

N° d'ordre : 2437

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE BORDEAUX I

Par Olivier GEFFARD

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : ECOTOXICOLOGIE

***TOXICITE POTENTIELLE DES SEDIMENTS MARINS ET ESTUARIENS
CONTAMINES : EVALUATION CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE,
BIODISPONIBILITE DES CONTAMINANTS SEDIMENTAIRES***

Soutenue le : 21 décembre 2001

Après avis de :

Mme P. VASSEUR, Professeur, Université de Metz
Mme J. PELLERIN, Professeur, Université du Québec

Rapporteurs

Devant la commission d'examen formée de :

Mme P. VASSEUR, Professeur, Université de Metz
Mme J. PELLERIN, Professeur, Université du Québec
Mme H. BUDZINSKI, Chargée de Recherches, Université de Bordeaux I
Mme C. AMIARD-TRIQUET, Directrice de Recherches, Université de Nantes
M A. BOUDOU, Professeur, Université Bordeaux I
M B. BARNOUIN, Directeur DEL, IFREMER Brest
M E. HIS, Directeur de Recherches, IFREMER Arcachon
M P. GARRIGUES, Directeur de Recherches, Université de Bordeaux I

Rapporteur

Président

Je dédie cette thèse à ma femme Karen.
Je te remercie pour ton soutien et ta confiance
sans toi, ce travail n'aurait pas pu voir le jour.

Je profite de ces avant-propos pour remercier toutes les personnes qui sont intervenues de façon plus ou moins importante dans ce travail.

Je tiens tout d'abord à remercier le Dr Philippe. Garrigues d'avoir accepté d'être le directeur de cette thèse, ainsi que la direction d'IFREMER, en particulier Monsieur Bruno Barnouin et la région Aquitaine pour leur financement, sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir.

Je suis très reconnaissant à Paule Vasseur Professeur à l'université de Metz et à Jocelyne Pellerin Professeur à l'université du Québec, pour avoir accepté de juger ce travail et de venir à Bordeaux pour participer au jury de thèse. Etant donné leur grande expérience et connaissance en toxicologie de l'environnement, leur examen critique de ce travail m'a fait honneur. Je remercie également Madame Claude Amiard-Triquet et Monsieur Alain Boudou pour leur participation au jury de thèse. J'en profite pour exprimer toute ma gratitude à Madame et Messieurs Amiard pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire à plusieurs reprises, mais aussi pour nous avoir permis, mon frère Alain et moi, de travailler ensemble et notamment de coupler l'utilisation d'un bio marqueur et d'un bio-essai.

Je tiens particulièrement à remercier Hélène Budzinski et Edouard His, leur encadrement m'a apporté de nombreux enseignements aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Je te remercie Hélène pour avoir cru aux tests embryo-larvaire dès le départ de ma thèse et pour ta confiance. Je te suis très reconnaissant pour ton accueil au sein de ton groupe et pour la grande liberté que tu m'as donné dans mon travail. Ces années passées dans ton laboratoire ont été une grande chance, donnant une pluridisciplinarité passionnante à mon travail. Je tiens également à te remercier pour ton écoute et tes nombreux conseils qui m'ont permis, entre autres, de me donner la confiance nécessaire pour les présentations orales et la rédaction des publications.

Je remercie Monsieur Edouard His de m'avoir accueilli dans son laboratoire il y a cinq ans pour mon DEA et de m'avoir transmis sa passion pour l'écotoxicologie et plus particulièrement pour les bio-essais chez les bivalves. Je tiens également à vous remercier pour la confiance et pour la grande liberté que vous m'avez accordé dans mes recherches, ainsi que votre aide pour la rédaction des publications présentes dans ce travail. Je vous

promets d'être moins « bordellique » dans l'avenir. Nos voyages dans le sud de la France et nos repas à « Menjoy » resteront pour moi de très bons souvenirs.

Merci Hélène et Edouard de m'avoir permis de découvrir la recherche scientifique et de réaliser ce travail pluridisciplinaire.

Bien sûr, je remercie tout particulièrement mon frère Alain pour tous les échanges et les bons moments que nous avons eu au cours de ces trois années. Cette expérience a été merveilleuse pour moi et j'espère que l'on pourra continuer de travailler ensemble, car c'est un grand plaisir. Notre complicité nous a permis, je crois, de faire des choses intéressantes.

Je tiens à remercier toutes les personnes qui, à divers titres, ont contribué à la réalisation de ce travail :

- Tout d'abord un grand merci à Karyn Lemenach qui a consacré beaucoup de son temps pour m'apprendre les techniques de dosages. Je te remercie pour ta patiente, ta disponibilité et ta sympathie.

- à Christophe Ledu d'IFREMER La Tremblade pour sa sympathie et pour avoir accepté à de nombreuses reprises de nous maturer des huîtres.

- à Alexandra Coynel et Henri Etcheber de l'université de Bordeaux1, pour les analyses de carbone organique et la collaboration sympathique que nous avons eu.

- à Jean François Chiffolleau d'IFREMER Nantes et à Sylvie Augagneur de l'université de Bordeaux 1, pour m'avoir permis de faire des dosages de métaux dans leur laboratoire.

- à Monsieur Mariette et Ropital du port autonome de Dunkerque pour avoir accepté avec gentillesse et à plusieurs reprises de faire des échantillonnages de boues portuaires.

- à Florence d'Amico d'IFREMER Arcachon pour les dosages d'ammoniac

- à Monsieur Claude Pellier, Directeur de la station d'IFREMER Arcachon, pour son accueil et pour m'avoir laissé libre accès à tout le matériel de la station.

Je remercie toutes les personnes du LPTC et d'IFREMER qui ont toujours accepté avec beaucoup de sympathie de m'aider ou de me donner des conseils. Pascal, Jacqueline, Laurent, Gill, Florence, Isabelle, Cécile, Danièle, Marie-Pierre, Nadine, Christian.

Je remercie également tous mes amis et en particulier Marie et Stéphane.

Je ne peux finir ces remerciements sans dire merci à ma famille : mes grands parents, Marthe et Edmond, mon père Abel, Nicole, ma belle-mère Michèle, Michel, mes frères et sœurs et leurs enfants Bruno, Dolores, Elisabeth, Samuel, Elia, Marie-christine, Richard, Julie, Marine et Alain, mon beau-frère Benjamin et mes belles-sœurs, Mélanie, Caroline et leur ami Armelle, Anthony, Karine. Je ne trouve pas de mots pour définir ce que je ressens pour vous si ce n'est que je suis très heureux lorsqu'on est ensemble.

J'ai une pensée toute particulière pour toi maman qui malgré ton absence me donne tous les jours la force et le courage de prendre la vie du bon côté, d'être le plus cool possible et de toujours voir la réalité de façon positive.

SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale.....	1
Chapitre I : Synthèse bibliographique.....	7
1 - Sédiments et contaminants.....	8
1 - Sédiments.....	9
1 - Origine.....	9
2 - Granulométrie.....	9
3 - Composition.....	10
2 - Contaminants sédimentaires.....	10
1 - Métaux : sources, caractéristiques et répartition.....	10
2 - HAP : sources, caractéristiques et répartition.....	14
3 - Mobilité et biodisponibilité des contaminants dans un sédiment.....	17
1 - Mobilité des métaux : <i>salinité, pH, potentiel redox, carbone organique</i>	17
2 - Mobilité des HAP : <i>granulométrie et carbone organique</i>	19
3 - Cas particulier des sédiments remis en suspension.....	20
4 - Biodisponibilité et toxicité des contaminants sédimentaires : modèles développés.....	21
1 - <i>Modèles développés pour les métaux</i>	22
2 - <i>Modèle développé pour les HAP</i>	24
2 - Evaluation de la qualité des sédiments.....	25
1 - Les différents outils.....	26
1 - Analyse chimique.....	26
2 - Etudes écologiques, biologiques et biochimiques.....	27
3 - Bioessais.....	30
4 - Approches intégrées.....	31
2 - Tests biologiques ou bioessais.....	33
1 - Problèmes rencontrés : <i>prélèvement, stockage, choix de l'organisme</i>	33

2 - Bioessais en laboratoire : <i>sédiment contact, eau interstitielle, éluatriat</i>	37
3 - Bioessais <i>in situ</i>	46
3 - Espèce choisie dans cette étude : <i>Crassostrea gigas</i>	46
1 - Gamétogenèse et ponte.....	47
2 - Développement embryonnaire, larvaire et fixation.....	47
3 - Sensibilité des embryons de <i>C. gigas</i>	51
But des travaux	54
Chapitre II : Matériels et méthodes	55
1 - Sédiments	56
1 - Prélèvement et stockage.....	56
2 - Traitements sédimentaires.....	56
2 - Bioessais	59
1 - Frai et fertilisation.....	59
1 - <u>Paracentrotus lividus</u>	59
2 - <u>Crassostrea gigas</u>	60
3 - <u>Mytilus galloprovincialis</u>	61
2 - Test de spermioxicité.....	61
3 - Test d'embryotoxicité.....	61
1 - Test au laboratoire.....	61
2 - Test <u>in situ</u>	66
4 - Test de bioaccumulation et étude de la métallothionéine.....	68
5 - Test de croissance larvaire.....	68
1 - Culture algale.....	68
2 - Elevages larvaires.....	69
6 - Test sur la métamorphose de <i>C. gigas</i>	70
3 - Caractérisation des sédiments et des éluatriats	71
1 - Teneur en eau, en matière organique, en carbone organique et granulométrie des sédiments.....	71
2 - Teneur en matière en suspension, carbone organique particulaire et dissous et ammoniac des éluatriats.....	71

4 - Prétraitements des échantillons pour les analyses chimiques et biochimiques.....	73
1 - Précautions de manipulations.....	73
2 - Métaux dans les sédiments, les éluviats, les algues et les larves.....	73
3 - HAP dans les sédiments, les éluviats, les algues et les larves.....	75
5 - Méthodes d'analyses.....	77
1 - Métaux dans les sédiments, les éluviats, les algues et les larves.....	77
2 - HAP dans les sédiments, les éluviats, les algues et les larves.....	78
3 - Métallothionéine dans les larves.....	80
Chapitre III : Synthèse.....	81
1 - Choix de l'organisme test.....	82
2 - Utilisation des embryons de <i>C. gigas</i> pour évaluer la qualité des sédiments et choix des sédiments modèles.....	86
3 - Impact du mode et de la durée de la conservation des sédiments sur leur toxicité.....	89
4 - Etude de la biodisponibilité des HAP et des métaux sédimentaires.....	91
5 - Test embryo-larvaire <i>in situ</i> chez <i>C. gigas</i> et <i>M. galloprovincialis</i>.....	100
Chapitre IV : Choix de l'organisme test.....	102
<u>Publication n°1</u> : E. His, I. Heyvang, O. Geffard, X. de Montaudouin. A Comparison between oyster (<i>Crassostrea gigas</i>) and sea urchin (<i>Paracentrotus lividus</i>) larval bioassays for toxicological studies. (<i>Wat Res</i> 33(7):1706-1718).....	103
<u>Note n°1</u> : Toxicité du Phénanthrène (Phe), 2-Méthyl-phénanthrène et Benzo(a)pyrène sur l'embryogenèse et le développement larvaire de l'oursin <i>Paracentrotus lividus</i> et de l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	117
<u>Publication n°2</u> : O. Geffard, H. Budzinski, S. Augagneur, MNL. Seaman, E. His. Assessment of sediment contamination by spermioxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (<i>Paracentrotus lividus</i>) and oysters (<i>Crassostrea gigas</i>) (<i>Environ Toxicol Chem</i> 16:2190-2199).....	123

<u>Publication n°3</u> : E. His, H. Budzinski, O. Geffard, R. Beiras. Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître Japonaise, <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg) (<i>C R Acad Sci Paris</i> 320:797-803).....	131
Chapitre V : Evaluation de la qualité des sédiments et choix de sédiments modèles.....	139
<u>Publication n°4</u> : O. Geffard, H. Budzinski, E. His, MNL. Seaman, P. Garrigues. Relationships Between Contaminant Levels in Marine Sediments and their Biological Effects upon Embryos of Oysters, <i>Crassostrea gigas</i> (soumise à <i>Environ Toxicol Chem</i>).....	140
<u>Note n°2</u> : Etude du mode d'action du sédiment contact vis à vis des embryons de <i>Crassostrea gigas</i> au cours du test d'embryotoxicité.....	161
Chapitre VI : Choix du mode de conservation des sédiments.....	166
<u>Publication n°5</u> : O. Geffard, E. His, H. Budzinski, JF. Chiffolleau, A. Coynel, H. Etcheber. Effects of Storage Method and Duration on the Toxicity of Marine Sediments to embryos of oysters <i>Crassostrea gigas</i> . (soumise à <i>Mar Pollut Bull</i>).....	167
<u>Publication n°6</u> : O. Geffard, A. Geffard, H. Budzinski, C. Crouzet, R. Menasria, C. Amiard-Triquet. Bioavailability and Toxicity of Sediment-Bound Chemicals in a Tidal Estuary. (soumise à <i>Estuaries</i>).....	187
Chapitre VII : Biodisponibilité des HAP et métaux sédimentaires.....	213
<u>Publication n°7</u> : O. Geffard, A. Geffard, E. His, H. Budzinski. Bioavailability and Toxicity of Sediment-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Metals to <i>Crassostrea gigas</i> Embryos and Larvae. (soumise à <i>Mar Pollut Bull</i>).....	214

<u>Publication n°8</u> : O. Geffard, H. Budzinski, E. His. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of the pollutants from sedimentary origin. (soumise à <i>Ecotoxicology</i>).....	236
<u>Publication n°9</u> : A. Geffard, O. Geffard, E. His, JC. Amiard. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of <i>Mytilus galloprovincialis</i> exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. (acceptée dans <i>Marine Ecology-Progress Series</i>).....	262
<u>Publication n° 10</u> : O. Geffard, A. Geffard, E. His, JC. Amiard. Responses of <i>Crassostrea gigas</i> larvae exposed to elutriate from a metal-rich sediment : growth, metals bioaccumulation and induction of metallothionein. (soumise à <i>Environ Toxicol Chem</i>).....	290
Chapitre VIII : Test embryo-larvaire <i>in situ</i>	307
<u>Publication n°11</u> : O. Geffard, E. His, H. Budzinski, MNL. Seaman, P. Garrigues. Qualité biologique de l'eau de mer évaluée <i>in situ</i> par le test embryo-larvaire de <i>Crassostrea gigas</i> et <i>Mytilus galloprovincialis</i> (publiée dans les Comptes Rendus de <i>l'Académie des Sciences de Paris</i> 324:1149-1155).....	308
Conclusion et perspectives	324
Références bibliographiques	331
Annexe	350

Liste des abréviations

An	:	Anthracène
ADN	:	Acide DésoxyriboNucléique
AET	:	Apparent Effect Threshold
ARN	:	Acide RiboNucléique
AVS	:	Acid-Volatile Sulfide
BaA	:	Benz(a)Anthracène
BaP	:	Benzo(a)Pyrène
BbF	:	Benzo(b)Fluoranthène
BeP	:	Benzo(e)Pyrène
BjF	:	Benzo(j)Fluoranthène
BkF	:	Benzo(k)Fluoranthène
BP	:	Benzo(g,h,i)Pérylène
Cd	:	Cadmium
Chrys	:	Chrysène
LCx	:	Letal Concentration, x étant le pourcentage de la population affectée
COC	:	Carbone Organique Colloïdal
COD	:	Carbone Organique Dissous
COP	:	Carbone Organique Particulaire
Cu	:	Cuivre
D(ac)A	:	Dibenz(a,c)Anthracène
D(ah)A	:	Dibenz(a,h)Anthracène
DMSO	:	DiMéthyl-SulfOxyde
ECx	:	Effective Concentration, x étant le pourcentage de la population affectée
EMF	:	Eau de Mer Filtrée
ER-L	:	Effects Range-Low
ER-M	:	Effects Range-Medium
Fluo	:	Fluoranthène
GEODE	:	Groupement d'Etudes et d'Observations des activités de Dragage sur l'Environnement
HAP	:	Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
IP	:	Indéno(1,2,3-c,d)Pyrène
IWCTU	:	Interstitial Water Criteria Toxicity Unit
NOEC	:	No Observed Effect Concentration
Pb	:	Plomb
PEL	:	Probable Effect Level
Per	:	Pérylène

PCB	:	PolyChloro-Biphényles
Phe	:	Phénanthrène
Pyr	:	Pyrène
Q-ERL	:	Quotient Effects Range Low
Q-ERM	:	Quotient Effects Range Medium
SEM	:	Simultaneously Extracted Metals
TEL	:	Threshold Effect Level
Triph	:	Triphénylène
UV	:	Ultra Violet
WQC	:	Water Quality Criteria
Zn	:	Zinc

Liste des figures

Chapitre I

Figure I-1 : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).....	15
Figure I-2 : Schéma de la fixation chez <i>Crassostrea gigas</i> (passage de la vie larvaire pélagique à la phase adulte benthique par la métamorphose). 1, 2 et 3 : choix du support avec rôle des organes sensoriels (tâche oculaire en particulier). 4 et 5 : sécrétion du ciment de fixation par le pied et passage au stage plantigrade (Weiner <i>et al.</i> , 1989).....	51

Chapitre II

Figure II-1 : Sites des différents sédiments prélevés et utilisés dans cette étude.....	57
Figure II-2 : Comparaison des réponses obtenues en récipients expérimentaux de 30 ml et en puits de 3ml, au cours d'un test d'embryotoxicité chez <i>Crassostrea gigas</i> (A) et <i>Paracentrotus lividus</i> (B), en présence du surnageant d'une vase de l'estuaire de la Gironde. Résultats exprimés en pourcentages d'anomalies larvaires, avec intervalle de confiance au seuil de 95%.....	63
Figure II-3 : Les différentes anomalies embryonnaires et larvaires chez <i>Crassostrea gigas</i> . a : développements retardés, b : développement normal, c : charnière concave, d : échancrure à la commissure des valves, e : une valve est anormalement développée, f : le velum ne se rétracte pas totalement quand la larve est fermée.(d'après His <i>et al.</i> , 1997b).....	65
Figure II-4 : Les différentes anomalies embryonnaires et larvaires chez <i>Paracentrotus lividus</i> (d'après Klöckner <i>et al.</i> , 1985). a : développements retardés, b : développement normal, c : longueur inégale des baguettes somatiques, d : baguette antéro-latérale tordue, e : une baguette somatique plus courte, f : dédoublement d'une baguette somatique, g : surnombre des baguettes somatiques et h : chevauchement des baguettes somatiques.....	65
Figure II-5 : Chambre utilisée pour le test embryo-larvaire <i>in situ</i>	66

Chapitre III

Figure III-1 : Pourcentages d'anomalies larvaires (\pm E.T.) chez <i>Paracentrotus lividus</i> et <i>Crassostrea gigas</i> en fonction du pourcentage de la solution saturée de Phe, 2MP ou B(a)P.....	83
Figure III-2 : Résultats de l'analyse en composantes principales montrant les relations entre les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques des sédiments pour le test sédiment contact. * : les facteurs sont significativement corrélés.....	87
Figure III-3 : Concentrations relatives (%) des composés tetra, penta et hexa-aromatiques chez des larves de <i>Crassostrea gigas</i> de 24 h obtenus à la suite d'embryons exposés au sédiment contact d'Arès (A), à l'élutriat non	

filtré d'Arès (B) et chez des larves de 9 jours contaminées directement par l'éluatriat non filtré d'Arès (C) ou nourries à l'aide d'algues <i>I.galbana</i> contaminées par l'éluatriat filtré d'Arès (D).....	95
Figure III-4 : Teneurs ($\mu\text{g/g} \pm \text{E.T}$, poids frais) en Cd (A), Cu (B) et Zn (C) dans les larves de <i>C. gigas</i> , suite à l'exposition d'embryons à différentes concentrations de sédiment contact (histogrammes noirs) et d'éluatriat (histogrammes blancs), obtenues à l'aide du sédiment de la Bidassoa. Les valeurs qui ne sont pas significativement différentes sont regroupées sous une même barre (ANOVA, $p < 0,05$; test de Tukey).....	97
Figure III-5 : Teneurs totales ($\mu\text{g/g} \pm \text{ET}$, poids frais) de Cd (A), Cu (B), Zn (C) et Pb (D) chez les larves de <i>C. gigas</i> élevées pendant 10 jours en présence de différentes concentrations de l'éluatriat de la Bidassoa (histogrammes noirs) et de Dunkerque (histogrammes blancs).....	97
Figure III-6 : Relations entre les concentrations en métaux cytosoliques (pris individuellement ou ensemble) et les teneurs en MT chez les larves de <i>Crassostrea gigas</i> exposées pendant 10 jours à différentes concentrations de l'éluatriat de la Bidassoa (15 échantillons, 3 répliquats pour 5 concentrations testées). * : corrélation significative au niveau de sécurité de 95 % ; ** : corrélation significative au niveau de sécurité de 99%. A : Cd ; B : Cu ; C : Zn et D : Cd+Cu+Zn.....	98
Figure III-7 : Pourcentages d'anomalies larvaires obtenus chez <i>C. gigas</i> (été 2000) lors des tests d'embryotoxicité <i>in situ</i> . A, B, C et D correspondent aux différents points d'observation.....	101

Chapitre IV

Publication n°1

Figure 1 : The different abnormalities observed in <i>Crassostrea gigas</i> D larve (A) and <i>Paracentrotus lividus</i> plutei (B) according to His <i>et al.</i> (1997) and Klöchner <i>et al.</i> (1985), respectively.(A) (a) unsegmented eggs, normal or abnormal blastula, gastrula and trochophore, (b) normal larva, (c) convex hinge, (d) indented shell margin, (e) incomplete shell, (f) protruded mantle. (B) (a) various deformed or retarded developmental stages from egg to two-armed echinopluteus, (b) normal echinopluteus, (c) unequal length of postoral arms, (d) twisted right oral rod, (e) parts of right body rod missing, (f) left body rod doubled, (g) additional crossbarred body rod, (h) apically "crossed" body rod.....	106
Figure 2 : Percentages of abnormal <i>Paracentrotus lividus</i> larval development (\pm 95% confidence limits) in relation to salinity.....	107
Figure 3 : Percentages of abnormal <i>Paracentrotus lividus</i> (black dots) and <i>Crassostrea gigas</i> (white dots) larval development (\pm 95% confidence limits) in relation to different concentrations of heavy metals. (A) TBT ; (B) HgCl_2 , (C) CuSO_4 , (D) Pb-acetate.....	108
Figure 4 : Percentages of abnormal <i>Paracentrotus lividus</i> (black dots) and <i>Crassostrea gigas</i> (white dots) larval development (\pm 95% confidence limits) in relation to different concentrations of pesticides. (A) mercaptodimethur, (B) glyphosate, (C) dinoterbe.....	111
Figure 5 : Percentages of abnormal <i>Paracentrotus lividus</i> (black dots) and <i>Crassostrea gigas</i> (white dots) larval development (\pm 95% confidence limits) in relation to different concentrations of sediment. (A) La fosse sediment, (B) La Rochelle sediment.....	113

Note n°1

Figure IV-1 : Pourcentages d'anomalies larvaires (\pm E.T.) chez *Paracentrotus lividus* et *Crassostrea gigas* en fonction du pourcentage de solution saturée de Phe, 2MP ou B(a)P..... 121

Figure IV-2 : Effets de synergie pour le Phe avec 25 % de B(a)P ou de 2MP (A) et pour le B(a)p et le 2MP avec 25% de Phe (B) sur les pourcentages d'anomalies larvaires chez *C. gigas*..... 121

Publication n°2

Figure 1 : Spermioxicité of whole sediment (top), unfiltered elutriates (center), and filtered elutriate (bottom) to sea urchins (*P.lividus* ; Δ : Arès, O : Bidassoa) and oysters (*C.gigas* ; \blacktriangle :Arès, \bullet Bidassoa). Percentage of fertilized eggs (\pm 95% confidence intervals)..... 127

Figure2 : Embryotoxicité of decanted whole sediment (top), unfiltered elutriates (center), and filtered elutriates (bottom) to sea urchins (*P.lividus* ; Δ :Arès, O Bidassoa) and oysters (*C.gigas* ; \blacktriangle :Arès, \bullet Bidassoa). Percentage of normal larvae (\pm 95% confidence intervals)..... 128

Publication n°3

Figure 1 : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans le sédiment d'Arès..... 134

Chapitre V**Publication n°4**

Figure 1 : Atlantic coast of France. Sampling stations..... 155

Figure 2 : Results of principal components analysis for fresh and freeze-dried sediments.*factors are significantly correlated..... 156

Figure 3 : Relationship between biological effects (EC20) and the percentages, for each sediment, of contaminants that have concentrations levels higher than ERL..... 156

Note n°2

Figure V-1 : Pourcentages d'anomalies larvaires observés chez les larves de *Crassostrea gigas*, après l'exposition d'œufs fécondés pendant les 7 premières heures (histogrammes noirs) ou la totalité (histogrammes blancs) de leur développement embryonnaire, en présence de différentes concentrations de sédiments contacts lyophilisés d'Arès, de la Bidassoa ou de Dunkerque..... 164

Chapitre VI

Publication n°5

Figure 1 : Concentrations of ammonia (NH ₄ ; μmol/l) in elutriates obtained from Arès, Bidassoa and Dunkerque sediments (fresh, frozen and freeze-dried), after a storage period from 10 to 120 days.....	182
Figure 2 : Concentrations of PAHs (total of 16 compounds ; ng/l) in the unfiltered and filtered elutriates obtained from Arès, Bidassoa and Dunkerque sediments (fresh, frozen and freeze-dried), after a storage period from 10 to 120 days.....	182
Figure 3 : Concentrations of metals (Cd, Cu and Zn μg/l) in the unfiltered elutriates obtained from Arès, Bidassoa and Dunkerque sediments (fresh, frozen and freeze-dried), after a storage period from 10 to 120 days...	183
Figure 4 : Toxicity (EC ₁₀ ± SD) of the sediments (A) and of the elutriates (B) for the various storage modes and durations. * : indicate significant variation of toxicity as compared with the toxicity at the beginning of the study (10 days of preservation).....	184

Publication n°6

Figure 1 : Relative importance of different aromatic compounds in sediments originating from the Gironde estuary (mean for 8 monthly samples and standard deviation). PHE : phenanthrene ; AN : anthracene ; 3MP : 3-methylphenanthrene ; 2MP : 2-methylphenanthrene ; 2MA : 2-methylanthracene ; 9MP+1MA : 9-methylphenanthrene + 1-methylanthracene ; 1MP : 1- methylphenanthrene ; FLUO : fluoranthene ; PYR : pyrene ; BAA : benz(a)anthracene ; TRIPH+CHRYS : triphenylene + chrysene ; BBF + BKF + BJF : benzo(b)fluoranthene + benzo(k)fluoranthene + benzo(j)fluoranthene ; BEP : benzo(e)pyrene ; BAP : benzo(a)pyrene ; PER : perylene ; IP : indeno(1,2,3-cd)pyrene ; DAA+DAC : dibenz(ah)anthracene + dibenz(ac)anthracene ; BP : benzo(ghi)perylene.....	204
Figure 2 : Temporal changes of aromatic contaminant levels in sediments from the Gironde estuary. Concentrations expressed in relation to the dry weight of sediments. A, all aromatic compounds without perylene were considered. B, only perylene was considered.....	205
Figure 3 : Temporal changes of cadmium, copper and zinc levels in sediments from the Gironde estuary. Concentrations expressed in relation to the dry weight of sediments.....	206
Figure 4 : Mean mortality percentages (shown with standard deviations) in <i>Tigriopus brevicornis</i> exposed to leachates from sediment samples collected monthly in the Gironde estuary.....	207
Figure 5 : <i>Crassostrea gigas</i> .- Temporal changes in the mean percentages of abnormal larvae after exposure to different concentrations of total sediment (0, 0.5, 1, 2.5 g.L ⁻¹ : A) and sediment elutriate (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100% : B). The size of symbols increases with increasing concentrations.....	208

Figure 6 : <i>Paracentrotus lividus</i> .- Temporal changes in the mean percentages of abnormal larvae after exposure to different concentrations of total sediment (0, 0.5, 1, 2.5 g.L ⁻¹ : A) and sediment elutriate (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100% : B). The size of symbols increases with increasing concentrations.....	209
---	-----

Chapitre VII

Publication n°7

Figure 1 : Whole sediment (A) and elutriate sediment (B) <i>Crassostrea gigas</i> embryotoxicity. Percentages of abnormal larvae (\pm 95% confidence intervals). ● : Arès sediment ; O : Bidassoa sediment. * : abnormal larvae (%) significantly higher than in controls.....	230
Figure 2 : Concentrations of totals PAHs in <i>C.gigas</i> larvae (ng/g dry weight) after exposure to a range of Arès whole sediment (black bars) and elutriate (white bars) concentrations.....	230
Figure 3 : Relative contents (%) of tetra, penta and hexa-aromatic compounds in the different Arès sediment treatments and larvae. A : In Arès sediment and its unfiltered and filtered elutriates. B : In Arès sediment and larvae exposed to it. C : In Arès unfiltered and filtered elutriates and in larvae exposed to unfiltered elutriate.....	231
Figure 4 : Total Cd (A), Cu (B), Zn (C) concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight \pm SD) and cytosolic Cd (D), Cu (E) and Zn (F) concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight \pm SD) in oyster larvae after exposure to a range of Bidassoa whole sediment (black bars) and elutriate (white bars) concentrations. Values not significantly different one from other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey test).....	232
Figure 5 : Metallothionein contents ($\mu\text{g/g}$ dry weight \pm SD) in the oyster larvae reared in the presence of a range of Bidassoa whole sediment (black bars) and elutriate (white bars) concentrations. Values not significantly different one from other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey test).....	233

Publication n°8

Figure 1 : <i>Crassostrea gigas</i> height ($\mu\text{m} \pm$ S.D.) increase in larvae reared in the presence of different Arès (A), Bidassoa (B) and Dunkerque (C) elutriate concentrations and in larvae fed on <i>I. galbana</i> grown in the presence of different concentrations of the same Arès (D), Bidassoa (E) and Dunkerque (F) elutriates.....	255
Figure 2 : Total PAH contents of <i>Isochrysis galbana</i> (A ; ng g ⁻¹ dry weight) grown in the presence of Arès filtered elutriate and of larvae reared in the presence of unfiltered Arès elutriate and of larvae fed on contaminated algae (B ; ng g ⁻¹ dry weight) during 9 days.....	256
Figure 3 : Relative contents (%) of tetra, penta and hexa-aromatic compounds in the different sediment treatments, in algae and in larvae : A : in Arès sediment, in the unfiltered and filtered elutriates and in <i>I.galbana</i> ; B : in larvae reared in the presence of Arès unfiltered elutriate, in unfiltered and filtered elutriates. C : in larvae fed on contaminated <i>I. galbana</i> and in the algae. D : in larvae reared in the presence of Arès elutriate and in larvae fed on contaminated algae.....	257

Figure 4 : Total Cd (A), Cu (B), Zn (C) and Pb (D) contents ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight \pm SD) of *C. gigas* larvae after an exposure to a range of Bidassoa (white bars) and Dunkerque (black bars) unfiltered elutriates..... 258

Publication n°9

Figure 1 : Height ($\mu\text{m} \pm$ SD) of *Mytilus galloprovincialis* larvae after exposure to a range of sediment elutriate percentages during 48 h (A) and 96 h (B). Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120.000 and 20.000 larvae at 48 and 96 h respectively..... 280

Figure 2 : Dry weight per larvae ($\mu\text{g} \pm$ SD) after exposure of 48 h (A) and 96 h (B) to a range of sediment elutriate concentrations. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120.000 and 20.000 larvae at 48 and 96 h respectively..... 281

Figure 3 : Condition index (\pm SD) of *Mytilus galloprovincialis* larvae after exposure to a range of sediment elutriate percentages during 48 h (A) and 96 h (B). Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120.000 and 20.000 larvae at 48 and 96 h respectively..... 282

Figure 4 : Total metal (S1+P1 ; Mean \pm SD) concentrations (Cd, A ; Cu, B ; Zn, C) in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 h (black bars) and 96 h (white bars) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120.000 and 20.000 larvae at 48 and 96 h respectively..... 283

Figure 5 : Cytosolic metal (S1; Mean \pm SD) concentrations (Cd, A ; Cu, B ; Zn, C) in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 (black bars) and 96 h (white bars) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120.000 and 20.000 larvae at 48 h and 96 h respectively..... 284

Figure 6 : Relationships between total and cytosolic (S1 ; dotted lines) or insoluble (P1 ; continuous lines) Cd in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 (A) or 96 h (B) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Equations and correlation coefficients were determined for each fraction. Each replicate containing about 120.000 and 20.000 larvae at 48 and 96 h respectively..... 285

Figure 7 : Relationships between total and cytosolic (S1 ; dotted lines) or insoluble (P1 ; continuous lines) Zn in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 (A) or 96 h (B) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Equations and correlation coefficients were determined for each fraction. Each replicate containing about 120.000 and 20.000 larvae at 48 and 96 h respectively..... 286

Figure 8 : Metallothionein concentrations (Means \pm SD) in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 h (black bars) or 96 h (white bars) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120.000 and 20.000 larvae at 48 and 96 h respectively..... 287

Publication n°10

Figure 1 : Height (mean \pm SD) of larvae exposed for ten days to different elutriate concentrations expressed according to the sediment concentration (see Materials and Methods).....	303
Figure 2 : Methallothionein concentrations (mean \pm SD, three replications) in larvae after ten days of exposure to different elutriate concentrations. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Scheffé's test).....	303
Figure 3 : Total metal concentrations (mean \pm SD, three replications) in larvae after ten days of exposure to different elutriate concentrations. A, Cd ; B, Cu and C, Zn. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Scheffé's test).....	304
Figure 4 : Cytosolic metal concentrations (mean \pm SD) in larvae after ten days of exposure to different elutriate concentrations. A, Cd ; B, Cu and C, Zn. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Scheffé's test).....	304
Figure 5 : Relationships between cytosolic metal (individual or total) and MT concentrations in whole larva categories (n= 15). Significant correlations are indicated with an asterisk (* at 95 % level and ** at 99% level). A : Cd ; B : Cu ; C : Zn and D : Cd + Cu+ Zn.....	305

Chapitre VIII

Figure 1 : Le port de plaisance d'Arcachon, avec les points d'observation, dans le port lui même (A, B et C) et dans le chenal d'Arams (D).....	321
Figure 2 : Présentation des chambres d'exposition <i>in situ</i>	322
Figure 3 : Pourcentages d'anomalies larvaires obtenus chez <i>M. galloprovincialis</i> (I, 10/01/99) et <i>C. gigas</i> (II, été 2000) lors des tests d'embryotoxicité <i>in situ</i> . A, B , C et D correspondent aux différents points d'observation (voir figure 1).....	323

Conclusion et perspectives

Figure 1 : Démarche pour l'évaluation de la qualité des sédiments marins, côtiers, estuariens lors d'études de biomonitoring.....	328
--	-----

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau I-1 : Principales sources des métaux étudiés dans le présent travail (d'après Förstner, 1987 ; Michel, 1993a dans Ettajani, 1994).....	11
Tableau I-2 : Classification des métaux et des métalloïdes en fonction de leur toxicité et de leur disponibilité (Wood, 1974 dans Förstner et Wittmann, 1979).....	12
Tableau I-3 : Valeurs de quelques indices moléculaires caractérisant l'origine des HAP (d'après Thompson, 1999).....	16
Tableau I-4 : Valeurs de références du niveau de contamination des sédiments proposées par GEODE (Lamy Environnement, 1996).....	27
Tableau I-5 : Espèces les plus utilisées et les différents types d'exposition dans les tests de toxicité sur les sédiments marins et estuariens, classés selon leur fréquence d'utilisation.....	39

Chapitre II

Tableau II-1 : Dates et coefficient de marée des jours de prélèvement des sédiments.....	58
Tableau II-2 : Résultats des tests d'embryotoxicité chez <i>C. gigas</i> et <i>P. lividus</i> réalisés à l'aide du toxique de référence (CuSO ₄ , 2H ₂ O) au cours de cette étude. EC50 exprimées en µg de Cu/l. E.T : écart type en µg/l; C.V. :coefficient de variation en %.....	64
Tableau II-3 : Unités d'expression de l'azote ammoniacal (d'après Aminot et Chaussepied, 1983).....	72
Tableau II-4 : HAP étudiés et HAP deutérés correspondants.....	76
Tableau II-5 : Résultats du contrôle de qualité du protocole d'extraction métallique. Concentrations exprimées en µg/g de poids sec (± E.T.). Ces résultats ont été obtenus pour 10 répliquats réalisés au cours de cette étude.....	77
Tableau II-6 : Résultats du contrôle de qualité du protocole d'extraction métallique sur une eau. Résultats exprimés en concentration (± E.T.). Ces résultats ont été obtenus à l'aide de 6 répliquats réalisés au cours de cette étude.....	78
Tableau II-7 : Valeurs certifiées en ng/g des HAP dans le sédiment certifié SRM 1941a et valeurs obtenues dans cette étude. Valeurs obtenues sur 4 répliquats.....	79
Tableau II-8 : Résultats du contrôle de qualité du protocole d'extraction des HAP en phase liquide. Résultats exprimés en µg/l (± E.T.). Ces résultats ont été obtenus à l'aide de trois répliquats.....	79
Tableau II-9 : Résultats du contrôle de la répétabilité du protocole d'extraction des HAP en phase liquide, à l'aide d'un éluatriat brut. Résultats exprimés en ng/l, avec l'écart type (E.T) et le coefficient de variation (C.V. en %)......	80

Chapitre III

Tableau III-1 : Contamination des sédiments et de leurs éluviats utilisés pour les études sur la biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Les composés pour lesquels il existe des seuils de qualité définis par Long <i>et al.</i> (1995 ; ER-L, ER-M) sont soulignés. * :>ER-L ; ** :>ER-M.	93
---	----

Chapitre IV

Publication n°1

Table 1 : Parameters of one-way ANOVAs testing the effects of different salinities (<i>P. lividus</i> only), pollutants and sediment concentrations on the percentage of abnormal development of <i>Paracentrotus lividus</i> larvae and <i>Crassostrea gigas</i>	107
Table 2 : EC50 (\pm confidence interval limits in parenthesis) in larval development of <i>Paracentrotus lividus</i> and <i>Crassostrea gigas</i> at different salinities (<i>P. lividus</i> only) and in the presence of the different pollutant tested. For TBT data, concerning the effect on <i>C. gigas</i> embryogenesis, see His (1996), table 12.3, p246.....	110

Publication n°2

Table 1 : Physical and chemical characteristics of Arès and Bidassoa sediments (PCB levels in Arès sediment after Pierard [43]).....	125
Table 2 : French Géode classification of sediment quality [42].....	125
Table 3 : Performance of the controls in bioassays with oysters (<i>C. gigas</i>) and sea urchins (<i>P. lividus</i>). Percentage of unfertilized eggs in spermotoxicity controls and abnormal larvae in embryotoxicity controls. Identical control values are given in cases where several bioassay series were conducted simultaneously.....	127
Table 4 : Toxicity of the different sediment treatments to spermatozoa and embryos of sea urchins (<i>P. lividus</i>) and oysters (<i>C. gigas</i>). Effective concentrations (EC20 and EC50) \pm 95% confidence intervals. In spermotoxicity assays with oysters, there was no effect at any of the sediment concentrations tested.....	128

Publication n°3

Tableau I : Concentrations (ng g ⁻¹ de sédiment) des différents composés aromatiques du sédiment d'Arès.....	134
Tableau II : Pourcentages de mortalités des pédivéligères de <i>Crassostrea gigas</i> exposées au sédiment d'Arès lyophilisé.....	135
Tableau III : Influence du sédiment d'Arès lyophilisé sur la métamorphose chez <i>Crassostrea gigas</i>	135

Chapitre V

Publication n°4

Table 1 : Performances of quality control	157
Table 2 : Physical and chemical characteristics of the tested sediments and elutriates. Silt = grain size fraction <63µm ; *= toxic concentrations of ammonia (>200 µmol ⁻¹)	158
Table 3 : Concentrations (in ng g ⁻¹ dry weight) of PAH and of heavy metals in the sediments tested. Compounds for wich Long et al, (1995) provide effect ranges are underlined ; * = value exceeds ER-L (Effect Range Low) ; ** = value exceeds ER-M (effect Range Medium). The last two lines give the concentration of individual PAH relative to the sum of the concentration of all the PAHs. The result is the mean and the coefficient of variation between sediments.....	159
Table 4 : Concentrations (in µg l ⁻¹) of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and heavy metals in the tested elutriates (n.d. = not determined).....	160
Table 5 : Toxicity (effective concentrations, EC20, in g l ⁻¹) of whole sediments and elutriates to oyster larvae (no tox.= no toxicity observed).	160

Chapitre VI

Publication n°5

Table 1 : Physical and chimical characteristics of the three studied sediments	185
Table 2 : Size (µm) of particles constituting the principal sediment fraction.....	185
Table 3 : size of particles (µm) constituting the principal fraction of the SPM in the different elutriates. One value : there was only one majority fraction (unimodal distribution) ; Two values : there is two majority fraction (bimodal distribution)	185
Table 4 : Concentrations of dissolved organic carbon (DOC ; mg/l) in the various elutriates	186

Publication n°6

Table 1 : Intercalibration exercise (Coquery et al. 2000) : determination of Cd, Cu and Zn in sediment (mean and confidence interval at 95%, mg.kg ⁻¹ dw)	210
Table 2 : Distribution and mobility of sediment-bound metals monthly samples collected in the Gironde estuary (le Cheyzin). Mean and standard deviations (between brackets).	210
Table 3 : NOEC (No observed Effect Concentration), LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) and EC50 (50% Effective Concentration) determined after exposure of oyster and sea-urchin larvae to total sediment or	

sediment elutriates. nd : not determined because the lowest concentration tested (0.5 g total sediment l ⁻¹) induced a significant effect compared to control.....	211
Table 4 : Pearson correlation coefficients values between toxicological and chemical factors in the Gironde estuary. Underlined values are significant at the 95 % level.....	212

Chapitre VII

Publication n°7

Table 1 : Concentrations of PAHs (in ascending order of molecular weight) in the sediments and elutriates obtained from Arès ; sediment concentrations of heavy metals in the tested sediments. Compounds for which Long et al. (1995) provide effect ranges are underlined ; * = value exceeds ER-L (Effect range-Low) ; ** = value exceeds ER-M (Effect Range- Medium).	234
Table 2 : Values of the BeP/BaP (benzo(e)pyrene concentration against benzo(a)pyrene concentration) in Arès sediment and unfiltered and filtered Arès elutriate and in larvae exposed to these sediment treatments (mean of the ratio for each tested concentration ± S.D.).....	235
Table 3 : Equation of the relation between cytosolic concentrations of Cd, Cu, Zn or Cd + Cu + Zn and MT in larvae after exposure to a range of whole sediment or elutriate concentrations of Bidassoa sediment. n : number of samples. r ² : correlation coefficient. * and ** show that the relation is significantly correlated at 95 and 99% respectively.	235

Publication n°8

Table 1 : PAH contents (in molecular weight ascending order) of Arès sediment, seawater (controls) and Arès unfiltered and filtered elutriates. Compounds for which Long <i>et al.</i> (1995) provided Effect Range values are underlined ; * = values exceeding ER-L (Effect Range-Low) ; ** = value exceeding ER-M values (Effects Range-Medium). Nd : no detected.....	259
Table 2 : Heavy metal contents of Bidassoa and Dunkerque sediments, seawater (controls) and unfiltered and filtered elutriates. Compounds for wich Long et al. (1995) provided effect range values are underlined ; * = value exceeding ER-L values(Effects Range-Low) ; ** = value exceeding ER-M values (Effects Range-Medium).....	260
Table 3 : Toxicity to <i>Crassostrea gigas</i> embryos of Arès, Bidassoa and Dunkerque sediment elutriates. Percentages of abnormal larvae (± S.D.). *= biological effects significantly higher than in controls.....	260
Table 4 : Relative contents of BeP/BaP in Arès sediment, and in Arès unfiltered and filtered elutriates and in contaminated <i>I. galbana</i> , in larvae reared in the presence of Arès unfiltered elutriate and in larvae fed on contaminated <i>I. galbana</i> (± S.D.).....	242

Publication n°9

Table 1 : Results of internal quality control (mean concentrations and standard deviations in mg kg ⁻¹ dry weight).....	288
Table 2 : Cadmium, copper and zinc concentrations in the sediment (µg g ⁻¹ dry weight ± SD), filtered sea water (µg l ⁻¹ , control used in the present study), and concentrations at various estuarine and marine locations. References : 1 : present study ; 2 : RNO 1984 ; 3 : Cossa and Lassus, 1989 ; 4 : Boutier <i>et al.</i> , 1989	288
Table 3 : Equations of the relation between cytosolic Cd, Cu, Zn or Cd + Cu + Zn and MT in larvae after exposure of 96 h to a range of sediment elutriate concentrations. n : number of samples (three for each elutriate concentration tested). r ² : correlation coefficient. ** shown that the relation is significantly correlated at 99 %....	289

Publication n°10

Table 1 : Cadmium, Copper and zinc concentrations in sediment (mg kg ⁻¹ dry weight ± S.D), filtered sea water (µg l ⁻¹ , control used in the present study), and raw elutriate (µg l ⁻¹ , ± S.D).....	306
Table 2 : Relationships between metal (individual or total) and MT concentrations in whole larva categories (n = 15). Significant correlations are indicated with an asterisk (* at 95% level and ** at 99% level).....	306

Introduction générale

Depuis le début du siècle, l'environnement (atmosphérique, terrestre et aquatique) a été soumis à la pression croissante des activités industrielles et humaines dont les effets se sont faits rapidement sentir.

Une substance d'origine anthropique rejetée dans le milieu est un **contaminant**, si elle exerce des effets défavorables sur le plan biologique, il s'agit alors d'un **polluant** (Moriarty, 1990) ou d'un **xénobiotique** (Butler & Lowe, 1978). Ce dernier terme désigne toute substance qui n'existe pas à l'état naturel et qui se caractérise par une forte toxicité à des faibles concentrations (Ramade, 1998). Les contaminants rejetés dans l'environnement finissent par se retrouver plus ou moins rapidement dans les milieux aquatiques, en particulier estuariens et côtiers, où ils peuvent avoir des effets à court et à long terme (Burton, 1992a).

L'**écotoxicologie** est la discipline qui évalue les effets des perturbations physiques et chimiques sur les êtres vivants, les voies de transfert des contaminants et leur action sur l'environnement (Truhaut, 1977). Elle regroupe des **études physico-chimiques**, permettant de décrire le milieu étudié et de définir son niveau de contamination, ainsi que des **études biologiques** afin de déterminer la qualité du milieu. L'écotoxicologie peut intervenir à différents **niveaux d'organisation biologique** : moléculaire, subcellulaire et cellulaire, tissulaire, de l'organisme, de la population et de l'écosystème.

Dans le milieu aquatique, une grande partie des composés d'origine anthropique ou naturelle s'adsorbent sur les particules en suspension, puis s'accumulent au niveau des sédiments. Ainsi, les dépôts sédimentaires, à l'interface des zones océaniques et continentales, constituent de véritables filtres et réservoirs pour les contaminants connus ou non et forment d'importantes sources de contamination. Les zones côtières sont des biotopes où de nombreuses espèces animales se reproduisent et méritent donc à ce titre d'être protégées. On s'aperçoit aujourd'hui que les perturbations environnementales ont aussi des répercussions sur la santé publique. Ainsi les autorités américaines estiment que 10 % des sédiments présents dans leur lacs, rivières et baies sont suffisamment contaminés par des composés toxiques pour avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques, mais également sur la population humaine consommatrice des ressources aquatiques présentes dans ces milieux (McCauley *et al.*, 2000 ; Long, 2000). Il est devenu indispensable d'évaluer la qualité de ces milieux aquatiques et plus particulièrement celle de la phase sédimentaire.

C'est au compartiment sédimentaire marin que nous nous sommes donc intéressés dans cette étude. A l'heure actuelle, en comparaison des écosystèmes continentaux, les études consacrées au milieu marin sont moins abondantes, en France en particulier.

Les analyses chimiques permettent de déterminer et de connaître le niveau de contamination d'un sédiment, mais donnent peu d'informations sur sa « qualité biologique ». Pour mieux appréhender cette dernière, il est plus approprié d'utiliser les réponses d'organismes vivants : les bioessais.

His *et al.* (1999a), à l'aide du test embryon-larvaire chez les bivalves marins définissent la qualité biologique d'une eau de mer à partir des perturbations rencontrées au niveau de l'embryogenèse. De la même façon, à l'aide des bioessais pratiqués dans ce travail, nous parlerons de la qualité biologique des sédiments en fonction des effets produits par ces derniers sur le modèle biologique retenu.

Les **espèces benthiques** sont exposées directement aux contaminants adsorbés sur la phase particulaire, mais aussi à ceux qui sont dissous dans l'eau interstitielle et dans l'eau à l'interface eau-sédiment. De nombreux bioessais, plus ou moins standardisés, permettent d'évaluer les effets des sédiments marins contaminés vis à vis des organismes benthiques. Ils utilisent principalement des amphipodes, des polychètes, des copépodes et des bivalves (Chapman et Morgan, 1983 ; Carr *et al.*, 1989 ; Swartz *et al.*, 1979, 1982, 1985, 1988, 1989 ; ASTM, 1992 ; Becker *et al.*, 1990 ; Long *et al.*, 1990 ; Eertman *et al.*, 1993 ; Burgess et Morrison, 1994 ; Long et Wilson, 1997 ; Matthiessen *et al.*, 1998). Toutefois, ces tests sont relativement longs (entre 10 et 28 jours), utilisant souvent la survie comme réponse biologique, ils sont donc peu sensibles. Par ailleurs, le nombre d'individus utilisés par répliquat est peu important (10 à 20), posant des problèmes de représentativité (Lawrence, 1999). De plus, certaines espèces utilisées sont sensibles aux caractéristiques physiques des sédiments telles que la granulométrie et la teneur en matière organique (DeWitt *et al.*, 1988 ; Lacey *et al.*, 1999 ; Cripe *et al.*, 2000) et il est alors difficile de discerner les véritables effets dus aux contaminants. Des tests plus rapides, Microtox[®] (Chapman *et al.*, 1992 ; Carr *et al.*, 1996a), spermio et embryotoxicité chez les bivalves et échinodermes (Meador *et al.*, 1990 ; Chapman *et al.*, 1991 ; Chapman et Morgan, 1993 ; Carr *et al.*, 1996b, 2000 ; Carr, 1998 ; Thompson *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 2000) ont aussi été développés, mais à l'heure actuelle, ils sont généralement utilisés sur des extraits sédimentaires et non sur le sédiment lui même.

Pour ce qui concerne les **organismes pélagiques**, ils sont contaminés par le relargage de contaminants sédimentaires dans la colonne d'eau et par la voie trophique (de nombreuses espèces se nourrissent d'organismes benthiques). Ainsi le passage de xénobiotiques du sédiment vers la colonne d'eau se fait par diffusion, mais surtout lors de la remise en suspension des sédiments, par des phénomènes naturels (marée, tempêtes, bioturbation ; Chapman *et al.*, 1998) et par l'activité humaine comme les opérations de dragage (Lee et Jones, 1982 ; Fichet *et al.*, 1998 ; Matthiessen *et al.*, 1998). Cet impact des sédiments contaminés sur les organismes pélagiques a été à ce jour, moins abordé que celui sur les organismes benthiques (Burgess et Scott, 1992 ; Burgess *et al.*, 1993). Pourtant, ces deux types d'organismes (benthiques et pélagiques) doivent être pris en compte au même titre si on veut réellement protéger l'environnement marin.

Le but final des essais biologiques est d'évaluer l'impact des micro-polluants, sédimentaires en particulier, de la façon la plus réaliste possible sur le plan environnemental. Or le prélèvement, le stockage et la manipulation des sédiments peuvent modifier la biodisponibilité des contaminants et par conséquent leur toxicité. Ceci représente la principale limite des tests biologiques en laboratoire (Lamberson *et al.*, 1992 ; Burton, 1992b).

Les bioessais pratiqués en laboratoire ne peuvent refléter les variations spatio-temporelles de la température, la salinité, la lumière et l'oxygène du milieu naturel, pouvant modifier la spéciation et donc la toxicité des contaminants. Ils permettent seulement d'évaluer « **une toxicité potentielle** » de ces sédiments sans que l'on connaisse vraiment sa signification sur la plan écologique.

Très récemment, des études ont été consacrées à l'adaptation et au développement de **bioessais *in situ***. Ces outils présentent les avantages développés au laboratoire (**sensibilité, rapidité, simplicité**) et permettent également de déterminer la réelle qualité biologique d'un milieu vis à vis d'une espèce. A l'heure actuelle, les bioessais *in situ* concernent uniquement les sédiments du **milieu dulçaquicole** (Chappie et Burton, 1997 ; Crane *et al.*, 2000).

Les bioessais reflètent la toxicité de la fraction biodisponible des contaminants, mais ne permettent pas d'identifier les composés responsables des effets biologiques observés. Cette **biodisponibilité** des contaminants dépend de nombreux **facteurs physiques**

(granulométrie et teneur en matière organique du sédiment et des particules en suspension.....), **chimiques** (solubilité et réactivité des composés, présence d'agents complexants.....), **biologiques** (organismes pélagiques ou benthiques utilisés, mode de contamination.....) (Borgmann, 2000). Elle peut dans une certaine mesure être mesurée par l'accumulation des contaminants par les organismes tests. On parle alors de bioaccumulation. Pour différents composés, des **concentrations corporelles critiques**, au-dessus desquelles des effets biologiques sont observés, ont été déterminées. Pour les contaminants non ou faiblement régulés et transformés, les teneurs dans les organismes sont de meilleurs **indicateurs** de la qualité du milieu que la mesure des concentrations en polluants dans le milieu même. Ceci permet de prendre en compte tous les facteurs qui influencent la biodisponibilité de ce type de contaminants (McCarty et Mackay, 1993 ; Borgmann et Norwood, 1997 ; Connell *et al.*, 1999 ; Borgmann, 2000 ; Borgmann *et al.* 2001 ; Hwang *et al.*, 2001).

D'autres outils, les **biomarqueurs**, sont utilisables pour étudier la biodisponibilité des contaminants. La notion de biomarqueur a été définie par Lagadic *et al.* (1997) comme étant « un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant ». L'utilisation de biomarqueurs a pour but de mettre en évidence de façon précoce une pollution. Ils peuvent être classés en fonction de la spécificité relative de leur réponse à un type de contamination (Ex : les métallothionéines qui ont une certaine spécificité par rapport à une contamination métallique) ou selon le type de réponse ; on différencie alors les biomarqueurs de **défense** (Ex : inductions enzymatiques) ou de **dommage** (Ex : adduits à l'ADN) (de Lafontaine *et al.*, 2000).

A l'heure actuelle, les études de bioaccumulation et l'utilisation de biomarqueurs ont une signification écologique limitée ; peu de relations ont pu être mises en évidence entre les teneurs en contaminants accumulés et les réponses de biomarqueurs chez les organismes avec les effets observés au niveau de la population (Caquet et Lagadic, 1997 ; Borgmann, 2000).

Ce manuscrit présente l'étude de l'évaluation de la toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés, à l'aide de bioessais. Cette étude a consisté à sélectionner les

organismes les plus sensibles, à comprendre le mode de contamination de ces derniers en fonction du traitement sédimentaire utilisé, afin de développer et de proposer une démarche utilisable lors d'études de biomonitoring (nécessitant des tests sensibles, simples et surtout rapides à mettre en œuvre), mais également des outils utilisables dans les études d'analyses des risques chimiques et écotoxicologiques (c'est à dire permettant d'évaluer l'impact de composés à des doses réalistes d'un point de vue environnemental).

L'exposé de cette étude s'articule en différents chapitres. Le **chapitre I** est consacré à une synthèse bibliographique sur les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les métaux, rappelant, leurs grandes caractéristiques physico-chimiques, ainsi que les facteurs qui régulent leur biodisponibilité. Dans un second temps, une présentation des outils disponibles pour évaluer la qualité des sédiments, ainsi que de l'espèce la plus utilisée dans cette étude, l'huître japonaise *Crassostrea gigas*, a été faite. Le **chapitre II** regroupe les différentes techniques biologiques et chimiques mises en œuvre tout au long de ce travail.

Dans une troisième partie (**Chapitre III**) l'ensemble des résultats, détaillés dans les chapitres suivants, est présenté sous forme de synthèse.

Le chapitre suivant (**IV**), est consacré aux études portant sur le choix de l'organisme test. Les sensibilités des différents stades de développement chez *Crassostrea gigas* et *Paracentrotus lividus* ont été comparées. Une fois l'organisme test choisi (embryons de *C. gigas*), sa capacité à déterminer la qualité des sédiments a été évaluée (**chapitre V**). A l'aide de trois sédiments modèles, les effets du mode et de la durée de conservation des sédiments sur leur toxicité ont été étudiés (**chapitre VI**). Le **chapitre VII** a été entièrement consacré à la mise en évidence et à l'évaluation de la biodisponibilité des contaminants d'origine sédimentaire vis à vis des embryons et des larves de *Crassostrea gigas* et de *Mytilus galloprovincialis*. Le **chapitre VIII**, concerne la mise en place et l'utilisation du test embryolaire *in situ* chez *C. gigas* et *M. galloprovincialis*.

Chapitre I : Synthèse bibliographique

Ce chapitre a pour but, dans une première partie, de faire brièvement le point des connaissances actuelles sur les sédiments contaminés, ainsi que sur le comportement, la mobilité et la biodisponibilité de deux types de polluants très fréquents, les métaux et les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

Une seconde partie est consacrée aux grandes lignes de la reproduction de l'espèce retenue comme modèle dans les bioessais, l'huître *Crassostrea gigas*, et plus particulièrement sur les stades embryonnaires et larvaires de ce bivalve marin.

I.1 - Sédiments et contaminants

Le sédiment, compartiment important de l'écosystème aquatique, sert d'habitat et de source de nourriture pour de nombreuses espèces écologiquement et économiquement importantes. Les dépôts sédimentaires marins et littoraux qui font l'objet de la présente étude, se forment à l'interface des zones continentales et océaniques. Ils constituent un filtre pour les polluants et deviennent ainsi les réservoirs ultimes pour de nombreux composés chimiques connus ou inconnus (Chapman et Long, 1983). Ils contiennent donc des xénobiotiques persistants qui peuvent avoir des effets létaux immédiats ou à long terme.

Les contaminants chimiques sont d'origine très diverse (contamination atmosphérique, effluents urbains, rejets en mer, naufrages) résultant d'activités anthropiques présentes ou passées. Dans de nombreux cas, bien que les apports aient cessé, les sédiments jouent toujours le rôle de source de contamination et l'impact sur les organismes vivants reste important (Power et Chapman, 1992 ; Luoma et Ho, 1993).

Le niveau de contamination des sédiments est traditionnellement déterminé par des analyses chimiques qui donnent peu d'informations sur sa «qualité biologique», c'est-à-dire ses effets sur le biota. L'évaluation de la toxicité de l'ensemble des contaminants sédimentaires biodisponibles nécessite donc l'utilisation de tests réalisés à l'aide d'organismes vivants (Stebbing *et al.*, 1980 ; Chapman et Long, 1983). La fraction biodisponible des contaminants est représentée par les composés qui peuvent rentrer directement en contact avec les organismes et être absorbés. La biodisponibilité d'un xénobiotique dépend des caractéristiques du sédiment (granulométrie, teneur en matière organique, potentiel redox etc..), des propriétés physico-chimiques du composé (spéciation) et de l'organisme lui-même (habitat, mode alimentaire) (Förstner et Wittman, 1979 ; Landrum et Robbins, 1990).

L'approche biologique et chimique sont deux méthodes essentielles et complémentaires pour évaluer la qualité d'un environnement et les effets à différents niveaux d'organisation biologique, de la cellule à la population (Chapman *et al.*, 1987 ; Woodhead *et al.*, 1999).

I.1.1 - Sédiments

I.1.1.1 - Origine

Les sédiments proviennent du dépôt des particules en suspension dans l'eau dérivant elles-mêmes de l'érosion des roches et des sols, de matériaux détritiques organiques et de la floculation d'éléments colloïdaux. Ces particules parviennent au milieu aquatique par les cours d'eau et par voie atmosphérique.

Ces éléments sont dits d'origine allochtone quand ils sont issus de l'érosion du bassin versant par des agents dynamiques externes comme l'eau ou le vent et d'origine autochtone quand ils sont dus à la sédimentation de composés minéraux (carbonates, phosphates, évaporites) et organique (organismes planctoniques morts) (Ramade, 1998).

Les sédiments sont essentiellement caractérisés par leur granulométrie et leur composition.

I.1.1.2 - Granulométrie

Les sédiments sont classés en fonction de la taille de leurs particules (Bellair et Pomerol, 1977) :

- Les particules d'un diamètre supérieur à 63 μm caractérisent les sédiments grossiers qui sont principalement constitués de sable et de matériel inorganique silicaté. Ces sédiments présentent une faible cohésion, les surfaces de contact des différentes particules sont peu importantes et donc sont peu associées aux contaminants. On distingue généralement les graviers (diamètre supérieur à 2 mm) et les sables (diamètre compris entre 63 μm et 2 mm).

- Les particules d'une taille inférieure à 63 μm sont constituées de minéraux argileux ayant un diamètre compris entre 0,2 et 2 μm et de silt ayant un diamètre compris entre 2 μm et 63 μm . Cette fraction fine peut également contenir de la matière organique. Les particules fines sont très cohésives, elles sont chargées négativement et leur surface de contact est importante ; ces caractéristiques leur donnent un grand pouvoir adsorbant vis à vis des contaminants métalliques. La matière organique sédimentaire, caractérisée par le carbone organique, est constituée de macromolécules polymérisées hétérogènes ; elle possède des sites hydrophiles qui lui permet de s'adsorber à la surface des particules argileuses et de complexer de nombreux contaminants, organiques notamment (Burton, 1992b ; Bonnet, 2000).

I.1.1.3 - Composition

Le sédiment est une matrice très hétérogène, constitué de matériaux détritiques inorganiques et organiques (Power et Chapman, 1992). Il présente principalement 3 composants:

- **Eau interstitielle** : elle correspond à l'eau qui occupe l'espace entre les particules sédimentaires et représente une fraction importante du sédiment avec généralement plus de 50 % de son volume (Förstner, 1987).
- **Phase inorganique** : elle est formée de minéraux provenant de l'érosion de l'écorce terrestre et de débris coquilliers. Ses composés sont principalement, les argiles, carbonates et les silicates. Les particules inorganiques sont généralement enrobées d'hydroxyde de fer et de manganèse et de substances organiques qui leur confèrent une grande capacité d'adsorption vis à vis des contaminants.
- **Phase organique** : elle n'occupe qu'un faible volume du sédiment (quelques %), mais joue un rôle primordial puisqu'elle régule la mobilité et donc la biodisponibilité d'un grand nombre de contaminants, en particulier les composés organiques non ioniques (Power et Chapman, 1992). Selon sa taille la matière organique peut être classée en carbone organique dissous (COD < 1 kDa), colloïdal (1 kDa < COC < 0,22 µm) et particulaire (COP > 0,22 µm ; Bonnet, 2000).

Les sédiments sont aussi également caractérisés par leur pH, leur potentiel redox, leur salinité, leur teneur en oxygène et en sulfures. Ces paramètres gèrent la répartition des contaminants entre les différentes phases d'un sédiment, ainsi que leur biodisponibilité.

I.1.2 - Contaminants sédimentaires

Dans le cadre de cette étude, des sédiments contaminés par les métaux et les HAP ont été étudiés, à l'exclusion de tout autre type de contamination (PCB en particulier).

I.1.2.1 - Métaux : sources, caractéristiques et répartition

Les métaux proviennent principalement de l'érosion des roches, des sols et des sédiments où ils sont présents à l'état naturel et mais aussi majoritairement des activités humaines.

Les métaux étudiés dans le présent travail sont le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le zinc (Zn) et le plomb (Pb). Ils ont été choisis car ils sont les plus représentés et les plus problématiques dans l'environnement (Haynes et Johnson, 2000 ; McPherson et Chapman, 2000 ; Hagopian-Schlekat *et al.*, 2001). De plus ce sont les métaux qui ont été utilisés pour développer les différents modèles de biodisponibilité et de toxicité que nous présenterons ultérieurement (Ankley *et al.*, 1994). Le tableau I-1 donne les principaux secteurs d'activités qui utilisent ces métaux et entraînent leur rejet dans l'environnement.

Les métaux rencontrés dans l'environnement peuvent être classés selon leur caractère essentiel ou non. Un métal est considéré comme essentiel si des symptômes pathologiques apparaissent lorsque sa teneur diminue ou qu'il est absent et disparaissent lorsqu'il est rajouté. Il faut aussi que les symptômes soient associés à une défection biochimique (Förstner et Wittmann, 1979). Cependant, un élément essentiel peut également être toxique lorsqu'il est présent à de trop fortes concentrations. Suivant ces critères, 17 métaux sont considérés comme essentiels, dont quatre (Na, K, Ca et Mg) sont présents en grande quantité (supérieurs à $> 1 \text{ mmole kg}^{-1}$ de poids frais) alors que les treize autres (As, Cr, Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Si, Sn, V et Zn) sont présents à l'état de trace ($0,001$ à 1 mmole kg^{-1} de poids frais) ou d'ultra-trace ($< 1 \mu\text{mol kg}^{-1}$ de poids frais ; Mason & Jenkins, 1995).

Les métaux non essentiels n'ont, à l'inverse des précédents, aucun rôle biologique actuellement connu. C'est le cas du Hg, Ag, Cd et Pb (Mason & Jenkins, 1995). Ils sont considérés comme néfastes dès qu'ils sont présents dans le milieu et entraînent des effets biologiques délétères à de très faibles concentrations.

Tableau I-1 : Principales sources des métaux étudiés dans le présent travail (d'après Förstner, 1987 ; Michel, 1993a dans Ettajani, 1994).

Eléments	Secteur d'activité
Cd	Production de soufre, photographie, plastiques, fongicides, insecticides, peintures antisalissures, céramiques, verreries, cimenterie, raffinage du pétrole, engrais.
Cu	Métallurgie, papeterie, engrais, raffinage, tannerie, photographies, peinture antisalissures, céramiques
Zn	Papeteries, peintures, plastiques, lubrifiants.
Pb	Papeterie, engrais, raffinage, métallurgie, imprimerie, canalisations, accumulateurs céramiques, antirouille.

La toxicité des métaux dépend de nombreux facteurs. Wood (1974 ; dans Förstner et Wittmann, 1979) a classé différents métaux et métalloïdes en fonction de leur toxicité (action chez l'organisme vivant) et leur disponibilité dans l'environnement (Tableau I-2)

Les métaux sont répartis dans les diverses fractions des sédiments et sous différentes formes physico-chimiques : c'est la spéciation.

Dans la phase aqueuse, ils peuvent être sous forme d'ions libres hydratés, complexés avec des ligands inorganiques comme les carbonates ou organiques dissous (COD) comme des peptides, protéines et des acides fulviques. Ils peuvent également être associés à une phase colloïdale inorganique (Fe_2O_3) ou organique colloïdal (COC) comme les acides humiques.

Dans la phase particulaire, ils peuvent être adsorbés sur l'argile, complexés avec la matière organique, adsorbés et/ou coprécipités avec les hydroxydes de fer et de manganèse, précipités avec les ions sulfures (dans la partie anoxique du sédiment) ; ils peuvent enfin être liés à la matrice cristalline des particules (Morisson, 1989 ; Burgess et Scott, 1992 ; Burton, 1992a ; Förstner et Whitmann, 1979 ; Rybicka *et al.*, 1995 ; Chapman *et al.*, 1998).

On a pu montrer récemment (Di Toro *et al.*, 1990 ; Ankley *et al.*, 1994 ; Hansen *et al.*, 1996 ; Sibley *et al.*, 1996 ; De Witt *et al.*, 1996) que les ions sulfures, provenant de la dégradation bactérienne de la matière organique en milieu anoxique ou de la réduction des sulfates jouent un rôle primordial dans le piégeage des métaux divalent (Cd, Ni, Zn, Cu, Pb). Les principaux sulfures sont le mono-sulfure de fer (FeS), appelé greigite et le bisulfure de fer (la pyrite ; Di Toro *et al.*, 1990).

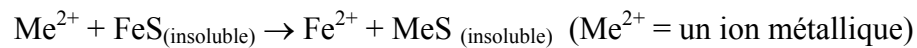
Tableau I-2 : Classification des métaux et des métalloïdes en fonction de leur toxicité et de leur disponibilité (Wood, 1974 dans Förstner et Wittmann, 1979).

Pas toxiques			Toxiques, mais peu solubles ou rares		Très toxiques et relativement disponibles		
Na	C	F	Ti	Ga	Be	As	Au
K	P	Li	Hf	La	Co	Se	Hg
Mg	Fe	Rb	Zr	Os	Ni	Te	Tl
Ca	S	Sr	W	Rh	Cu	Pb	Pb
H	Cl	Al	Nb	Ir	Zn	Ag	Sb
O	Br	Si	Ta	Ru	Sn	Cd	Bi
N			Re	Ba		Pt	

Les sulfures des sédiments se divisent en 3 catégories, en fonction des techniques utilisées pour les quantifier :

- 1 - Les plus volatiles, « acid volatil sulfide » (AVS), sont les mono-sulfure de fer et de manganèse qui sont extraits par attaque acide à froid (Allen *et al.*, 1993).
- 2 - La plus résistante, la pyrite de fer qui n'est pas soluble lors de l'extraction des AVS.
- 3 - Enfin, les sulfures organiques associés à la matière organique.

Lorsque des métaux (Cd, Zn, Ni, etc..) sont présents dans un sédiment, le sulfure de fer est déplacé par un des ions métalliques pour former du fer soluble et un nouveau sulfure métallique, selon l'équation suivante :



Malgré sa prédominance dans les sédiments, le fer a une affinité pour les ions sulfures beaucoup plus faible que les autres métaux. L'affinité des métaux traces pour les ions sulfures peut être classée de façon croissante de la manière suivante : Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} et Hg^{2+} (Di Toro *et al.*, 1990).

La forme physico-chimique des métaux (spéciation) conditionne leur mobilité et par suite leur biodisponibilité. En général, la forme libre ou ionique est la plus biodisponible et toxique. Afin de pouvoir identifier et déterminer les nombreuses espèces concourant à la concentration totale d'un élément trace, plusieurs techniques de spéciation ont été développées.

Dans la phase aqueuse, les différentes méthodes sont électrochimiques, physico-chimiques, la séparation physique par la taille (Batley, 1989), ainsi que l'application de modèles mathématiques (Fisher *et al.*, 1990).

Dans la phase particulaire on utilise principalement des techniques de séparation physique (tamisage, gravité de sédimentation, centrifugation différentielle), de microanalyse non destructives et des méthodes d'extractions sélectives, par différents types d'attaque comme l'acide acétique, oxalique ou action d'agents chélateurs comme l'EDTA (Acide éthylène-di-amine-tétra-acétique) ou le DTPA (Acide diéthylène-tri-amine-penta-acétique) (Kersten et Förstner 1989). Parmi les techniques d'extraction séquentielle, la méthode de Tessier *et al.* (1979) est une des plus recommandées ; elle permet de différencier les métaux associés aux carbonates, aux hydroxydes de fer et de manganèse, à la matière organique et à la matrice minérale du sédiment.

I.1.2.2 - HAP : sources, caractéristiques et répartition

Les composés organiques sont représentés par plusieurs classes, les alcanes, les polychlorobiphényles (PCB), les pesticides, les dioxines et les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Ces composés proviennent de sources diverses et ont des propriétés chimiques différentes. Ils sont stables, lipophiles et possèdent au moins un noyau aromatique.

Les HAP sont des hydrocarbures formés de cycles benzéniques condensés sous forme linéaire ou angulaire. Pour cette étude, 17 HAP (Fig. I-1) ont été choisis parmi les polluants prioritaires définis par l'Agence pour la Protection de l'Environnement Américaine (EPA) en raison de leur toxicité et de leurs propriétés mutagènes (Keith et Teillard, 1979). De plus, en comparaisons aux PCB et dioxines, peu de normes environnementales ont été établies pour ces contaminants (Ex : Géode pour les boues de dragage), alors qu'ils sont encore actuellement générés et déversés dans l'environnement.

Les HAP ont trois origines ; la plus importante est la source pyrolytique qui correspond à la combustion incomplète de la matière organique à haute température (Neff, 1979 ; McElroy *et al.*, 1989). La seconde est pétrogénique, elle correspond à tous les déversements de pétrole dans l'environnement (naturels ou anthropiques). Enfin la dernière, moins importante, est la diagenèse précoce, processus qui transforme les dépôts sédimentaires et les roches en pétrole. (Neff, 1979 ; McElroy *et al.*, 1989).

Les apports en HAP dans l'environnement résultent de phénomènes naturels (feux de forêts, éruptions volcaniques ou fuites de réserves naturelles de pétrole), mais surtout d'activités humaines, comme la combustion du pétrole, charbon, gaz naturel ou du bois (sources pyrolytiques) ou encore le déversement de pétrole lors de son exploitation, de son transport ou lors des opérations de dégazage (sources pétrogéniques).

Les divers processus de formation des HAP génèrent des distributions différentes pouvant être utilisées comme empreinte moléculaire. Plusieurs indices (rapport de la concentration entre deux HAP) ont été développés afin de pouvoir identifier la source des HAP présents dans une matrice sédimentaire. Certains de ces indices, correspondant aux rapports de concentration entre isomères, sont présentés dans le tableau I-3.

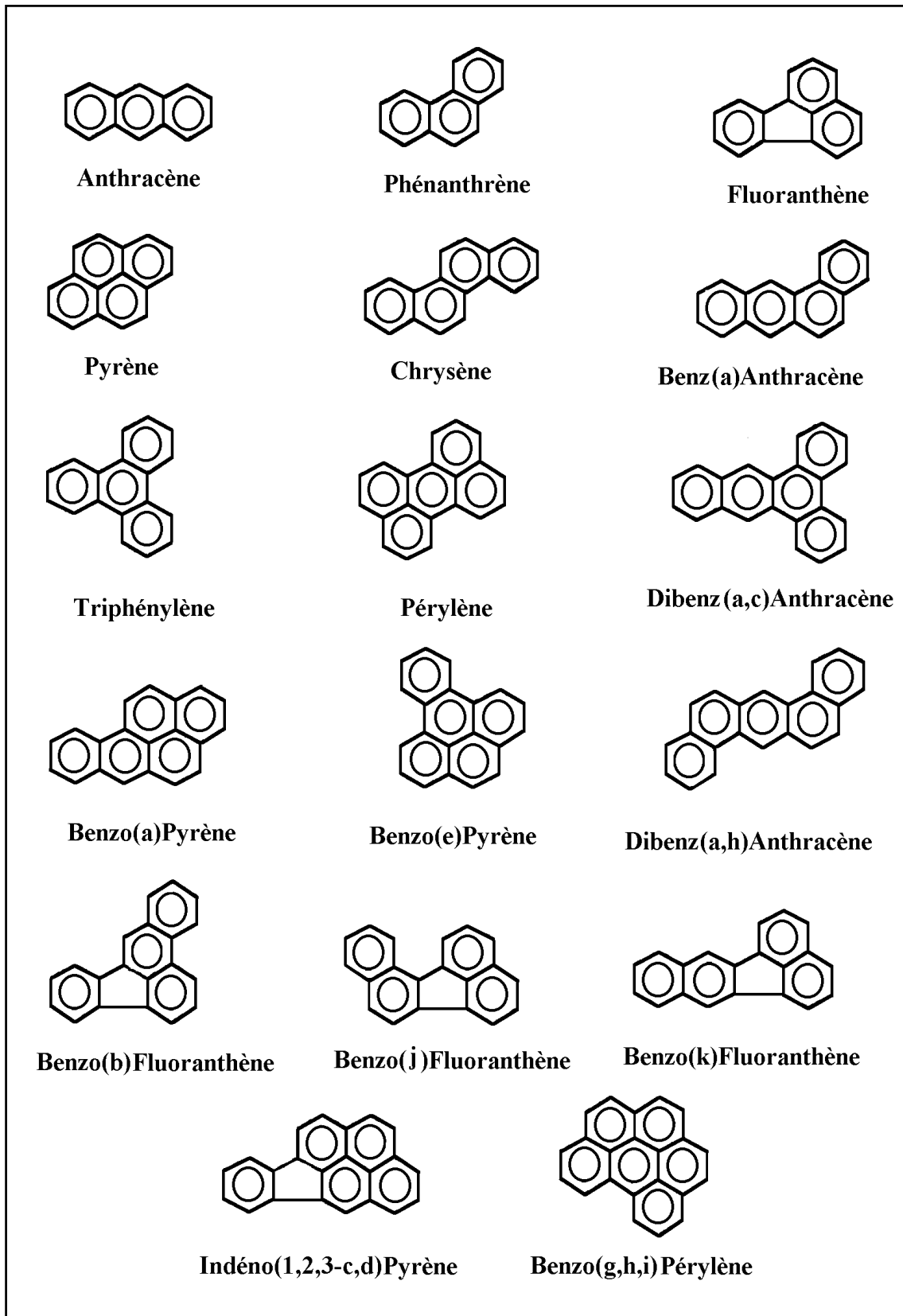


Figure I-1 : Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).

Tableau I-3 : Valeurs de quelques indices moléculaires caractérisant l'origine des HAP (d'après Thompson, 1999).

Indice	Phe/An	Fluo/Pyr	Chrys/BaA	BeP/BaP
Source Pyrolytique	1 - 10	> 1	< 1	< 2
Source pétrogénique	> 25	< 1	> 1	> 5
Référence	Garrigues <i>et al.</i> , 1995	Soclo, 1986	Sicre <i>et al.</i> , 1987 Raoux, 1991	Broyelle, 1997

Les HAP peuvent avoir un caractère toxique aigu ou chronique, mais également un effet mutagène (génétoxicité). Une des caractéristiques en ce qui concerne la toxicité des HAP est la différence d'effets biologiques que l'on peut observer entre deux isomères (Ex, le BeP et le BaP). La génotoxicité de ces composés est affectée par leur transformation au sein des organismes. Au cours des mécanismes de détoxification (augmentation du caractère hydrosoluble du composé pour être éliminé), il peut y avoir formation de composés électrophiles qui se fixent sur les sites nucléophiles de l'ADN et de l'ARN, provoquant des dysfonctionnements cellulaires, pouvant conduire au développement de cancers.

Les caractéristiques des HAP étudiés, sont liées à leur structure et à leur masse moléculaire. Ils sont très peu solubles (lipophiles). Leur solubilité est caractérisée à l'aide du coefficient de partage octanol-eau (K_{ow}) : rapport de concentration d'un composé (i) dissous à saturation dans le solvant n-octanol et l'eau

$$K_{ow} = \frac{[i] / \text{octanol}}{[i] / \text{eau}}$$

Plus le coefficient est élevé, moins le composé est soluble dans l'eau et plus son affinité pour les lipides est élevée. La solubilité des composés varie de $7,2 \times 10^{-3}$ mmole l⁻¹ (phénanthrène, Log K_{ow} = 4,6) à $6,9 \times 10^{-7}$ mmole l⁻¹ (indéno(1,2,3(cd)pyrène, Log K_{ow} = 7,0 ; Pearlman *et al.*, 1984).

Comme les métaux, les HAP sont présents sous forme dissoute, complexés à la matière organique dissoute ou adsorbés sur les particules. La répartition entre la phase dissoute et

particulaire est définie par le coefficient de partage K_p (Karickhoff *et al.*, 1979) : rapport de concentration d'un composé (i) adsorbé à la phase solide (sédiment) et dissous dans l'eau à l'équilibre.

$$K_p (l / kg) = \frac{[i] / \text{sédiment}}{[i] / \text{eau}}$$

Le coefficient Log K_p des composés utilisés dans cette étude varie de 2,7 (phénanthrène) à 5,6 (dibenzo(a,h)anthracène). Introduits dans l'environnement aquatique, ces composés ont tendance à s'associer aux particules en suspension et à s'accumuler dans les sédiments. Ce phénomène est accentué par la teneur en matière organique du sédiment (Swartz *et al.*, 1990 ; Di Toro *et al.*, 1991 ; Burton, 1992a). Pour en tenir compte le coefficient de partage K_p est normalisé par rapport à la quantité de CO, c'est le coefficient K_{oc} (Karickhoff, 1984) :

$$K_{oc} (l / kg \text{ de CO}) = \frac{[i] \text{ sédiment} / \text{CO sédiment}}{[i] / \text{eau}}$$

I.1.3 - Mobilité et biodisponibilité des contaminants dans un sédiment

La forme physico-chimique d'un composé détermine sa mobilité, biodisponibilité et toxicité vis à vis des organismes vivants. Dans un sédiment, il existe de nombreux échanges entre les différents compartiments, tel que de la phase particulaire vers la phase dissoute, entraînant ainsi une contamination (Wen & Allen 1999). Ces échanges sont complexes et influencés par de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques (Förstner et Whittmann, 1979 ; Burgess et Scott, 1992 ; Lau et Chu, 1999).

I.1.3.1 - Mobilité des métaux : *salinité, pH, potentiel redox, carbone organique*

Les variations de mobilité des métaux se traduisent par le passage de la forme colloïdale et particulaire à la forme dissoute (ionique ou adsorbé) et vice et versa. Ces échanges sont influencés par la salinité, le pH, le potentiel redox et la teneur en carbone organique du sédiment (Förstner et Whittmann, 1979 ; Burgess et Scott, 1992).

L'augmentation de la salinité entraîne la remobilisation des métaux sédimentaires par compétition des ions magnésium et calcium vis à vis des autres métaux sur les sites de fixation (Förstner et Whitmann, 1979 ; Lau et Chu, 1999 ; Rasmussen et Andersen, 1999). Ceci a été observé pour le Cd, et le Mg. Pour le Cu et le Pb, les désorptions sont beaucoup plus faibles car ils sont principalement associés à la matière organique. Les métaux libérés (mobiles) présentent une toxicité plus ou moins marquée, car ils vont former des chloro-complexes qui sont moins biodisponibles que les ions libres (Förstner et Whitmann, 1979 ; Ettajani, 1994).

Dans les sédiments, le pH dépend de l'activité biologique et de la capacité tampon du système. La réduction des sulfates (SO_4^{2-}) en sulfure (S^{2-}) entraîne une augmentation du pH alors que la dénitrification (réduction des nitrates (NO_3) en azote (N_2)) entraîne sa réduction. Dans ce dernier cas, on observe une dissolution des carbonates et une augmentation de la compétition entre les métaux et les ions hydrogène vis à vis des sites d'adsorption ; ceci se traduit par un relargage de métaux sous la forme hydratée et par suite une augmentation de leur biodisponibilité et de leur toxicité (Förstner et Whitmann, 1979 ; Burgess et Scott, 1992).

Le potentiel redox est un des facteurs les plus importants pour la mobilité des métaux. Sa faible augmentation entraîne une oxydation des sulfures (AVS, voir Chapitre I § I.1.2.1), et la libération de métaux dans l'eau interstitielle et l'eau surnageante (Chapman *et al.*, 1998 ; Peterson *et al.*, 1996 ; Zoumis *et al.*, 2001).

L'augmentation du potentiel redox peut être due à différents processus :

- (i) La modification du taux de sédimentation des particules ou la réduction des sulfates par les bactéries, qui entraînent des variations spatiales et saisonnières de la quantité d'AVS dans les sédiments (Ankley *et al.*, 1994 ; Hansen *et al.*, 1996 ; Chapman *et al.*, 1998).
- (ii) La bioturbation et l'irrigation du sédiment par les organismes benthiques lorsqu'ils se déplacent, mangent, fabriquent leur tube et excrètent (Tessier *et al.*, 1994 ; Peterson *et al.*, 1996 ; Ciarelli *et al.*, 1999, 2000).
- (iii) Une remise en suspension du sédiment lors des tempêtes, les fortes marées ou les activités de dragages (Chapman *et al.*, 1998).

Le carbone organique est également un composant important dans l'adsorption des métaux, aussi bien dans la partie oxygénée du sédiment que dans la partie anoxique lorsque les métaux sont en quantité supérieure aux ions sulfures. Blasco *et al.* (2000) ont montré que dans l'eau interstitielle

les profils de concentration sont différents selon les métaux. Le Cu et le Cr sont enrichis dans l'eau interstitielle de la partie oxygène du sédiment car ils sont principalement pris en charge par la matière organique.

I.1.3.2 - Mobilité des HAP : *granulométrie et carbone organique*

Les HAP, faiblement solubles dans l'eau, s'associent très facilement aux particules ainsi qu'à la matière organique. Cependant, des échanges existent entre la phase particulaire et la phase dissoute ; ils sont influencés par la teneur en matière organique (exprimée en teneur de carbone organique, CO) (Di Toro *et al.*, 1991 ; Ankley *et al.*, 1994) et la granulométrie des sédiments. La mobilité et la disponibilité des HAP dépendent également de la source qui les a générés. Les HAP pétroliers, présents sous forme d'émulsion avec l'eau sont plus facilement disponibles en comparaison des HAP d'origine pyrolytique fortement adsorbés sur et dans les particules (McGroddy et Farrington, 1995).

Le passage des composés organiques de la phase particulaire à la phase dissoute est principalement géré par le caractère hydrophobe de ces molécules, ainsi que par la quantité et la qualité de la matière organique. Plus un composé est hydrophobe, plus il est fortement adsorbé sur les particules (Woodhead *et al.*, 1999). De la même façon plus la teneur en matière organique est élevée, moins les HAP sont mobiles et leur coefficient K_p diminue (Karickhoff, 1980, dans Meador *et al.*, 1990). Plusieurs phénomènes tels que l'activité bactérienne, qui utilise la matière organique comme source d'énergie, peuvent entraîner la libération d'HAP sous forme dissoute.

La quantité de colloïdes dans l'eau interstitielle joue également un rôle important dans la mobilité des composés organiques. Brownawell et Farrington (1986) ont montré que la concentration en PCB dans l'eau interstitielle est corrélée à la teneur en colloïdes. De la même façon Landrum *et al.* (1987) ont observé des teneurs en BaP dans l'eau interstitielle supérieures à son seuil et solubilité, ceci grâce à la présence de matière organique sous forme colloïdale.

La granulométrie du sédiment joue également un rôle important dans la distribution des HAP. Les HAP de poids moléculaire élevé (peu hydrosolubles) sont préférentiellement associés aux particules fines en comparaison aux composés plus hydrosolubles ; leur mobilité et leur biodisponibilité diminuent donc lorsque la fraction de particules fines d'un sédiment augmente (Raoux et Garrigues, 1993).

I.1.3.3 - Cas particulier des sédiments remis en suspension

La remise en suspension des sédiments, par des phénomènes naturels (marée, tempêtes), ou par des activités humaines (dragage) se traduit par un apport en particules sédimentaires et en eau interstitielle ce qui peut entraîner le relargage de contaminants (totaux et/ou dissous) dans la colonne d'eau et en détériorer la qualité.

La remise en suspension d'un sédiment provoque principalement l'oxygénation des sulfures, et le passage des métaux sous forme dissoute. Néanmoins Van Den Berg *et al.* (2001) ont montré lors d'une étude en milieu naturel, que le rejet de boues de dragages entraîne une augmentation de la teneur totale en métaux dans la colonne d'eau, résultant de l'augmentation de la turbidité ; par contre, les teneurs en métaux sous la forme dissoute ne sont pas modifiées. Des observations similaires ont été faites par Zhuang *et al.* (1994) et Slotten et Reuter (1995). Ces phénomènes résultent de l'action de deux processus simultanés : la faible vitesse d'oxygénation des sulfures métalliques et la formation de nouveaux sites d'adsorption comme les hydroxydes de fer (Saulnier et Mucci, 2000). Ces études qui n'ont concerné que quelques métaux (fer et manganèse en particulier) ne permettent pas de conclure de façon définitive sur les effets des rejets de boues de dragage ou de la remise en suspension d'un sédiment sur la qualité biologique de la colonne d'eau. Ainsi, la remobilisation maximale du Cd n'est observée qu'un mois après les rejets (Kerstern et Förstner, 1987 ; dans Burton, 1992a page 41). De la même façon, Wirth *et al.* (1996) ont montré une contamination de l'eau en As après des rejets de boues de dragage. Cependant, ces études concernent uniquement la remise en suspension de sédiments anoxiques, en ce qui concerne les sédiments oxiques, régulièrement remis en suspension lors des marées (milieux côtiers et estuariens), la remobilisation des métaux est différente (Saulnier et Mucci, 2000).

La remobilisation des contaminants organiques (HAP en particulier) par la remise en suspension des sédiments est d'autant plus faible que leur caractère hydrophobe et leur affinité pour la matière organique est élevée (Landrum, 1988 ; Di Toro *et al.*, 1991 ; voir chapitre I § I.1.3.2). Le temps de contact entre le composé et le sédiment joue aussi un rôle important sur leur relargage. Les HAP résultant d'une contamination ancienne (temps de contact important avec les particules) sont plus fortement fixés, incrustés dans les particules et plus difficiles à désorber (Harkey *et al.*, 1995 ; Lamoureux et Bronawell, 1999 ; Leppänen et Kukkonen, 2000). Ces résultats montrent la difficulté à définir un équilibre entre les composés et les particules, lors de la fabrication de sédiments artificiels.

I.1.3.4 - Biodisponibilité et toxicité des contaminants sédimentaires : modèles développés

Afin de pouvoir déterminer le risque que représente un sédiment vis-à-vis des organismes, il est indispensable de connaître la fraction biodisponible des contaminants. Un composé est dit biodisponible lorsqu'il peut rentrer en contact direct avec l'organisme et être absorbé et traverser la membrane cellulaire.

La biodisponibilité des contaminants (métaux et HAP) dépend de l'organisme lui-même. Les voies d'expositions peuvent se faire soit par l'intermédiaire du sédiment, de l'eau interstitielle et de la colonne d'eau. La contamination des organismes se fait par le passage des composés à travers la barrière corporelle (tégument) et les voies respiratoires, soit par l'ingestion de particules sédimentaires ou alimentaires contaminées (Power et Chapman, 1992).

S'il est souvent difficile de corrélérer les effets biologiques observés avec les teneurs totales en contaminants dans les sédiments, en revanche, ces corrélations sont plus facilement mises en évidence lorsque les teneurs en polluants sont normalisées par les facteurs qui gèrent leur répartition :

- teneur en hydroxyde de fer et/ou en carbone organique dans les sédiments oxygènes (Tessier et Campbell, 1987 ; Campbell et Tessier, 1994)
- teneur en AVS et/ou carbone organique (Di Toro *et al.*, 1990 ; Mahony *et al.*, 1996 ; Ankley *et al.*, 1996a) dans les sédiments anoxiques pour les métaux et par la teneur en carbone organique pour les HAP (Di Toro *et al.*, 1991).

Vis à vis des organismes benthiques, plusieurs auteurs ont montré que la toxicité des sédiments peut être prédite à partir de la concentration en polluants de l'eau interstitielle lorsque le système sédimentaire est en équilibre, ceci aussi bien pour les métaux (Swartz *et al.*, 1985 ; Kemp et Swartz, 1986) que les HAP (Di Toro *et al.*, 1991).

Plusieurs modèles ont été développés afin de d'évaluer la biodisponibilité des contaminants, leur toxicité, puis de développer des critères de qualité des sédiments.

I.1.3.4.1 - Modèles développés pour les métaux

Ils ont été développés, à partir d'une approche sur l'eau interstitielle, ou sur le sédiment lui-même.

Eau interstitielle

Le modèle de Ankley *et al.*, (1996b) permet de déterminer sa toxicité. (Interstitial Water Criteria Toxicity Unit : IWCTU) :

$$\text{IWCTU} = \Sigma ([\text{Me}]/\text{WQC})$$

[Me] correspond à la concentration totale d'un métal dans l'eau interstitielle

WQC (Water Quality Criteria) est la valeur pour le même métal qui correspond au critère de qualité pour une eau (concentration au-dessus de laquelle des effets biologiques sont possibles).

Ce modèle consiste à comparer les concentrations en contaminants dans l'eau interstitielle aux critères de qualité existant pour les eaux. Ceci est possible car selon Di Toro *et al.* (1991), la principale voie d'exposition des organismes benthiques est l'eau interstitielle et la sensibilité des organismes benthiques et pélagiques est la même.

Si l'indice IWCTU est inférieur à 1, le sédiment (eau interstitielle) ne présente pas de toxicité. A l'inverse, s'il est supérieur à 1 des effets biologiques sont prévisibles.

Les principales limites de ce modèle sont :

- (i) Les critères de qualités des eaux n'ont été définis que pour peu de métaux (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn).
- (ii) La biodisponibilité des métaux est évaluée à l'aide de la teneur totale sous forme dissoute et non à partir de la fraction hydratée (ou libre).

Sédiment

La biodisponibilité des métaux d'origine sédimentaire est contrôlée par leur teneur et par la quantité de composants adsorbants dans le sédiment. On se base donc sur la comparaison entre le nombre de moles de métaux et le nombre de sites de fixations des métaux présents dans le sédiment. Cette méthode présente des avantages car, en opposition avec le précédent modèle, les analyses chimiques sont plus facilement réalisables sur les sédiments que sur les eaux interstitielles.

Dans le cas d'un sédiment anoxique, Di Toro *et al.* (1992) proposent le modèle AVS/SEM ou AVS correspond aux sulfures extraits par attaque acide à froid (Allen *et al.*, 1993) et SEM à la

somme des métaux extrait en même temps que les AVS. Le sédiment n'est pas toxique lorsque la somme molaire des AVS est supérieure à la somme molaire des métaux (SEM), car aucun métal ne doit se trouver sous la forme soluble dans l'eau interstitielle. En revanche, une toxicité peut apparaître lorsque le rapport est supérieur à 1.

Ce modèle a été validé pour des expositions à court et long terme à la fois par des études en laboratoire et *in situ* (Ankley *et al.*, 1994 ; Di Toro *et al.*, 1990 ; Berry *et al.*, 1996 ; Hansen *et al.*, 1996 ; De Witt *et al.*, 1996 ; Sibley *et al.*, 1996 ; Boothman *et al.*, 2001).

Il présente néanmoins plusieurs inconvénients :

- (i) Il ne concerne que cinq métaux (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn).
- (ii) C'est aussi un modèle de non-toxicité, car même si le rapport AVS/SEM est supérieur à 1 le sédiment n'est pas forcément toxique (il existe des fractions adsorbantes comme la matière organique).
- (iii) Il est basé sur la relation entre la toxicité et les ions métalliques libres, or ce n'est pas la seule forme de métaux bio disponible.
- (iv) Comme le modèle précédent, il ne tient pas compte des effets de synergies ou antagonistes qui existent entre les métaux (Amiard-Triquet et Amiard, 1998 ; Ettajani *et al.*, 1992 ; Hapogian-Schlekat *et al.*, 2001).
- (v) Son application est difficile à cause des fortes variations du rapport AVS/SEM observées en fonction de la profondeur dans le sédiment. La concentration métallique peut présenter soit un profil constant, soit être plus élevée en surface (contamination récente). De la même façon, la quantité d'AVS est plus importante en profondeur qu'en surface. Dans ce dernier cas, l'utilisation simultanée du modèle sur l'eau interstitielle permet de résoudre le problème. En effet si un sédiment présente un rapport AVS/SEM supérieur à 1 (à cause d'une faible concentration en AVS) et un indice IWCTU inférieur à 1, alors il n'est pas toxique.

Les deux précédents modèles ont donc été récemment proposés pour déterminer les critères de qualité des sédiments (Ankley *et al.*, 1996b).

Dans le cas d'un sédiment de surface (oxygéné), la principale méthode pour prédire la biodisponibilité et la toxicité des métaux est de normaliser les concentrations trouvées dans le sédiment par les teneurs en carbone organique (CO) et/ou en hydroxydes de fer. Ainsi, dans 38 lacs canadiens, les concentrations en Cd sous forme libre (Cd^{2+}) à l'interface eau-sédiment sont mieux

prédites après la normalisation des concentrations en Cd dans le sédiment par les teneurs en hydroxydes de fer et en CO que par la détermination de la concentration totale de Cd dissous dans l'eau (Tessier *et al.*, 1993).

I.1.3.4.2 - Modèle développé pour les HAP

La biodisponibilité des HAP a été très étudiée par Di Toro *et al.* (1991) qui ont proposé un modèle de partage des HAP à l'équilibre entre la phase particulaire et dissoute (eau interstitielle). L'équation ci-dessous permet de déterminer la fraction dissoute des HAP dans l'eau interstitielle, à l'aide des teneurs dans le sédiment.

$$C_{ei} = C_s / (foc \times K_{oc})$$

C_{ei} : concentration du composé dans l'eau interstitielle ($\mu\text{g/l}$)

C_s : concentration du composé dans le sédiment ($\mu\text{g/g}$)

foc : fraction de carbone organique dans le sédiment (g CO/g sédiment poids sec)

K_{oc} : coefficient de partage du composé carbone organique-eau (l/kg CO).

Ce modèle de partage à l'équilibre ne peut être utilisé que pour des sédiments ayant plus de 0.2% de carbone organique. De plus il est affecté par la teneur en colloïdes qui peut augmenter de façon considérable les concentrations en HAP sous forme dissoute dans l'eau interstitielle (Harkey *et al.*, 1995).

Ce modèle a été repris par Swartz *et al.* (1995) pour développer un modèle permettant de prédire la toxicité d'un mélange d'HAP présents dans un sédiment naturel. Il est basé sur la comparaison entre les teneurs en HAP dans l'eau interstitielle (obtenue à partir du modèle du partage à l'équilibre) et les concentrations létales (CL50, concentration entraînant la mort de 50 % des organismes exposés) de chacun des composés. Il est basé sur l'effet additif des différents HAP présents et a été validé pour 13 composés. Le TU (Toxic Unit) de chaque composé est obtenu en divisant sa concentration dans l'eau interstitielle par sa CL50, puis les différents TU sont additionnés ; si la valeur obtenue est inférieure à 0.1 le sédiment est considéré non toxique.

Ce modèle présente lui aussi plusieurs limites :

- (i) Il n'a été réalisé que pour évaluer la toxicité des sédiments vis à vis des amphipodes.

- (ii) La CL50 est calculée en fonction de la solubilité du composé, or la toxicité des HAP est caractérisée par le fait que les isomères ont des toxicités différentes.
- (iii) Il se base sur le fait que les actions des différents HAP sont additives, ce qui ne semble pas être toujours le cas. Lors d'une exposition simultanée à plusieurs HAP, des effets d'antagonisme ont été observés chez *Daphnia* (Munoz et Tarazona, 1993) et l'amphipode *Rhepoxynius abronius* (Swartz *et al.*, 1997). A l'inverse, Verrhiest *et al.* (2001) ont montré des effets de synergies entre le phénanthrène, fluoranthène et le benzo(k)fluoranthène, chez *Daphnia magna*.
- (iv) Il ne tient pas compte de la photosensibilité de ces composés. Plusieurs études ont montré que l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo(k)fluoranthène présentent une forte phototoxicité (transformation des composés par photooxydation, donnant des polluants secondaires plus toxiques), ceci aussi bien lors d'une exposition en milieu aqueux qu'en présence de sédiments contaminés (Ankley *et al.*, 1995 ; Pelletier *et al.*, 1997 ; Hatch et Burton, 1998 ; Verrhiest *et al.*, 2001). Pelletier *et al.* (2000) ont récemment montré de forte mortalité chez des larves de *Mulinia lateralis* obtenues à partir de géniteurs contaminés par des HAP et après avoir été exposées aux UV.
- (v) L'augmentation de toxicité par métabolisation de certains composés n'est pas prise en compte. Par exemple, le B(a)P qui n'a pas de toxicité intrinsèque est en revanche très génotoxique par formation d'époxydes et de diols lors de sa transformation métabolique (Michel, 1993b ; Michel *et al.*, 1995).

I.2 - Evaluation de la qualité des sédiments

L'impact des contaminants sédimentaires sur les organismes aquatiques est aujourd'hui bien connu. Aux Etats-Unis, les autorités estiment que 10 % des rivières, lacs et baies sont contaminés par des composés toxiques qui peuvent avoir des effets néfastes sur les organismes aquatiques mais aussi affecter la santé des personnes qui consomment poissons et crustacés de ces milieux (McCauley *et al.*, 2000 ; Long, 2000).

La gestion de la qualité des milieux aquatiques et en particulier de leur phase sédimentaire est donc devenue une priorité pour de nombreux pays. Une première phase est l'identification des sources de pollutions et des zones contaminées. Il faut ensuite développer des stratégies d'évaluation de risques écotoxicologiques pour les endroits les plus impactés (McCauley *et al.*, 2000). Il est donc indispensable de posséder des outils, sensibles, fiables et rapides pour évaluer la toxicité des sédiments, ceci afin de cartographier la qualité des estuaires, des côtes et des baies et de développer des critères de qualité utilisables par la réglementation et la législation.

I.2.1 - Les différents outils

Différents outils, plus ou moins précis, rapides, coûteux et donnant des résultats faciles à interpréter, existent pour évaluer la qualité d'un sédiment.

I.2.1.1 - Analyse chimique

Les analyses chimiques sont les outils les plus utilisés pour détecter les problèmes de contamination dans les sédiments.

Elles sont utilisées dans la prévention de la pollution marine, notamment lors des opérations d'immersion de boues de dragage. En France, le groupe de travail GEODE (Groupement d'Etude et d'Observation des activités de Dragage sur l'Environnement), créé en 1990, a déterminé des valeurs de références permettant de qualifier un sédiment uniquement à l'aide des données chimiques (Lamy Environnement, 1996). L'obtention de ces valeurs est basée sur le calcul de la médiane de la courbe de distribution des concentrations de huit métaux et des PCB (soulignons que les HAP ne sont pas pris en compte) déterminées dans divers sédiments de ports français entre 1986 et 1990. A partir de la médiane, différents niveaux de qualité d'un sédiment ont été définis (Tableau I-4) :

- Le bruit de fond correspond au bruit de fond géologique.
- La médiane a été définie à partir des teneurs présentes dans divers ports français.
- Le niveau 1 correspond à deux fois la valeur de la médiane. C'est le seuil plafond pour autorisation d'immersion sans étude complémentaire.
- Le niveau 2 atteint quatre fois la médiane. Au-delà de ce niveau, l'immersion peut être interdite.

Ces critères ont été retenus par la législation française pour déterminer la qualité non seulement des boues portuaires, mais également des sédiments estuariens et côtiers (*Journal Officiel du 10 août 2000, Arrêté du 14 juin 2000*).

Tableau I-4 : Valeurs de références du niveau de contamination des sédiments proposées par GEODE (Lamy Environnement, 1996)

	Concentration ($\mu\text{g/g}$ de poids sec)							
	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn	PCB
Bruit de fond	0.5	45	35	0.2	20	47	115	-
Médiane	0.6	45	22.5	0.2	18.5	50	138	0.25
Niveau 1	1.2	90	45	0.4	37	100	276	0.5
Niveau 2	2.4	180	90	0.8	74	200	552	1

Les analyses chimiques sont également à la base des modèles présentés précédemment (chapitre I § I.1.3) qui ont été développés pour prédire la biodisponibilité et la toxicité des contaminants sédimentaires.

I.2.1.2 - Etudes écologiques, biologiques et biochimiques

L'étude de modifications structurales des communautés benthiques permet d'évaluer l'impact des sédiments contaminés sur les organismes, ceci avec une très grande signification écologique. Swartz *et al.* (1986), Chapman *et al.* (1991) ont mis en évidence des modifications de la structure des populations benthiques, en fonction du niveau de contamination des sédiments, notamment le long de gradients de pollution. Cependant, lors de contaminations modérées, il est souvent très difficile de séparer les effets biologiques liés aux facteurs environnementaux (structure du sédiment, saison, salinité, etc...) de ceux qui sont dus aux polluants (Stebbing, 1985 ; DeWitt *et al.*, 1989 ; Moriarty, 1990 ; Cripe *et al.*, 2000).

Plus récemment, l'impact des sédiments contaminés sur les populations benthiques a été abordé à partir de changements biologiques et biochimiques, tel que l'évaluation de la bioaccumulation et l'utilisation de biomarqueur. Ces nouvelles approches sont plus sensibles, plus spécifiques et permettent de mettre en évidence des changements biologiques de façon plus précoce, cependant, elles sont encore peu utilisées et principalement en milieu dulçaquicole (Karouna-Reiner et Zehr, 1999 ; Choi *et al.*, 2000).

L'étude de la bioaccumulation des contaminants par les organismes permet de mettre en évidence les composés qui ont pu pénétrer dans l'organisme et avoir des effets néfastes.

Récemment, McCarty et Mackay (1993) ont proposé d'utiliser la bioaccumulation des contaminants chez les organismes comme indicateur de la qualité du milieu. Le but de cette approche est d'évaluer ou étudier non plus la relation entre les effets biologiques et les concentrations en contaminants dans le milieu, mais de relier les effets biologiques à des concentrations dans l'organisme. Plusieurs études ont montré que l'accumulation des contaminants (métaux et composés organiques) chez les organismes est souvent un meilleur indicateur de la toxicité de ces composés que leur concentration dans le milieu même, car les variations de leur biodisponibilité sont obligatoirement prises en compte (Connell *et al.*, 1999 ; Borgmann, 2000). Borgmann et Norwood (1997) ont pu ainsi déterminer le métal responsable de la toxicité observée chez *Hyalella azteca* en comparant les concentrations métalliques accumulées chez ces organismes aux valeurs corporelles critiques qui correspondent aux concentrations au-dessus desquelles des effets biologiques sont observés. Cependant, cette approche est limitée pour les métaux essentiels puisqu'ils sont régulés (Borgmann, 2000), ainsi que pour les composés organiques rapidement transformés (Fisher *et al.*, 1999).

Un biomarqueur exprime une réponse biochimique, physiologique ou pathologique mesurée chez un organisme, donnant des informations sur son exposition aux contaminants environnementaux et/ou sur les effets sublétaux résultants de telles expositions (Benson et Di Giulio, 1992 ; Lagadic *et al.*, 1997). Les biomarqueurs donnent la réponse la plus sensible à l'exposition à de nombreux contaminants. Ils sont donc utilisés comme signal précoce de la dégradation écologique et comme outil de monitoring pour évaluer les zones polluées. En plus de leur sensibilité, ils se caractérisent par un temps de réponse très court (heures, jours). Ils peuvent être classés de la façon suivante : (de Lafontaine *et al.*, 2000).

- Les **biomarqueurs de défense**, qui est une réponse de type adaptatif, c'est le cas de la métallothionéine et de l'activité EROD qui sont des systèmes de détoxification ou de dégradation et dont la teneur augmente en présence de contaminants dans le milieu. Cette adaptation peut empêcher les effets au niveau de l'individu et par conséquent au niveau des populations, communautés et écosystèmes.

- Les **biomarqueurs de dommages**, dont la réponse peut indiquer un effet néfaste. C'est le cas de neurotoxiques qui entraînent des effets au niveau du comportement, pouvant être évalués indirectement par la mesure de biomarqueurs caractéristiques du fonctionnement du système nerveux, par exemple de l'acétylcholinestérase (AChE).

Pour une contamination métallique, les métallothioneines ont le plus fort potentiel pour être utilisées comme biomarqueur (Viarengo *et al.*, 1985, 1999 ; Dallinger, 1993). Ce sont des protéines ubiquistes, de faible poids moléculaire, thermorésistantes et riches en groupement cytéinique, ce qui leur confère une grande affinité avec les métaux. Deux principaux rôles leur sont attribués : le premier dans l'homéostasie des éléments essentiels (par exemple le Cu et le Zn) et le second dans la détoxification. Un excès en métaux (essentiels ou non) entraîne une induction, c'est à dire une augmentation de la teneur en métallothioneines qui les prennent en charge et les rendent non disponibles donc non toxiques. Les métallothioneines ont été proposées et utilisées comme biomarqueur d'exposition métallique (Amiard et Cosson, 1997 ; Geffard, 2001). Beyer *et al.* (1994) les ont utilisés chez le carrelet, *Platichthys flesus*, pour évaluer la contamination métallique des sédiments proches d'une industrie minière. A leur tour, Pedersen *et al.* (1997) les ont utilisés chez des crabes, *Carcinus maenas*, collectés dans des zones contaminées par les métaux. De même Geffard (2001) a étudié la métallothionéine chez les larves de moule *Mytilus galloprovincialis* pour mettre en évidence la biodisponibilité des métaux d'origine sédimentaire.

D'autres biomarqueurs comme la stabilité lysosomiale et la concentration en glutathion ont permis de mettre en évidence l'impact des sédiments contaminés par les métaux sur l'huître *Crassostrea virginica* (Ringwood *et al.*, 1999).

Dans le cas d'une contamination par les composés organiques, différents biomarqueurs ont été développés. Ils sont principalement basés sur les systèmes enzymatiques responsables de leur transformation et de leur élimination sous forme plus soluble. La transformation des composés organiques se fait généralement en deux phases.

La phase I, dite de fonctionnalisation, augmente le caractère polaire des molécules par des réactions d'oxydation (formation d'époxyde et de diols). A l'issue de cette première phase, le composé formé peut être plus toxique que le composé initial.

La phase II, dite de conjugaison au cours de laquelle les molécules sont associées à l'acide glucuronique, un groupement glutathion ou sulfate, permettant ainsi leur élimination.

La phase I comprend par une famille d'enzymes appelée cytochrome P450, dont l'isoforme P450IA présente une bonne spécificité aux HAP (Benson et Di Giulio, 1992). La phase II fait intervenir également plusieurs enzymes, comme la glutathion S-transférase (GST), l'uridine diphosphate glucuronosyltransférase (UDPGT) et la sulfotransférase. Etant donné l'affinité des systèmes enzymatiques de phase I et II aux composés organiques, leur utilisation a été proposée comme biomarqueur d'exposition ou de défense. Ce sont surtout les enzymes de phase I (Cytochrome P450) qui sont les plus utilisées (Wong *et al.*, 2000 ; Burgeot *et al.*, 2001).

Cependant, aussi bien pour les métallothioneines que les enzymes cytochrome P450 le niveau de contamination n'est pas le seul facteur qui influence leur teneur. Les biomarqueurs dépendent également de plusieurs facteurs biotiques (âge, cycle de reproduction, sexe) et abiotiques (variations saisonnières, salinité, température, hypoxie ; Benson *et al.*, 1988, 1992 ; Baudrimont *et al.*, 1997 ; Lagadic *et al.*, 1997).

L'étude de la bioaccumulation des contaminants et de celles des biomarqueurs sont des outils très sensibles, spécifiques et précoces, mais leurs résultats sont encore souvent difficiles à corréler avec les changements écologiques (Luoma et Ho, 1993).

I.2.1.3 - Bioessais

Le troisième outil est la réalisation de bio essais ou tests biologiques. C'est à ce niveau qu'a été réalisé la partie essentielle de cette étude qui fera donc l'objet d'un développement particulier (Chapitre I § I.2.2). Le but d'un bioessai est d'évaluer des réponses biologiques chez des organismes soumis, dans le cas présent, aux effets des sédiments contaminés. Les tests biologiques présentent généralement différentes caractéristiques :

- (i) Ils sont rapides et peu coûteux.
- (ii) Ils reflètent la toxicité de la fraction biodisponible des contaminants.
- (iii) Ils peuvent mettre en évidence la présence de contaminants non détectés par l'analyse chimique, ou que l'on ne sait pas doser.
- (iv) Ils sont réalisés en milieu contrôlé, les effets de facteurs pouvant rendre l'interprétation difficile comme dans le milieu naturel, sont limités.

Cependant, les bioessais ont également des limites ; on connaît mal leur signification écologique et l'extrapolation des résultats au milieu naturel n'est pas toujours satisfaisante.

De nombreuses espèces sont utilisées comme organismes tests, des bivalves (*Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*), des échinodermes (*Paracentrotus lividus*, *Arbacia punctulata*, *Strongylocentrotus purpuratus*), des amphipodes (*Rhepoxynius abronius*, *Ehaustorius estuarius*, *Corophium volutator*), des polychètes (*Neanthes arenaceodentata*, *Dinophilus gyrociliatus*), des organismes zooplanctoniques (*Acartia sp.*) des micoralgues (*Skeletonemas costatum*, *Phaedactylum tricornutum*) (Chapman et Morgan, 1983 ; Carr *et al.*, 1989 ; Swartz *et al.*, 1979, 1982, 1985 ; ASTM, 1992, 1994b, 1994c ; EPA, 1994 ; Long et Wilson, 1997 ; Carr, 1998 ; ISO, 1998 ; Thompson *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 2000).

I.2.1.4 - Approches intégrées

Devant les objectifs et les limitations de chacun des outils passés en revue, l'approche souhaitable, pour évaluer la qualité d'un sédiment, est de les intégrer les uns aux autres. Cette approche correspond au concept défini par Chapman, la Triade (Chapman, 1990 ; Chapman *et al.*, 1987, 1991). Elle est basée sur :

- La détermination, du niveau de contamination du sédiment.
- La toxicité du sédiment, déterminée à l'aide d'un ou plusieurs bioessais, utilisant différents traitements sédimentaires (sédiment contact, eau interstitielle, extrait aqueux ou organique).
- La structure des populations benthiques, définies par leur biodiversité et le nombre d'organismes présents.

A la suite de cette approche, un indice du niveau de dégradation du sédiment est calculé et sa qualité est déterminée.

La triade a été utilisée pour de nombreuses études, concernant l'impact de boues de dragage (Chapman, 1990), la qualité des sédiments dans une zone soumise à des apports anthropiques (Carr *et al.*, 2000) comme les plates-formes de pétrole (Chapman *et al.*, 1991) ou des rejets urbains (Chapman *et al.*, 1996). Cependant, cette méthode est lourde, coûteuse à mettre en place et elle requiert l'intervention d'équipes pluridisciplinaires.

Les études écotoxicologiques menées sur la qualité des sédiments estuariens, côtiers et marins sont basées sur la détermination du niveau de contamination des sédiments et sur l'évaluation de leur toxicité à l'aide de bioessais. Il est recommandé d'utiliser plusieurs tests biologiques faisant appel à plusieurs organismes (bactéries, algues bivalves, amphipodes, polychètes, poissons). Ceci permet de prendre en compte la différence de sensibilité des espèces vis à vis des différents contaminants et d'évaluer l'impact des sédiments sur des organismes occupant différents niveaux des chaînes trophiques.

Toutes ces approches intégrées, ainsi que les différents modèles vus dans la première partie de ce chapitre (chapitre I § I.1.3.4), ont été utilisées afin de développer des seuils de toxicité pour les sédiments. Les premiers seuils de toxicité ont été initialement développés par Long et Morgan (1990), suite à de nombreuses études sur la baie du Puget Sound (Etat de Washington, USA). A partir des niveaux de contamination des sédiments, des résultats des bioessais et d'études de la structure des communautés benthiques, ils ont défini des seuils de qualité (AET : Apparent Effect

Threshold, concentrations les plus fortes pour lesquelles aucun effet biologique n'est observé) pour de nombreux contaminants.

En France, il existe une approche similaire, permettant d'évaluer le risque toxique que représente un sédiment. Elle consiste à déterminer pour chaque contaminant une PEC (Probable Environmental Concentration) qui est obtenue soit par dosage, soit déterminée à l'aide de la PEC dans l'eau multiplié par le coefficient de partage du composé (K_p) étudié et par 1000. On détermine également une PNEC (Probable No Effect Concentration) qui correspond à la concentration la plus forte d'un composé sans effets biologiques observés. La PNEC est déterminée à l'aide de bioessais ou à partir de modèle similaire à ceux développés par Di Toro *et al.* (1991, 1992). Les rapports entre les PEC et les PNEC des différents contaminants présents dans un sédiment permettent de caractériser le risque toxique de ce dernier.

Plus récemment Long *et al.* (1995) et MacDonalds *et al.* (1996) ont respectivement défini des seuils de toxicité et déterminé des valeurs ER-L (Effect Range low) et ER-M (Effect Range Medium) dans le premier cas et TEL (Threshold Effect Level) et PEL (Probable Effect Level) dans le second. Ces seuils ou critères de toxicité ont été obtenus de manière empirique, c'est à dire en compilant les résultats de nombreuses études réalisées soit au laboratoire, soit en milieu naturel et pour lesquelles, le niveau de contamination et de toxicité des sédiments étaient disponibles. A partir de cette banque de données, ces auteurs ont défini pour chaque contaminant les concentrations pour lesquelles des effets biologiques sont rarement (en dessous des ERL et TEL), occasionnellement (entre les ER-L et ERM ou entre TEL et PEL) ou fréquemment rencontrés (au dessus des ER-M ou PEL). De cette façon, les seuils de toxicité développés prennent en compte les effets dus au mélange de contaminants ainsi que de nombreuses caractéristiques du sédiment.

Long *et al.* (1998, 2000), Ingersoll *et al.* (2000) ont vérifié la capacité de ces seuils à prédire la toxicité des sédiments, ainsi que la possibilité de les appliquer dans de nombreuses régions. De plus, ces auteurs les ont simplifiés et standardisés, afin de calculer des coefficients (QER-L et QER-M) prenant en compte tous les composés chimiques dosés et non pas seulement ceux dont la teneur dépasse la valeur seuil. Cette standardisation permet une utilisation plus facile de ces critères et une meilleure comparaison entre les études.

Ces seuils de toxicité permettent de classer les sédiments en fonction de leur toxicité potentielle (Long et Wilson, 1997 ; Long *et al.*, 1998, 2000), d'identifier les contaminants les plus problématiques, ainsi que les zones méritant être étudiées et/ou restaurées (Chapman *et al.*, 1998), de corréler des effets biologiques observés au niveau de contamination des sédiments (Ringwood *et*

al., 1999 ; Miller *et al.*, 2000) et d'interpréter des résultats analytiques obtenus lors de programmes de surveillance sur le plan du risque environnemental (Woodhead *et al.*, 1999).

Cependant, ils ne sont pas à l'heure actuelle reconnus par la législation et ne peuvent en aucun cas remplacer les tests de toxicité, d'accumulation ou les études sur les communautés benthiques (McCauley *et al.*, 2000) dans l'évaluation de la qualité d'un sédiment. En effet, la détermination de valeurs seuils de tous les composés toxiques n'est pas possible, de plus leur utilisation est souvent plus coûteuse que celle des bio-essais.

Plusieurs limites existent, notamment avec les sédiments présentant des contaminations intermédiaires (entre ER-L et ER-M). La biodisponibilité des contaminants, ainsi que la présence d'un composé non déterminé ou pour lequel il n'existe pas de valeur guide peuvent avoir un impact important sur la toxicité du sédiment. De plus, ils ne tiennent pas compte des produits de dégradation des composés organiques qui peuvent être plus toxiques que les composés parents. Enfin lors des études écotoxicologiques, les corrélations entre les effets biologiques et la qualité des sédiments définie à l'aide de ces seuils de toxicité ne permettent pas d'en déduire des relations de causes à effets et par conséquent d'identifier avec justesse les contaminants responsables des effets observés.

Ces critères de toxicité n'ont pas pour but d'évaluer avec exactitude la qualité d'un sédiment ou de remplacer la réalisation de tests biologiques, mais ils ont été développés pour donner un outil pratique et relativement fiable aux gestionnaires afin qu'ils puissent déterminer quelles sont les zones côtières, estuariennes et portuaires les plus impactées par une pollution, les classer en fonction de leur contamination, identifier celles qui doivent être restaurées en priorité et supporter ou recommander le développement de programme de surveillance de la qualité des sédiments.

L'utilisation de ces seuils de toxicité constitue des outils puissants pour évaluer la qualité d'un milieu lorsqu'ils sont couplés à des tests de toxicité, d'accumulation ou des études sur les communautés benthiques (Mac Donald *et al.*, 2000).

I.2.2 - Tests biologiques ou bioessais

I.2.2.1 - Problèmes rencontrés : prélèvement, stockage, choix de l'organisme

Les tests de toxicité effectués sur les sédiments présentent de nombreux avantages par rapport aux autres outils utilisés lors d'approches intégrées. Ils sont généralement moins coûteux à

mettre en œuvre, plus rapides et nécessitant un matériel beaucoup moins sophistiqué que les analyses chimiques ou faunistiques.

Ils donnent des informations uniques :

- (i) Ils intègrent les effets additifs, antagonistes ou synergiques qui peuvent exister entre les contaminants présents.
- (ii) Les relations «cause» à effet peuvent être démontrées en diluant le milieu testé (Swartz *et al.*, 1988, 1989).
- (iii) Une grande variété d'effets biologiques peut être étudiée, pour des périodes d'exposition variables, afin de prédire les impacts potentiels à différents niveaux d'organisation biologiques, tel que physiologique (luminescence, enzymatique, croissance), ontogénétique (développement), comportementales (déplacement, choix), populationnelle (reproduction et mortalité).

Cependant, les modifications géochimiques et géophysiques induites lors de l'échantillonnage, la manipulation et le stockage des sédiments constituent des facteurs limitatifs, en modifiant la toxicité initiale du sédiment (Lamberson *et al.*, 1992 ; Luoma, 1995).

Le sédiment *in situ* est situé dans un milieu ouvert, dynamique où il présente une partie oxiqne (en surface) et une partie anoxiqne en profondeur. La zone oxiqne peut varier de quelques millimètres à dix mètres dans les environnements oligotrophes et les fonds sableux (Luoma et Ho, 1993). Tous les modes de prélèvement entraînent des perturbations plus ou moins importantes de la structure du sédiment. Le carottage est la méthode la moins perturbatrice, elle permet de conserver le profil du sédiment, cependant son utilisation est limitée par la couche d'eau à traverser, par la dureté du sédiment (trop sableux) et par la quantité de sédiment à prélever (faible quantité ; ASTM, 1994a).

L'utilisation de la benne est beaucoup plus fréquente (Long *et al.*, 1990, 1996 ; Carr *et al.*, 1996a). Le modèle le plus utilisé est le type Van Veen (Meador *et al.*, 1990 ; Wolfe *et al.*, 1996 ; Thompson *et al.*, 1999). Ce mode de prélèvement entraîne une modification de la structure du sédiment, la perte des particules de surface et des composés très hydrosolubles ou volatiles (Burton, 1992b), ainsi que le mélange entre la partie oxiqne et anoxiqne du sédiment, modifiant la biodisponibilité des contaminants (Chapitre I § I.1.3.1).

Les organismes vivants se trouvent principalement dans la fraction oxygénée du sédiment qui est le lieu d'échanges avec la colonne d'eau. Par conséquent, pour les études écotoxicologiques, il est recommandé de n'utiliser que la couche oxydée des sédiments (Meador *et al.*, 1990 ; Dave et

Nilson, 1994 ; Carr *et al.*, 1996a). Cependant, comme les méthodes ou instruments qui permettent de mesurer l'épaisseur de la couche oxydée en milieu naturel ne sont pas facilement disponibles ou utilisables, les auteurs recommandent de ne prélever que les deux premiers centimètres de la surface du sédiment (Cardwell *et al.*, 1976 ; Chapman *et al.*, 1987, 1996 ; Burton, 1992b ; Burgess *et al.*, 1993 ; Luoma et Ho, 1993 ; Carr *et al.*, 1996c).

Les sédiments une fois prélevés, sont tamisés afin d'éliminer les débris grossiers, les organismes endogènes et de les homogénéiser pour avoir une bonne reproductibilité lors de leur utilisation (Meador *et al.*, 1990 ; Thompson *et al.*, 1999), toutefois, ceci engendre des modifications. Anderson *et al.* (2001) ont montré que l'eau à l'interface eau-sédiment est plus toxique avec les sédiments non homogénéisés. A l'inverse, selon Burgess et McKinney (1997), l'homogénéisation augmente la concentration des PCB dans la phase dissoute.

Avant leur utilisation, les sédiments sont généralement stockés dans des récipients en polyéthylène (Ciarelli *et al.*, 1998 ; Cripe *et al.*, 2000) ou en verre (Commendatore *et al.*, 2000). L'ASTM (1994a) recommande une conservation au frais (4°C), à l'abri de la lumière et de l'air pendant une durée maximale de deux semaines. Ces recommandations sont basées sur des observations relatives aux modifications de la structure géochimique des sédiments au cours du stockage et non sur l'évolution de leur toxicité (Thompson *et al.*, 1980 ; DeFoe et Ankley, 1998). Dans la littérature, la durée de stockage n'est pas toujours mentionnée et elle varie de quelques jours (Cardwell *et al.*, 1976 ; Swartz *et al.*, 1979 ; Chapman *et al.*, 1987, 1992, 1996 ; Magnuson *et al.*, 1996) à plusieurs années (Burgess *et al.*, 1993).

L'impact du mode et de la durée de stockage sur la toxicité des sédiments a fait l'objet de plusieurs études ; il est cependant très difficile d'en tirer une conclusion définitive. Phelps et Warner (1990), Stemmer *et al.* (1990), Beiras et His (1995), Beiras *et al.* (1998) et Wiederholm et Dave (1989) ont noté que la toxicité diminue au cours du stockage. Enfin, plusieurs auteurs montrent que la qualité varie de façon imprévisible (Malueg *et al.*, 1986 ; Dave et Nilsson, 1994 ; Becker et Ginn, 1995) ou ne varie pas (DeFoe et Ankley, 1998).

Le changement de toxicité lors du stockage résulte de plusieurs processus

- (i) Coagulation des acides humiques dans l'eau interstitielle pouvant diminuer la concentration en contaminants (Landrum *et al.*, 1987).
- (ii) Complexation et coprécipitation des métaux et ions sulfures lorsque le sédiment se réduit (Di Toro *et al.*, 1990).

- (iii) Dégradation bactérienne de la matière organique et production d'ammoniac (Moore *et al.*, 1995).
- (iv) Indépendamment des modifications précédentes, variations de la qualité biologique des organismes utilisés dans le test (DeFoe et Ankley, 1998).

En règle générale, ce sont les sédiments moyennement contaminés qui présentent les plus grandes variations lors du stockage. Les sédiments pas ou au contraire fortement contaminés ont une toxicité constante (Becker et Ginn, 1995 ; Beiras *et al.*, 1998 ; DeFoe et Ankley, 1998).

Certains auteurs congèlent ou lyophilisent les sédiments. Selon Malueg *et al.* (1986), la congélation entraîne une diminution de la toxicité des sédiments ; A l'inverse, Schuytema *et al.* (1989) n'ont noté aucun effet de la congélation, alors que Beiras *et al.* (1998) ont trouvé que la congélation et la lyophilisation exacerbent la toxicité des sédiments.

Tous les organismes vivants ne peuvent pas être utilisés comme organisme test ; pour ce faire, ils doivent répondre à différents critères (De Witt *et al.*, 1989 ; Lamberson *et al.*, 1992).

- (i) Ils doivent être facilement disponibles en nombre suffisant, soit dans le milieu naturel, soit en élevage.
- (ii) Leur sensibilité doit être constante dans le temps et celle des différents stades de leur vie doit être connue.
- (iii) Ils doivent supporter d'être manipulés (tamisage, prélèvement, transfert).
- (iv) Ils doivent être tolérants vis à vis de différents facteurs abiotiques (granulométrie, teneur en matière organique des sédiments, salinité et la température).
- (v) Ils doivent pouvoir être exposés aux contaminants sédimentaires dissous dans l'eau ou adsorbés sur les particules de sédiments.
- (vi) Ils doivent présenter un intérêt écologique et économique.
- (vii) Les espèces qui ont une grande répartition géographique sont préférées, afin de donner une grande importance écologique au test.
- (viii) Il est aussi préférable d'utiliser les espèces pour lesquelles une méthodologie standardisée existe ; ce qui permet la comparaison des résultats de différentes études plus facilement. S'il n'existe pas de procédure standardisée pour l'organisme choisi, sa sensibilité doit être comparée à celle des espèces couramment utilisées, à l'aide d'un toxique de référence.
- (ix) Les effets observés sur l'organisme au laboratoire doivent être en accord avec les modifications observées au niveau de la structure de la communauté benthique et avec les niveaux de contamination du milieu naturel.

- (x) Des tests chroniques (voir paragraphe suivant) doivent pouvoir être réalisés à différentes périodes de la vie de l'organisme.

I.2.2.2 - Bioessais en laboratoire : *sédiment contact, eau interstitielle, éluatriat*

Les premiers tests biologiques sur les sédiments datent des années 70, leur utilisation et leur développement se sont ultérieurement généralisés et ils ont été très rapidement recommandés en plus des analyses chimiques et benthiques, pour évaluer l'impact écologique des sédiments contaminés (Chapman et Long, 1983).

Il existe deux types de tests : aigus et chroniques. Un test est dit aigu lorsque l'exposition de l'organisme au sédiment ne correspond qu'à une faible période de sa vie. A l'inverse, il est dit chronique lorsque cette période est longue ou correspond à une phase critique de la vie de l'organisme (développement embryonnaire, métamorphose, etc.. ; Lamberson *et al.*, 1992). De la même façon un test est dit léthal si la réponse biologique étudiée est la mortalité de l'organisme, sinon il est dit subléthal.

Selon les études, les organismes sont exposés à différents traitements sédimentaires, le sédiment entier (sédiment contact), la phase liquide du sédiment qui peut être l'eau interstitielle ou un extrait (éluatriat) aqueux ou organique (à l'aide de solvant comme le diméthylsulfoxyde ou l'acétone) (Tableau I-5). L'utilisation des deux premiers traitements a pour but principal d'évaluer la toxicité des sédiments vis à vis des organismes benthiques et épibenthiques, en revanche, l'extrait aqueux permet d'étudier la toxicité d'un sédiment vis à vis des organismes pélagiques lors de sa remise en suspension. Cependant, dans la littérature, cette distinction n'est pas toujours très claire.

Sédiment contact

Le sédiment contact est un des meilleurs indicateurs de la toxicité des sédiments, les organismes pouvant être exposés simultanément au sédiment, à l'eau interstitielle et à l'eau de l'interface eau-sédiment, lors du test (Burton, 1992a). Il a été principalement développé et standardisé pour les amphipodes et les polychètes (ASTM, 1992, 1994b, 1994c ; EPA, 1994), mais est également utilisé avec des bivalves, des copépodes des décapodes et des bactéries (Tableau I-5).

Les amphipodes sont les plus utilisés pour les bioessais, car ils sont considérés comme les organismes benthiques les plus sensibles. Ce sont les premiers à disparaître lorsque le milieu est soumis à une contamination (Swartz *et al.*, 1982 ; Anderson *et al.*, 1998). La plupart des tests amphipodes ont une durée de 10 jours : on détermine le taux de mortalité et parfois la capacité à l'enfouissement (effet subléthal). La procédure du test est la suivante (Lamberson *et al.*, 1992 ; Luoma et Ho, 1993) : le sédiment de surface est prélevé (2 à 5 cm de surface) et est homogénéisé afin de permettre une bonne reproductibilité. 5 répliquats sont réalisés pour chaque prélèvement. Le sédiment est tamisé (élimination des débris et de la faune naturelle) et placé dans des béciers d'un litre sur une épaisseur de 2 cm recouverte par 750 ml d'eau de mer naturelle filtrée et aérée en continue. 20 amphipodes sont placés dans chaque bécier pendant les 10 jours. L'eau n'est pas changée et les organismes ne sont pas alimentés. Les amphipodes sont récupérés par tamisage et le pourcentage de mortalité est déterminé. La capacité à l'enfouissement est mesurée en remplaçant les animaux sur du sédiment non contaminé et en mesurant la vitesse à laquelle ils s'enfouissent. La procédure a été standardisée pour quatre espèces, *Rhepoxynius abronius*, *Eohaustorius estuarius*, *Ampelisca abdita* et *Grandidierella japonica*.

Rhepoxynius abronius est particulièrement recommandé (Long *et al.*, 1990, 1996 ; Chapman *et al.*, 1992), car il est très sensible aux contaminants, très bien représenté dans le milieu, et facile à maintenir en élevage. Cependant, il est également sensible aux fortes variations de salinité et à des fortes teneurs en particules fines dans les sédiments. DeWitt *et al.* (1988, 1989) ont développé un modèle permettant de différencier les effets dus aux caractéristiques des sédiments (% de particules fines) de ceux des contaminants.

L'espèce *Grandidierella japonica* a été recommandée par Nipper *et al.* (1989) car à l'inverse elle n'est pas sensible aux effets de la granulométrie. De la même façon *Eohaustorius estuarius*, *Leptocheirus plumulosus* et *Corophium sp.* ont été beaucoup utilisés car ils supportent des salinités de 0 à 34 (DeWitt *et al.*, 1989 ; Schlekot *et al.*, 1992 ; Hyne et Everett, 1998 ; Kravitz *et al.*, 1999 ; Chapman et Wang, 2001). L'espèce *Ampelisca abdita* s'est révélée moins sensible que *R. abronius* (Long *et al.*, 2000).

Tableau I-5 : Espèces les plus utilisées et les différents types d'exposition dans les tests de toxicité sur les sédiments marins et estuariens, classés selon leur fréquence d'utilisation.

Sédiment contact	Références
Amphipodes : mortalité, enfouissement, (10 jours)	
<i>Rhepoxynius abronius</i>	DeWitt <i>et al.</i> , 1989 ; Becker <i>et al.</i> , 1990 ; Long <i>et al.</i> , 1990, 1996 ; ASTM, 1992 ; Chapman <i>et al.</i> , 1992 ; EPA, 1994 ; Anderson <i>et al.</i> , 1998.
<i>Eohaustorius estuarius</i>	DeWitt <i>et al.</i> , 1989 ; ASTM, 1992 ; Burgess et Morrison 1994 ; EPA, 1994 ; Thompson <i>et al.</i> , 1999 ; Kravitz <i>et al.</i> , 1999.
<i>Ampelisca abdita et araucana</i>	Long <i>et al.</i> , 1990, 1996 ; ASTM, 1992 ; Burgess et Morisson 1994 ; EPA, 1994 ; Carr <i>et al.</i> , 1996c, 2000 ; Wolfe <i>et al.</i> , 1996 ; Larrain <i>et al.</i> , 1998.
<i>Grandidierella japonica</i>	Nipper <i>et al.</i> , 1989 (croissance en 28 jours) ; ASTM, 1992 ; Carr et Chapman 1992 ; Carr <i>et al.</i> , 1996b.
<i>Corophium Volutator</i>	Lourens <i>et al.</i> , 1995 ; Ciarelli <i>et al.</i> , 1998 ; Pellegrini <i>et al.</i> , 1999 ; Matthiessen <i>et al.</i> , 1998.
<i>Leptocheirus plumulosus</i>	ASTM, 1992 ; Schlekat <i>et al.</i> , 1992 ; EPA, 1994 ; McGee <i>et al.</i> , 1999 ; Bona <i>et al.</i> , 2000.
Polychètes : mortalité, croissance, (4 à 28 jours)	
<i>Neanthes arenaceodentata</i>	Chapman <i>et al.</i> , 1992 ; ASTM, 1994b ; Murdoch <i>et al.</i> , 1997 ; Anderson <i>et al.</i> , 1998.
<i>Dinophilus gyrociliatus</i>	Carr <i>et al.</i> , 1989 ; Long <i>et al.</i> , 1990.
<i>Arenicola marina</i>	Matthiessen <i>et al.</i> , 1998.
<i>Streblospio benedicti</i>	Chandler et Scott, 1991 ; Lee Ferguson et Chandler 1998.

Bivalves : mortalité et croissance (7 jours)

Mulinia lateralis

Burgess et Morrison 1994.

Bivalves : développement embryonnaire(24 h)

Crassostrea gigas

Quiniou *et al.*, 1997 ; His *et al.*, 1999b.

Copépodes : mortalité (4 jours)

Nitocra spinipes

Magnusson *et al.*, 1996.

Amphiascus tenuiremis

Wirth *et al.*, 1998.

Décapodes : mortalité (4 jours).

Paleomonetes pugio

Wirth *et al.*, 1998.

Microtox : luminescence (5, 10, 15 minutes)

Photobacterium phosphoreum

Quiniou *et al.*, 1997 ; Ringwood *et al.*, 1997 ; Pellegrini *et al.*, 1999 ; Bona *et al.*, 2000 ; Lau et Chu, 1999.

Eau interstitielle ou Elutriat

[®]Microtox : luminescence (5, 10, 15 minutes)

Photobacterium phosphoreum

Becker *et al.*, 1990 ; Pellegrini *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 2000.

Test d'embryotoxicité

Bivalves : pourcentages d'anomalies (de 24-48 heures).

Crassostrea gigas

Becker *et al.*, 1990 ; Van den Hurck, 1994, Van den Hurck *et al.* 1997 ; Chapman *et al.*, 1991, 1992 ; ASTM, 1994c ; Lourens *et al.*, 1995 ; Quiniou *et al.*, 1997 ; Fichet *et al.*, 1998 ; Thompson *et al.*, 1999 ; Pellegrini *et al.*, 1999 ; Miller *et al.*, 2000.

Mytilus sp.

Long *et al.*, 1990 ; Magnusson *et al.*, 1996 ; Thompson *et al.*, 1999.

Haliotis rufescens

Long *et al.*, 1996.

Mulinia lateralis

Wolfe *et al.*, 1996.

Echinodermes : pourcentages d'anomalies (de 48-96 heures).

<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	Long <i>et al.</i> , 1990, 1996. ASTM, 1995.
<i>Arbacia punctulata</i>	Carr et Chapman 1992, ASTM, 1995 ; Carr <i>et al.</i> , 1996a, 2000.
<i>Paracentrotus lividus</i>	His <i>et al.</i> , 1999b ; Fichet <i>et al.</i> , 1998.

Tests de spermiotoxicité

Bivalves : pourcentages d'œufs fécondés (2 heures).

<i>Crassostrea gigas</i>	Quiniou <i>et al.</i> , 1997.
--------------------------	-------------------------------

Echinodermes : pourcentages d'œufs fécondés (30 minutes).

<i>Arbacia punctulata</i>	Burgess <i>et al.</i> , 1993 ; Carr et Chapman 1995 ; Carr <i>et al.</i> , 1996a, 2000.
---------------------------	--

Extrait organique

[®]Microtox : luminescence (5, 10, 15 minutes)

<i>Photobacterium phosphoreum</i>	Jonhson et Long 1998 ; Matthiessen <i>et al.</i> , 1998.
-----------------------------------	--

Les polychètes ont été les premiers organismes qui ont permis de tester la toxicité des sédiments, mais ils sont moins sensibles que les amphipodes (Anderson *et al.*, 1998). L'espèce *Neanthes aranaceodontata*, très facile à maintenir en laboratoire et très bien représentée dans le milieu, est la plus employée. D'autres espèces sont également utilisées, *Dinophylus gyrotilatus*, *Arenicola marina*, *Capitella capitata* et *Streblospio benedicti* (Tableau I-5).

Les juvéniles de *Neanthes aranaceodontata* sont employés dans des tests de létalité (expositions comprises entre 4 et 10 jours), ou de croissance et de bioaccumulation après une exposition de 28 jours (Melzian, 1990). Le protocole est le même que pour les amphipodes, mais les organismes sont nourris lors de l'exposition de 28 jours, ce qui peut entraîner un biais.

Ces différents tests aigus, sensibles et standardisés, sont cependant relativement longs, nécessitant de l'espace et donc difficiles à utiliser en routine pour les études de monitoring. C'est la raison pour laquelle des bio-essais plus rapides ont été développés, sur des espèces non benthiques comme les bivalves, les copépodes et les décapodes (Lamberson *et al.*, 1992 ; Burton, 1992c ; Magnusson *et al.*, 1996). Quiniou *et al.* (1997) et His *et al.* (1999b) ont également utilisé les embryons de *Crassostrea gigas* en les exposant directement à différentes concentrations de

sédiments décantés. Ce test est rapide (24 h) et peut être qualifié de chronique puisqu'il consiste à évaluer l'impact des contaminants sur le développement embryonnaire, période cruciale et sensible de la vie de ces organismes (His *et al.*, 1999a).

Le test [®]Microtox est le plus rapide, il ne dure que quelques minutes : il consiste à évaluer l'impact de la contamination sédimentaire sur l'activité physiologique des bactéries marines *Photobacterium phosphoreum* (Pellegrini *et al.*, 1999). Cette activité est déterminée par la mesure de la luminescence de la bactérie qui diminue lorsque la toxicité augmente. Ce test simple, livré en kit, est rapide et sensible, mais semble affecté par la granulométrie quand il est appliqué directement aux sédiments (Ringwood *et al.*, 1997).

Eau interstitielle.

L'utilisation de l'eau interstitielle est une méthode alternative à la précédente. Ce traitement présente de nombreux avantages

- (i) Les concentrations en contaminants sont souvent corrélées avec les effets observés (Swartz *et al.*, 1986 ; Di Toro *et al.*, 1990, 1991 ; Ankley *et al.*, 1996a et b), c'est le compartiment sédimentaire considéré comme la principale voie de contamination des organismes benthiques (Ankley *et al.*, 1991 ; Di Toro *et al.*, 1991). Les modèles de partage et d'évaluation de la toxicité des sédiments sont basés sur l'estimation de sa teneur en contaminants.
- (ii) Il permet d'éliminer les artéfacts liés aux caractéristiques du sédiment, comme la granulométrie (Carr *et al.*, 1989 ; Luoma 1983 ; Chapman, 1989).
- (iii) On peut utiliser les bioessais mis au point pour évaluer la qualité biologique des eaux, qui sont des tests plus anciens, mieux standardisés (pour huîtres et oursins, ASTM, 1994c, 1995), plus rapides et très sensibles (Carr *et al.*, 1989 ; Dinnel, 1995 ; His *et al.*, 1999a et b).

La méthode d'extraction de l'eau interstitielle n'est pas standardisée. Elle peut se faire par centrifugation (Landrum *et al.*, 1987 ; Giesy *et al.*, 1988), par pression (Carr et Chapman, 1992 ; Carr *et al.*, 2000), par filtration, souvent indispensable à la suite des deux premières techniques, (Swartz *et al.*, 1988 ; Carr *et al.*, 1989 ; Carr et Chapman, 1995) et enfin par dialyse directement dans le milieu naturel (Di Toro *et al.*, 1990 ; Burton, 1992b). Chacune des techniques présente des avantages et inconvénients.

La méthode *in situ* permet d'obtenir des eaux interstitielles ayant les caractéristiques les plus proches de celles du milieu naturel, cependant c'est une technique très lourde à mettre en œuvre qui ne permet de récupérer que de très faibles volumes (Burton, 1992b).

Les techniques de laboratoire sont donc les plus utilisées. La centrifugation (2000 à 5000g pendant 10 à 60 minutes ; Carr et Chapman, 1995 ; Carr, 1998) permet de récupérer les quantités d'eau interstitielle les plus importantes tout en minimisant les modifications physico-chimiques.

L'extraction par centrifugation ou par pression conserve des particules fines dans l'eau interstitielle ; une filtration ou une seconde centrifugation sont donc souvent nécessaires. Carr et Chapman (1995) recommandent une seconde centrifugation afin de limiter les pertes de polluants, notamment pour les échantillons contaminés par les HAP qui peuvent s'adsorber sur le matériel de filtration. Ces deux auteurs ont également montré que la congélation n'affecte pas la toxicité de l'eau interstitielle si elle est exempte de toutes particules.

L'extraction modifie plus ou moins les caractéristiques physico-chimiques de l'eau interstitielle et donc la spéciation et la biodisponibilité des contaminants. Par exemple, si une eau interstitielle obtenue à l'aide d'un sédiment anoxique contient du fer et du manganèse et qu'elle est mise en contact de l'oxygène, les oxydes de fer et de manganèse précipitent, adsorbent des métaux et diminuent ainsi leur toxicité. L'obtention d'eau interstitielle pauvre en oxygène est couramment rencontrée, cependant ceci est incompatible avec la réalisation de bioessais (nécessité de la présence d'oxygène pour les organismes) et doit être réoxygénée. Les bioessais à partir de l'eau interstitielle de sédiments réduits sous estiment donc leur toxicité (Meador *et al.*, 1990).

L'utilisation de l'eau interstitielle pose également le problème des fortes teneurs en ammoniac (Burgess *et al.*, 1993), composé très toxique pour de nombreux organismes marins (Kohn *et al.*, 1994). L'ammoniac peut se former très rapidement dans un sédiment prélevé et stocké au frais (Carr *et al.*, 1989) ; l'extraction de l'eau interstitielle doit donc être réalisée juste après le prélèvement, ce qui n'est pas toujours le cas.

Le bioessai le plus utilisé avec l'eau interstitielle est le test de spermiotoxicité et d'embryotoxicité chez les oursins et les bivalves (Tableau I-5). La spermiotoxicité consiste à étudier l'impact des contaminants sur le pouvoir fécondant du sperme. Celui-ci est mis en contact avec différentes concentrations d'eau interstitielle pendant une durée allant de 20 à 75 min (Dinnel, 1995 ; Warnau *et al.*, 1996), puis il est utilisé pour féconder des œufs. Après 30 min de contact entre les gamètes, le pourcentage d'œuf fécondé est déterminé. Pour le test d'embryotoxicité, ce sont les œufs fécondés en eau propre qui sont exposés à différentes concentrations d'eau

interstitielle afin de voir les effets sur le développement embryonnaire. La durée varie de 24 et 48 h selon l'espèce utilisée.

Carr et Chapman (1992), Carr *et al.* (1996b) ont montré que l'utilisation de l'eau interstitielle avec le test d'embryotoxicité et de spermioxicité chez les oursins est beaucoup plus sensible que le test d'amphipode avec le sédiment contact. Ces auteurs recommandent donc leur utilisation pour les études de monitoring. Le test d'embryotoxicité, aussi bien chez les échinodermes que les bivalves s'est révélé plus sensible que le test de spermioxicité vis à vis de nombreux contaminants (Nacci *et al.*, 1986 ; Ringwood, 1992 ; Carr et Chapman, 1992 ; Vashchenko et Zhadan, 1993).

Le test Microtox est également utilisé avec ce traitement, la bactérie *Photobacterium phosphoreum* est mise en présence d'eau interstitielle pendant 5 à 15 min. La luminescence des bactéries est alors mesurée, plus elle diminue, plus l'eau interstitielle est toxique.

Elutriat

L'élutriat permet de faire passer les contaminants du sédiment vers une phase liquide (Tableau 5). On mélange le sédiment avec de l'eau de mer non contaminée, puis la phase aqueuse est testée. Plusieurs méthodes d'agitation ont été utilisées : agitateur rotatif (Cardwell *et al.*, 1976 ; Chapman et Morgan, 1983 ; Williams *et al.*, 1986 ; Becker *et al.*, 1990), agitation magnétique (Beiras et His, 1995 ; Fichet *et al.*, 1998), agitateur secoueur pour fioles et flacons (Thain, 1992 ; His *et al.*, 1999b) ou agitation à la main (Long *et al.*, 1990).

Deux grandes méthodes ont été standardisées pour la réalisation des élutriats (Chapman *et al.*, 1992). La première est couramment utilisée en Angleterre et en Europe, elle consiste à mélanger le sédiment et l'eau de mer dans un rapport de, d'agiter l'ensemble, de laisser décanter. Puis l'eau surnageante est récupérée et testée avant ou après filtration (Long *et al.*, 1990 ; US EPA/OCE dans Meador *et al.*, 1990 ; Melzian, 1990). La seconde méthode, plus utilisée en Amérique du Nord, consiste à prendre une suspension de sédiment à 20g l⁻¹, de l'agiter, de la laisser décanter, sans retirer le sédiment pendant l'exposition des organismes (Chapman et Morgan, 1983 ; Chapman *et al.*, 1992). C'est ce que les biologistes français appellent le sédiment contact (Quiniou *et al.*, 1997 ; His *et al.*, 1999b).

Pour les deux méthodes, le temps d'agitation varie de 10 s (Chapman *et al.*, 1992) à 24 h (Van den Hurck, 1994) et la durée de décantation est comprise entre 1 h (Long *et al.*, 1990) et 8 h (Beiras et His, 1995 ; Beiras *et al.*, 1998). Le temps d'agitation doit être suffisant pour saturer l'eau

avec la fraction de contaminants remobilisables, ce qui est un phénomène complexe (Chapitre I § I.1.3.3) et dépend de chaque contaminant.

L'utilisation des éluviats est très controversée. Leur réalisation entraîne une modification très importante des paramètres physico-chimiques des sédiments (en particulier pour les sédiments anoxiques), de la spéciation et de la biodisponibilité des contaminants. (Chapitre I § I.1.3). Chapman et Morgan (1983), Chapman *et al.* (1987) et Long *et al.* (1990) ont montré que leur utilisation donne des résultats semblables aux tests avec le sédiment contact chez les amphipodes.

A l'inverse, Lee et Jones, (1982), Luoma et Ho, (1983) et Thompson *et al.* (1999), n'ont établi aucune corrélation entre les effets biologiques des éluviats et le niveau de contamination des sédiments. Ils ne préconisent l'utilisation des éluviats que pour évaluer la toxicité des contaminants relargués dans la colonne d'eau lors d'une remise en suspension. Dans ce dernier cas, les modifications engendrées par l'oxygénation du sédiment lors de la préparation de l'éluviat ont pour but de reproduire les phénomènes du milieu naturel.

Extraits organiques

Un solvant organique (diméthylsulfoxyde ou acétone) permet et de tester la toxicité des composés présents dans un sédiment. C'est le test [®]Microtox qui est le plus utilisé avec ce type d'extrait (Carr *et al.*, 1996a ; Jonhson et Long 1998 ; Matthiessen *et al.*, 1998). Cependant cette méthode n'a aucune signification écologique et a pour but une utilisation comme outil de screening, car elle est rapide et simple. Ziehl et Schmitt (2000) ont récemment montré que l'utilisation du DMSO pour extraire les composés organiques d'un sédiment est déconseillée. La biotransformation de ce solvant par les bactéries d'origine sédimentaire, lors de la fabrication de l'éluviat, peut engendrer la formation de métabolites toxiques pour la bactérie utilisée et par conséquent entraîner une diminution de sa luminescence.

Peu d'études ont comparé simultanément la toxicité des différents traitements sédimentaires. En règle générale, les auteurs utilisent différents organismes pour chaque traitement (Long *et al.*, 1990 ; Chapman *et al.*, 1991, 1992 ; Matthiessen *et al.*, 1998). Seuls Ankley *et al.* (1991) en milieu dulçaquicole et Burgess *et al.* (1993) et Burgess et McKinney (1997) ont comparé la sensibilité du sédiment total, de l'eau interstitielle et de l'éluviat en utilisant les mêmes organismes tests dans chaque cas. L'eau interstitielle est plus toxique que le sédiment total qui est plus toxique que

l'élutriat. La forte toxicité de l'eau interstitielle peut dans certain cas être attribuée à la présence d'ammoniac (Burgess *et al.*, 1993)

En résumé, les auteurs utilisent régulièrement le sédiment total à l'aide d'organismes benthiques. En ce qui concerne les phases aqueuses, ils utilisent soit l'eau interstitielle, soit l'élutriat, mais rarement les deux. L'eau interstitielle est recommandée pour évaluer la toxicité des sédiments vis à vis des organismes benthiques, au même titre que le sédiment total, mais à l'aide d'organismes pélagiques avec des réponses plus rapides. L'utilisation d'élutriat permet d'évaluer la toxicité des contaminants relargués dans la colonne d'eau lors de la remise en suspension d'un sédiment.

I.2.2.3 - Bioessais *in situ*

Les tests *in situ* sont des outils très intéressants aussi bien pour valider les bioessais réalisés en laboratoire que pour évaluer la toxicité d'un sédiment dans son milieu. Contrairement aux tests en laboratoire, les bioessais *in situ* prennent en compte les variations spatio-temporelles des facteurs environnementaux.

On cherche à adapter les tests de laboratoire au milieu naturel, ce qui permet entre autres, de mettre en évidence l'impact de l'échantillonnage.

Les principaux bioessais *in situ* développés ne concernent que les sédiments d'eau douce avec des poissons (Harries *et al.*, 1996), des daphnies, *Daphna magna* (Pereira *et al.*, 1999, 2000), des chironomes (Chappie et Burton 1997 ; Crane *et al.*, 2000) et des amphipodes (Chappie et Burton, 1997 ; Schulz et Liess, 1999).

Les effets biologiques observés sont plus importants au laboratoire que dans le milieu naturel (Chappie et Burton, 1997 ; Sasson-Brickson et Burton, 1991 ; Pereira *et al.*, 2000). Cette augmentation de toxicité est attribuée à la déstructuration du sédiment lors de son prélèvement, de son stockage et de sa manipulation. Crane *et al.* (2000) et Meregalli *et al.* (2000) ont mis en évidence l'efficacité de tels tests *in situ* en observant une bonne corrélation entre les effets biologiques et le niveau de contamination des sédiments.

A l'heure actuelle, à notre connaissance, aucun test *in situ* n'a été proposé pour évaluer la toxicité des sédiments marins et estuariens.

I.2.3 - Espèce choisie dans cette étude : *Crassostrea gigas*

Dans cette étude, différentes espèces ont été utilisées, l'huître (*Crassostrea gigas*), la moule (*Mytilus galloprovincialis*) et l'oursin (*Paracentrotus lividus*). Comme nous le verrons

ultérieurement, c'est l'huître qui a été retenue dans la majorité des expérimentations. Nous rappellerons donc brièvement les grandes lignes de sa reproduction.

Crassostrea gigas est l'huître japonaise originaire de l'Asie. Elle a été importée en France à la suite de la disparition de *Crassostrea angulata*. Elle est euryhaline et colonise à l'état naturel aussi bien sur la côte, dans les baies et les estuaires. C'est l'espèce d'huître dont l'aire de répartition géographique est la plus importante (Chew, 1990), ce qui explique son utilisation très fréquente en écotoxicologie marine.

Crassostrea gigas est une espèce hermaphrodite alternative, c'est à dire que des changements de sexe plus ou moins réguliers s'observent au cours de sa vie. Il existe une protandrie, environ 70% des individus de la population sont des mâles la première année, puis 50 % la deuxième et enfin ce sont les femelles qui sont dominantes chez les individus plus âgés, ce qui explique le choix de géniteurs de deux ans pour la conduite des tests, afin d'augmenter les chances de disposer d'individus des deux sexes dans un même pool de géniteurs.

I.2.3.1 - Gamétogenèse et ponte

L'anatomie de son appareil reproducteur est simple. Il est constitué de tubules qui se développent progressivement lors de la gamétogenèse. En plein été, lorsque la maturité est atteinte, les produits sexuels représentent jusqu'à 50% du volume corporel.

La gamétogenèse dépend de plusieurs facteurs environnementaux, essentiellement la nourriture et la température. Elle dépend également de facteurs internes, hormonaux.

A la fin de la gamétogenèse, la maturation des gamètes intervient, cette étape ne peut être discernée ni macroscopiquement, ni microscopiquement. Un état physiologique particulier appelé « la phase instable » est atteinte (Galtsoft, 1964): l'application d'un ou plusieurs stimuli provoque la ponte ou l'éjaculation (chocs thermiques, variations de salinité ou différences de pression).

Il est possible d'obtenir des sujets mûrs toute l'année en éclosion, par la technique du conditionnement (Loosanoff et Davis, 1963). Ceci présente un avantage majeur pour la conduite des études écotoxicologiques. La maturation est soit provoquée, par le maintien des animaux à une température de 20°C en présence de nourriture, soit retardée par abaissement de la température à 15°C (Loosanoff et Davis, 1963).

L'éjaculation se produit sous forme d'un mince filet continu blanc, sans mouvement valvaire spécifique, bien que l'amplitude d'ouverture soit plus importante qu'en temps normal. A l'inverse,

la ponte s'accompagne d'une activité valvaire particulière qui s'observe pendant toute l'émission avec une rythmicité remarquable. La valve droite operculaire se soulève lentement avec une amplitude inhabituelle, puis marque un léger palier et enfin s'abaisse brutalement pour provoquer l'expulsion des ovocytes. Cette différence de comportement est mise à profit, lors des tests pour reconnaître les individus des deux sexes.

I.2.3.2 - Développement embryonnaire, larvaire et fixation

La fécondation, externe, intervient quelques minutes après la rencontre des gamètes mâles et femelles ; l'élévation de la membrane de fécondation (observée chez des organismes comme l'oursin) a été remise en question récemment (Cherr *et al.*, 1990). Il s'agirait plutôt d'une opacification plus ou moins marquée de la membrane ovocytaire, après la pénétration du spermatozoïde.

La fécondation déclenche la fin de la maturation des ovocytes. En effet chez l'huître le gamète femelle reste au stade d'ovocyte de 1^{er} ordre (à 2n chromosomes) jusqu'à la ponte (stade métaphasique de la méiose). La réduction chromosomique s'effectue donc après la fécondation et s'accompagne de l'émission du globule polaire. C'est cette caractéristique qui est habituellement prise en compte pour déterminer le succès de la fécondation au cours des tests de spermitoxité chez les bivalves (Ringwood, 1992).

La segmentation, de type spiral (divisions successives à angle droit), aboutit à la formation du stade morula (phase d'émergence ; Galtsoff, 1964). La division des micromères (pôle animal) est plus rapide que celle des macromères (pôle végétatif), finissant par envelopper le pôle végétatif. A ce stade c'est la blastula qui est entièrement ciliée et qui gagne la colonne d'eau (phase d'émergence). La gastrulation se fait par épibolie (recouvrement) des micromères sur les macromères et par une invagination qui donne l'endoderme, communiquant avec l'extérieur par un petit blastopore. La gastrula est le dernier stade embryonnaire.

Le premier stade larvaire, la trochophore, apparaît 12 h après la fécondation. Il se caractérise par une couronne de cils au pôle apical, la prototroche qui lui permet de nager. Le stade larvaire suivant est la véligère, ainsi appelée à cause de son vélum, organe cilié, en forme de voile, qui lui permet de nager et de capturer des particules alimentaires. A ce stade, les organismes sortent de la phase endotrophe et commencent à pouvoir s'alimenter. Le vélum est rétractable dans la coquille larvaire (prodissoconque I).

Au cours de la croissance larvaire, différentes étapes peuvent être reconnues :

- La larve D (hauteur moyenne de 60 μm , photographie I-1). Elle est obtenue en 24 h à une température de 24°C et se caractérise par une charnière droite, ce qui lui confère une forme générale de D. C'est le stade ultime qui est utilisé dans les tests d'embryotoxicité (Chapitre I § I.2.1.3).

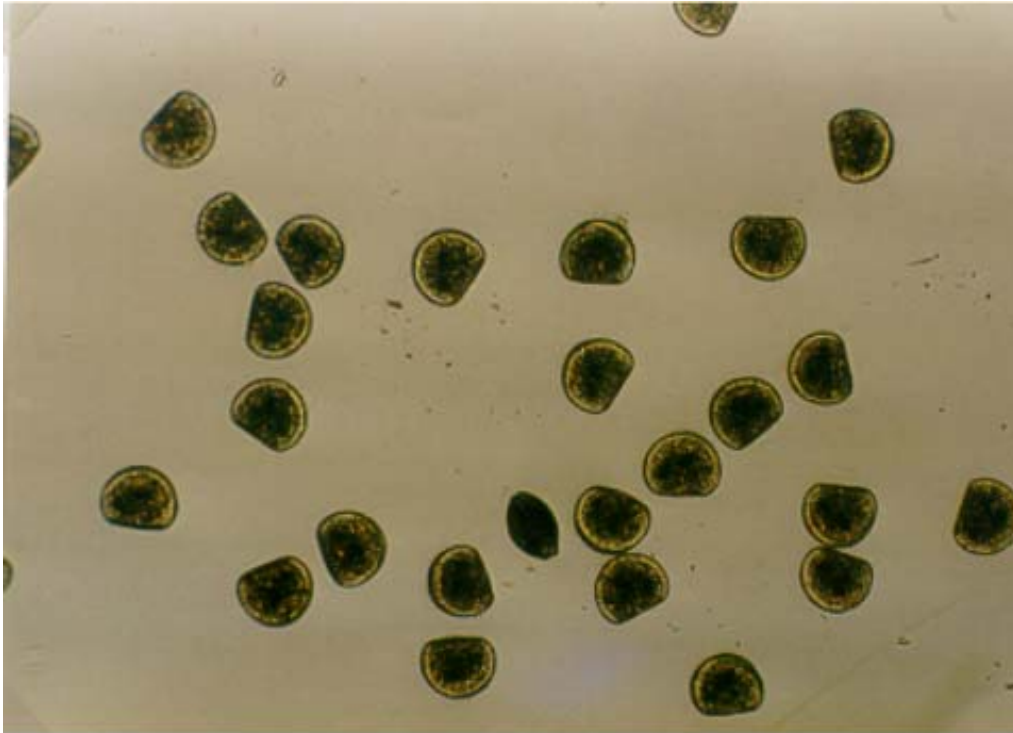
- La larve umbonée (d'un hauteur de 100 à 250 μm , photographie I-2). La charnière devient bombée entre le quatrième et le cinquième jour, c'est l'umbo ou crochet qui devient de plus en plus proéminent, avec l'augmentation de taille. A ce stade la coquille larvaire est beaucoup plus calcifiée et est appelée la prodissoconque II.

- La pédivéligère (hauteur > 250 μm , photographie I-3). Elle apparaît vers le 15^{ème} jour et est caractérisée par la présence simultanée d'un pied, du vélum et de la tâche oculaire (organe sensoriel).

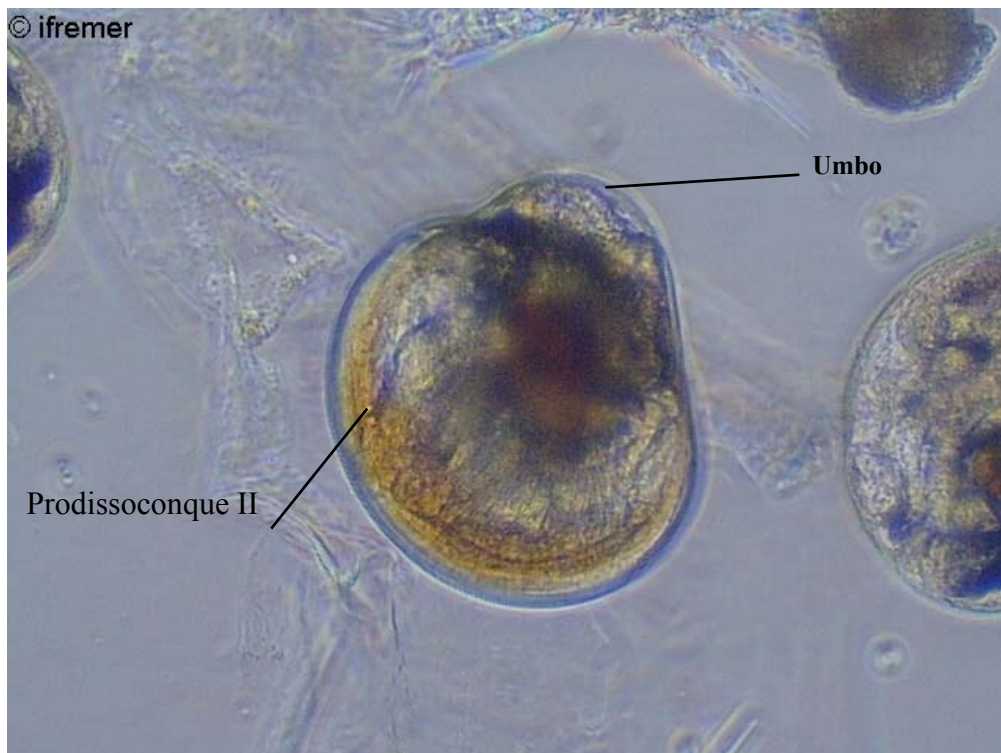
La pédivéligère devient compétente à la métamorphose (photographie I-4). Son pied lui permet de ramper et de choisir un substratum favorable (signal de surface). Elle se fixe alors grâce à un ciment (substance fluide) sécrété par une glande située à la base de son pied. Elle subit la métamorphose (Fig. 2) pour donner le stade plantigrade ou "naissain", avec sécrétion de la coquille définitive (dissoconque ; photographie I-5). Si elle ne détecte pas le signal, la pédivéligère redevient pélagique. La métamorphose peut être différée de plusieurs jours.

La métamorphose s'accompagne de profondes modifications anatomiques : le vélum et le pied disparaissent ; les branchies permettent dorénavant la capture de la nourriture et la respiration ; l'animal à l'état naturel, vit fixé sur son support ; il sécrète la coquille définitive, la dissoconque. Pendant ces phénomènes, compte tenu des modifications anatomiques précédemment mentionnées, la pédivéligère ne peut s'alimenter (Bayne, 1976), ce qui est un avantage pour l'utilisation dans les bioessais.

La métamorphose peut être induite chez les larves "compétentes", par action d'un médiateur chimique tel que l'épinéphrine - adrénaline (Coon *et al.*, 1985 ; Coon et Bonar, 1986 ; Beiras et Widdows, 1995). On peut alors observer la sécrétion de la dissoconque, mais la fixation sur le support est inhibée ; les juvéniles n'adhèrent pas aux parois des récipients d'élevage et peuvent donc être facilement observés et dénombrés pour la lecture du test. Outre l'intérêt économique en éclosion (production de naissains « un à un »), cette particularité a été mise à profit lors d'études écotoxicologiques pour étudier l'action de contaminants ou sédiments pollués sur la métamorphose des huîtres (Phelps et Warner, 1990 ; His *et al.*, 1997a).



Photographie I-1 : Larve D de *Crassostrea gigas* (hauteur moyenne de 60 à 70 μm). Noter la charnière droite.



Photographie I-2 : Larve de *Crassostrea gigas* umbonée (hauteur de 200 μm).

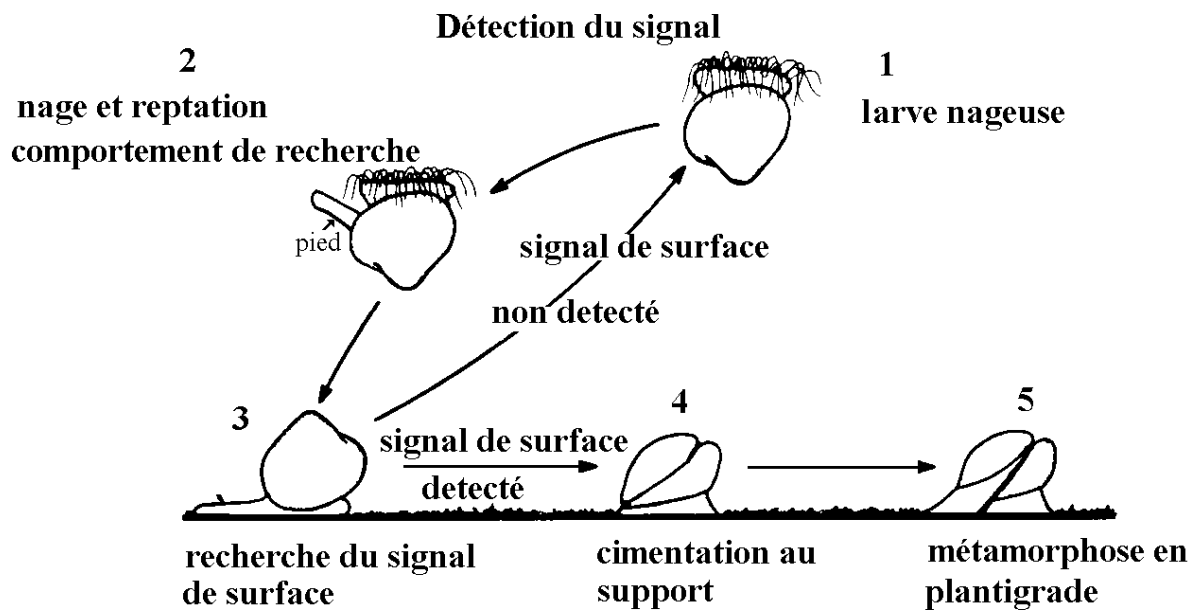
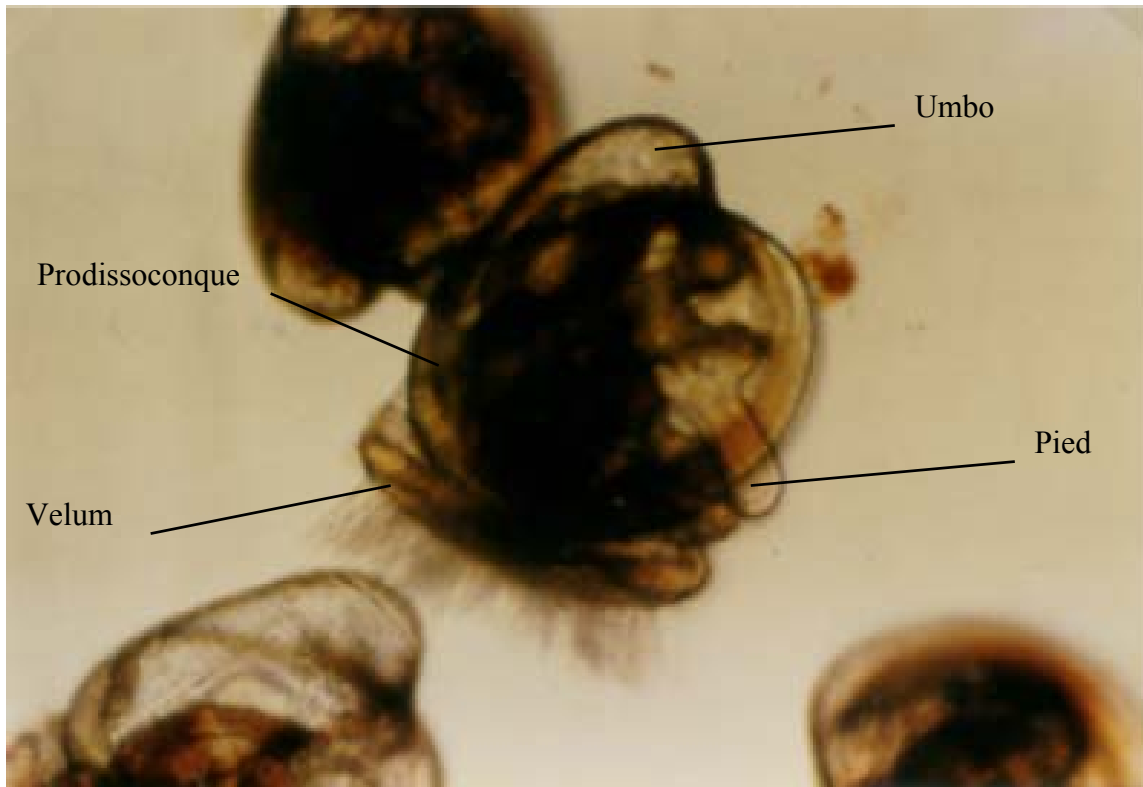


Figure I-2 : Schéma de la fixation chez *Crassostrea gigas* (passage de la vie larvaire pélagique à la phase adulte benthique par la métamorphose). 1, 2 et 3 : choix du support avec rôle des organes sensoriels (tâche oculaire en particulier). 4 et 5 : sécrétion du ciment de fixation par le pied et passage au stade plantigrade (Weiner *et al.*, 1989).

I.2.3.3 - Sensibilité des embryons de *C. gigas*

Lors d'une récente synthèse bibliographique, His *et al.* (1999a) ont montré que les sensibilités des embryons de bivalves les plus couramment utilisés (*Crassostrea gigas*, *C. virginica*, *C. rhizophorae*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *Mulinia lateralis*) sont très voisines vis à vis de nombreux contaminants. Toutefois, *C. gigas* présente l'avantage d'avoir le développement embryonnaire le plus rapide ; 24 h, contre 48 h chez *Mytilus sp.* et *Mulinia lateralis*.

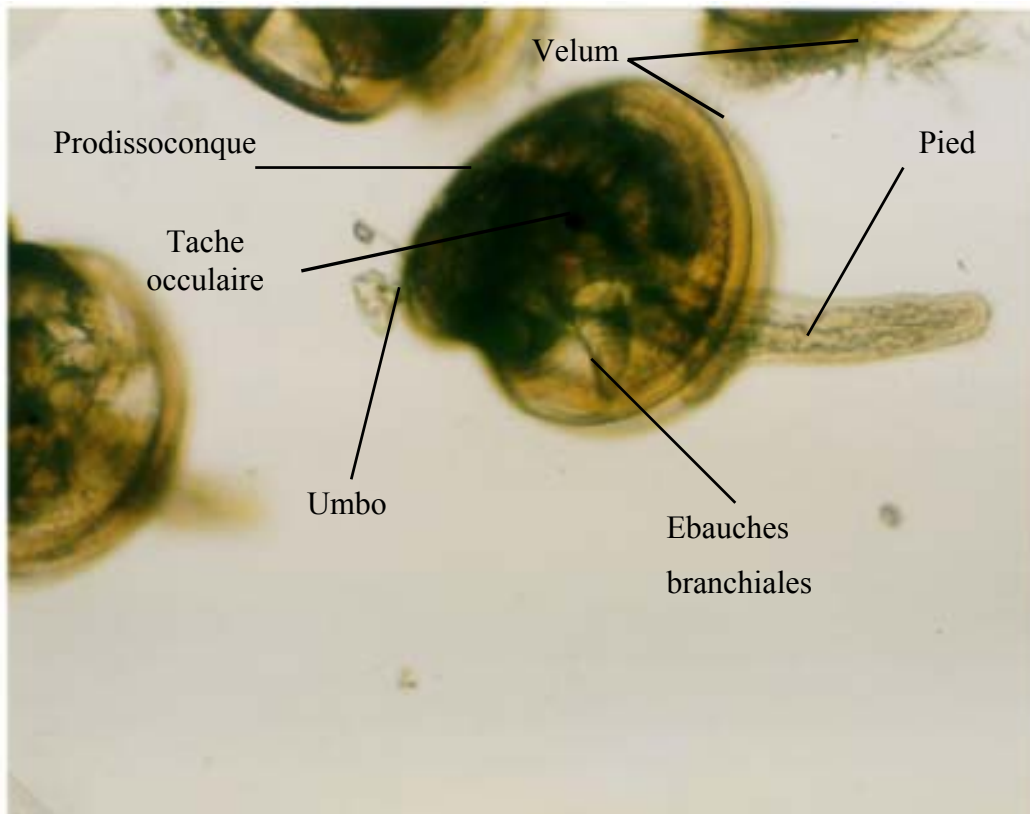
La sensibilité des embryons de *C. gigas* vis à vis de métaux peut être classée de façon décroissante de la manière suivante ; les valeurs entre parenthèses correspondent aux concentrations effectives ayant entraîné 50 % d'anomalies dans la population larvaire (EC50) : Hg (6-13 µg/l) = Cu (6-12 µg/l) < Ag (8-20µg/l) < Zn (100-250 µg/l) < As (300 µg/l) < Ni (350 µg/l) < Cd (600µg/l) < Pb (750 µg/l) < Cr (4500 µg/l) (Okubo et Okubo, 1962 ; Coglianese et Martin, 1981 ; Martin *et al.*, 1981 ; His et Robert, 1982 ; Zhadan *et al.*, 1992 ; Beiras et His, 1994).



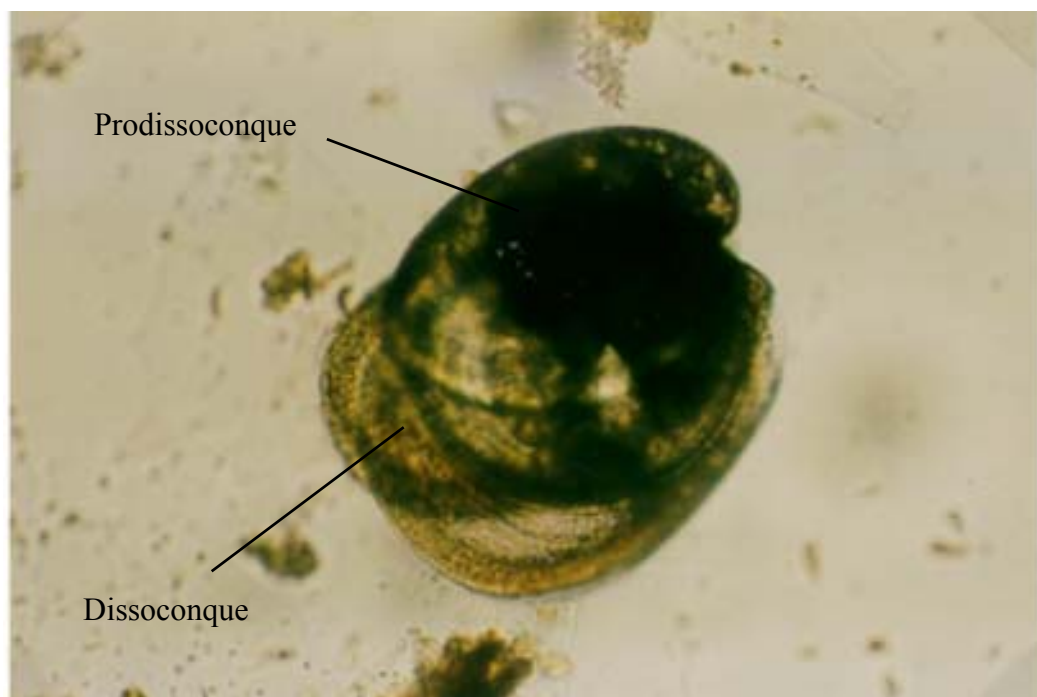
Photographie I-3 : Pédiveligère de *Crassostrea gigas* (hauteur moyenne de 320 μm).

His et Seaman (1993) ont testé plusieurs pesticides et ont montré qu'en général, ces composés sont toxiques pour des concentrations inférieures à 100 $\mu\text{g/l}$. A l'inverse, cette espèce semble peu sensible aux herbicides (Robert *et al.*, 1986). Il n'existe pas de données sur la toxicité intrinsèque des HAP vis à vis des embryons de *C. gigas*. La totalité des études menées, concernent l'évaluation de la toxicité des fractions solubles des pétroles. His *et al.* (1999a) ont rapporté que les pétroles raffinés sont plus toxiques que les pétroles bruts.

A partir des synthèses de Taylor (1978, 1981a, 1981b), de His *et al.* (1999a) et de McPherson et Chapman (2000), il est possible de constater que l'embryon de *C. gigas* est plus sensible, vis à vis des métaux et des hydrocarbures, que les autres organismes marins couramment utilisés tels que les polychètes (*Nenathes arenaceodentata*, *Capitella capitata*, *Nereis virens*), les amphipodes (*Ampelisca abdita*, *Corophium volutator*), les poissons (*Lates calcarifer*), les bivalves adultes (*Crassostrea gigas*, *Mytilus sp.*, *Mulinia lateralis*), les crustacés (*Mysidopsis bahia*, *Artemia salina*, *Elminius modestus*, *Balanus improvisus*) et les bactéries (*Photobacterium phosphoreum*). A l'inverse, les embryons de *Crassostrea gigas* se sont révélés moins sensibles que les crustacés et les arthropodes vis à vis des pesticides et d'autres biocides (Tagatz et Ivey, 1981 ; Thain *et al.*, 1990).



Photographie I-4 : Pédivéligère de *Crassostrea gigas* en cours de métamorphose (hauteur moyenne de 302 μm). Noter la présence du pied et des 4 ébauches branchiales.



Photographie I-5 : Larve métamorphosée de *Crassostrea gigas*. Stade plantigrade (juvénile), hauteur 350 μm . Noter la présence de la coquille définitive (dissoconque), encore peu calcifiée et la perte du pied.

But des Travaux

Les sédiments estuariens, côtiers et portuaires, localisés à l'interface des zones océaniques et continentales forment un réservoir ultime pour de nombreux contaminants connus ou inconnus et constituent ainsi un danger pour tous les organismes vivants. La frange littorale se caractérise par une grande biodiversité et sert de nourricerie et de lieu de reproduction pour de nombreuses espèces ; elle est aussi très souvent le siège d'activités aquacoles et mérite donc d'être protégée. Il est devenu nécessaire d'évaluer le risque que représentent aussi bien les sédiments déposés que leur remise en suspension lors d'opération de dragage ou simplement sous l'effet des phénomènes naturels de houle.

Les travaux de cette thèse ont pour but de développer des tests biologiques sensibles, rapides, simples et fiables permettant d'évaluer le risque que constitue un sédiment contaminé vis à vis des organismes benthiques et pélagiques et d'aborder la biodisponibilité des contaminants sédimentaires.

Dans une première partie, la sensibilité de différents stades de développement chez deux organismes couramment utilisés en écotoxicologie marine (*Crassostrea gigas* et *Paracentrotus lividus*) a été comparée. Une fois l'organisme test choisi, il a été utilisé pour étudier et comparer la toxicité de deux traitements sédimentaires, le sédiment contact et l'élutriat, afin d'évaluer sa capacité à déterminer la qualité d'un sédiment. De plus et dans un objectif de standardisation, l'impact du mode et de la durée de conservation des sédiments sur leur toxicité a été étudiée.

Dans une seconde partie, la biodisponibilité des xénobiotiques a été abordée à l'aide de trois sédiments modèles frais (Arès, Bidassoa et Dunkerque) et un lyophilisé (le Cheyzin). La bioaccumulation des contaminants et l'induction de métallothionéines (dans le cas d'une contamination métallique) chez les organismes tests ont été déterminées, afin d'augmenter non seulement la spécificité, mais également la sensibilité des tests, en observant des réponses au niveau cellulaire et non plus chez l'organisme entier.

Dans une dernière partie et afin d'étudier la toxicité d'un milieu de façon la plus juste possible, un test *in situ* a été mis en place.

Le but ultime de ce travail est d'une part de donner une démarche simple, rapide et sensible pour évaluer la toxicité des sédiments marins profonds, estuariens et marin côtiers, lors d'études de biomonitoring, mais aussi, de développer des outils biologiques extrêmement sensibles pouvant être utilisés dans des démarches d'évaluation de risque chimiques et écotoxicologiques.

Chapitre II : Matériels et Méthodes

Ce chapitre précise l'origine, le mode de stockage et le traitement des sédiments pour leur utilisation dans les bioessais afin d'évaluer leur qualité, ainsi que les méthodes utilisées pour leur caractérisation physico-chimique.

II.1 - Sédiments

II.1.1 - Prélèvement et stockage

Les sédiments choisis pour cette étude proviennent de onze sites côtiers, estuariens ou portuaires (Figure II-1). Le sédiment du Cheyzin (estuaire de la Gironde), d'Arès, de Gujan, de l'Île aux Oiseaux, les Argiles (Bassin d'Arcachon), de l'estuaire de l'Adour (deux sites), de la Nivelle et de la Bidassoa (Pays Basque Atlantique) ont été prélevés à la main, à marée basse. Seuls les sédiments de surface (les 2 à 5 cm premiers centimètres) ont été récupérés ; ils représentent la zone la plus habitée mais aussi la plus susceptible d'être remise en suspension lors des marées, sous les effets de la houle et des tempêtes. Deux boues portuaires ont également été utilisées, l'une provenant de Dunkerque et l'autre d'Arcachon. Elles ont été obtenues à la benne Van-Veen. Les différentes dates de prélèvements et les coefficients de marée correspondants sont portés dans le tableau II-1.

Les sédiments ont été acheminés au laboratoire dans une glacière (à 4°C), tamisés frais à 2 mm afin d'éliminer les débris grossiers et de les homogénéiser.

Les bioessais, les analyses granulométriques et la teneur en matière organique ont été étudiés sur les sédiments frais, stockés à 4°C, à l'obscurité, à l'abri de l'air et pour une durée inférieure à deux semaines.

Pour les analyses chimiques, les sédiments ont été congelés (-30°C) pendant 24 h, puis lyophilisés et conservés à 4°C, à l'abri de la lumière et de l'air.

II.1.2 - Traitements sédimentaires

Trois traitements sédimentaires ont été utilisés pour les bio-essais, le sédiment contact, l'élutriat brut et filtré.

Le sédiment contact est préparé en mélangeant du sédiment (soit frais, soit lyophilisé, après adjonction dans ce dernier cas de la quantité d'eau Milli-Q nécessaire pour retrouver sa teneur en eau initiale) et de l'eau de mer naturelle filtrée à 0,2 µm (EMF) à une salinité de 33 ‰. Les teneurs sédimentaires testées sont de 0 (témoin) 0,5, 1, 2,5 et 5 g l⁻¹. Une décantation de 1 h précède l'introduction du matériel biologique, afin d'éviter tout effet mécanique des particules sédimentaires sur les organismes tests. De cette façon aucune anomalie larvaire n'est observée avec les sédiments non contaminés (Ex : sédiment de l'île aux Oiseaux).

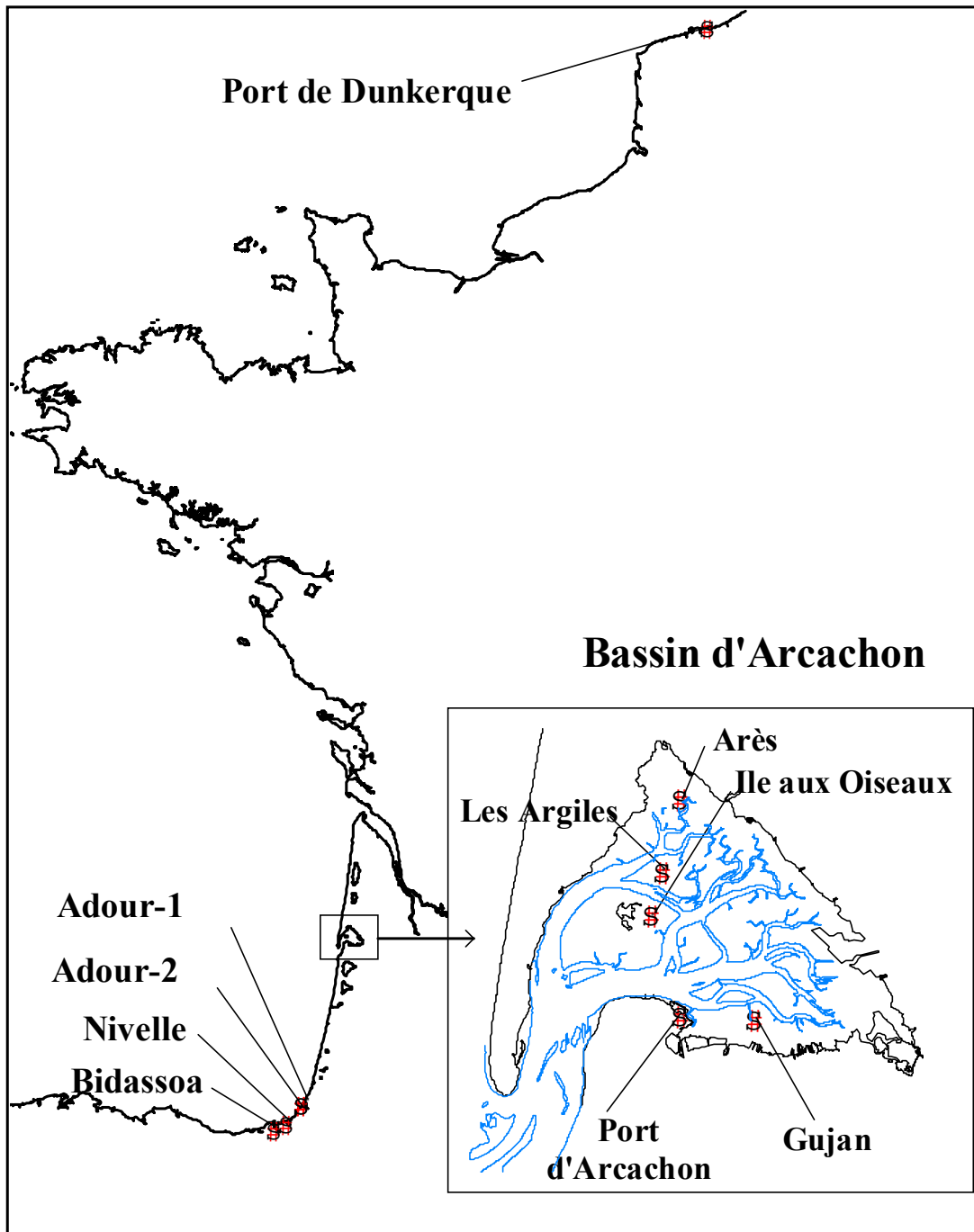


Figure II-1 : Sites des différents sédiments prélevés et utilisés dans cette étude.

Tableau II-1 : Dates et coefficient de marée des jours de prélèvement des sédiments.

Site	Date	Coefficient de marée
Dunkerque	24/3/1999	61
	8/9/1999	87
	9/2/2000	86
Cheyzin (Gironde)	Entre 24/4/1997 et 15/10/1997 (tous les mois)	80 - 107
Arès	6/3/1996	92
	25/3/1999	49
	9/8/1999	78
	8/2/2000	87
	12/7/2000	51
Les Argiles	25/3/1999	49
Ile aux Oiseaux	25/3/1999	49
Gujan	25/3/1999	49
Port d'Arcachon	25/3/1999	49
Adour-1	26/3/1999	47
Adour-2	26/3/1999	47
Nivelle	26/3/1999	47
Bidassoa	26/3/1999	47
	9/7/1999	65
	7/2/2000	88
	17/4/2000	90

L'élutriat brut est obtenu à partir d'une modification de la méthode de Melzian (1990). Le sédiment (frais ou lyophilisé après réhydratation avec de l'eau Milli-Q) est agité mécaniquement (agitateur-secoueur, 500 secousses par minute ; [®]Stuart Scientific SF1) avec de l'EMF dans un rapport de $\frac{1}{4}$ pendant 8h, puis laissé décanter 8 h avant de récupérer l'eau surnageante : c'est l'élutriat brut. La quantité de sédiment agitée est préalablement pesée afin de pouvoir exprimer les résultats en g de sédiment l⁻¹. L'élutriat est dilué à l'aide d'EMF et testé à des concentrations comprises entre 0 (témoin) et 100%.

L'élutriat filtré est obtenu par la filtration à 0,7 μm de l'élutriat brut sur filtres (Whatman GF/F), préalablement brûlés et lavés à l'acide chlorhydrique (Carlo Erba, de qualité Suprapur :12N) dilué au 1/10.

Pour les bioessais, les élutriats (filtrés ou non) sont utilisés dès leur préparation. Pour le dosage des métaux, ils sont stockés dans des flacons en polyéthylène (250 ml), acidifiés (au 1/1000 avec HCl à 12N) et conservés à 4°C à l'abri de la lumière. Pour les analyses organiques, les échantillons sont stockés en bouteilles de verre (préalablement lavées et brûlées à 450°C toute une nuit) et congelés à -30°C.

II.2 - Bioessais

Les gamètes de l'oursin commun *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816), ceux de la moule méditerranéenne, *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819) et de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) ont été utilisés pour les différents tests présentés dans cette étude ; de plus quelques observations ont aussi été effectuées à l'aide des larves véligères et des pédivéligères (*C. gigas* seulement) des deux bivalves.

II.2.1 - Frai et fertilisation

II.2.1.1 - Paracentrotus lividus

La méthode est inspirée de Dinnel *et al.* (1988). Les individus mûrs (de mai à octobre dans le bassin d'Arcachon) sont prélevés sur parc le jour même de l'expérience. La ponte est induite par injection de 0,5 ml d'une solution de KCl à 0,5M dans la cavité coelomique (Harvey, 1940).

Les mâles en train de frayer (produits sexuels blanchâtres émis aux niveaux des pores génitaux) sont conservés à l'air libre afin d'obtenir du sperme très condensé. Celui-ci est récupéré «à sec» ; c'est à dire sans adjonction d'EMF, à l'aide d'une pipette automatique et conservé dans un tube en verre placé dans la glace fondante ; il garde ainsi son pouvoir fécondant pendant plusieurs heures. Le sperme de plusieurs mâles peut être mélangé après avoir vérifié la mobilité des gamètes.

Les femelles (émission sous forme d'amas granuleux oranges) sont placées au-dessus d'un erlen de 250 ml en verre contenant de l'EMF, les pores génitaux se trouvant en contact avec la surface de l'eau, de manière à ce que les œufs s'écoulent et décantent peu à peu sur le fond.

Après une ponte intense de 30 min, les œufs sont tamisés à 160 µm pour éliminer les débris et sont recueillis dans une éprouvette de 500 ml dont le volume est ajusté à l'aide d'EMF et homogénéisés à l'aide d'un agitateur en matière Plexiglas (disque circulaire perforé, monté sur un axe). Ils sont mis à décanter 10 min ; puis les 100 premiers ml de la solution d'œufs sont éliminés et remplacés par de l'EMF ; cette opération est renouvelée une seconde fois. Ceci permet d'éliminer les œufs les moins denses, de moins bonne qualité. Les œufs sont enfin dénombrés.

II.2.1.2 - Crassostrea gigas

La méthode utilisée est celle de His *et al.* (1997b). Les huîtres utilisées proviennent soit du milieu naturel, lorsque les expérimentations ont lieu aux mois de Juillet et Août, soit de l'écloserie de La Tremblade après une période de maturation variant selon la saison de 15 jours (fin du printemps) à 2 mois (début de l'hiver).

L'émission de gamètes est provoquée par choc thermique (immersions successives en eau de mer à 18°C et à 28°C à intervalles d'une demi-heure) et stimulation chimique (action d'une suspension de gamètes de chaque sexe en eau de mer, obtenues en sacrifiant quelques animaux).

Dès qu'un mâle fraie (Chapitre I § I.2.3.1), il est placé dans un faible volume d'eau afin d'obtenir une solution de sperme la plus concentrée possible ; contrairement à l'oursin, les spermatozoïdes ne conservent leur pouvoir fécondant que pendant une demi-heure à une heure.

Les femelles en train de pondre (Chapitre I § I.2.3.1), sont placées individuellement dans un premier béccher contenant environ 300 ml d'EMF pendant 3 minutes ; lorsque la ponte est bien déclenchée, chaque femelle est mise dans un nouveau béccher avec de 1 à 2 litres d'EMF. Seuls les œufs émis dans ce dernier cas seront utilisés pour les bioessais ; ce changement d'eau a pour but d'éliminer les œufs qui ont pu être fécondés au cours de la stimulation.

Après 30 min de frai intense, les solution de spermes et d'œufs sont respectivement tamisées à 40 et 100 µm, ceci afin d'éliminer les impuretés émises par les bivalves (débris de coquille et pseudofèces).

Pour les tests de spermioxicité, le sperme est obtenu par prélèvement direct dans la gonade chez un mâle dont le frai a été induit, ce qui permet de sélectionner des individus bien mûrs, puisqu'ils sont en «phase instable» (Chapitre I § I.2.3.1).

II.2.1.3 - Mytilus galloprovincialis

Les moules utilisées proviennent du bassin d'Arcachon. Outre une vaste aire de répartition géographique, cette espèce est dite bradyctique, c'est à dire est caractérisée par la présence dans les populations naturelles de sujets mûrs toute l'année.

L'obtention et la manipulation des gamètes s'effectuent comme pour *C. gigas*, les chocs thermiques s'effectuant cependant entre 16 et 24°C.

II.2.2 - Test de spermioxicité

Il a été réalisé uniquement chez l'oursin et l'huître. 20 µl de sperme (récupéré à sec) de chacune des deux espèces sont introduits dans des tubes en verre (10 ml, Pyrex) avec 5 ml de chaque traitement à tester (sédiment contact et éluviat filtré ou non) ou d'EMF pour le témoin. L'ensemble est mélangé pendant 30 min à l'aide d'un agitateur rotatif (Merck ; 10 tours par min). Dans le cas du sédiment contact, le sperme n'est utilisé pour les fécondations qu'à l'issue d'une période de décantation d'une minute (dépôt des plus particules sédimentaires les plus volumineuses, afin d'éviter une action mécanique sur les œufs).

30 µl de chaque solution de sperme sont utilisés pour féconder les œufs placés en EMF dans des puits de 3 ml sur des plaques[®]Nunc (Poly-Labo) en polystyrène (300 œufs par puit et 5 répliquats par traitement). Les gamètes sont ensuite mises à incuber pendant 2 h à 21 ± 1°C chez *Paracentrotus lividus* et à 24 ± 1°C chez *Crassostrea gigas*. A l'issue de cette période d'incubation, 100 µl d'une solution de formol neutre sont ajoutés dans chacun des puits et 100 œufs sont examinés au hasard, à l'aide d'un microscope inversé, pour déterminer le taux de fécondation dans chacun des puits.

Chez l'oursin, la fécondation est déterminée par la présence ou non de la membrane de fécondation, très facilement observable. En revanche, chez l'huître il est préférable de se baser sur la présence du globule polaire ou des premières divisions cellulaires.

II.2.3 - Test d'embryotoxicité

II.2.3.1 - Test au laboratoire

Une fois les suspensions de gamètes obtenues (Chapitre II § II.1.1), la procédure est pratiquement identique chez les oursins et les bivalves.

Pour les élutriats, nous avons miniaturisé le protocole décrit par His *et al.* (1997b). Les œufs fécondés sont mis à incuber dans des micropuits de 3 ml sur des plaques de microtitration ([®]Nunc, en polystyrène) au lieu de pots de 30 ml (Photographie II-1). La figure II-2 montre que cette miniaturisation donne des résultats tout à fait similaires à la méthode de His *et al.* (1997b).

L'utilisation de micropuits présentent plusieurs avantages : gain de place, utilisation de volumes d'élutriat plus faibles, ce qui est souvent un facteur limitant et possibilité de tester un plus grand nombre d'élutriats simultanément. Les sédiments contacts sont préparés en flacon de 30 ml à prélèvement stérile, en polystyrène (Photographie II-1). Des problèmes d'homogénéité ne permettent pas de miniaturiser ce test avec le sédiment contact.

Chez les oursins, les œufs sont fécondés à l'aide d'1 ml d'une suspension de sperme préparée à partir de 40 µl de sperme à l'état sec dilué dans 2 ml d'EMF.

Chez les bivalves la fécondation est réalisée à l'aide de la solution dense de sperme. En règle générale, un volume compris entre 5 et 10 ml est nécessaire pour obtenir une dizaine de spermatozoïdes autour de chaque œuf.

Une fois la fécondation vérifiée au microscope, 300 et 1500 œufs fécondés pour les deux espèces sont respectivement placés dans chacun des puits de 3 ml ou des pots de 30 ml contenant les différents traitements à tester respectivement (5 répliquats par traitement). Les œufs fécondés sont ensuite mis à incuber 24 h à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ chez *Crassostrea gigas* et à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 h chez *Paracentrotus lividus* et *Mytilus galloprovincialis*.

A l'issue de cette période d'incubation, les larves obtenues sont tuées par adjonction de formol neutre (30 µl pour les puits de 3 ml contre 100µl pour ceux de 30 ml) et les pourcentages d'anomalies sont déterminés d'après les critères de His *et al.* (1997b ; Fig. II-3) chez les bivalves et Klöckner *et al.* (1985 ; Fig. II-4) chez l'oursin. Ces observations se font directement à l'aide d'un microscope inversé. Dans le cas du sédiment contact, les larves sont colorées à l'aide du Rose Bengale afin de faciliter les lectures : en effet seule la matière organique (et non les particules minérales) se colore en rose. L'étude directe au microscope inversé permet l'observation de tout le matériel biologique présent à la fin du test (embryons très peu développés y compris). En effet, de nombreux auteurs font leur lecture uniquement à partir de prélèvements dans la couche d'eau (Chapman et Morgan, 1983 ; Long *et al.*, 1990). De cette façon, ils ne tiennent pas compte des embryons très peu développés qui restent à la surface du sédiment et donc ils sous estiment les effets.



Photo 1 : Présentations des puits utilisés pour la réalisation des tests d'embryotoxicité. À gauche, sont présentés les pots de 30 ml en polystyrène utilisés avec le sédiment contact et à droite les puits de 3 ml, sur des plaques Nunc, qui sont utilisés avec les éluviats.

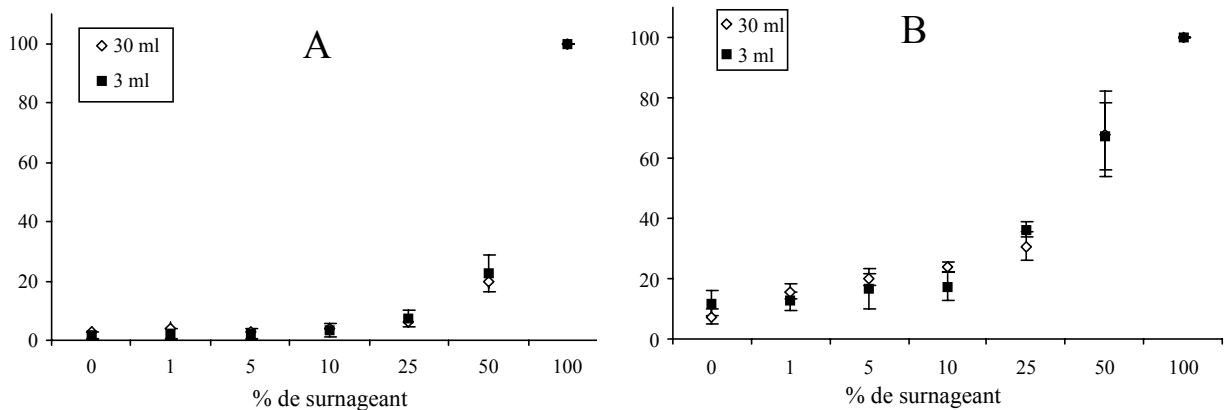


Figure II-2 : Comparaison des réponses obtenues en récipients expérimentaux de 30 ml et en puits de 3 ml, au cours d'un test d'embryotoxicité chez *Crassostrea gigas* (A) et *Paracentrotus lividus* (B), en présence de l'éluviat d'une vase de l'estuaire de la Gironde. Résultats exprimés en pourcentages d'anomalies larvaires, avec intervalle de confiance au seuil de 95 %.

La validité du test d'embryotoxicité dans cette étude a été vérifiée en utilisant pour chaque série de tests un toxique de référence qui est le sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$). Ce composé a été retenu car il est bien connu, peu coûteux, sa composition chimique est relativement stable ; enfin le cuivre fait partie des polluants les plus problématiques dans l'environnement.

Aussi bien chez l'huître que chez l'oursin, les effets observés pour le sulfate de cuivre sont parfaitement en accord avec les valeurs obtenues d'après la littérature (Tableau II-2). La sensibilité des différents géniteurs d'huître et d'oursin utilisés au cours de cette étude a respectivement varié que de 21 et 12 %. Ces résultats montrent que le protocole utilisé dans cette étude est valide et permet de fournir des résultats comparables entre eux et à ceux de la littérature.

Tableau II-2 : Résultats des tests d'embryotoxicité chez *C. gigas* et *P. lividus* réalisés à l'aide du toxique de référence ($\text{CuSO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$) au cours de cette étude. EC50 exprimées en μg de Cu/l. E.T : écart type en $\mu\text{g/l}$; C.V. : coefficient de variation en %.

	<i>Crassostrea gigas</i>						Moyenne	E.T.	C.V.
	1	2	3	4	5	6			
Nos résultats	11,4	11,7	18,9	15,9	13,2	17,0	14,7	3,1	21
Breton, 1999							12,3	4,2	
Coglianesse, 1982							10		
His et Robert, 1982							13		
	<i>Paracentrotus lividus</i>					Moyenne	E.T.	C.V.	
	1	2	3	4					
Nos résultats	39,5	33,5	40	31,5		36,1	4,3	12	
Warnau <i>et al.</i> , 1996						47			
Radenac <i>et al.</i> , 2001						55			

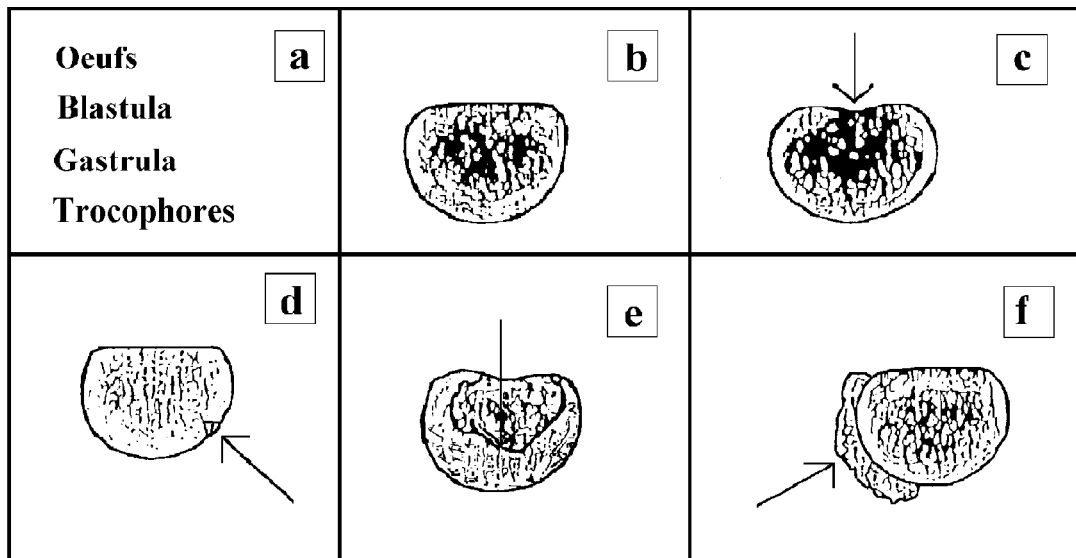


Figure II-3 : Les différentes anomalies embryonnaires et larvaires chez *Crassostrea gigas*. a: développements retardés, b: développement normal, c: charnière concave , d: échancrure à la commissure des valves, e: une valve est anormalement développée, f: le velum ne se rétracte pas totalement quand la larve est fermée. (d'après His *et al.*, 1997b)

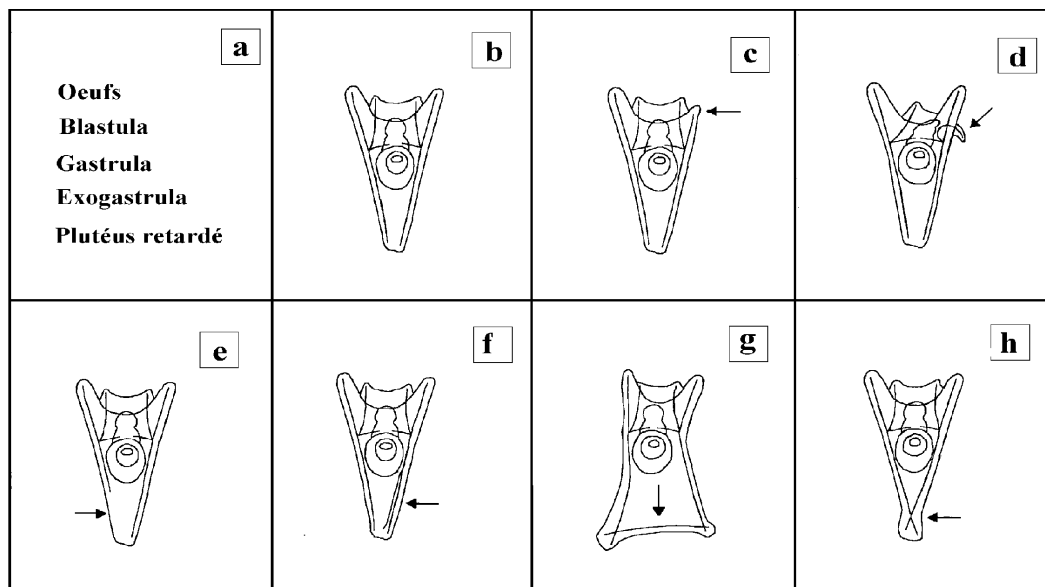


Figure II-4 : Les différentes anomalies embryonnaires et larvaires chez *Paracentrotus lividus* (d'après de Klöckner *et al.*, 1985). a: développements retardés, b: développement normal, c: longueur inégale des baguettes somatiques, d: baguette antéro-latérale tordue, e: une baguette somatique plus courte, f: dédoublement d'une baguette somatique, g: surnombre des baguettes somatiques et h: chevauchement des baguettes somatiques.

II.2.3.2 - Test *in situ*

On a cherché à savoir s'il était possible d'exposer des oeufs fécondés de bivalves marins « in situ », afin de détecter d'éventuelles perturbations environnementales ; en particulier, l'incidence des rejets en mer des boues de dragage pourrait ainsi être étudiée.

Des chambres d'exposition ont été réalisées (Fig. II-5 et photographie II-2) à l'aide de bouteille en polyéthylène souple d'un litre. Le fond de chaque bouteille a été découpé et recouvert de toile à bluter en polyamide (porosité 30 μm). Cette toile a été soudée à chaud, afin d'éviter toute utilisation de colle. Pour permettre la circulation de l'eau à l'intérieur de la bouteille, la partie supérieure est également recouverte de toile à bluter (porosité de 30 μm) qui est maintenue à l'aide d'une capsule et d'un capuchon à vis ouvert. Le temps de rétention de l'eau dans les chambres ainsi préparées a été estimé, par utilisation d'une solution de rouge neutre, à $\frac{1}{4}$ heure.

Les différentes chambres d'exposition sont remplies d'EMF au laboratoire etensemencées avec 60 000 œufs fécondés ; elles sont acheminées dans un récipient contenant de l'EMF sur le site d'observation, immergées sous 1 mètre d'eau (3 par point). La mise en place est effectuée dans l'heure qui suit les fécondations.

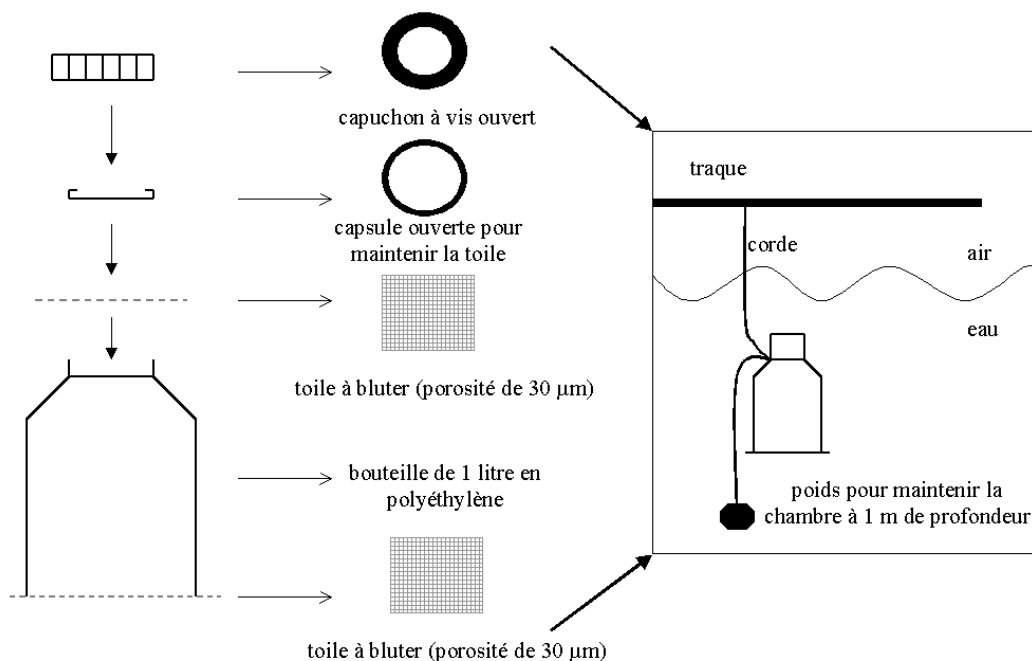
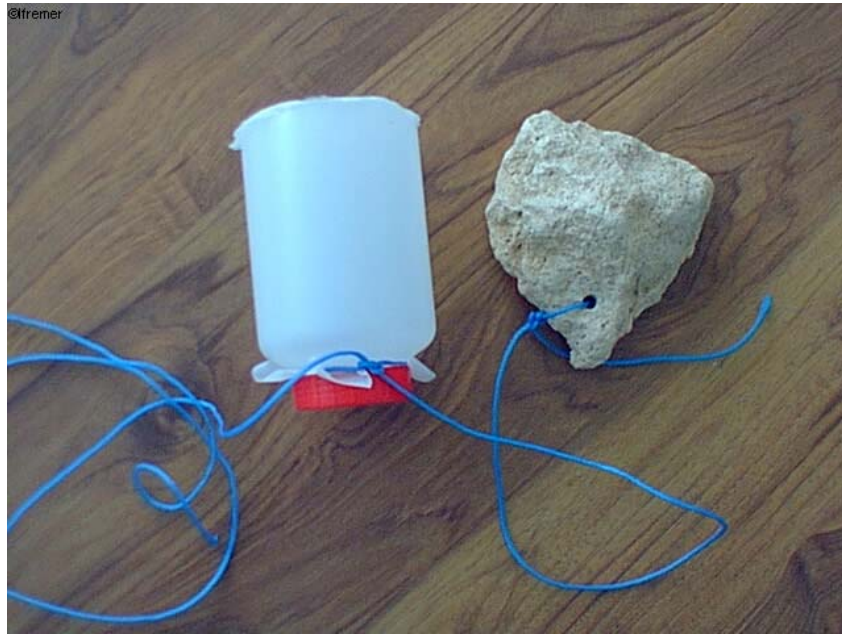


Figure II-5 : Chambre utilisée pour le test embryo-larvaire *in situ*.



Photographie II-2 : Présentation des différents éléments constituant la chambre utilisée pour réaliser les tests d'embryotoxicité *in situ*.

Lorsque les larves D sont formées (généralement entre 24 h et 48 h, selon l'espèce et la température de l'eau, mais jusqu'à 4 jours chez *M. galloprovincialis* en hiver, à 10°C), les chambres

sont ramenées au laboratoire, et les larves récupérées sur tamis inox de porosité 32 µm, et enfin formolées pour observation et détermination des pourcentages d'anomalies larvaires.

II.2.4 - Test de bioaccumulation et étude de la métallothionéine

Les larves D sont obtenues comme précédemment, mais en béciers de 2 litres afin de récolter le matériel indispensable aux analyses. (120.000 larves D au minimum).

Après l'incubation de 24 h à 24°C, la mensuration et le poids des larves sont mesurés selon la technique de His *et al.* (1983 ; voir chapitre II § II.2.5.2). Les larves sont ensuite dénombrées, rincées à l'aide de formiate d'ammonium (solution à 30 g/l, pour éliminer le NaCl ; Holland et Hannant, 1973), placées dans des microtubes d'Eppendorf à fond conique, préalablement pesés. Les échantillons sont ensuite congelés, lyophilisés et stockés à l'abri de l'air et de la lumière jusqu'aux analyses chimiques.

A partir de la hauteur moyenne et du poids sec moyen d'une larve, un indice de condition (I.C.) a été calculé :

$$I.C. = \frac{\text{Poids sec moyen d'une larve } (\mu\text{g})}{\text{Hauteur moyenne d'une larve } (\mu\text{m})} * 100$$

II.2.5 - Test de croissance larvaire

Le test sur la croissance des larves a été réalisé pour évaluer la toxicité d'élutriats chez l'huître *Crassostrea gigas* et la moule *Mytilus galloprovincialis*. La réalisation de tels tests nécessite la production de microalgues servant de nourriture aux larves. Dans un but de simplification du protocole expérimental, les larves d'huîtres n'ont reçu comme nourriture que la seule *Isochrysis galbana*, celles de la moule ayant bénéficié d'une alimentation bi-algale (*I. galbana* et *Chaetoceros calcitrans*)

II.2.5.1 - Culture algale

La prymnésiophyceée *Isochrysis galbana* (Parke, 1949) et la diatomée *Chaetoceros calcitrans* var. *calcitrans* (Paulsen, 1905) ont été cultivées pour nourrir les véligères pendant les 10 jours d'observation. Le milieu de culture utilisé est celui de Conway (Walne, 1970), enrichi en

métasilicate de sodium, en ce qui concerne la diatomée. Toutefois, l'EDTA (Acide éthylène-diamine-tétra-acétique) a été supprimé afin d'éviter la complexation des micropolluants métalliques d'origine sédimentaire, éventuellement présents.

Deux types d'observations ont été effectués, afin d'étudier le transfert des polluants le long d'une chaîne trophique courte (algues, consommateur primaire) :

- élevages larvaires en EMF, et alimentation des larves à l'aide d'algues cultivées sur milieu de Conway contaminé par l'élutriat sédimentaire filtré à $0.7\mu\text{m}$ (GF/F Whatman préalablement brûlé et lavé à l'acide HCl (Carlo Erba pour analyse, 12N) dilué à 1/10.
- élevages larvaires contaminées avec de l'élutriat brut, les véligères étant alimentées avec des algues cultivées sur milieu de Conway (non contaminé).

Après mise en culture dans des Erlenmeyers de 2 litres contenant 1,3 litres de milieu de Conway, les cultures d'algues, en phase exponentielle, ont été utilisées dès le troisième jour, et pendant deux jours seulement, afin d'éviter d'éventuelles contaminations bactériennes (espèces pathogènes pour les larves) qui se manifestent parfois lorsque les cultures sont en phase stationnaire. Pour chaque nouvelle culture d'algues, un prélèvement de 250 ml d'EMF et d'élutriat est réalisé pour l'analyse des métaux et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (Chapitre II § II.1.2).

La croissance algale a été suivie quotidiennement par comptage au Coulter Counter (Z1), afin de déterminer la quantité de nourriture à apporter aux élevages. Parallèlement 500 ml de la culture ont été prélevés stérilement et centrifugés (4000 rpm pendant 15 min à température ambiante) dans des pots en polyéthylène. Les culots de centrifugation ont été congelés, lyophilisés et stockés pour analyse (métaux et HAP).

II.2.5.2 - Elevages larvaires

Après la fécondation, les œufs sont placés dans des béciers de deux litres (60 000 embryons/l) contenant les différentes concentrations d'élutriat (non filtré) à tester (trois répliquats par traitement), puis mis à incuber pendant 24 h à $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ chez l'huître et 48 h à $21^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ chez la moule, temps nécessaire à l'obtention des larves D. Ces dernières sont alors mises en élevages à une densité de 10 000/l et nourries quotidiennement soit à l'aide d'un mélange (50/50) *Isochrysis galbana* et *Chaetoceros calcitrans* (Chapitre II § II.2.5.1), soit uniquement par *Isochrysis galbana* lors des expérimentations de contamination par voie trophique. L'alimentation se fait à

raison de 100 cellules/ μ l d'élevage. Dans tous les cas le volume de la culture algale utilisé représentait moins de 3 % du volume total des élevages larvaires, ce qui correspond à une contamination maximale en éluviat filtré de 1.5 %.

Les milieux d'élevage (éluviat ou EMF dans le cas des contaminations par voie trophique) sont changés tous les deux jours. A chaque changement, 50 larves par élevage sont photographiées pour les mensurations et les études de croissance, par calcul de la hauteur moyenne des véligères (plus grande dimension entre le sommet de l'umbo et le bord ventral de la prodissoconque) (His *et al.*, 1983).

A la fin des tests de croissance (de 4 à 10 jours selon le cas), les larves sont récupérées pour analyse (Chapitre II § 2.4).

II.2.6 - Test sur la métamorphose de *C. gigas*

Compte tenu de sa complexité et de sa faible sensibilité par comparaison du test embryolaire (constaté au cours d'une première étude sur le sédiment d'Arès), ce test n'a été pratiqué qu'une seule fois à l'aide du sédiment d'Arès.

Des véligères (hauteur moyenne de 250 μ m) ont été obtenues dans une éclosérie industrielle et maintenues en élevage au laboratoire, une semaine supplémentaire, jusqu'à une taille moyenne de 305 μ m (Helm et Millican, 1977). A cette hauteur, toutes les larves ont atteint le stade pédiveligère caractérisé par la tâche oculaire et la présence du pied. Des lots de 50 individus ont été préparés à la loupe binoculaire et placés dans des puits de 3 ml (plaques de microtitration Nunc) contenant les différents traitements sédimentaires (5 répliquats par concentration). Chaque préparation testée contient une concentration d'épinéphrine de 10^{-4} M (Beiras et His, 1994 ; Beiras et Widdows, 1995), neuromédiateur qui induit la métamorphose chez les larves, tout en inhibant la fixation, ce qui facilite le comptage des individus métamorphosés, puisqu'ils restent sur le fond du récipient d'observation. Les larves sont maintenues pendant 48 h à $24 \pm 1^\circ\text{C}$, à l'obscurité, sans nourriture ; puis les pourcentages de mortalité et de métamorphose (présence de la dissoconque, absence de pied et présence d'ébauches branchiales essentiellement; Chapitre I § I.2.3.2) sont déterminés par observation directe au microscope inversé (photographie I-5).

II.3 - Caractérisation des sédiments et des éluutriats

II.3.1 - Teneur en eau, en matière organique, en carbone organique et granulométrie des sédiments

Le sédiment frais, homogénéisé, est réparti dans des coupelles en verre préalablement pesées (5 coupelles par sédiment). Il est ensuite congelé (-30°C), puis lyophilisé.

La teneur en eau est calculée (différence pondérale avant et après lyophilisation exprimée en pourcentage du poids du sédiment frais).

Le pourcentage de matière organique (MO) est déterminé en calculant la différence pondérale, sur 5 échantillons indépendants de sédiment lyophilisé, avant et après calcination à 450°C pendant 12 h (Wollast, 1989). La température de 450°C permet la calcination de la matière organique ; seul le carbone provenant du CaCO₃ n'est pas volatilisé (Giere, 1993).

La teneur en carbone organique (CO) a été déterminée par A. Coynel et H. Etcheber au département de Géologie et d'Océanographie de l'Université de Bordeaux I. La méthode utilise l'analyseur de carbone LECO CS 125 selon la méthode de Cauwet (1975).

Les analyses granulométriques ont été réalisées au Département de Géologie et d'Océanographie de l'Université Bordeaux I. Elles ont été effectuées par diffraction laser à l'aide d'un diffractomètre Malvern-Instrumat. Le principe de cette méthode est basé sur la détermination du diamètre des particules composant le sédiment grâce à l'interaction de ces dernières avec un faisceau laser focalisé. Les résultats obtenus représentent la proportion des différentes classes de taille des particules, comprises entre 0,1 et 880 µm.

II.3.2 - Teneur en matière en suspension, carbone organique particulaire et dissous et ammoniac des éluutriats

Pour mesurer la teneur en matière en suspension (MES), un volume déterminé de chaque éluutriat est filtré sur Whatman GF/F (porosité 0,7 µm), préalablement brûlés à 500°C pendant 12 h et pesés. Après filtration de l'éluutriat, le filtre est abondamment rincé à l'eau Milli-Q afin d'éliminer

le NaCl. Le filtre est ensuite séché à l'étuve à 40°C pendant 12 h, puis repesé. Le poids des particules, rapporté au volume d'élutriat filtré, permet de calculer la teneur en MES exprimée en g/l.

La teneur en carbone organique particulaire (COP) est mesurée sur les particules elles-mêmes de la MES (voir précédemment) à l'aide d'un analyseur LECO CS 125, comme pour les sédiments. Le principe consiste à déterminer la teneur en carbone organique lors d'une calcination à 850°C des échantillons, après décarbonatation à l'acide HCl (Carlo Erba Supra-pur à 12N) à 90%.

Les teneurs en COD sont obtenus à partir du filtrat à l'aide d'un analyseur SHIMADZU TOC 5000 : l'échantillon (100 µl) est porté à 680°C et le carbone organique est décomposé en CO₂. La mesure du CO₂ permet de quantifier le COD.

La méthode de dosage de l'ammoniac est celle de Koroleff (1969), décrite par Aminot et Chaussepied (1983). 100 ml de l'élutriat sont centrifugés (5000 rpm pendant 15 min à température ambiante) afin d'éliminer les particules en suspension, puis on ajoute 3 ml de réactif 1 (solution de phénol-nitroprussiate), l'ensemble est agité vigoureusement pendant quelques secondes et enfin 3 ml du réactif 2 (solution alcaline d'hypochlorite) sont ajoutés. Les échantillons sont laissés à l'abri de la lumière pendant 12 h. Ces réactions permettent de transformer l'ammoniac en bleu d'indophénol adsorbant à 630 nm, qui est ensuite mesuré par spectrophotométrie (Lambda 3, Perkin-Elmer ;). Les résultats obtenus sont exprimés en µmol/l, pour les convertir en mg/l, il suffit de leur appliquer un facteur multiplicateur (Tableau II-3).

Tableau II-3: Unités d'expression de l'azote ammoniacal (d'après Aminot et Chaussepied, 1983).

Pour exprimer la concentration d'azote ammoniacal en	Multiplier les µmol/l par
mg/l d'azote ammoniacal (N-NH _{3,4})	0,014
mg/l d'ammoniac (NH ₃)	0,017
mg/l d'ammonium (NH ₄ ⁺)	0,018

En général, les teneurs en ammoniac de l'élutriat doivent être mesurées car c'est la forme la plus toxique vis à vis des organismes vivants. L'ammoniac représente un pourcentage de l'azote ammoniacal qui varie de 0,022 à 46,6 % en fonction du pH, de la température et de la salinité. Dans les conditions expérimentales de cette étude, ce pourcentage est compris entre 4,9 et 5%.

II.4 - Prétraitements des échantillons pour les analyses chimiques et biochimiques

II.4.1 - Précautions de manipulations

La qualité des résultats obtenus lors d'analyses de micropolluants métalliques ou organiques dépend de la fiabilité, de la répétabilité des méthodes de dosages, mais également des précautions prises lors de l'échantillonnage, du stockage et de la préparation des prélèvements.

Pour le prélèvement des sédiments et leur stockage, tout le matériel utilisé est en verre et a été préalablement lavé au détergent (RBS), brûlé à 500°C (pendant 12 h) et lavé à l'HCl (Carlo Erba Supra-pur à 12N) dilué au 1/10.

Pour les phases aqueuses, les flacons utilisés sont en verre (lavés au détergent et brûlés à 500°C pendant 12 h) pour les analyses en organique et en polyéthylène (250 ml) pour les métaux. Les flacons en polyéthylène sont remplis à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique (Carlo Erba pour analyse à 12N) dilué ½, pendant 48 h, puis rincés trois fois à l'eau Milli-Q. L'opération est renouvelée une seconde fois avec de l'HCl (Carlo Erba Supra-pur à 12N) dilué au 1/10.

Les algues sont stockées dans des tubes Falcon à centrifugation de 10 ml et les larves dans des tubes Eppendorf à fond conique de 1.5 ml. Ces différents matériaux de stockage en polyéthylène, ont été lavés soit au RBS et soigneusement rincés à l'eau Milli-Q, pour les échantillons utilisés en analyses organiques, soit à l'acide comme précédemment pour les analyses métalliques.

II.4.2 - Métaux dans les sédiments, les éluviats, les algues et les larves

Les analyses des micropolluants métalliques sur les échantillons de sédiments, de larves et des algues ont été effectuées en collaboration de A. Geffard et JC. Amiard au service d'écotoxicologie à l'ISOMer de Nantes. Pour les éluviats, les analyses ont été réalisées à IFREMER Nantes, sous la responsabilité de JF Choffoleau. Les métaux déterminés sont le Cd, Cu, Zn et le Pb.

Pour les sédiments, des échantillons de 0,5 g (lyophilisés) sont placés dans des tubes en verre préalablement lavés à l'acide et subissent une minéralisation à l'aide de 5 ml d'acide nitrique (HNO₃ 3N) et 3 ml d'acide chlorhydrique (HCl 12N). Le résidu sec est repris dans 10 ml d'acide chlorhydrique à 1N (Aminot et Chaussepied, 1983).

Pour les éluutriats, la méthode utilisée est décrite par Danielson *et al.* (1982). Elle consiste dans un premier temps en une complexation des métaux par un mélange d'ammonium pyrolidine dithiocarbamate (APDC) et de diéthylammonium N, N-diéthyl dithiocarbamate (DDDC), une extraction des complexes formés par le fréon et une extraction en retour par un faible volume d'acide nitrique dilué.

100 g de chaque éluatriat sont placés dans une ampoule à décanter (500 ml) et agités en présence de 3 ml de solution de complexation (APDC + DDDC). On rajoute 20 ml de fréon puis le mélange est dégazé, agité pendant 3 min et laissé reposer pendant 5 min. Le fréon est récupéré dans une seconde ampoule à décanter (100 ml). La manipulation est répétée une nouvelle fois, 10 ml de fréon sont placés dans la première ampoule (500 ml), contenant l'échantillon de départ, l'ensemble est dégazé, agité pendant 3 min et laissé reposer pendant 5 min. Ensuite le fréon est récupéré dans la seconde ampoule (100 ml) contenant déjà les 20 premiers ml.

1 ml d'acide nitrique est ajouté dans la deuxième des ampoules et puis on procède à une nouvelle agitation pendant 3 min. Après un repos de 10 min, 4 ml d'eau Milli-Q sont ajoutés et l'ensemble est de nouveau agité pendant quelques secondes, puis laissé reposer 10 min, avant de récupérer la fraction acide dans laquelle les teneurs en métaux seront déterminées.

Pour les algues, chaque échantillon lyophilisé est placé dans un tube en verre avec 2ml d'acide nitrique (65%) Supra-pur (Carlo Erba), puis porté à 95°C pendant 1 heure (Ettajani, 1994). Le volume de chaque tube est ajusté à l'aide d'eau déminéralisée.

Pour les larves, l'étude de la répartition métallique tissulaire ainsi que l'extraction partielle des métallothionéines (MT) nécessitent une étape dite de compartimentation qui a été décrite par Mouneyrac *et al.* (1998). Les échantillons de larve lyophilisés sont broyés et homogénéisés à l'aide d'un broyeur en verre en présence de tampon Tris-NaCl 0,02 M, à pH 8,6 et dans une proportion de 5 ml par g de larve (poids humide). Les réactions protéolytiques et d'oxydation des MT sont évitées en travaillant à une température de 4°C et en ajoutant du β -mercaptoethanol (10 mmol/l) au tampon Tris. La fraction cytosolique (S1) et insoluble (P1) sont séparées à l'aide d'une première centrifugation (25 000 g, 55min à 4°C). Les MT sont isolées de la fraction S1 à l'aide d'une seconde centrifugation (15 000g, 10min à 4°C) après avoir subi la chaleur (75°C, 15 min). La seconde fraction soluble obtenue (S2) qui contient les MT est stockée à -80°C jusqu'à l'analyse par polarographie à impulsion différentielle.

En ce qui concerne la fraction soluble S1 et insoluble P1, une attaque acide à 60°C est nécessaire avant l'analyse métallique. Cette attaque est conduite à chaud après ajout d'acide nitrique 3N Suprapur (Carlo Erba). L'acide est rajouté à l'échantillon dans un rapport de 1ml par ml de fraction S1 et 1 ml par 0.5 g de larve pour P1. Ces solutions, sont ensuite ajustées à un volume connu à l'aide d'eau Milli-Q.

II.4.3 - HAP dans les sédiments, les éluutriats, les algues et les larves

Les HAP étudiés sont le phénanthrène (Phe), l'anthracène (An), le fluoranthène (Fluo), le pyrène (Pyr), le benz(a)anthracène (BaA), le triphénylène (Triph), le chrysène (Chrys), le benzo(b)fluoranthène (BbF), le benzo(k)fluoranthène (BkF), le benzo(j)fluoranthène (BjF), le benzo(e)pyrène (BeP), le benzo(a)pyrène (BaP), le pérylène (Per), l'indéno(1,2,3-cd)pyrène (IP), le benzo(g,h,i)pérylène (BPer), le dibenz(a,h)anthracène (DahA) et le dibenz(a,c)anthracène (DacA).

Ces composés organiques ont été quantifiés à l'aide d'étalons internes perdeutérés qui sont introduits dans les différentes matrices avant leur extraction. Les différents étalons utilisés pour quantifier chaque HAP sont présentés dans le tableau II-4.

Les HAP présents dans les sédiments sont extraits par micro-ondes à l'aide du Maxidigest MX350 (Prolabo, Paris, France) selon la technique décrite par Budzinski *et al.*, (1995). Pour chaque échantillon lyophilisé, 2 ou 4 g sont pesés dans un matra[®] en verre, dans lequel est rajoutée par pesée (100 µl) une solution d'étalons (Tableau II-4) dont les concentrations sont parfaitement connues. 40 ml de dichlorométhane sont ajoutés à chaque matra[®], avant une extraction de 10 min sous une irradiation de 30 W. L'extrait organique est ensuite récupéré par filtration sur coton de verre prénettoyé, reconcentré à l'aide d'un évaporateur rotatif et sous flux d'azote. Une fois le volume réduit à 0,5 ml, l'extrait est désoufré (au contact de cuivre activé), purifié sur colonne d'alumine, puis fractionné sur un colonne de silice, permettant de récupérer la fraction organique de l'extrait. Cette fraction aromatique est ensuite reconcentrée sous flux d'azote, puis analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Dans les éluutriats, les HAP sont extraits par extraction liquide-liquide. 100 ml d'éluatriat (filtré ou non) ou d'EMF (témoin) et 150 µl d'une solution d'étalon sont pesés dans une ampoule à décanter (250 ml) préalablement tarée. La solution d'étalon utilisée présente des concentrations en HAP deutérés 100 fois plus faibles que celle utilisée pour les sédiments. L'échantillon est extrait

trois fois avec 40 ml de dichlorométhane. La phase organique (120 ml) est séchée à l'aide de sulfate de sodium anhydre (Na_2SO_4) préalablement lavé trois fois avec du dichlorométhane dans un bain à ultrasons pendant 15 min. Le Na_2SO_4 est ensuite éliminé par filtration sous vide. La phase organique est reconcentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif et sous flux d'azote, puis fractionnée sur une colonne de silice. Une fois la fraction aromatique récupérée, elle est reconcentrée sous flux d'azote et analysée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

Tableau II-4 : HAP étudiés et HAP deutérés correspondants

Composé quantifié	m/z	Etalon interne utilisé	m/z
Anthracène	178	Phénanthrène-d10 (Pd10)	188
Phénanthrène	178		
Fluoranthène	202	Pyrène-d10 (Pyrd10)	212
Pyrène	202		
Benz(a)anthracène	228	Chrysène-d12 (Chrysd12)	240
Chrysène	228		
Benzo(b)fluoranthène	252	Benzo(e)pyrène-d12 (BePd12)	264
Benzo(j)fluoranthène	252		
Benzo(k)fluoranthène	252		
Benzo(e)pyrène	252		
Benzo(a)pyrène	252	Benzo(a)pyrène-d12 (BaPd12)	264
Pérylène	252		
Indéno(1,2,3,c-d)pyrène	276	Benzo(g,h,i)pérylène-d12 (BPd12)	288
Benzo(g,h,i)pérylène	276		
Dibenz(a,h)anthracène	278		
Dibenz(a,c)anthracène	278		

La même méthode a été utilisée pour les algues et les larves. Chaque échantillon lyophilisé est placé dans un broyeur manuel en verre et est broyé en présence de dichlorométhane, puis transféré dans un matra[®] en verre. Le broyeur est rincé plusieurs fois à l'aide de dichlorométhane et en dernier à l'aide d'éthanol. 150 μl d'une solution d'HAP perdeutérés (identique à celle utilisée pour les éluutriats) sont ajoutés dans le matra[®]. L'ajout est contrôlé par pesée préalablement pesé. Comme pour les sédiments, l'extraction se fait sous irradiation micro-ondes de 30 Watts pendant 10 min ; les échantillons sont ensuite filtrés, purifiés et fractionnés, comme décrit précédemment, pour

recupérer uniquement la fraction aromatique qui est ensuite reconcentrée et analysée en chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

II.5 - Méthodes d'analyses

II.5.1 - Métaux dans les sédiments, les éluutriats, les algues et les larves

Pour les sédiments et les larves, à l'issue de la digestion acide, les métaux ont été dosés par Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) de flamme (Cu et Zn) ou électrothermique (Cd, Pb) sur un appareil Hitachi Z8200 avec effet Zeeman. Les éléments métalliques ont été dosés selon la méthode décrite par Amiard *et al.* (1987) par ajouts dosés.

La qualité des dosages est validée en réalisant des blancs d'extraction, qui subissent les mêmes traitements que les échantillons, mais également en vérifiant la teneur métallique de plusieurs échantillons (sédiments, tissus de moule) étalons de référence. Le tableau II-5 présente les résultats obtenus lors du contrôle de la méthode de dosage.

Pour les éluutriats, les métaux présents dans la fraction acide ont été dosés en Spectrométrie d'Absorption Atomique (SAA) électrothermique à l'aide d'un Perkin-Elmer (modèle 3030) et un Varian (modèle SPECTRAA-800). La qualité des dosages a été validée par l'utilisation d'une eau côtière certifiée (CASS-3). Les résultats des analyses, sont présentés dans le tableau II-6 et montrent que le protocole utilisé est parfaitement valide.

Tableau II-5 : Résultats du contrôle de qualité du protocole d'extraction métallique. Concentrations exprimées en $\mu\text{g/g}$ de poids sec (\pm E.T.). Ces résultats ont été obtenus pour 10 répliquats réalisés au cours de cette étude.

Sédiment marin (SD-MEDPOL-1/TM)			
	Cadmium	Cuivre	Zinc
Valeurs obtenues	0,127 (\pm 0,003)	28,7 (\pm 0,3)	71,8 (\pm 2,25)
Valeurs certifiées	0,113 (0,108-0,149)	32,7 (31,7-34,2)	74,8 (72,0-78,3)
Tissus de moules (BCR/278R-N°188)			
	Cadmium	Cuivre	Zinc
Valeurs obtenues	0,349 (\pm 0,013)	9,58 (\pm 0,12)	76,2 (\pm 0,5)
Valeurs certifiées	0,34 (\pm 0,002)	9,6 (\pm 0,16)	76 (\pm 2)

Tableau II-6 : Résultats du contrôle de qualité du protocole d'extraction métallique sur une eau. Résultats exprimés en concentration (\pm E.T.). Ces résultats ont été obtenus à l'aide de 6 répliquats réalisés au cours de cette étude.

	Eau côtière (CASS-3)			
	Cadmium (ng/l)	Cuivre (μ g/l)	Zinc (μ g/l)	Plomb (μ g/l)
Valeurs obtenues	31 (\pm 3)	0.539 (\pm 0.02)	1.4 (\pm 0.2)	0.019 (\pm 0.008)
Valeurs certifiées	30 (\pm 5)	0.517 (\pm 0.06)	1.24 (\pm 0.25)	0.012 (\pm 0.004)

II.5.2 - HAP dans les sédiments, les éluutriats, les algues et les larves

La fraction aromatique de chaque échantillon est analysée par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse pour la détermination et la quantification des HAP. Les conditions d'analyses sont présentées dans l'annexe 1. Comme pour les métaux, la qualité des dosages a été validée en réalisant des blancs d'extraction, mais également en déterminant la teneur en HAP dans un sédiment certifié, ainsi que dans des solutions aqueuses préparées à des concentrations connues (s'il n'existe pas de solutions d'HAP certifiée).

Le sédiment marin certifié SRM 1941a a été utilisé. Les résultats (Tableau II-7) montrent que l'extraction mise en œuvre donne des valeurs légèrement inférieures aux valeurs certifiées, mais dans tous les cas avec un rendement supérieur à 70 %, ce qui est, pour ce domaine d'analyse, tout à fait satisfaisant. Les valeurs obtenues sont similaires à celles déterminées par Letellier (1998) sur le même matériel certifié. La répétabilité du protocole d'extraction est confirmée par des pourcentages de rendements qui varient très peu. De la même façon, les résultats obtenus sur les sédiments du Cheyzin (publication n°6) montrent que la teneur moyenne des HAP totaux est de 1000 ng/g et que le coefficient de variation est inférieur à 20%, confirmant la répétabilité de ce protocole d'extraction.

En ce qui concerne l'extraction des HAP dans une phase aqueuse. Les solutions préparées renferment soit un seul HAP, à différentes concentrations, soit un mélange de composés. Plusieurs extractions simultanées sur le même échantillon ont également été réalisées, afin de vérifier la répétabilité du protocole d'extraction. Les résultats (Tableau II-8 et II-9) montrent que la méthode d'extraction permet de récupérer la quasi totalité des HAP présents en solution et montrent une très bonne reproductibilité, sauf pour le Phe à la concentration la plus faible.

Tableau II-7 : Valeurs certifiées en ng/g des HAPs dans le sédiment certifié SRM 1941a et valeurs obtenues dans cette étude. Valeurs obtenues sur 4 répliquats

	Valeur certifiée ng/g	Ecart type certifié ng/g	Valeur obtenue ng/g	Rendement en %	Valeur obtenue ng/g
Phe	489	23	428 ± 18	88 ± 4	428
An	184	14	142 ± 7	77 ± 4	142
Fluo	981	78	825 ± 43	84 ± 5	825
Pyr	811	24	666 ± 42	82 ± 6	666
BaA	427	25	391 ± 12	92 ± 3	391
Chrys + Triph	577	35	572 ± 14	99 ± 2	572
BbF + BkF + BjF	1442	150	1315 ± 101	91 ± 8	1315
BeP	553	59	531 ± 38	96 ± 7	531
BaP	628	52	489 ± 29	78 ± 6	489
Per	452	58	326 ± 12	72 ± 3	326
IP	501	72	615 ± 90	123 ± 16	615
BP	525	67	521 ± 31	99 ± 6	521
DA	117	13,4	133 ± 7	114 ± 6	133

Tableau II-8: Résultats du contrôle de qualité du protocole d'extraction des HAP en phase liquide. Résultats exprimés en µg/l (± E.T.). Ces résultats ont été obtenus à l'aide trois répliquats

	HAP	Concentration nominale µg l ⁻¹	Concentration déterminée µg l ⁻¹	Rendement En %
Solution n°1	Phe	165	179 ± 25	108 ± 15
	Pyr	33	26 ± 6	79 ± 17
	BP	7,5	4,2	nc
Solution n°2	Phe	800	780 ± 13	98 ± 1.7
		155	132 ± 14	86 ± 8
		34	31 ± 10	91 ± 31
Solution n°3	BaP	3	2,9 ±	nc
		1,3	0,8 ± 0.2	77 ± 9

Tableau II-9 : Résultats du contrôle de la répétabilité du protocole d'extraction des HAP en phase liquide, à l'aide d'un éluatriat brut. Résultats exprimés en ng/l, avec l'écart type (E.T.) et le coefficient de variation (C.V %).

	1	2	3	Moyenne	C.V.
Phe	30	45	63	46 ± 17	36
An	9	17	12	13 ± 4	32
Fluo	130	166	160	152 ± 19	13
Pyr	125	164	159	149 ± 21	14
BaA	53	63	60	59 ± 5	9
Chrys + Triph	73	89	83	82 ± 8	10
BbF + BkF + BjF	151	173	167	164 ± 11	7
BeP	60	69	65	65 ± 5	7
BaP	78	88	87	84 ± 6	7
Per	23	27	25	25 ± 2	8
IP	68	76	74	73 ± 4	6
BP	63	71	90	75 ± 14	19
DA	13	15	14	14 ± 1	7

II.5.3 - Métallothionéine dans les larves

La méthode utilisée est la polarographie à impulsion différentielle, d'après la technique décrite par Thompson et Cosson (1984). Cette méthode polarographique détermine les groupements SH. Elle est basée sur la détection des variations d'intensité de courant électrique qui apparaissent dans un électrolyte lors de la réduction des groupements thiols (SH) des MT. La détermination des concentrations de MT, se fait par la technique des ajouts dosés réalisée à l'aide d'une métallothionéine de foie de lapin (Sigma chemical Co., St Louis MO), étant donné l'absence d'échantillons de référence.

Chapitre III : Synthèse

Ce chapitre est une synthèse des principaux résultats obtenus dans ce travail.

Nous récapitulons dans ce chapitre les principaux résultats obtenus au cours de ces travaux de recherche et en faisons la synthèse. Le but de cette thèse était de développer un modèle biologique pertinent afin d'étudier la toxicité des sédiments vis à vis des organismes marins et estuariens et la biodisponibilité des contaminants d'origine sédimentaire.

Dans un premier temps, parmi les deux organismes marins les plus utilisés pour les bioessais (stades embryo-larvaires de bivalves et d'oursins), le stade biologique le plus sensible et le mieux adapté (facilité relative de la mise en œuvre et sensibilité des réponses) au biomonitoring a été sélectionné. Le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas*, choisi à l'issue de la première phase de ce travail, a ensuite été utilisé pour évaluer la qualité des sédiments, à l'aide de deux des traitements sédimentaires généralement retenus par les spécialistes, le sédiment contact et l'élutriat. Les relations entre les caractéristiques physico-chimiques des sédiments et leurs effets biologiques ont été mises en évidence. Parmi les différents sédiments étudiés, trois ont été désignés comme modèles et utilisés afin d'évaluer l'impact de la conservation des sédiments sur leur toxicité.

Une seconde partie de ce travail a été consacrée à l'étude de la biodisponibilité des contaminants d'origine sédimentaire. Pour ceci, trois sédiments modèles (Arès, Bidassoa et Dunkerque) à l'état frais, ainsi que celui du Cheyzin lyophilisé ont été utilisés. La bioaccumulation des HAP et des métaux, ainsi que l'induction d'un biomarqueur d'exposition métallique, les métallothionéines (MT) ont été étudiées chez les larves de *Crassostrea gigas* et de *Mytilus galloprovincialis*.

Enfin dans une dernière partie et dans l'objectif d'évaluer la qualité d'un milieu de la façon la plus juste possible, un test *in situ* a été développé, applicable dans le milieu naturel, lors des opérations d'aménagement qui remettent en suspension les sédiments contaminés pouvant entraîner une détérioration de la « qualité biologique de l'eau de mer » dans la zone impactée.

III.1 - Choix de l'organisme test :

Les embryons et les larves des organismes marins sont plus sensibles que les adultes de la même espèce (His *et al.*, 1999a). Depuis les travaux de Lillie (1921) chez *Arbacia* et de Prytherch (1924) chez *Crassostrea virginica*, les gamètes, les embryons et les larves d'oursin et d'huître sont reconnus comme des outils sensibles pour les études de toxicologie.

Le choix de l'organisme a été défini en comparant la sensibilité des différents stades embryo-larvaires chez l'oursin méditerranéen *Paracentrotus lividus* et chez l'huître creuse

Crassostrea gigas, vis à vis de divers micropolluants et sédiments contaminés. Les différents stades de développement utilisés chez ces deux invertébrés ont été : les gamètes (test de spermatoxycité), les embryons (test d'embryotoxicité) et les larves elles-mêmes, dans le cas de l'huître, pour des tests de croissance et de métamorphose.

Le test de spermatoxycité, le plus rapide (2 h), s'est montré moins sensible que le test d'embryotoxicité, ceci chez les deux espèces (Publication n°2). Ces résultats sont en accord avec ceux de Ringwood (1992) chez l'oursin *Echinometra mathaei* et le bivalve *Isognomon californicum*, de Nacci *et al.* (1986) et de Vashchenko et Zhadan (1993) chez les oursins *Arbacia punctulata* et *Strongylocentrotus intermedius*. Dans le présent travail, des effets néfastes sur le pouvoir fécondant du sperme ont été observés chez *P. lividus*. Mais Carr et Chapman (1995) ont montré que les particules en suspension elles mêmes, peuvent également avoir un effet délétère sur le sperme de l'oursin ; il est donc difficile de faire la différence entre les effets liés aux contaminants et ceux dus à l'action mécanique des particules, lors de l'utilisation des sédiments contacts et des éluviats non filtrés.

Les embryons de *Crassostrea gigas* et de *Paracentrotus lividus* présentent une sensibilité voisine vis à vis de nombreux polluants et de sédiments contaminés (Publications n°1, 2 et 6 ; Note n°1). La figure III-1 montre les anomalies larvaires observées chez les deux espèces vis-à-vis du Phe, du 2MP et du B(a)P.

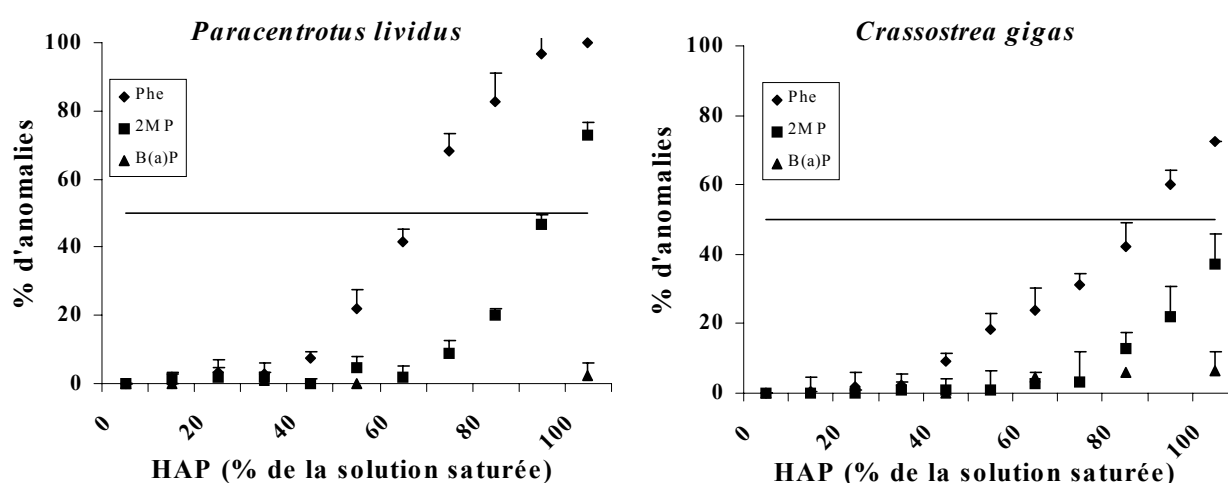


Figure III-1 : Pourcentages d'anomalies larvaires (\pm E.T.) chez *Paracentrotus lividus* et *Crassostrea gigas* en fonction du pourcentage de la solution saturée de Phe, 2MP ou B(a)P.

L'étude sur la toxicité des HAP a permis de mettre en évidence des effets de synergie, notamment entre le B(a)P et le Phe. Seul, le B(a)P ne présente aucune toxicité, alors que des effets biologiques bien marqués apparaissent lorsqu'il est en présence de Phe. Des observations similaires ont été faites par Verrhiest *et al.* (2001) entre le benzo(k)fluoranthène et le phénanthrène.

Ces résultats montrent les limites des modèles développés pour prédire la toxicité des sédiments contenant des mélanges complexes de HAP, comme celui de Swartz *et al.* (1995), qui se basent uniquement sur un effet additif de ces composés lorsqu'ils sont en mélange.

Néanmoins, le critère de sensibilité ne permet pas de choisir les embryons de l'une ou l'autre espèce. **L'huître *Crassostrea gigas* a été retenue, car elle présente plusieurs avantages.** C'est une espèce euryhaline, son développement embryonnaire se déroule parfaitement pour des salinités comprises entre 20 et 35 ‰ (His *et al.*, 1989), permettant son utilisation aussi bien en milieu marin, côtier qu'en milieu estuarien. A l'inverse, avec *P. lividus* des anomalies larvaires apparaissent à une salinité de 30 et 35 ‰. La salinité optimale pour cette espèce (provenant du bassin d'Arcachon) est de 33 ‰ (Publication n°1), ce qui nécessite dans certains cas, l'ajustement de la salinité des échantillons ; la bio-disponibilité des contaminants peut ainsi s'en trouver modifiée. Par ailleurs, dans le cadre de tests *in situ*, l'utilisation de *P. lividus* limite les zones de surveillance aux seules régions océaniques. Le développement embryonnaire chez *C. gigas* dure 24 h contre 48 h chez *P. lividus*, l'utilisation du bivalve présente donc un avantage supplémentaire, lorsque les résultats doivent être obtenus le plus rapidement possible. Enfin, dans le milieu naturel, les huîtres sont mûres de juin à septembre, alors que chez l'oursin la période est plus longue (de mars à novembre dans le bassin d'Arcachon). Cependant, le conditionnement de l'huître en éclosion est aujourd'hui bien maîtrisé et permet donc la conduite de tests toute l'année ; il n'en est pas de même pour les échinidés.

Les embryons de *C. gigas* et les larves obtenues ont également été utilisés pour un test de croissance larvaire, cependant et contrairement aux autres bioessais présentés, celui-ci est un test à plus long terme (10 jours). **Ce test est apparu plus sensible que le test d'embryotoxicité ; en effet un ralentissement et même un arrêt de la croissance larvaire ont été observés à des concentrations plus faibles que celles entraînant des anomalies larvaires** (Publication n°8). En présence de l'élutriat d'Arès et de Dunkerque, les NOEC (concentration la plus forte n'ayant pas d'effet significatif) sont respectivement passées de 25 % d'élutriat avec le test d'embryotoxicité à 5

et 1 % avec celui sur la croissance larvaire. Ces observations sur les effets d'un élutriat sédimentaire, sont en accord avec celles de Brereton *et al.* (1973) pour le Zn et de His et Robert (1982) pour le Cu, chez la même espèce.

Enfin, le dernier stade de développement utilisé chez *C. gigas*, a été la pédivéligère compétente à la métamorphose. Le passage de la vie pélagique à la vie benthique (la métamorphose) entraîne de grandes modifications physiologiques chez ces organismes (Chapitre I § 2.3.2), les rendant particulièrement sensibles aux altéragènes (Phelps et Warner, 1990). L'élutriat obtenu à l'aide du sédiment d'Arès qui est contaminé par les HAP, a une action inhibitrice sur la métamorphose des larves et présente donc un risque pour le recrutement de cette espèce (Publication n°3). Ce type de test fait parfaitement le lien entre les bioessais et les études sur les modifications des peuplements benthiques, objectif souvent difficile à atteindre en écotoxicologie. Toutefois, ce test s'est révélé moins sensible que le test d'embryotoxicité. Le sédiment contact d'Arès a présenté peu d'effets néfastes sur la métamorphose des larves, alors que d'importantes anomalies larvaires ont été observées. De la même façon pour l'élutriat, les EC50 calculées sont respectivement de 65 et 21 g/l avec le test sur la métamorphose et le test embryo-larvaire (Publications 2 et 3). De plus, l'utilisation de larves compétentes à la métamorphose nécessite le maintien des véligères en élevage pendant deux à trois semaines (hauteur de 300 µm), ce qui rend leur utilisation en routine difficilement envisageable.

Les différents tests biologiques utilisés chez l'espèce retenue, *Crassostrea gigas*, peuvent donc être classés selon une sensibilité décroissante de la façon suivante :

Croissance larvaire > Embryotoxicité > Métamorphose > Spermiotoxicité

Si le test de croissance larvaire chez *C. gigas* est le plus sensible, le temps nécessaire pour obtenir des réponses précises est d'une dizaine de jours ; son utilisation requiert des infrastructures élaborées (salle de culture d'algues en particulier) et un savoir-faire spécifique. Le bioessai le mieux adapté aux études de biomonitoring est donc le test d'embryotoxicité, rapide, simple, sensible et fiable pour l'espèce retenue. De plus, l'embryon de *C. gigas* répond parfaitement aux différents critères définis par De Witt *et al.* (1989) et Lamberson *et al.* (1992) (voir Chapitre I § I.2.2.1).

III.2 - Utilisation des embryons de *C. gigas* pour évaluer la qualité des sédiments et le choix de sédiments modèles

A partir des données du Réseau National d'Observation (RNO, IFREMER) sur l'état actuel du niveau de contamination du littoral français et de celles de Géode (Groupement d'Etudes et d'Observations sur le Dragage et l'Environnement), 10 sédiments côtiers, estuariens ou portuaires supposés contaminés ont été utilisés pour comparer les réponses de deux traitements sédimentaires, le sédiment contact et l'élutriat, à l'aide du test d'embryotoxicité chez *C. gigas*. Les sédiments ont été utilisés frais et lyophilisés (Publication n°4). Leurs caractéristiques physico-chimiques et leur toxicité ont été étudiées et comparées. A la suite de cette étude, trois sédiments modèles ont été sélectionnés.

A - sédiment contact :

L'utilisation du sédiment contact, tel qu'il a été pratiqué dans ce travail n'induit pas d'effet mécanique sur le développement embryonnaire de l'huître *Crassostrea gigas*, contrairement à la méthode utilisée par Chapman et Long (1983). Ainsi, le sédiment de l'Ile aux Oiseaux, peu contaminé, n'exerce aucun effet délétère sur le matériel biologique utilisé (aucune différence avec une simple eau de mer filtrée à 0.2 µm : EMF).

Avec le sédiment contact, les pourcentages d'anomalies larvaires (réponse biologique) observées chez *C. gigas* sont corrélés au niveau de contamination des sédiments et non pas à leurs caractéristiques (granulométrie, concentration en carbone organique). Ces corrélations ne sont significatives que dans le cas des sédiments frais (Fig. III-2). Toutefois, les anomalies larvaires obtenues avec les sédiments frais et lyophilisés sont également significativement corrélées entre elles (Publication n°4). Ces observations montrent que *C. gigas* présente un avantage considérable par rapport aux espèces couramment utilisées. DeWitt *et al.* (1988) et Cripe *et al.* (2000) ont respectivement montré que la croissance du crustacé *Americamysis bahia* et le taux de mortalité chez l'amphipode *Rhepoxynius abronius* dépendaient non seulement de la contamination du sédiment, mais également de sa teneur en matière organique et en particules fines. De la même façon, Ringwood *et al.* (1997) ont montré que le test Microtox, un des plus rapides, surestime la toxicité des sédiments fins, due à la perte de bactéries par leur adsorption sur les particules fines.

Les pourcentages d'anomalies larvaires observées pour les 10 sédiments de l'étude sont également corrélés à leur toxicité potentielle, calculée à partir des critères de qualité (ER-L et ER-M) définis par Long *et al.* (1995) (Publication n°4).

Ces résultats montrent que le test d'embryotoxicité chez *C. gigas*, avec le sédiment contact permet d'évaluer la qualité des sédiments vis à vis des organismes benthiques, ceci en 24 h contre une durée moyenne de 10 jours pour la plupart des tests de mortalité habituellement utilisés (Ex : Chez *Rhepoxynius abronius*).

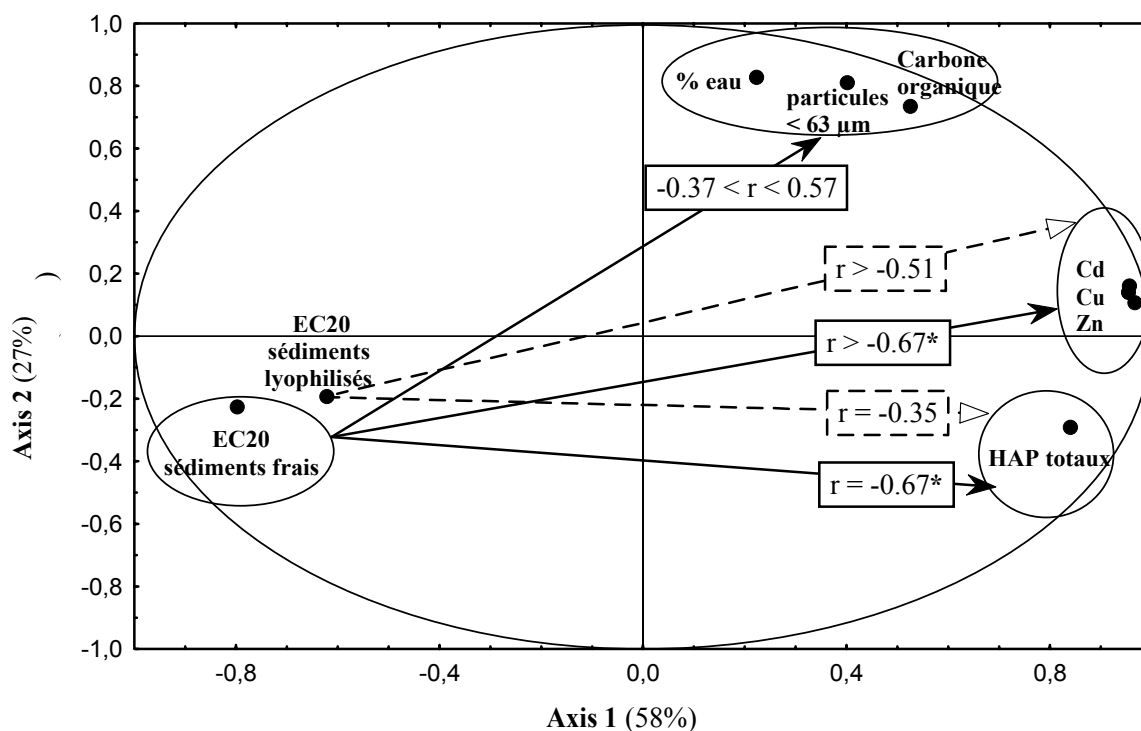


Figure III-2 : Résultats de l'analyse en composantes principales montrant les relations entre les caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques des sédiments pour le test sédiment contact.

* : les facteurs sont significativement corrélés.

B – Elutriat :

Avec les éluviats, conditions expérimentales se rapprochant de la remise en suspension des sédiments, des effets délétères ont été observés chez *C. gigas*. Comme pour le sédiment contact, les effets les plus marqués ont été obtenus à l'aide des sédiments lyophilisés (Publication n°4). Pour les sédiments frais, malgré la grande sensibilité du matériel biologique (Taylor, 1978, 1981a, 1981b ; His *et al.*, 1999a ; McPherson et Chapman, 2000), peu d'effets ont été observés avec les éluviats. Ceci s'explique d'une part par des teneurs en contaminants dans les éluviats nettement inférieures aux concentrations qui entraînent des anomalies larvaires chez l'espèce utilisée. Les EC50 sont de 590 µg/l pour le Phe ; elles sont comprises entre 500 et 1000 µg/l pour le Cd et entre 100 et

200 µg/l pour le zinc (Martin *et al.*, 1981 ; Watling, 1981, His *et al.*, 1999a, 1999b et cette étude). Seule la teneur en Cu dans l'élutriat (100%) de la Bidassoa et de la Nivelle atteint le niveau de la EC50 de ce métal (EC50=12.9 µg/l ; Publication n°1). D'autre part, la biodisponibilité des métaux d'un élutriat brut est bien plus faible que celle qui est obtenue lors de contaminations réalisées à partir de sels métalliques en eau de mer filtrée. Enfin, seuls les contaminants dissous sont disponibles pour les embryons de *C. gigas* (Publications n°2 et 7). Les éluviats obtenus à partir des sédiments frais se caractérisent par des niveaux de contamination comparables à ceux que l'on peut observer dans des zones côtières et estuariennes contaminées (RNO, 1984 ; Law *et al.*, 1997 ; Fernandes *et al.*, 1997 ; Van den Berg *et al.*, 2001) ; ces niveaux sont généralement bien inférieurs à ceux couramment utilisés dans les tests de toxicité sur les produits chimiques purs afin de déterminer leur EC50.

Ainsi, le test d'embryotoxicité chez *C. gigas* avec les éluviats devrait permettre d'évaluer la détérioration de la qualité du milieu hydrique lors de la remise en suspension de sédiments contaminés. Néanmoins, avec les sédiments frais utilisés dans cette étude, le relargage ne permet pas d'observer à court terme des effets bien marqués avec le modèle biologique retenu.

Parmi les éluviats étudiés, trois présentent des teneurs en ammoniac supérieures au seuil de toxicité de ce composé (200 µmol/l = 2,8 mg/l) vis à vis des embryons de *C. gigas* (Publication n°4). L'ammoniac a été défini comme principal composé toxique dans plusieurs études utilisant des extractions sédimentaires (eau interstitielle et élutriat ; Ankley *et al.*, 1990 ; Van Sprang et Janssen, 1997). Les teneurs en ammoniac observées dans cette étude sont du même ordre de grandeur que celles rapportées par Van den Hurck (1994) également pour des éluviats. En revanche, elles sont d'un à deux ordres de grandeur plus faibles que celles déterminées par Ankley *et al.* (1990) dans des eaux interstitielles.

Lors de l'utilisation d'élutriats, le suivi de leurs teneurs en ammoniac est donc indispensable.

C – Comparaison sédiment contact et élutriat :

Dans tous les cas (Publications n°2, 4, 5 et 8), le sédiment contact a été plus toxique d'un à quatre ordres de grandeur que l'élutriat. Par exemple, à l'état frais le sédiment du port de Dunkerque présente une EC20 de 0.2 g/l avec le sédiment contact et de 110 g/l avec l'élutriat

(Publication n°4). Des résultats similaires ont été observés par Chapman et Fink (1984) chez l'annélide *Capitella capitata* et Ankley *et al.* (1991) chez l'amphipode d'eau douce *Hyalella azteca*.

Au cours du test d'embryotoxicité, les embryons de *C. gigas* passent les 7 premières heures en contact direct avec le sédiment, puis les embryons deviennent ciliés (blastula), passent dans la colonne d'eau (c'est la phase d'émergence) où ils restent jusqu'à la fin de leur développement embryonnaire. A partir des trois sédiments modèles lyophilisés (Arès, Bidassoa et Dunkerque), les sédiments contacts entraînent les mêmes pourcentages d'anomalies chez les individus exposés uniquement pendant les 7 premières heures ou la totalité de leur développement embryonnaire (24 h ; Note 2).

Ces résultats montrent que la contamination des organismes, responsable des effets biologiques, se produit lors du contact direct des embryons avec le sédiment, période pendant laquelle les embryons vont accumuler les contaminants sédimentaires biodisponibles. Par conséquent, le test d'embryotoxicité avec le sédiment contact reflète bien la qualité du sédiment.

De la même façon, ces résultats expliquent qu'aucune action néfaste sur la métamorphose ait été observée chez les larves (les larves compétentes nagent dans la colonne d'eau et sont protégées par des coquilles) suite à leur exposition au sédiment contact (Publication n°3).

III.3 - Impact du mode et de la durée de conservation des sédiments sur leur toxicité

A partir de la caractérisation physico-chimique et toxicologique des 10 sédiments étudiés précédemment, trois d'entre eux ont été définis comme modèles : Sédiment d'Arès et de la Bidassoa, ainsi que leurs éluviats, sont caractérisés respectivement par une contamination en HAP et en métaux ; la boue portuaire de Dunkerque contient les deux types de polluants.

L'objectif des tests biologiques est d'évaluer la toxicité *in situ* des sédiments. Une des principales limites est la modification des caractéristiques physico-chimiques des sédiments lors de leur prélèvement, transport et stockage, qui modifie la forme physico-chimique des contaminants et par conséquent leur biodisponibilité et leur toxicité. Dans un objectif de standardisation du test d'embryotoxicité, pour une application en biomonitoring, il est indispensable de connaître l'effet du stockage des sédiments sur leur toxicité.

A partir des trois sédiments modèles (Arès, Bidassoa et Dunkerque), l'impact de trois méthodes (frais, congelé et lyophilisé) et de quatre périodes de stockage (10, 20, 60 et 120 jours) sur leur toxicité vis à vis des embryons de *C. gigas* a été déterminé. Les trois sédiments ont présenté des niveaux de contamination et de toxicité plus faibles que ceux observés lors d'études précédentes, utilisant des sédiments prélevés aux mêmes endroits. On a pu mettre en évidence que la congélation et la lyophilisation des sédiments augmentent la toxicité du sédiment contact et de l'élutriat (Publications n°4 et 5). Pour les éluutriats, les augmentations de toxicité s'accompagnent d'un relargage plus important de carbone organique dissous, mais aussi d'ammoniac dans le cas de la congélation. On sait que la matière organique joue un rôle important dans la répartition et la mobilité des xénobiotiques présents dans un sédiment. On peut donc penser que la congélation et la lyophilisation augmenteraient la biodisponibilité des contaminants. Les données analytiques obtenues montrent que, les concentrations des éluutriats en HAP dissous (plus biodisponibles) sont plus importantes après la lyophilisation des sédiments, contrairement aux teneurs des éluutriats en HAP totaux (particulaire et dissous) qui sont plus importantes avec les sédiments frais (Publication n°5).

La durée de stockage, n'affecte principalement que la toxicité des éluutriats obtenus à partir des sédiments d'Arès et de la Bidassoa gardés au frais (4°C). Les effets biologiques augmentent en fonction de la durée du stockage (la EC10 passe d'environ 100% à 20 % d'élutriat), ils sont également corrélés aux teneurs en ammoniac. Au delà de 20 jours à 4°C pour le sédiment d'Arès et de 60 jours pour celui de la Bidassoa, les concentrations en ammoniac dans les éluutriats dépassent le seuil de toxicité de ce composé vis à vis des embryons de *C. gigas*. Cet ammoniac provient de la dégradation bactérienne de la matière organique (Moore *et al.*, 1995). Cette production d'ammoniac n'affecte pas la toxicité du sédiment contact, car les quantités de sédiment utilisées pour le test sont faibles (maximum 5 g/l pour le sédiment contact contre 250 g/l pour l'élutriat). Avec le sédiment portuaire de Dunkerque, aucune production d'ammoniac n'a été observée au cours de son stockage. Ceci peut s'expliquer par des teneurs en carbone organique nettement plus basses (1,2 % de son poids) que celles du sédiment d'Arès et de la Bidassoa (3,5 %).

Pour des études sur la qualité de l'environnement marin et estuarien, les sédiments doivent donc être utilisés frais et dans les 20 jours qui suivent leur prélèvement. De plus, l'ammoniac dont les teneurs augmentent très rapidement dans un sédiment non oxygéné, peut constituer un biais important dans la conduite des bioessais sur les éluutriats, compte tenu de sa toxicité qui est confirmée ici. Il est donc important de déterminer sa teneur pour chaque test.

Néanmoins, pour des recherches plus fondamentales, la lyophilisation présente plusieurs avantages. Elle stabilise la qualité d'un sédiment, ce qui est intéressant lorsqu'on veut comparer la sensibilité de différents stades de développement d'une espèce et qu'ils ne sont pas disponibles simultanément (Publications n° 2 et 3). De plus, l'étude des 10 sédiments choisis au départ (Publication n°4), a mis en évidence une corrélation significative entre les pourcentages d'effets biologiques obtenus entre les sédiments contacts frais et les sédiments contacts lyophilisés. Par conséquent, même si les réponses biologiques obtenues avec des sédiments lyophilisés ont une moins bonne signification écologique, elles permettent néanmoins de mettre en évidence une toxicité potentielle de ces sédiments. En particulier, ce mode de stockage a permis d'étudier la variation mensuelle de la mobilité et de la toxicité des métaux d'un sédiment provenant du Cheyzin, site de l'estuaire de la Gironde connu pour sa contamination métallique. La mobilité des métaux (principalement Cu et Zn) et la toxicité des sédiments ont évolué de façon concomitante au cours de l'année. Les variations de toxicité du sédiment ont été observées simultanément chez trois organismes tests, les embryons de *Crassostrea gigas* et *Paracentrotus lividus* et le copépode *Tigriopus brevicornis* (Publication n°6).

III.4 - Etude de la biodisponibilité des HAP et des métaux sédimentaires

Sur le plan général, les bioessais mettent en évidence la toxicité de la fraction biodisponible des contaminants présents dans le milieu, mais ne permettent pas d'identifier les xénobiotiques responsables des effets observés. Pour étudier ce dernier problème, il est possible de réaliser des études de bioaccumulation et/ou d'utiliser des biomarqueurs d'exposition.

Les teneurs en HAP (à l'aide du sédiment d'Arès), en métaux et en métallothionéine (à l'aide des sédiments de la Bidassoa, de Dunkerque et du Cheyzin) ont été déterminées chez les larves de *C. gigas* et de *M. gallorprovincialis* après exposition des œufs fécondés et des larves au sédiment contact (test d'embryotoxicité), à l'élutriat (test d'embryotoxicité et de croissance larvaire), mais également à des algues contaminées (test de croissance larvaire avec des individus alimentés par une algue nanoplanctonique cultivée en présence de l'élutriat).

Au vu des résultats obtenus précédemment sur le mode de conservation, les trois sédiments modèles ont été utilisés à l'état frais et dans les 20 jours qui ont suivi leur prélèvement. Mis à part la boue portuaire de Dunkerque, deux séries de prélèvements ont dû être effectuées, avec chaque fois une caractérisation physico-chimiques des sédiments et des élutriats. Le sédiment du Cheyzin a été utilisé lyophilisé et uniquement vis à vis des embryons et des larves de *Mytilus galloprovincialis*.

A partir des critères de toxicité définis par Long *et al.* (1995), les sédiments de la Bidassoa et du Cheyzin sont considérés comme moyennement contaminés, par contre, ceux d'Arès et de Dunkerque sont considérés comme fortement contaminés, le premier par les HAP et le second par les HAP et les métaux. Leur remise en suspension entraîne une augmentation de la concentration en HAP et en métaux totaux de l'eau de mer (Tableau III-1 ; Publications 7 et 8). Les sédiments d'Arès et leurs éluviats non filtrés présentent les mêmes profils en HAP, ce qui est en accord avec les observations faites par Fernandes *et al.* (1997) sur des eaux naturelles, montrant que 80 à 90% des HAP présents dans l'eau sont en fait adsorbés sur les particules en suspension. L'éluviat filtré d'Arès présente une contamination en HAP dissous également bien marquée avec une valeur 100 fois plus forte que celle de l'eau de mer témoin. La fraction dissoute (éluviat filtré) est enrichie en composés de faible poids moléculaire (tetra-aromatique), donc plus solubles qui passent plus facilement dans la phase aqueuse lors de la préparation des éluviats.

Pour les éluviats de la Bidassoa et de Dunkerque, la majorité du Cd, du Cu et du Pb est adsorbée sur les particules en suspension ; il n'y a que pour le Zn qu'une partie non négligeable (1/3 de la totalité) passe sous forme dissoute (Publication n°8). Ces résultats sont en accord avec les observations faites par Sloten et Reuter (1995) en laboratoire et par Van den Berg *et al.* (2001) en milieu naturel qui ont montré que la remise en suspension d'un sédiment entraîne un relargage très faible de métaux dissous.

Les éluviats (non filtrés et filtrés) d'Arès, de la Bidassoa et de Dunkerque présentent malgré tout des niveaux de contamination réalistes sur le plan environnemental, avec des teneurs du même ordre de grandeur que celles rapportées dans la littérature pour les zones côtières et estuariennes (Fernandes *et al.*, 1997; Law *et al.*, 1997 ; Campanella *et al.*, 2001 ; Van den Berg *et al.*, 2001). Il en est de même pour l'éluviat du Cheyzin ; cependant celui-ci a été obtenu à l'aide d'un sédiment lyophilisé et par conséquent a une signification écologique limitée.

Le protocole utilisé pour l'élaboration des éluviats permet donc d'atteindre des niveaux de contamination réalistes par rapport au milieu naturel, autorisant des expositions biologiques, y compris par la voie trophique, ayant une bonne signification écologique.

Les embryons de *C. gigas* exposés au sédiment contact et à l'éluviat d'Arès (Publication n°7) ainsi que les larves contaminées pendant 9 jours à l'aide de l'éluviat par exposition directe ou par voie trophique (Publication n°8), ont accumulé les HAP en fonction du niveau de contamination du milieu ou de la nourriture.

Tableau S-1 : Contamination des sédiments et de leurs éluviats utilisés pour les études sur la biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Les composés pour lesquels il existe des seuils de qualité définis par Long *et al.* (1995 ; ER-L, ER-M) sont soulignés. * : > ER-L ; ** : > ER-M.

	<u>Fluo</u>	<u>Pyr</u>	<u>BaA</u>	<u>BbF + BkF + BjF</u>	<u>BeP</u>	<u>BaP</u>	<u>Per</u>	<u>IP</u>	<u>BP</u>	<u>DA</u>	<u>Σ HAP</u>
Publication 7 : Arès											
Sédiment (ng/g)	**5285	*3951	**3536	5331	1757	**2585	710	2300	2170	**720	28345
Elutriat non filtré (ng/l)	152	149	59	164	65	84	25	73	75	14	860
Elutriat filtré (ng/l)	35	36	15	20	9	10	3	5	7	1	164
Publication 8 : Arès											
Sédiment (ng/g)	*4034	**3328	**2146	4018	1264	**1953	505	1558	1063	**4311	20300
Elutriat non filtré (ng/l)	352	519	158	555	200	278	72	258	225	50	2600
Elutriat filtré (ng/l)	39	106	33	32	10	12	6	23	12	< 0,5	274
			<u>Cd</u>		<u>Cu</u>		<u>Zn</u>		<u>Pb</u>		
Publication 7											
Sédiment Bidassoa (µg/g)			0,84		*83		*328				
Elutriat non filtré de Bidassoa (µg/l)			0,1		14		26				
Publication 8											
Sédiment Bidassoa (µg/g)			0,80		*70		*268			*74	
Elutriat non filtré de Bidassoa (µg/l)			0,10		10,6		25,3			8,3	
Elutriat filtré de Bidassoa (µg/l)			0,02		1,1		13,3			1,1	
Sédiment Dunkerque (µg/g)			*2,2		*158		**542			**391	
Elutriat non filtré de Dunkerque (µg/l)			0,050		5,0		21,5			12,3	
Elutriat filtré de Dunkerque (µg/l)			0,006		0,4		7,3			0,3	
Publication 9											
Sédiment Cheyzin (µg/g)			0.67		*33		*218				

Les HAP d'origine sédimentaire sont donc biodisponibles vis à vis du matériel biologique utilisé.

A partir du test d'embryotoxicité et de croissance chez *C. gigas*, des concentrations corporelles critiques en HAP ont été déterminées, au-dessus desquelles des effets néfastes sont respectivement observées sur l'embryogenèse et la croissance larvaire de l'huître. Chez les larves D de 24 h, cette concentration critique est de 300 ng/g (de poids sec) ; chez les larves de 9 jours, elle est de 120 ng/g (de poids sec). Ces résultats confirment que le test de croissance larvaire est plus sensible que celui d'embryotoxicité.

La comparaison des concentrations relatives en HAP entre le milieu et les organismes renseigne sur la biodisponibilité de ces composés (Fig. III-3).

Lors du test embryo-larvaire avec le sédiment contact, la biodisponibilité des HAP est fonction de leur hydrophobicité.

Lors du test d'embryotoxicité avec le sédiment contact d'Arès, les larves D de *C. gigas* sont très enrichies en composés de faible poids moléculaire (tetra-aromatique ; Publication n°7 ; Fig. III-3A). Ces résultats montrent que la biodisponibilité des HAP sédimentaires est régulée par rapport à leur hydrophobicité, c'est à dire leur solubilité. Par conséquent, malgré le contact direct des embryons et du sédiment, il semble que l'accumulation des HAP par les organismes se fait par l'intermédiaire de la phase aqueuse (zone interface eau-sédiment) et non pas directement du sédiment vers les embryons.

Avec l'éluviat et le test embryo-larvaire, seuls les HAP sous forme dissoute sont disponibles pour les embryons ; les larves D de *C. gigas* ont un profil en HAP plus proche de celui de l'éluviat filtré que du non filtré (Fig. III-3B). Ceci tend à montrer que si la solubilisation des HAP dans l'eau de mer dépend de nombreux facteurs (leur hydrophobicité, teneur en carbone organique du sédiment, granulométrie), une fois dans la phase aqueuse, leur accumulation par les embryons est principalement fonction de leur quantité dans le milieu, il n'y a pas de discrimination entre les composés (Publication n°7).

L'étude de la bioaccumulation des HAP par les embryons donne une bonne idée de la contamination en HAP existant sous forme dissoute dans le milieu.

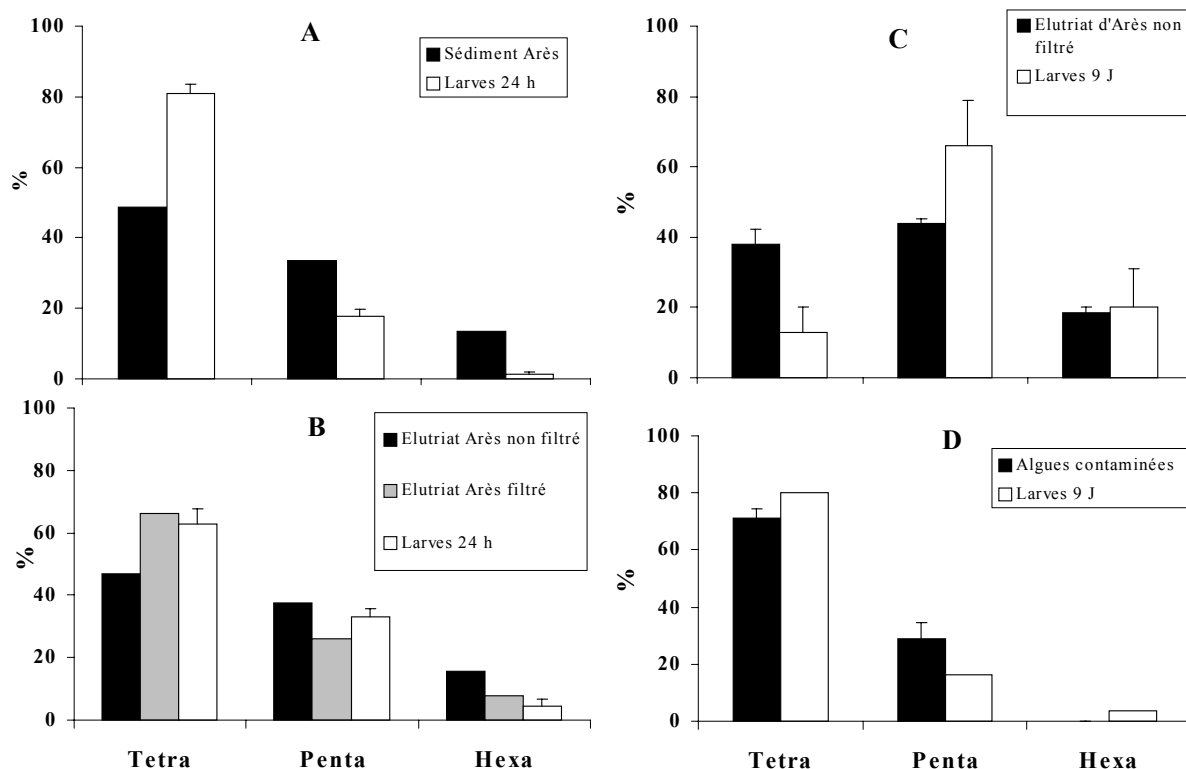


Figure III-3 : Concentrations relatives (%) des composés tétra, penta et hexa-aromatique chez des larves de *Crassostrea gigas* de 24 h obtenus à la suite d'embryons exposés au sédiment contact d'Arès (A), à l'élutriat non filtré d'Arès (B) et chez des larves de 9 jours contaminées directement par l'élutriat non filtré d'Arès (C) ou nourries à l'aide d'algues *I. galbana* contaminées par l'élutriat filtré d'Arès (D).

Avec le sédiment d'Arès, les larves de *C. gigas* élevées pendant 9 jours, présentent des profils en HAP différents selon leur mode de contamination, directe ou par voie trophique.

En présence de l'élutriat, les larves ont principalement accumulé les HAP penta-aromatiques (Fig. III-3C). En accord avec les observations faites par Baumard (1997) chez la moule *Mytilus galloprovincialis*, cet enrichissement en composés de haut poids moléculaire met en évidence la capacité des larves à ingérer les particules en suspension et à accumuler une partie des HAP adsorbés sur celles-ci (Publication n°8). Les particules en suspension sont les particules les plus fines du sédiment qui n'ont pas décanté dans l'élutriat pendant les 8 h de repos qui ont suivi l'agitation mécanique. Dans les sédiments, ces particules fines sont caractérisées par un enrichissement en composés de haut poids moléculaire (Raoux et Garrigues, 1993). A l'inverse, les larves contaminées par voie trophique (algues contaminées par l'élutriat d'Arès) ont principalement accumulé les composés de faibles poids moléculaire (tétra-aromatique), avec un profil en HAP similaire à celui des algues et de l'élutriat filtré (Fig. III-3D). Pour un niveau de contamination en

HAP dissous dans l'élutriat, réaliste sur le plan environnemental si l'on considère les eaux estuariennes (Law *et al.*, 1997), **le transfert des HAP par la voie trophique a été suffisant pour entraîner une inhibition de la croissance des larves** (Publication n°8).

L'étude du rapport B(e)P/B(a)P montre par ailleurs que les végétales de *C. gigas* âgées de 24 h et de 9 jours semblent avoir la capacité à transformer les HAP. Dans tous les cas, ce rapport est proche de 1 pour les sédiments d'Arès (0,7) et les élutriats d'Arès (0,7 pour les élutriats non filtrés et 0,9 pour les élutriats filtrés), tandis qu'il est nettement supérieur à 1 dans les larves (2,3 et 2,7 chez les larves D de 24 h respectivement exposées au sédiment contact et à l'élutriat ; 4,0 et 5,7 chez les larves de 9 jours respectivement exposées à l'élutriat non filtré d'Arès et à l'aide d'algues contaminées), ce qui tendrait à indiquer une biotransformation préférentielle du B(a)P par rapport au B(e)P.

Comme pour les HAP, la biodisponibilité des métaux sédimentaires a été mise en évidence par leur accumulation chez les organismes tests. Les embryons de *C. gigas* exposés au sédiment contact et à l'élutriat de la Bidassoa ont accumulé le Cd, Cu et Zn en fonction du niveau de contamination du milieu (Fig. III-4 ; Publication n°7). De la même façon, les larves de *Mytilus galloprovincialis* directement exposées à l'élutriat du Cheyzin (site de l'estuaire de la Gironde ; Publication n°8) et les larves de *C. gigas* exposées à celui de la Bidassoa et de Dunkerque pendant plusieurs jours, ont accumulé des métaux en fonction de la concentration d'élutriat non filtré testée (Fig. III-5 ; Publication n°9). Lors des tests de croissance larvaire chez *C. gigas*, les métaux adsorbés sur les particules en suspension ont constitué la principale source de contamination des larves. Malgré une contamination métallique similaire entre les deux élutriats non filtrés (Bidassoa et Dunkerque), des accumulations plus importantes (notamment en Cd et Pb) ont été observées avec l'élutriat de Dunkerque (Figure III-5). En accord avec les observations de McCarty et Mackay, (1993), Borgmann et Norwood, (1997) et Borgmann *et al.* (2001), ces résultats montrent que les teneurs en métaux dans les larves sont de bons indicateurs de la qualité du milieu, soit de la biodisponibilité des métaux (non essentiels) qui s'y trouvent.

Etant donné les faibles relargages de métaux sous forme soluble lors de la remise en suspension des sédiments de la Bidassoa et de Dunkerque, ni accumulation et ni transfert de métaux n'ont été observés entre les algues *Isochrysis galbana* et les larves de *C. gigas* (Publication n°8).

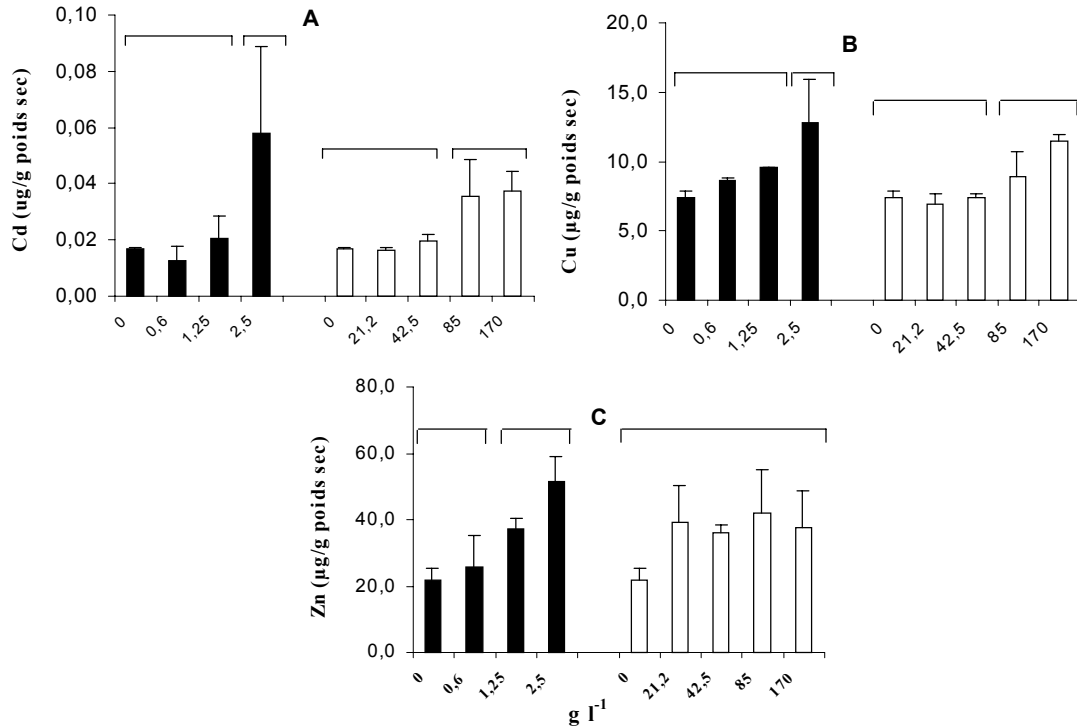


Figure III-4 : Teneurs ($\mu\text{g/g} \pm \text{E.T}$, poids frais) en Cd (A), Cu (B) et Zn (C) dans les larves de *C. gigas*, suite à l'exposition d'embryons à différentes concentrations de sédiment contact (histogrammes noirs) et d'éluviat (histogrammes blancs), obtenues à l'aide du sédiment de la Bidassoa. Les valeurs qui ne sont pas significativement différentes sont regroupées sous une même barre (ANOVA, $p < 0,05$; test de Tukey).

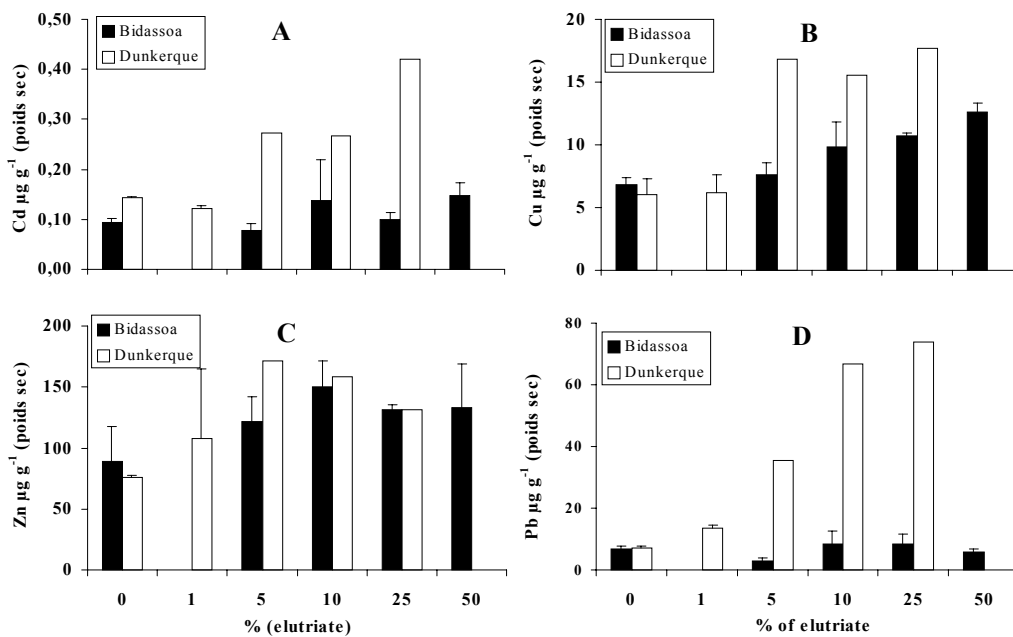


Figure III-5 : Teneurs totales ($\mu\text{g/g} \pm \text{ET}$, poids frais) de Cd (A), Cu (B), Zn (C) et Pb (D) chez les larves de *C. gigas* élevées pendant 10 jours en présence de différentes concentrations de l'éluviat de la Bidassoa (histogrammes noirs) et de Dunkerque (histogrammes blancs).

Les accumulations métalliques observées chez les larves exposées aux sédiments et aux éluviats de la Bidassoa (Publications n°7 et 10) et du Cheyzin (Publication n°9) ont été accompagnées d'une induction de métallothionéines. Dans tous les cas, les teneurs en métallothionéines sont parfaitement corrélées aux teneurs en métaux cytosoliques (généralement elles-mêmes corrélées aux concentrations du tissu total) ; ceci contribue à mettre en évidence la spécificité de ce biomarqueur d'exposition métallique chez les larves de bivalves (*C. gigas* et *M. galloprovincialis*). La figure III-6 montre les corrélations obtenues entre les teneurs métalliques cytosoliques et les teneurs en MT chez les larves de *Crassostrea gigas* gardées en élevage pendant 10 jours en présence de l'éluviat de la Bidassoa. Les meilleures corrélations sont obtenues avec le Cd et le Cu.

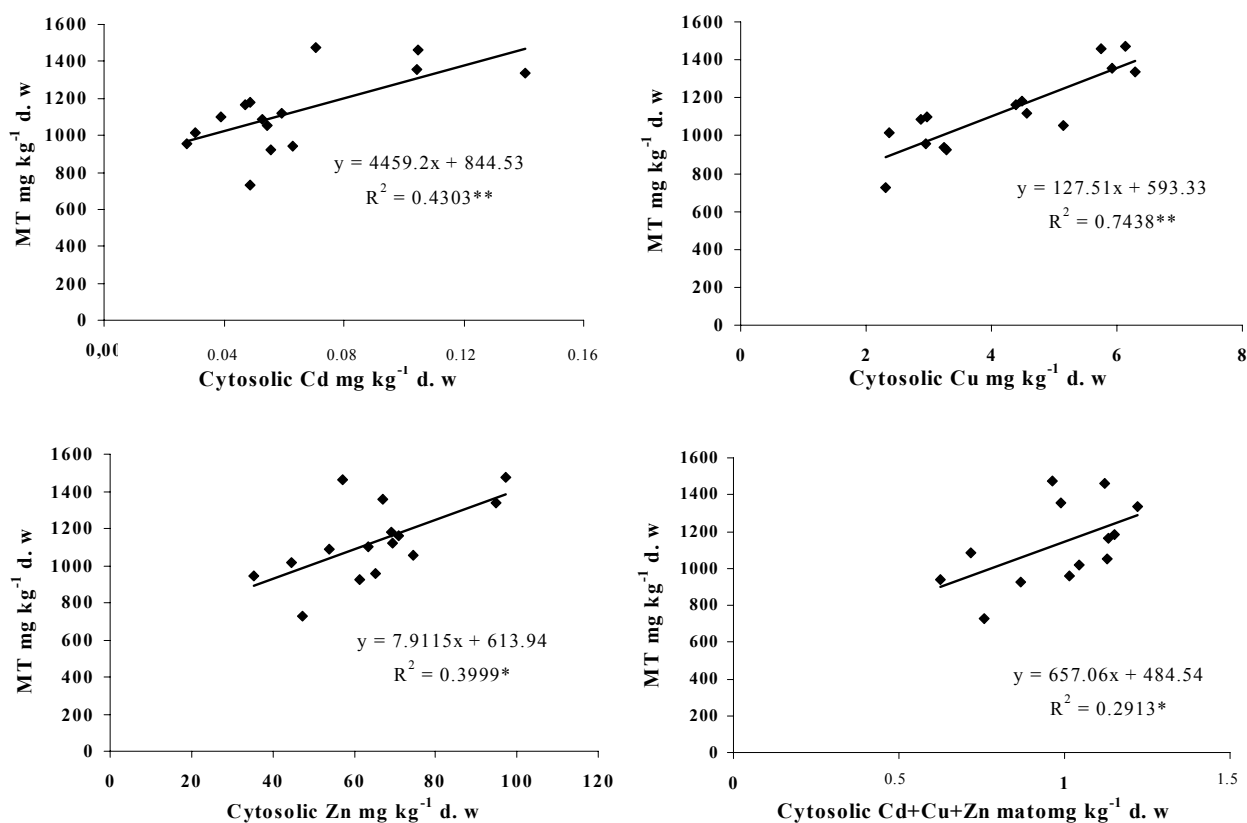


Figure III-6. Relations entre les concentrations en métaux cytosoliques (pris individuellement ou ensemble) et les teneurs en MT chez les larves de *Crassostrea gigas* exposées pendant 10 jours à différentes concentrations de l'éluviat de la Bidassoa (15 échantillons, 3 répliquats pour 5 concentrations testées). * : corrélation significative au niveau de sécurité de 95 % ; ** : corrélation significative au niveau de sécurité de 99%. A : Cd ; B : Cu ; C : Zn et D : Cd+Cu+Zn.

Seules les larves de *M. galloprovincialis* de 48 h présentent une accumulation métallique, mais pas d'induction de MT. Ces résultats ont été attribués à une faible accumulation de métaux dans la fraction cytosolique ; mais surtout, la MT présente dans l'ovocyte, au début du développement embryonnaire peut dans ce cas là être suffisante pour réguler le besoin en éléments essentiels des larves et, prendre en plus, en charge les métaux apportés par la contamination. Des inductions de MT chez des larves de bivalves ont déjà été signalées, mais toujours pour des contaminations obtenues à l'aide de sels métalliques purs et pour des concentrations bien supérieures à celles du milieu naturel (Ringwood et Brouwer, 1993, 1995 ; Roesijadi *et al.*, 1995, 1996, 1997), ce qui n'est pas le cas ici.

Comparées aux *Mytilus galloprovincialis* et aux *Crassostrea gigas* adultes, retenues pour les mesures de MT dans les études de surveillance (Lagadic *et al.*, 1997 ; Mouneyrac *et al.*, 1998 ; Geffard 2001), les larves de ces mêmes espèces présentent plusieurs avantages, notamment une plus grande sensibilité vis à vis des métaux. De plus, les embryons ou les larves ont un taux d'accumulation plus élevé en liaison avec leur développement rapide (Ringwood, 1990, 1992), ce qui permet de réaliser des observations de plus courtes durées. Chez *C. gigas*, par exemple, le test d'embryotoxicité et de croissance larvaire représente 5 et 50 % de son développement larvaire total, ce qui donne une bonne représentativité de cette période. L'amplification de la synthèse de MT est du même ordre de grandeur que l'accumulation métallique, ce qui n'est pas le cas chez les adultes, en effet, chez les larves, la quantité de Cd, Cu, et Zn associée à la MT est plus importante que celle associée aux autres protéines cytosoliques (Ringwood & Brouwer, 1993). Enfin, chez les larves, il n'y pas de problème de maturité sexuelle et l'hétérogénéité entre les individus est beaucoup moins importante, puisque les organismes sont à coup sûr du même âge et sont issus du même couple parental. Enfin on travaille avec une population entière et non avec quelques individus. Ceci plaide en faveur de l'utilisation des larves de bivalves comme matrice biologique pour la détermination des MT, biomarqueur d'exposition métallique.

De plus, chez les larves de *C. gigas* et *M. galloprovincialis*, l'induction de la MT se produit à des concentrations bien plus faibles que celles qui engendrent des effets néfastes sur le développement embryonnaire (effet à court terme) et sur la croissance larvaire (effet à long terme). La précocité de réponse d'un biomarqueur moléculaire constitue donc un signal d'alarme qui permet de détecter une exposition aux métaux avant la manifestation d'effets délétères irréversibles, au niveau de l'organisme entier et par suite de la population.

Ces résultats montrent que les HAP du sédiment d'Arès, ainsi que les métaux des sédiments de la Bidassoa et de Dunkerque sont biodisponibles et constituent un risque aussi bien vis à vis des organismes benthiques (sédiment contact) que pélagiques (éluviat). Malgré des teneurs peu élevées, les contaminants relargués dans l'eau (dissous ou adsorbés sur les particules en suspension) présentent une source de contamination et une toxicité non négligeable vis à vis des larves de *C. gigas*. L'étude de la bioaccumulation des contaminants, ainsi que l'utilisation de la MT (lors d'une contamination métallique) chez les larves de bivalves permettent d'augmenter de façon considérable la sensibilité du test d'embryotoxicité et de croissance larvaire. De plus, ces études permettent, ce qui est souvent difficile en écotoxicologie, de faire le lien entre les effets au niveau moléculaire (MT), cellulaire (bioaccumulation), individuel (à court et à long terme) et populationnel, puisque le recrutement des larves conditionne le maintien de la population.

III.5 - Test embryo-larvaire *in situ* chez *C. gigas* et *M. galloprovincialis*

Les observations en laboratoire et dans le cas présent les bioessais utilisés ne peuvent donner qu'une idée plus ou moins exacte de l'impact d'un sédiment contaminé sur le biota. En effet à côté des modifications physico-chimiques des échantillons occasionnés par le prélèvement, le stockage et la manipulation (Publication n°5), les tests en laboratoire ne peuvent pas non plus refléter parfaitement les conditions exactes du milieu naturel. Les variations spatio-temporelles de la lumière, du courant, de la turbidité, de la température et de l'oxygène modifient la spéciation, la biodisponibilité et donc la toxicité des contaminants.

Le test embryo-larvaire chez les bivalves, développé en laboratoire, a été transposé à une approche *in situ*. Des œufs fécondés de *C. gigas* ou *M. galloprovincialis* (selon la période) ont été exposés dans le milieu naturel dans des récipients expérimentaux fermés par de la toile à bluter de vide de maille appropriée (30 µm), qui permet le passage de l'eau de mer environnante (Publication n°11). Les résultats de cette étude montrent que le matériel utilisé n'entraîne aucune toxicité vis à vis des embryons des deux espèces et que ce test peut être utilisé pour évaluer «la qualité biologique des eaux». Dans le port d'Arcachon, une dégradation de la qualité biologique de l'eau a été observée au cours de l'été 2000, avec des pourcentages d'anomalies plus élevés lors des faibles marées (Fig. III-7)

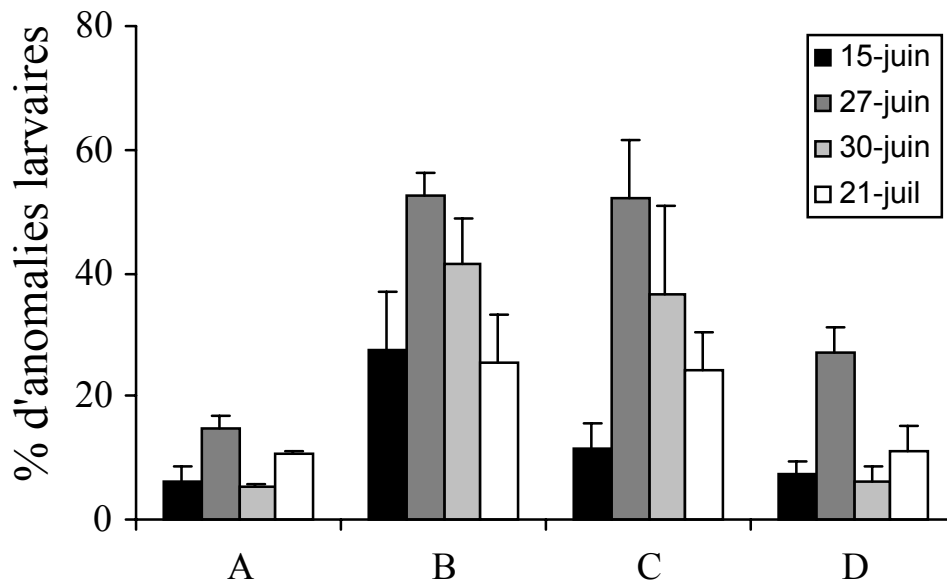


Figure III-7 : Pourcentages d'anomalies larvaires obtenus chez *C. gigas* (été 2000) lors des tests d'embryotoxicité *in situ*. A, B, C et D correspondent aux différents points d'observation.

En hiver, aucune toxicité n'a été observée à l'aide des embryons de *M. galloprovincialis*. Malgré une température faible de l'eau (10°C), le développement embryonnaire de la moule s'est déroulé parfaitement, montrant que ce test peut être réalisé en cette période de l'année où les opérations de dragages sont généralement effectuées.

Ce test embryo-larvaire *in situ* peut donc permettre éventuellement de délimiter la zone impactée, lors des opérations de dragage et de rejet de sédiments contaminés.

Chapitre IV: Choix de l'organisme test

Ce chapitre regroupe les études comparatives sur la sensibilité des différents stades du développement larvaire chez *C. gigas* et *P. lividus*. Ceci a fait l'objet de trois publications et une note.

- 1- A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. (Publication n°1).
- 2- Toxicité du phénanthrène (Phe), 2-méthyl-phénanthrène (2MP) et du benz(a)pyrène (BaP) sur l'embryogenèse et le développement larvaire de l'oursin *Paracentrotus lividus* et de l'huître *Crassostrea gigas*. (Note n°1).
- 3- Assessment of sediment contamination by spermioxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). (Publication n°2).
- 4- Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). (Publication n°3).

Pour les études de surveillance sur la qualité des sédiments, les bioessais doivent être rapides, simples et surtout sensibles. Les gamètes de l'huître *Crassostrea gigas* et de l'oursin *Paracentrotus lividus* répondent à ces critères. Différents stades du développement de ces deux invertébrés marins ont été utilisés : les gamètes (test de spermioxicité), les embryons (test d'embryotoxicité) et les larves elles-mêmes lors du test sur métamorphose dans le cas de l'huître.

La sensibilité des embryons de l'huître et de l'oursin est identique vis à vis des métaux, des pesticides, des HAP et des sédiments contaminés testés (Publications n°1 et 2 et Note n°1). Chez les deux espèces, le test d'embryotoxicité s'est montré plus sensible que le test de spermioxicité (Publication n°2). De la même façon, chez *C. gigas*, les études menées avec le sédiment d'Arès, contaminé par les HAP (Publications n°2 et 3) ont montré que le développement embryonnaire est une phase plus sensible que la métamorphose.

Ainsi, l'embryogenèse est la période la plus sensible tant chez *C. gigas* que chez *P. lividus*. Le seul critère de sensibilité ne permet pas de discriminer l'une ou l'autre espèce. Pour des raisons pratiques, l'embryon de *C. gigas* a été sélectionné comme étant l'organisme test le mieux adapté pour les études de biomonitoring.

Publication n°1 :

A Comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies

E. His, I. Heyvang, O. Geffard, X. de Montaudouin

La sensibilité des embryons et des larves de l'huître, *Crassostrea gigas* et l'oursin, *Paracentrotus lividus* vis à vis de la salinité, de quatre métaux lourds, de trois pesticides et de deux sédiments pollués a été comparée, à l'aide d'une méthode simplifiée. *C. gigas* est plus sensible au cuivre ; les mêmes effets délétères ont été observés avec le tributylétain (TBT) ; à l'inverse l'embryogenèse chez l'oursin a été plus affectée par le plomb et le mercure. Le seul pesticide qui s'est révélé toxique est le Dinoterbe, avec des effets plus marqués chez *C. gigas* que *P. lividus*. Le sédiment contaminé par le cadmium a exercé une action défavorable chez *P. lividus* ; à l'inverse, un sédiment d'origine portuaire contaminé par de nombreux métaux lourds a davantage perturbé l'embryogenèse des huîtres.

Le choix de l'une ou l'autre espèce pour des opérations de surveillance de l'environnement dépend plutôt de considérations d'ordre biologique, telles que la disponibilité de géniteurs mûrs pour les tests, ou de la salinité de la zone étudiée ; les bioessais à l'aide des huîtres semble préférable pour les eaux dessalées, compte tenu du caractère euryhalin de leurs embryons et de leurs larves, en comparaison de ceux des oursins.

Mots clés : bioessais larvaires, comparaison interspécifique, *Paracentrotus lividus*, *Crassostrea gigas*, métaux lourds, pesticides, sédiments pollués

Water Research 1999 33(7):1706-1718



Pergamon

Wat. Res. Vol. 33, No. 7, pp. 1706-1718, 1999
 © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved
 Printed in Great Britain
 0043-1354/99/\$ - see front matter

PII: S0043-1354(98)00381-9

A COMPARISON BETWEEN OYSTER (*CRASSOSTREA GIGAS*) AND SEA URCHIN (*PARACENTROTUS LIVIDUS*) LARVAL BIOASSAYS FOR TOXICOLOGICAL STUDIES

EDOUARD HIS^{*}, ISABELLE HEYVANG¹, OLIVIER GEFFARD¹ and XAVIER DE MONTAUDOUIN²

¹IFREMER, Quai du Commandant Silhouette, 33120 Arcachon, France and ²Laboratoire d'Océanographie Biologique, 2 rue du Professeur Jolyet, 33120 Arcachon, France

(First received September 1997; accepted in revised form August 1998)

Abstract—The respective sensitivity of oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) embryos and larvae to salinity, and to various micropollutants (four heavy metals, three pesticides) and to two polluted sediments were compared with a simplified bioassay method. *C. gigas* embryos and larvae were more sensitive to copper; the sensitivity of both species to tributyltin (TBT) was practically the same; *P. lividus* was more sensitive to lead and mercury. The only pesticide found to be toxic was a herbicide, Dinoterbe, to which oyster larvae were more sensitive than sea urchin plutei. Of the two sediments tested, the first one had effects on *P. lividus* embryogenesis only; *C. gigas* embryos and larvae were more affected by the second sediment which was originated from a harbour and was polluted by heavy-metals. The choice of species for biomonitoring may be based on biological considerations, such as the availability of mature adults for obtaining gametes, or on the salinity of the studied area; the oyster bioassay seems to be more suitable for coastal and estuarine brackish waters, because of the broader salinity tolerance of estuarine bivalve larvae as compared to sea urchin larvae. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

Key words—larval bioassays, interspecific comparison, *Paracentrotus lividus*, *Crassostrea gigas*, heavy metals, pesticides, polluted sediments

Résumé—La sensibilité des embryons et des larves de l'huître, *Crassostrea gigas* et de l'oursin, *Paracentrotus lividus* vis à vis de la salinité, de quatre métaux lourds, de trois pesticides et de deux sédiments pollués a été comparée, à l'aide d'une méthode simplifiée. *C. gigas* est plus sensible au cuivre; les mêmes effets délétères ont été observés avec le tributylétain (TBT); à l'inverse l'embryogenèse chez l'oursin a été plus affectée par le plomb et le mercure. Seul le Dinoterbe (herbicide) s'est révélé toxique dans les deux cas, avec des effets plus marqués chez *C. gigas*. Le sédiment contaminé par le cadmium a exercé une action défavorable chez *P. lividus*; à l'inverse, un sédiment d'origine portuaire contaminé par de nombreux métaux lourds a davantage perturbé l'embryogenèse des huîtres. Le choix de l'une ou l'autre espèce pour des opérations de surveillance de l'environnement dépend plutôt de considérations d'ordre biologique, telles que la disponibilité de géniteurs mûrs pour les tests, ou de la salinité de la zone étudiée; les bioessais à l'aide des huîtres semble préférable pour les eaux dessalées, compte tenu du caractère euryhalins de leurs embryons et de leurs larves, en comparaison de ceux des oursins. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

INTRODUCTION

Marine pollution has been traditionally documented in terms of chemical concentrations of contaminants; however, these measurements do not provide estimations of the deleterious effects upon living organisms and should be complemented with biological criteria obtained by means of bioassays (Chapman and Long, 1983). Only living systems are able to integrate the various complex effects of contaminants that are biologically important (Stebbing *et al.*, 1980; Stebbing, 1985; Anonymous, 1989).

Embryos and larvae are less tolerant to toxic metals (and pollutants in general) than adults of the same species and therefore represent the critical life stages for toxicity tests (Connor, 1972; Stebbing *et al.*, 1980; Martin *et al.*, 1981). Bivalve and sea urchin gametes and embryos were recognised as valuable tools for scientists already in the 1920s and 1930s (see Lillie, 1921, on *Arbacia* sea urchins, and Prytherch, 1924, on *Crassostrea virginica* oysters).

Increased concern regarding the use of the oceans as sites for the disposal of anthropogenic wastes has prompted studies on the toxicity of selected metals and micropollutants to representative species by means of short-term bioassays (Martin *et al.*, 1981). Water quality bioassays using the pelagic stages of

*Author to whom all correspondence should be addressed.
 [Tel.: +33-56-385-608; Fax: +33-56-838-980; E-mail: ehis@ifremer.fr].

several taxa of marine invertebrates have been used to monitor the biological effects of contamination (Stebbing, 1985); since the early findings of Wilson (1951) and Wilson and Armstrong (1961) with plutei of *Echinus esculentus*, and those of Woelke (1961, 1966, 1967, 1968, 1972) with *Crassostrea gigas* embryos and larvae, numerous reports have been published on biomonitoring of coastal waters (e.g. Okubo and Okubo, 1962; Bougis *et al.*, 1979; Chapman and Long, 1983; Calabrese, 1984; Pagano *et al.*, 1989; Kobayashi, 1991).

Pollution in the water column generally leads also to the chemical contamination of the sea bed; the development of sediment toxicity tests began in the early 1970s and their regulatory application has expanded greatly since 1977. Acute sediment toxicity tests are now well developed; they have become an integral part of benthic ecosystem impact assessment and they are also part of several comprehensive methods for generating sediment quality criteria (Swartz, 1989; Burton, 1992; Anonymous, 1993).

During the past decades numerous studies have been published concerning the effects of individual contaminants (Calabrese, 1984; Kobayashi, 1984) and on the assessment of seawater and sediment quality (Woelke, 1972; Swartz, 1989). They are based on the use of embryos and larvae of bivalves and sea urchins. Criteria concerning the choice of the organisms to be bioassayed have been established by Stebbing *et al.* (1980) who recommend the use of a micro-algal bioassay with *Skeletonema costatum* in addition to oyster and sea urchin larval bioassays.

To our knowledge, only a few studies have simultaneously considered the sensitivity of bivalve and sea urchin embryos and larvae to pollutants (Klößner *et al.*, 1985; Dinnel *et al.*, 1987; Long *et al.*, 1990; Pagano *et al.*, 1996). Such a comparison for Hawaiian species has been conducted by Ringwood (1992).

Routine ecotoxicological monitoring requires simple, inexpensive and rapid methods in order to be performed as standard procedures by not specifically trained laboratories (e.g. for the use aboard small research ships with limited space and equipment). A simplification of the ASTM standard method ASTM (1989) which can be used with bivalve larvae has been recently proposed (His and Beiras, 1995; His *et al.*, 1997). It is based on the percentage of abnormal D-larvae after the fertilised eggs have been incubated for one or two days in the water or in presence of the sediment (whole sediment or extract) to be tested.

In the present study, the same simplified method is applied to embryos and plutei of *Paracentrotus lividus*, a sea urchin which is abundant in European coastal waters, and has been frequently used in biological studies since the end of the last century (see Monroy, 1986) and in ecotoxicological investi-

gations (Dinnel *et al.*, 1982; Klößner *et al.*, 1985; Pagano *et al.*, 1989). Some experiments were conducted simultaneously with the same nominal concentrations of various micropollutants and sediments; other results obtained with *P. lividus* fertilised eggs are compared with previously published data concerning *C. gigas* (Beiras and His, 1994; His, 1996).

Oysters are euryhaline species subjected to fluctuating environmental conditions, and the relative effects of temperature and salinity on their embryogenesis and larval development have been described by His *et al.* (1989). Embryogenesis in *C. gigas* is not affected by salinities between 20 and 30 ppt, allowing the use of its embryos and larvae in monitoring brackish water quality (His and Beiras, 1995; His *et al.*, 1997). Sea urchins however are generally stenohaline animals and pollutant toxicity increases with decreasing salinities when gametes are exposed from 30 to 25‰ (Dinnel *et al.*, 1987). The first step of this study was to study the effects of salinity on *P. lividus* embryogenesis and larval development.

METHODS

Bioassay procedure

Crassostrea gigas. The method used in the *C. gigas* bioassay has been described in details by His *et al.* (1997).

The adults are induced to spawn naturally to guarantee gamete quality, the fertilised eggs are exposed to the pollutant in 0.2 µm filtered seawater (FSW) 15 min after fertilisation and are incubated for 18–24 h at 24 ± 1°C in 25 ml transparent polypropylene vessels (600 eggs; five replicates). After the incubation period 100 µl of 4% buffered formalin are added to each vessel, and abnormalities [unsegmented or, malformed embryos and abnormal D-larvae, Fig. 1(A)] are determined by direct observation of 100 individuals (chosen at random from the 600 in each vessel) by means of an Utermöhl inverted microscope.

Paracentrotus lividus. Spawning was induced in sea urchin from the field by injection of 1 ml of 0.5 M KCl through the perioral membrane.

Eggs were collected by placing spawning females separately in individuals 250 ml beakers with FSW (salinity 33 ppt — see below) at 21 ± 1°C. After 30 min of intense spawning, the eggs were sieved at 212 µm with a sterile stainless sieve and allowed to settle for 10 min in a 500 ml sterile graduated cylinder containing FSW. The upper 100 ml were then discarded in order to eliminate the less dense eggs and replaced by FSW. The contents of the cylinder were then mixed gently, but thoroughly by means of a rod with attached perforated disc, and again allowed to settle for 10 min. The upper 100 ml were discarded again and replaced by FSW. The eggs were then ready for fertilisation. Four subsamples of 100 µl were taken to count the number of eggs under the microscope.

While decanting the eggs in FSW, dry sperm from each male was collected separately with an automatic pipette and stored in a sterile 10 ml tube placed in a beaker with ice. Sperm mobility was checked under the microscope. When the eggs were ready for fertilisation, 40 µl of "dry sperm" (sperm directly collected from the gonad without any seawater) were mixed with 2 ml FSW, and 1 ml of this suspension was added to the unfertilised eggs in the 500 ml graduated cylinder, under continuous mixing.

As in the *C. gigas* bioassay, three to five batches of fertilised eggs, depending on the availability of spawning in-

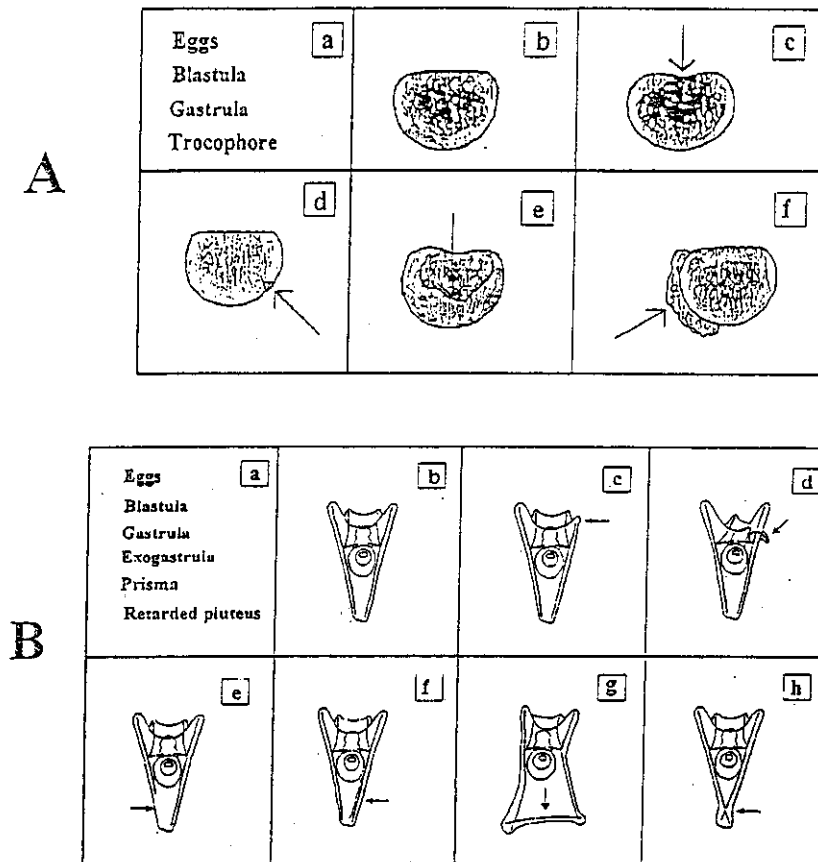


Fig. 1. The different abnormalities observed in *Crassostrea gigas* D larvae (A) and *Paracentrotus lividus* plutei (B) according to His *et al.* (1997) and Klöckner *et al.* (1985), respectively. (A) (a) unsegmented eggs, normal or abnormal blastula, gastrula and trochophore, (b) normal larva, (c) convex hinge, (d) indented shell margin, (e) incomplete shell, (f) protruded mantle. (B) (a) various deformed or retarded developmental stages from egg to two-armed echinopluteus, (b) normal echinopluteus, (c) unequal length of postoral arms, (d) twisted right oral rod, (e) parts of right body rod missing, (f) left body rod doubled, (g) additional crossbarred body rod, (h) apically "crossed" body rod.

dividuals, (each from one female and one male) were prepared and fertilisation success was verified within 1 min, after adding the sperm, as indicated by the presence of the fertilisation membrane. One batch per experiment with close to 100% fertilised eggs was chosen for the experiment.

Fifteen min after fertilisation, volumes corresponding to 300 fertilised eggs from the selected batch, were transferred with a variable-volume micro pipette (the tip of which had been cut off to allow the uptake of the eggs without damage), to the different polypropylene vessels (five replicates per treatment). The eggs were incubated at $21 \pm 1^\circ\text{C}$ for 48 h.

After this 48 h incubation period, 100 μl of 4% buffered formalin were added in each vessel and abnormalities [various deformed or not development stages from egg to 2-armed echinopluteus and various types of deformed echinopluteus larvae, Fig. 1(B)] were determined according to Klöckner *et al.* (1985) in *Psammechinus miliaris* — by direct observation of 100 individuals per vessel, randomly chosen from the 300 per vessel.

Experimental treatments

Salinity. Natural seawater was collected on the day of the experiments, in the Grand Banc, an area of the Bay of Arcachon which has naturally reproducing populations of oysters and sea urchins. The original salinity of the water

was 35 ppt and the following salinities were prepared by addition of deionized water. These were tested on fertilised eggs of *P. lividus*: 35 (undiluted), 33, 30, 25 and 20 ppt.

In accordance with the results obtained (see Section 3), all the following treatments were conducted at 33 ppt.

Heavy metals. All the heavy metal solutions were prepared with analytic grade salts.

Tributyltin (TBT). The various TBT concentrations were prepared by adding appropriate aliquots of a tributyltin acetate solution ($\text{C}_{14}\text{H}_{30}\text{O}_2\text{Sn}$, 50 mg l^{-1} in distilled water acidified with 2 ml of HCl), with the controls receiving the same quantity of acidified deionized water as the highest treatment (2 $\mu\text{g l}^{-1}$). The following concentrations were tested on *P. lividus* fertilised eggs for comparison with previous data on *C. gigas* embryos and larvae (His, 1996): 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 and 2 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Mercury. The following nominal concentrations (Hg concentration: $\mu\text{g l}^{-1}$) were prepared from a fresh stock solution of $\text{HgCl}_2 \cdot 0$ (controls) 2, 4, 8, 16, 32 and 64 $\mu\text{g l}^{-1}$. They were tested on fertilised *P. lividus* eggs for comparison with previous data on *C. gigas* embryos and larvae obtained with the same method (Beiras and His, 1994).

Copper. Concentrations of 0 (controls), 10, 25, 50, 100 and 150 $\mu\text{g l}^{-1}$ cupric sulphate, 5-hydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) were tested on embryos and larvae of both species.

Table 1. Parameters of one-way ANOVAs testing the effects of different salinities (*P. lividus* only), pollutants and sediment concentrations on the percentage of abnormal development of *Paracentrotus lividus* larvae and *Crassostrea gigas*

Source	<i>Paracentrotus lividus</i>		<i>Crassostrea gigas</i>	
	df	F	df	F
Salinity (‰)	5	1103.1***		
TBT ($\mu\text{g l}^{-1}$)	5	4.3**		
HgCl ₂ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	6	1777.8***		
SO ₄ Cu ($\mu\text{g l}^{-1}$)	5	559.6***	4	275.4***
Pb-acetate ($\mu\text{g l}^{-1}$)	8	239.7***	8	32.8**
Mercaptodimethur ($\mu\text{g l}^{-1}$)	6	4.0**	6	2.1 (ns)
Glyphosate ($\mu\text{g l}^{-1}$)	5	1.5 (ns)	5	0.7 (ns)
Dinoterbe ($\mu\text{g l}^{-1}$)	7	398.1***	5	5839.8***
Sediment La Fosse (g l^{-1})	4	23.6***	4	2.9*
Sediment La Rochelle (g l^{-1})	4	313.6***	4	313.6***

F: *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, ns: $P > 0.05$. df means degree of freedom.

Lead. The following lead (II) acetate ($\text{Pb}(\text{OCOCH}_3)_2$) concentrations were tested on embryos and larvae of both species: 0 (controls), 10, 25, 50, 100, 150, 300, 600 and 1200 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Pesticides

The pesticides tested were mercaptodimethur, glyphosate and dinoterbe, the main characteristics of which are described in Hayes and Laws (1991), and which are all used in recently cultivated marshes near a French shellfish farming area (Chevalier and Masson, 1988).

Mercaptodimethur. Mercaptodimethur (is methiocarbe) is a carbamate insecticide cholinesterase inhibitor (4-methylthio-3,5 xylyl methylcarbamate). Its solubility is 27 mg l^{-1} in water at 20°C. The following concentrations, prepared from a fresh stock solution in deionized water (10 mg l^{-1}), were tested: 0 (controls), 10, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Glyphosate. Glyphosate *N*-(phosphonomethyl glycine) which has a solubility in water of 10 mg l^{-1} , is an herbicide. The following concentrations, prepared from a stock solution (10 mg l^{-1} in 33 ppt FSW), were tested: 0 (controls), 10, 25, 50, 100, 150, 200 $\mu\text{g l}^{-1}$.

Dinoterbe. Dinoterbe (2-ter-butyl-4,6 dinitrophenol) is a herbicide which has a water solubility of only 0.45 mg l^{-1} . 5 mg of this pesticide were dissolved in dimethylsulfoxyde (DMSO) and mixed for 1 h at 60°C in 33 ppt FSW. From this stock solution the following concentrations were made up and tested: 0, 10, 25, 50, 100, 150, 200 and 250 $\mu\text{g l}^{-1}$; all polypropylene vessels (controls included) received a final concentration of 0.5 ml DMSO l^{-1} .

Sediments

Two fine silt sediments, with 80–90% of the particles smaller than 63 μm were bioassayed. The first (La Fosse) was collected in the Gironde estuary, a site well known for its cadmium pollution (Anonymous, 1988); the second sediment was collected near a dumping site from La Rochelle harbour (Radenac, 1996).

Both sediments were stored at 4°C (Anonymous, 1993) and tested as follows: a stock suspension (10 g l^{-1} in 33 ppt FSW) was hand-shaken for 10 s and used to prepare the following concentrations: 0 (controls), 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 and 10.0 g l^{-1} , (this last value for *C. gigas* only with La Fosse sediment). The various suspensions were put into the experimental vessels and allowed to settle for 1 h; they were then inoculated with fertilised eggs of both species.

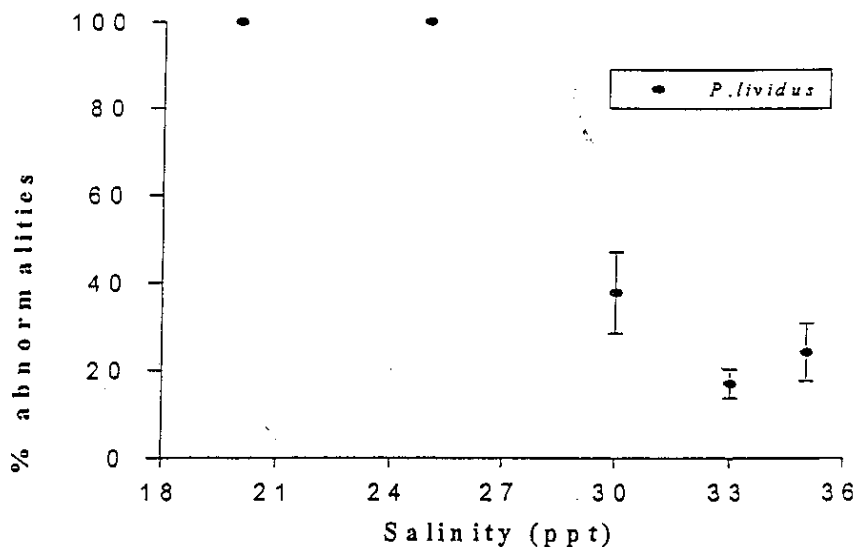


Fig. 2. Percentages of abnormal *Paracentrotus lividus* larval development ($\pm 95\%$ confidence limits) in relation to salinity.

1710

Edouard His *et al.*

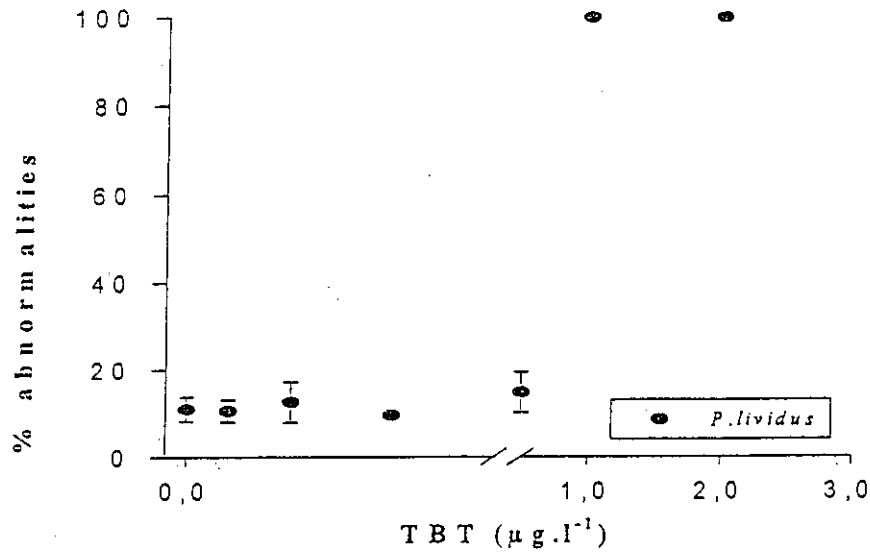
Statistical procedure

Mean percentage abnormalities and 95% confidence limit were calculated for the different samples and compared to the results for the controls. If abnormalities in

the controls were 20% or more, the test was judged invalid and repeated.

In order to test the nul-hypothesis that salinity, pollutant and sediments had no effect on larval development,

A



B

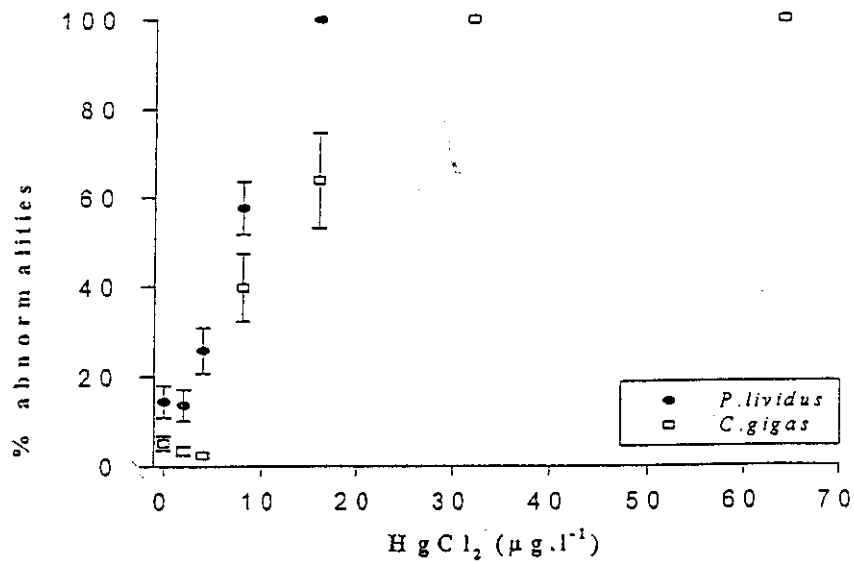
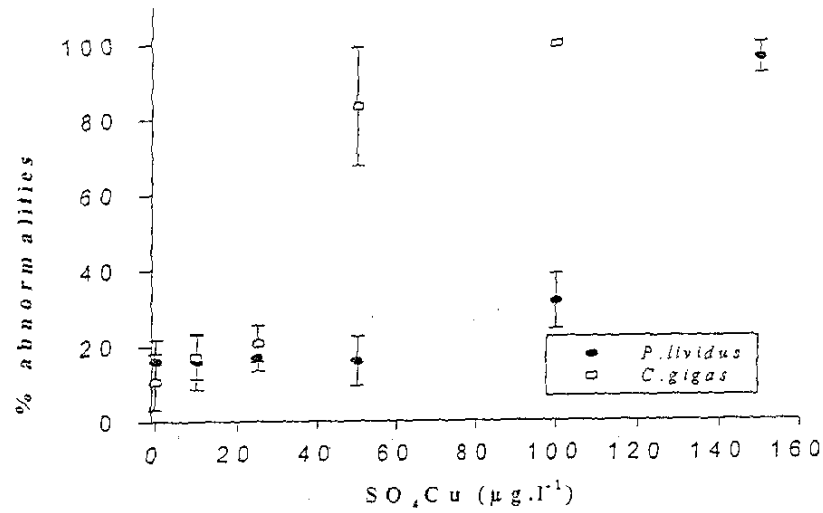


Fig. 3. Percentages of abnormal *Paracentrotus lividus* (black dots) and *Crassostrea gigas* (white dots) larval development (\pm 95% confidence limits) in relation to different concentrations of heavy metals. (A) TBT, (B) HgCl₂, (C) CuSO₄, (D) Pb-acetate.

C



D

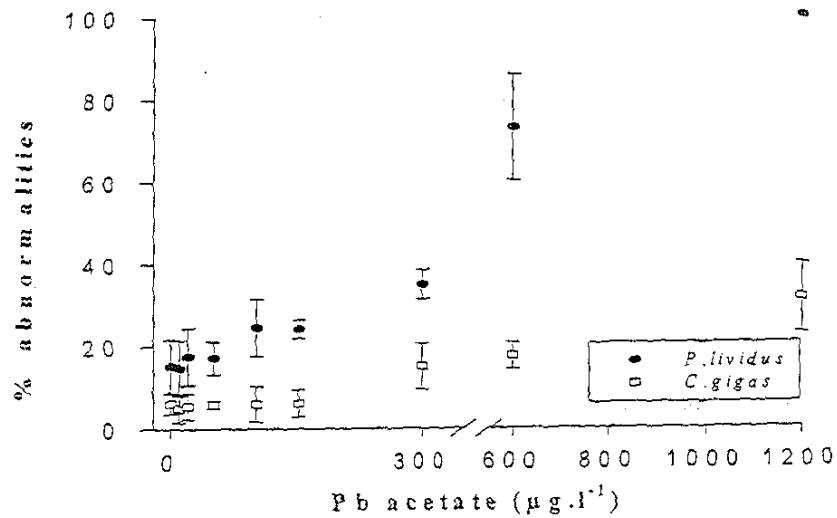


Fig. 3 (continued)

percentages of abnormal larvae at each concentration were compared to the controls using a one-level ANOVA (Sokal and Rohlf, 1981; Underwood, 1981). Prior to the ANOVA, Cochran's test for homogeneity of variance was used (Winer, 1971). If the data failed this test, arcsin/√p transformations were applied; this was sufficient in our

study to achieve homogeneity. Whenever the null hypothesis was rejected ($\alpha = 0.05$), and when 100% mortality was achieved in presence of high doses of pollutant, nonlinear regressions were performed in order to assess $EC50 \pm CI$ (confidence interval) by using a nonlinear regression analysis program (Macro Hill version 2), accord-

Table 2. EC50 (\pm confidence interval limits in parenthesis) in larval development of *Paracentrotus lividus* and *Crassostrea gigas* at different salinities (*P. lividus* only) and in the presence of the different pollutant tested. For TBT data, concerning the effects on *C. gigas* embryogenesis, see His (1996), Table 12.3, p. 246

Source	<i>Paracentrotus lividus</i>		<i>Crassostrea gigas</i>	
	EC50	C.I.	EC50	C.I.
TBT ($\mu\text{g l}^{-1}$)	0.6	0.2		
HgCl ₂ ($\mu\text{g l}^{-1}$)	7.8	0.4	12.3	1.3
SO ₄ Cu ($\mu\text{g l}^{-1}$)	114.7	3.8	37	3.4
Pb-acetate ($\mu\text{g l}^{-1}$)	482	101	not reached	
Mercaptodimethur ($\mu\text{g l}^{-1}$)	not reached		not reached	
Glyphosate ($\mu\text{g l}^{-1}$)	not reached		not reached	
Dinoterbe ($\mu\text{g l}^{-1}$)	200.9	7.5	72.2	2.3
Sediment La Fosse (g l^{-1})	not reached		not reached	
Sediment La Rochelle (g l^{-1})	3.3	0.4	2.4	0.5

ing to Vindimian *et al.* (1983), after Abbott's correction (Hamilton *et al.*, 1977).

RESULTS

ANOVA showed that glyphosate had no significant effect ($P > 0.05$) on *P. lividus* development of larvae for the tested concentrations (i.e. 0–200 $\mu\text{g l}^{-1}$) and that glyphosate and mercaptodimethur had no significant effect ($P > 0.05$) on *C. gigas* larvae for the same concentrations.

Salinity

Salinity had a significant effect on *P. lividus* larval development ($P < 0.001$) (Table 1, Fig. 2). At 20 and 25 ppt, all the larvae were abnormal. At higher salinities, development failure decreased significantly and was lowest ($17\% \pm 3.3\%$) at 33 ppt but abnormalities increasing again at 35 ppt ($24.2\% \pm 9.3\%$). Consequently, the salinity used in the following experiments was 33 ppt as being the salinity the most suitable for successful development in *P. lividus* as well as in *C. gigas* (His *et al.*, 1997).

Heavy metals

Tributyltin (TBT). TBT had a significant effect on *P. lividus* larval development ($P < 0.01$) [Table 1, Fig. 3(A)]. Its toxicity remained insignificant up to 0.02 $\mu\text{g l}^{-1}$, increased slightly at values up to 0.5 $\mu\text{g l}^{-1}$, and increased strongly at 1.0 $\mu\text{g l}^{-1}$, all the larvae being abnormal at this last concentration. The EC50 was $0.6 \pm 0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ (Table 2).

Mercury. Mercuric chloride had a significant effect on *P. lividus* larval development ($P < 0.001$) [Table 1, Fig. 3(B)]. The toxicity was not significant ($P > 0.05$) at concentrations $\leq 2 \mu\text{g l}^{-1}$, but sharply increased at higher values, reaching 100% abnormalities at 16 $\mu\text{g l}^{-1}$. The EC50 was $7.8 \pm 0.4 \mu\text{g l}^{-1}$ (Table 2).

The effects on *C. gigas* embryogenesis were significant ($P < 0.001$) [Beiras and His, 1994; Fig. 3(B)], with a higher EC50 than for *P. lividus* (i.e. $12.3 \pm 1.3 \mu\text{g l}^{-1}$, Table 2).

Copper. Copper sulfate had a significant effect on *P. lividus* larval development ($P < 0.001$) [Table 1, Fig. 3(C)]. No difference was observed at values from 0 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($16.0\% \pm 5.8\%$) to 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($16.0\% \pm 6.6\%$). At higher concentrations, the percentage of abnormalities increased significantly to nearly 100% at 150 $\mu\text{g l}^{-1}$. The EC50 was $114.7 \pm 3.8 \mu\text{g l}^{-1}$.

In contrast, the embryogenesis in *C. gigas*, resulted in increasing abnormalities at concentrations up to 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($85.4\% \pm 15.8\%$) as compared to the controls ($10.6\% \pm 7.5\%$) and all the larvae were abnormal at 100 $\mu\text{g l}^{-1}$ [Table 2, Fig. 3(C)], the EC50 being $37.0 \pm 3.4 \mu\text{g l}^{-1}$, lower than for the sea urchin embryos.

Lead. Lead acetate had a significant effect on *P. lividus* larval development ($P < 0.001$) [Table 1, Fig. 3(D)]. No effect was observed between the controls ($15.2\% \pm 6.4\%$) and 10 to 50 $\mu\text{g l}^{-1}$ ($14.8\% \pm 6.7\%$ and $17.2\% \pm 3.9\%$, respectively). At higher concentrations, abnormalities increased steadily to 100% at 1200 $\mu\text{g l}^{-1}$. The EC50 was $482.0 \pm 101.0 \mu\text{g l}^{-1}$ (Table 2).

Lead acetate also had significant effects on oyster larval development ($P < 0.01$) [Table 2, Fig. 3(D)], although they were less pronounced. Abnormalities increased slowly at the higher concentrations, but reached only $31.2\% \pm 8.5\%$ at 1200 $\mu\text{g l}^{-1}$; so the EC50 could not be calculated.

Pesticides

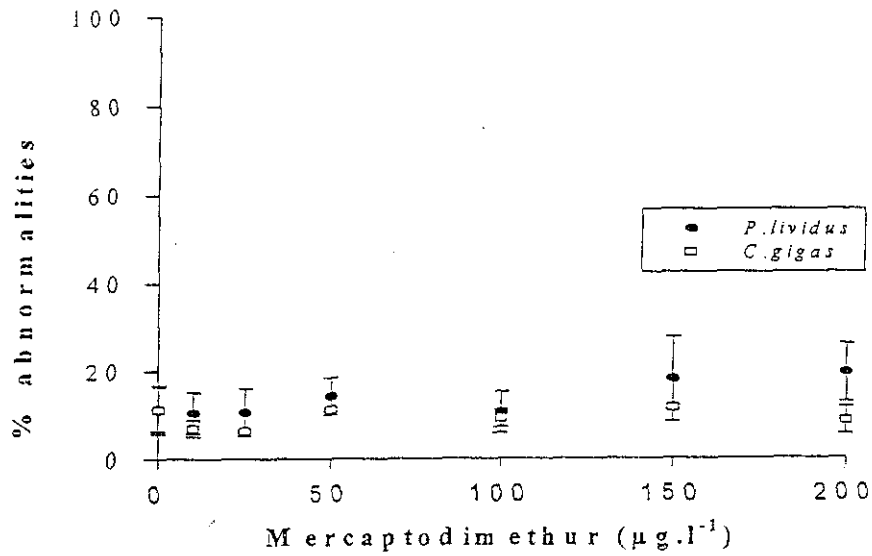
Mercaptodimethur. Mercaptodimethur had significant effects on *P. lividus* embryogenesis ($P < 0.01$) [Table 1, Fig. 4(A)]. Its action was, however moderate and the abnormalities ranged from $8.2\% \pm 3.2\%$ (controls) to $13.0\% \pm 6.4\%$ at the highest value tested (200 $\mu\text{g l}^{-1}$).

No significant effects were observed in *C. gigas* embryos and larvae ($P > 0.05$) [Table 2, Fig. 4(A)] for the same concentrations ($8.4\% \pm 2.9\%$ at the highest concentration and $8.5\% \pm 3.1\%$ in the controls).

Glyphosate. Glyphosate had no significant effects on either *P. lividus* or *C. gigas* larval development ($P > 0.05$) [Tables 1 and 2, Fig. 4(B)] at concentrations ranging from 0 (controls) to $200 \mu\text{g l}^{-1}$.

Dinoterbe. Dinoterbe had significant effects on *P. lividus* larval development ($P < 0.001$) [Table 1, Fig. 4(C)]; percentage abnormalities were moderate from 0 to $150 \mu\text{g l}^{-1}$ ($11.8\% \pm 4.5\%$ and

A



B

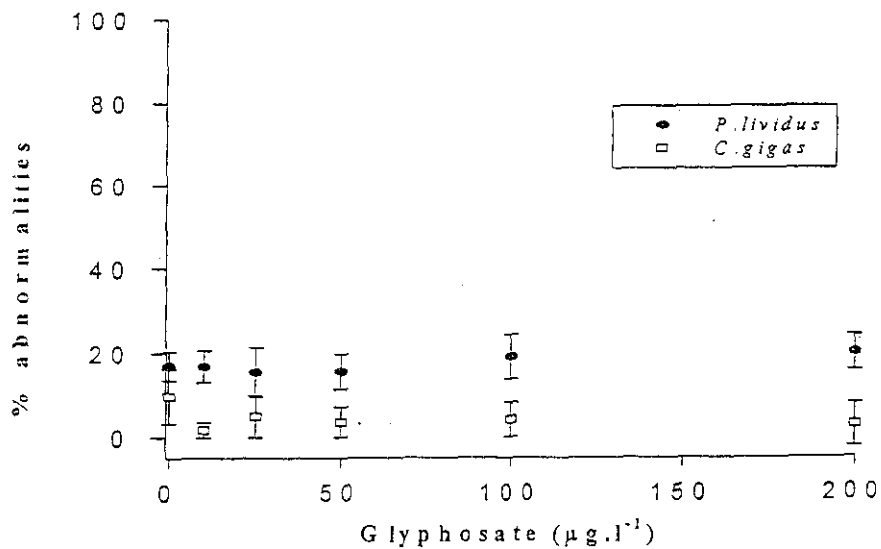


Fig. 4. Percentages of abnormal *Paracentrotus lividus* (black dots) and *Crassostrea gigas* (white dots) larval development ($\pm 95\%$ confidence limits) in relation to different concentrations of pesticides. (A) mercaptodimethur, (B) glyphosate, (C) dinoterbe.

C

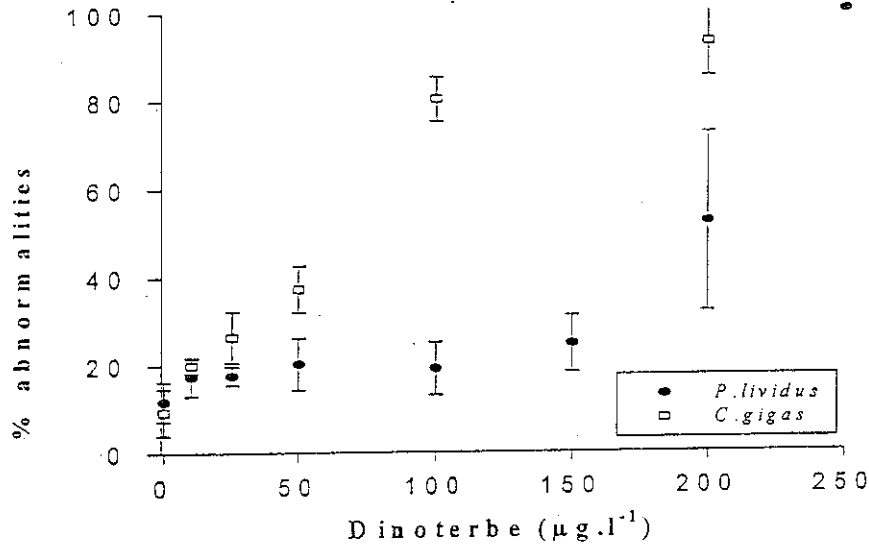


Fig. 4 (continued)

24.6% \pm 2.2%, respectively) and increased rapidly: abnormalities reached 100% at 250 $\mu\text{g l}^{-1}$. The EC50 was 200.9 \pm 7.5 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Table 2).

With respect to *C. gigas* embryogenesis, this herbicide also had significant adverse effects ($P < 0.001$) [Table 2, Fig. 4(C)] even at the lowest concentration tested (20.0% \pm 1.7% abnormalities instead of 9.4% \pm 5.3% in the controls). The percentage of abnormalities increased much more rapidly with increasing dinoterbe concentration than in the case of sea urchin larval development (93.0% \pm 7.7% at 200 $\mu\text{g l}^{-1}$, and there was no embryonic development at all at 250 $\mu\text{g l}^{-1}$). The EC50 was 72.2 $\mu\text{g l}^{-1}$ \pm 2.3 (Table 2).

Sediments

La Fosse. The sediment from La Fosse had a significant ($P < 0.001$) but moderate effect on *P. lividus* larval development at the highest concentration of 5 g l^{-1} , with 30.1% \pm 7.4% abnormalities instead of 13.3% \pm 2.2% in controls [Table 1, Fig. 5(A)].

No effects on *C. gigas* embryogenesis could be observed at 5 g l^{-1} [Table 1, Fig. 5(A)]: 6.0% \pm 2.3% abnormalities in the controls and only (4.2% \pm 1.4% abnormalities) some action occurred at 10 g l^{-1} (7.2% \pm 3.9% abnormalities, $P > 0.05$).

La Rochelle. The toxicity of La Rochelle sediment was higher than the toxicity of the previous one, with similar patterns for both species ($P < 0.001$) [Tables 1 and 2, Fig. 5(B)]. The percentage of abnormalities increased significantly from the lowest concentration (1 g l^{-1}) to the highest one

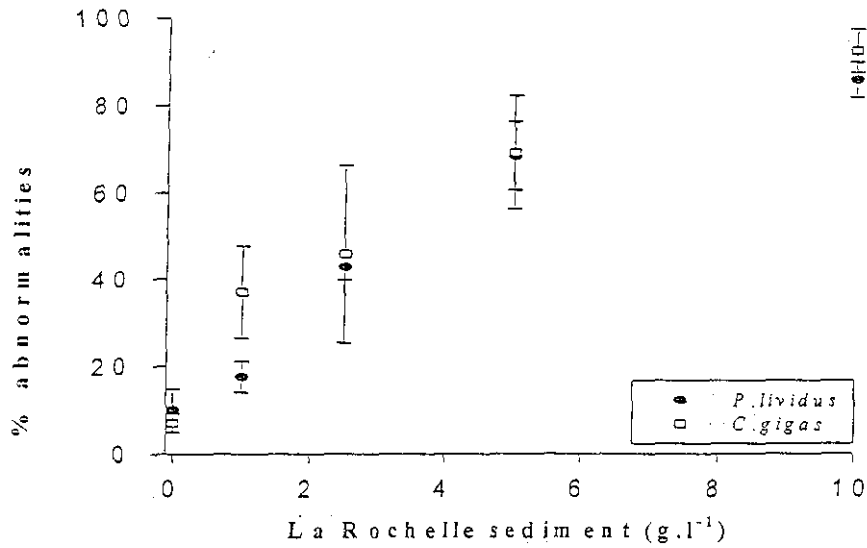
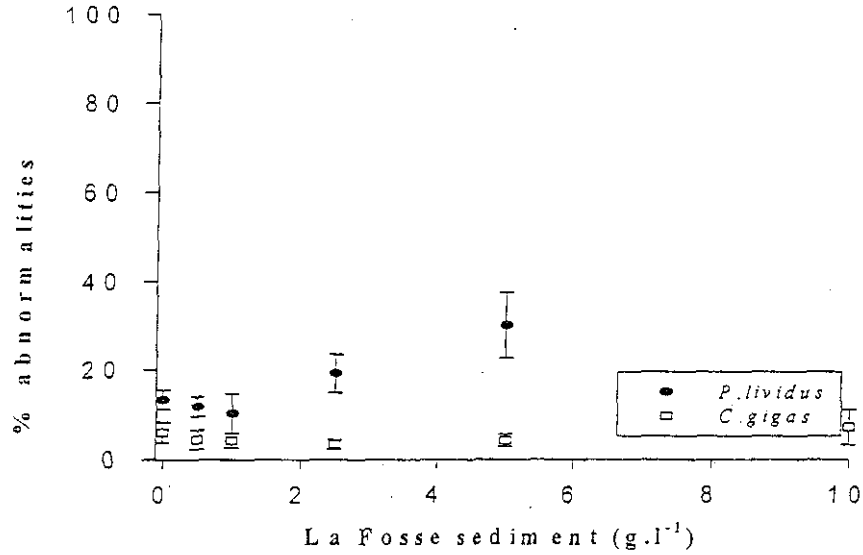
(10 g l^{-1}), with values of 85.8% \pm 4.0% abnormalities for *P. lividus* (EC50: 3.3 \pm 0.4 g l^{-1}) and 92.4% \pm 5.0% abnormalities for *C. gigas* embryogenesis. (EC50: 2.4 \pm 0.5 g l^{-1}).

DISCUSSION

The aim of this study was:

1. To adapt the simplified bivalve embryogenesis bioassay method recently proposed by His *et al.* (1997). It can be adapted without any problem to the sea urchin (*P. lividus*) bioassay, this organism being also one of those used most commonly in biomonitoring studies which require simple, rapid and inexpensive, but sensitive methods.
2. To compare the respective sensitivity of the two species characterized by a larger geographical range than the Hawaiian sea urchins and bivalves proposed by Ringwood (1992). We used the nominal concentrations which cause effects on at least one species, without taking into account the unrealistically high values sometimes used in experimental works; the results presented here are not compared to the numerous previous data on the effects of pollutants on embryogenesis of the oysters and sea urchins. The effects of various micropollutants and of polluted sediments were studied under strictly identical experimental procedures, to avoid the variability of responses due to experimental conditions; this

A



B

Fig. 5. Percentages of abnormal *Paracentrotus lividus* (black dots) and *Crassostrea gigas* (white dots) larval development ($\pm 95\%$ confidence limits) in relation to different concentrations of sediment. (A) La Fosse sediment, (B) La Rochelle sediment.

allows to minimize the "high background noise" caused by different experimental procedures (Klößner *et al.*, 1985). Only the induction of spawning differed, as thermal stimulation was

used in the case of oysters, and KCl injection in the case of sea urchin.

3. To propose, if possible, the most sensitive method for biomonitoring purpose.

Among the various contaminants which affect environmental quality in oceans and coastal waters, heavy metals and pesticides are some of the most toxic, and they may accumulate in sediments at concentrations 1000–5000 times higher than in the water column (Livett, 1988). This led us to compare the effects on embryogenesis and larval development of both species (Table 2), of four heavy metal salts (highly toxic ones, such as TBT and HgCl_2 , as well as practically nontoxic ones at realistic concentrations, such as Pb acetate), three pesticides commonly used near French oyster farming areas (Chevalier and Masson, 1988) and two polluted sediments (Anonymous, 1988; Radenac, 1996).

In the case of *C. gigas*, a euryhaline species, embryogenesis is not affected at salinities between 20–25 and 35 ppt (His *et al.*, 1989); this particularly allows the use of oyster (as well as mussel) embryos and larvae to assess the water quality of fresh and brackish waters by mixing them with oceanic 35 ppt waters in the concentration range previously mentioned (His and Beiras, 1995; His *et al.*, 1997). This possibility is limited with *P. lividus* embryos: abnormalities increasing markedly at 30 and 35 ppt for this species (Fig. 2), with an optimum salinity at 33 ppt for Arcachon sea urchins. According to Dinnel *et al.* (1987), the gametes of the American sea urchins, remain particularly sensitive to reduced salinity despite acclimatization of the adults. This is probably also true for European species such as *P. lividus*, which on the other hand may develop at salinities as high as 38‰ in Mediterranean areas (Warnau *et al.*, 1996). This clearly indicates that the optimum salinity requisite for bioassays, may depend on the origin of the adults; this is not the case for bioassays with *C. gigas*.

For both species, *C. gigas* and *P. lividus*, an artificial seawater can be used for conducting tests if unpolluted seawater is not available; the adequacy of the formula by Zarogian *et al.* (1969) for oysters embryos has been confirmed by His *et al.* (1997); with regard to *P. lividus*, formulas have been proposed by Fridberger *et al.* (1979) and Marin *et al.* (1987).

C. gigas D-larvae are obtained in 24 h and *P. lividus* plutei need at least 48 h for development, this may be important if a result needs to be obtained as quickly as possible.

Table 2 sums up the different results of this study. *C. gigas* embryos and *P. lividus* embryos and larvae presented practically the same sensitivity to TBT with respectively EC50 values between 0.2 and $0.5 \mu\text{g l}^{-1}$ in oysters (see His, 1996) and $0.6 \pm 0.2 \mu\text{g l}^{-1}$ in sea urchins. Oysters embryos were more sensitive to copper and less sensitive to lead and mercury.

The pesticides mercaptodimethur and glyphosate had no marked effects on either species; in contrast,

dinoterbe was toxic to the oyster embryos at lower values ($\text{EC}_{50} = 72.2 \pm 2.3 \mu\text{g l}^{-1}$) than to sea urchin embryos ($\text{EC}_{50} = 200.9 \pm 7.5 \mu\text{g l}^{-1}$).

La Fosse sediment, strongly polluted by cadmium (Anonymous, 1988) had little effect on *C. gigas* larval development, and some effect on *P. lividus*. La Rochelle sediment, polluted by heavy metals (Cu, Pb, Sn and Hg; Radenac, 1996), had the opposite effect, disturbing oyster embryogenesis ($\text{EC}_{50} = 2.4 \pm 0.5 \text{ g l}^{-1}$) more than the development of sea urchin eggs ($\text{EC}_{50} = 3.3 \pm 0.4 \text{ g l}^{-1}$).

Eurytopic species, with a wide tolerance to environmental changes (including estuarine molluscs, worms and crustaceans) are more suited for environmental quality assessment than stenotopic species with narrow tolerance (Moriarty, 1990). Except for monitoring the water quality of fresh and brackish water, which is easier with bivalve embryos and larvae, the choice between the two species is arbitrary, as pointed out by Ringwood (1992) in the case of two Hawaiian species, *Echinometra mathaei* and *Isognomon californicum*. According to the results of this study. The choice may depend on practical considerations, such as the availability of mature adults for the tests. Mature oysters are available along the French coast from June to September and may be conditioned all the year round, with some difficulties in the fall. However, conditioning of oysters requires considerable efforts. On the other hand, gametes can be obtained from *P. lividus* at Arcachon year-round by KCl injection, and plutei can be obtained even in winter.

The choice of species may also depend on the characteristics of the area to be monitored: bivalve larvae are preferable when assessing the environmental quality in coastal waters and particularly in shellfish farming areas, and sea urchins should be used for offshore waters. As pointed out by Moriarty (1990) the choice may also depend on "the species that we most wish to protect from pollutants".

Acknowledgements—We thank Matthias Seaman (Institut für Meereskunde, Kiel, Germany) for corrections of the manuscript, Eric Vindimian (INERIS, Verneuil en Halatte, France), for providing us with the Macro Hill version 2 computer program, and Christian Cantin (IFREMER, Arcachon) for his technical assistance.

REFERENCES

- Anonymous (1988) Réseau National d'Observation de la Qualité du Milieu Marin: Dix Années de Surveillance 1974–1984. Document technique IV: Mercure et Cadmium. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer, 127 pp.
- Anonymous (1989) Report of the Working Group on the Biological Effects of Contaminants — ICES, C. M. 1989/E: 19, 16 pp.

- Anonymous (1993) Workshop on sediment toxicity assessment. *Soc. Environ. Toxicol. Chem.*, ed. I. R. Hill, P. Matthiessen and F. Heimbach, 8-10 november, 105 pp.
- ASTM (1989) Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. ASTM, E 724-89, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 334-351.
- Beiras R. and His E. (1994) Effects of dissolved mercury on embryogenesis and metamorphosis of *C. gigas* oyster larvae. *Mar. Ecol. Progr. Ser.* 113, 95-103.
- Bougis P., Corre M.-C. and Etienne M. (1979) Sea urchin larvae as a tool for assessment of the quality of seawater. *Ann. Inst. Oceanog. Paris* 55, 21-26.
- Burton Jr., G. A. (1992) *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis Publishers, London, 211 pp.
- Calabrese A. (1984) Ecotoxicological testing with marine molluscs. In *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, ed. E. Jaspers and C. Claus, Vol. 1, pp. 455-477. State University Ghent and Institute for Marine Scientific Research, Bredene, Belgium.
- Chapman P. M. and Long E. R. (1983) The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 81-84.
- Chevalier C. and Masson D. (1988) Agriculture, conchyliculture et circulation des eaux en Charente Maritime: état actuel des recherches. *Aqua Rev.* 21, 27-33.
- Connor P. M. (1972) Acute toxicity of heavy metals to some marine larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 3, 190-192.
- Dinnel P. A., Stober Q. J., Crumley C. and Nakatani R. E. (1982) Development of a sperm cell toxicity test for marine waters. In: *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fifth Conference, ASTM STP 766*, ed. J. G. Pearson, R. B. Foster and W. E. Bishop. American Society of Testing and Materials, Philadelphia, pp. 82-98.
- Dinnel P. A., Link J. M. and Strober A. J. (1987) Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol. U.S.A.* 16, 23-32.
- Fridberger A., Fridberger T. and Lundin J. G. (1979) Cultivation of sea urchins of five different species under strict artificial conditions. *Zoon* 7, 149-151.
- Hamilton M.A., Russo R.C. and Thurston R.V. (1977) Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ. Sci. Technol.* 11, 714-719 correction 12(4), 417 (1978).
- Hayes Jr. W. J. and Laws Jr. E. R. (Eds.) (1991) *Handbook of Pesticide Toxicology*, 3 Vols. Academic Press, San Diego, 1576 pp.
- His E. (1996) Embryogenesis and larval development in *C. gigas*: experimental data and field observations on the effects of tributyltin compounds. In: *Organotin*, ed. M. Champ and P. F. Seligman. Chapman and Hall, pp. 239-258.
- His E., Robert R. and Dinet A. (1989) Combined effects of temperature and salinity on fed starved larvae of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster, *C. gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455-463.
- His E. and Beiras R. (1995) Monitoring fresh and brackish water quality around shellfish farming areas with a bivalve embryo and larvae simplified bioassay method. *Oceanol. Acta.* 18(5), 591-595.
- His E., Seaman M. N. L. and Beiras R. (1997) A simplification of the bivalve embryogenesis and larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Res.* 31(2), 351-355.
- Kobayashi N. (1984) Marine ecological testing with echinoderms. In *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, ed. G. Persoone and C. Claus, Vol. 1. Lab. Biol. Res. Aquat. Pollut., State University Ghent, pp. 341-405.
- Kobayashi N. (1991) Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanabe Bay, Wakayama Prefecture, Japan, 1970-1987. *Mar. Pollut. Bull.* 23, 709-713.
- Klößner K., Rosenthal H. and Willführ J. (1985) Invertebrate bioassays with North Sea water samples. Structural effects on embryos and larvae of serpulid oysters and sea urchins. *Helgoländer Meeresunters.* 39, 1-19.
- Lillie F. R. (1921) Studies on fertilization X. The effects of copper salts on the fertilization reaction in *Arbacia* and a comparison of mercury effects. *Biol. Bull.* 41, 125-143.
- Livett E. A. (1988) Geochemical monitoring of atmospheric heavy metal pollution: theory and applications. *Adv. Ecol. Res.* 18, 65-177.
- Long H. R., Buchman M. F., Bay S. M., Bretler D. J., Chapman P. M., Hose J. E., Lissner A. L., Scott J. and Wolte D. A. (1990) Comparative evaluation of five toxicity tests with sediment from San Francisco Bay and Tomales Bay. *CA. Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1193-1214.
- Marin M. G., Bressan M. and Brunetti R. (1987) Early development of sea urchin eggs (*P. lividus* Imk) in artificial media. *Acta Embryol. Morph. Exp.* 8, 31-37.
- Martin M., Osborn K. E., Billig P. and Glickstein N. (1981) Toxicities of ten metals to *C. gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.* 12(9), 305-308.
- Monroy A. (1986) A centennial debt of developmental biology to the sea urchin. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab.* 33, 330-337.
- Moriarty F. (1990) *Ecotoxicology: the Study of Pollutants in Ecosystems*. Academic Press, London, 289 pp.
- Okubo K. and Okubo T. (1962) Study of the bio-assay method for the evaluation of water pollution. II. Use of the fertilized eggs of sea urchins and bivalves. *Bull. Reg. Fish. Res. Lab.* 32, 131-140.
- Pagano G., Corsale G., Esposito A., Dinnel P. A. and Romaña L. A. (1989) Use of sea urchin sperm and embryo bioassay in testing the sublethal toxicity of realistic pollutant levels. *Adv. Appl. Biotech. Ser.* 5, 153-163.
- Pagano G., His E., Beiras R., Iaccarino M., Oral R., Quimiou F., Warnau M. and Trief N. (1996) Development, cytogenetic and reproductive toxicity of aluminium, iron and their mixture in sea urchin and mussel embryos and sperm. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 466-474.
- Prytherch H.F. (1924) Experiments in the artificial propagation of oysters. *Rep. U.S. Com. Fish.* XI, 1-14.
- Radenac G. (1996) Etude de l'impact biologique d'un rejet de dragage: suivi *in situ* de la croissance, des concentrations métalliques et de l'activité acétylcholinestérasique de *Mytilus edulis* L. et expérimentations *in vitro* sur l'embryogénèse de *C. gigas*. Ph.D. thesis, Université de La Rochelle, 179 pp.
- Ringwood A. H. (1992) Comparative sensitivity of gametes and early development stages of a sea urchin (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 288-295.
- Sokal R. R. and Rohlf F. J. (1981) In *Biometry*, ed. W. H. Freeman *et al.*, 859 pp.
- Stebbing A. R. D. (1985) Bioassay. In *The Effects of Stress and Pollution on Marine Animals*, ed. B. L. Bayne, D. A. Brown, K. Burns, D. R. Dixon, A. D. Ivanovici, D. R. Livingstone, D. M. Lowe, M. N. Moore, A. R. S. Stebbing and J. Widdows. Praeger, New York, pp. 133-137.

- Stebbing A. R. D., Akesson B., Calabrese A., Gentile J. H., Jensen A. and Lloyd R. (1980) The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapp. P.-v Réuni. Cons. Int. Explor. Mer.* 179, 322-332.
- Swartz R. C. (1989) Marine sediment toxicity tests. In *Contaminated Marine Sediments: Assessment and Remediation*. Committee on Contaminated Marine Sediments, Marine Board, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council, National Academic Press, Washington, pp. 115-129.
- Underwood A. J. (1981) Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 19, 513-605.
- Vindimian E., Robaut C. and Fillion G. (1983) A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *J. Appl. Biochem.* 5, 261-268.
- Warnau M., Iacarino M., de Biase A., Temara A., Jangoux M., Dubois P. and Pagano G. (1996) Spermiotoxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *P. lividus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1931-1936.
- Wilson D. P. (1951) A biological difference between natural waters. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 30, 1-21.
- Wilson D. P. and Armstrong F. A. T. (1961) Biological differences between seawaters: experiments in 1960. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 41, 663-681.
- Winer B. J. (1971) *Statistical Principles in Experimental Design*. McGraw-Hill, Tokyo, 907 pp.
- Woelke C. E. (1961) Bioassay the bivalve larvae tool. In *Proc. Northwest Sym. Water Pollut. Res.* U.S. Dept. HEWPHS, Portland, pp. 113-123.
- Woelke C. E. (1966) Bioassay with bivalve larvae. In *18th annual report of the Pacific Marine Fisheries Commission for the year 1965*. Pacific Marine Fisheries Commission, Portland, Oregon, pp. 33-35.
- Woelke C. E. (1967) Measurement of water quality with the Pacific oyster embryo bioassay. Water quality criteria, ASTM STP 416, Am. Soc. Testing Mats, pp. 112-120.
- Woelke C. E. (1968) Application of shellfish bioassay results to the puget sound pulp-mill pollution problem. *Northwest Sci.* 42(4), 125-133.
- Washington Department of Fisheries Woelke C. E. (1972) Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-h Pacific oyster (*C. gigas*) embryo. *Tech. Rep.* 9, 1-93.
- Zarogian G. E., Pesch G. and Morrison G. (1969) Formulation of an artificial seawater media suitable for oyster larvae. *Am. Zool.* 9, 1144.

Note n°1 :

Toxicité du phénanthrène (Phe), du 2-méthyl-phénanthrène (2MP) et du benzo(a)pyrène (BaP) sur l'embryogenèse et le développement larvaire de l'oursin *Paracentrotus lividus* et de l'huître *Crassostrea gigas*

La toxicité du phénanthrène (Phe), du 2-méthyl-phénanthrène (2MP) et du benzo(a)pyrène (BaP) a été évaluée vis-à-vis des embryons de l'huître *Crassostrea gigas* et de l'oursin *Paracentrotus lividus*. Les trois HAP ont été utilisés individuellement ou en mélange et à des concentrations inférieures à leur seuil de solubilité.

Les embryons de *C. gigas* et de *P. lividus* présentent des sensibilités similaires pour les trois HAP testés. Le Phe, le plus soluble, est le plus toxique, à l'inverse le BaP qui est très peu soluble, ne présente aucune toxicité pour ces organismes. D'importants effets de synergie ont été observés entre ces trois composés et notamment entre le BaP et le Phe.

Cette étude montre la difficulté de prédire la toxicité d'un sédiment, qui contient une multitude d'HAP, à partir des modèles existants qui sont basés sur la prédiction d'effets additifs entre ces composés.

Toxicité du phénanthrène (Phe), du 2-méthyl-phénanthrène (2MP) et du benzo(a)pyrène (BaP) sur l'embryogenèse et le développement larvaire de l'oursin *Paracentrotus lividus* et de l'huître *Crassostrea gigas*

Introduction

Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) sont des composés ubiquistes, présents dans tous les compartiments environnementaux et connus pour être toxiques, génotoxiques, cancérigènes et facilement bioaccumulables (Newsted et Giesy, 1987). Ils sont caractérisés par une faible solubilité ; introduits dans le milieu aquatique, ils s'adsorbent rapidement sur les particules en suspension et s'accumulent dans les sédiments qui deviennent ainsi d'importants réservoirs de ce type de xénobiotique. La majorité des études de toxicité des HAP utilise donc la phase sédimentaire et concerne les organismes benthiques. Or lors de catastrophes comme les marées noires, mais également lors de la remise en suspension de sédiments, soit par les tempêtes, marées, ou lors d'opération de dragage (boues souvent riches en HAP), une fraction de ces composés peut repasser dans la colonne d'eau et avoir un impact direct ou indirect (voie trophique) sur les organismes pélagiques (Pelletier *et al.*, 1997).

Il existe peu d'études sur la toxicité intrinsèque des HAP, seuls ou en mélange, vis à vis des organismes marins pélagiques et à des concentrations inférieures à leur seuil de solubilité. Les résultats disponibles concernent principalement des espèces d'eau douce et en particulier *Daphnia magna* (Munoz et Tarazona, 1993 ; Hatch et Burton, 1998 ; Billard *et al.*, 1999).

Les embryons et les larves des invertébrés marins sont plus sensibles aux micropolluants que les adultes de la même espèce (Stebbing *et al.*, 1980 ; His *et al.*, 1999a). A la suite des études de Lillie (1921) chez *Arbacia* et de Prytherch (1924) chez *Crassostrea virginica*, les gamètes et les larves d'oursin et d'huître ont été recommandés comme outils en écotoxicologie marine. Le test d'embryotoxicité (effets sur le développement embryonnaire) est reconnu comme un des plus sensibles et est couramment utilisé (mise en évidence de la toxicité des métaux, pesticides, produits pétroliers, effluents urbains ou industriels). En revanche, aucune donnée n'est disponible pour les HAP (His *et al.*, 1999a).

But de l'étude

Le but de ce travail a été d'évaluer la toxicité du phénanthrène (Phe), du 2-méthylphénanthrène (2MP) et du benzo(a)pyrène (BaP) vis à vis des embryons et des larves de *Paracentrotus lividus* et de *Crassostrea gigas*. Chaque composé a été testé seul ou en mélange. Pour une meilleure signification écologique, les HAP ont été testés en fonction de leur solubilité dans l'eau de mer, sans utilisation de solvant tel que l'acétone ou le DMSO.

Les solutions d'HAP ont été préparées en agitant chaque composé dans de l'eau de mer filtrée (EMF), pendant 12 heures, en quantité suffisante pour être à une concentration supérieure à leur solubilité. L'excès de cristaux a ensuite été éliminé par filtration (0,7 μm ; GF/F Whatman). Les solutions ont été testées à des concentrations comprises entre 0 et 100 %. Après l'exposition des œufs fécondés pendant l'embryogenèse, la NOEC (concentration la plus forte sans effet biologique significatif) et la EC50 (concentration entraînant 50 % d'anomalies dans la population larvaire) de chaque composé ont été déterminées chez les deux espèces.

Pour l'étude des synergies, les solutions ont été obtenues en mélangeant un HAP à la concentration de 25 % de saturation (inférieure à la NOEC de tous les composés testés) à un second HAP à une concentration de 25 puis de 75 % de la solution saturée. Ces préparations ont été testées uniquement chez *C. gigas*.

Les gamètes de chaque espèce sont obtenus selon la méthode décrite par His *et al.* (1999b). Les œufs fécondés sont placés dans des flacons à prélèvement stérile de 30 ml contenant les différentes solutions à tester (5 répliquats par concentration), puis ils sont mis à incuber à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 h chez *Paracentrotus lividus* et à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h chez *Crassostrea gigas*, jusqu'à l'obtention des plutéus et des véligères, respectivement. On ajoute alors 100 μl de formol neutre à 30 % dans chaque récipient et les pourcentages d'anomalies larvaires sont déterminés par observation directe au microscope inversé d'Utermöhl.

Résultats et discussion

Toxicité des trois HAP (Figure IV-1).

Le B(a)P ne présente aucun effet délétère sur les embryons de l'oursin et de l'huître. A la plus forte concentration (100 % de saturation), les pourcentages d'anomalies sont inférieurs à 10 % et ne sont pas significativement différents des témoins ($p > 0.50$).

Ces résultats s'expliquent par la faible solubilité ($3.8 \mu\text{g l}^{-1}$) de ce composé. Verrhiest *et al.* (2001) ont observé des résultats similaires avec le benzo(k)fluoranthène, très peu soluble également ($1.5 \mu\text{g l}^{-1}$), qui ne présente aucune toxicité vis à vis de *Daphnia magna*.

En général, il est difficile de déterminer une toxicité intrinsèque pour des composés aussi peu solubles, leur EC50 estimée est souvent de deux ordres de grandeur plus grande que leur seuil de solubilité (Pelletier *et al.*, 1997).

Le 2MP et le Phe entraînent des anomalies larvaires chez les deux espèces. Chez *Paracentrotus lividus*, les EC50 calculées sont respectivement de 90 et 63 % de saturation pour le 2MP et le Phe et chez *Crassostrea gigas*, ces EC50 sont d'environ 100 % dans le premier cas et 83,5 % dans le second.

La concentration en Phe de la solution saturée a été dosée : elle atteint $710 \mu\text{g l}^{-1}$. Cette valeur est plus faible que celle attendue à partir de la solubilité de ce composé ($1000 \mu\text{g l}^{-1}$; May, 1980). Cependant, ce seuil de solubilité a été défini en eau pure et non en eau de mer, ce qui explique cette différence. La EC50 calculée pour le Phe est donc respectivement de 450 et $590 \mu\text{g l}^{-1}$ chez l'oursin et l'huître.

Chez le cladocère d'eau douce *Daphnia magna*, la EC50 du Phe est plus élevée, avec une valeur de $850 \mu\text{g l}^{-1}$ (Munoz et Tarazona, 1993 ; Verrhiest *et al.*, 2001). Par contre les embryons d'oursin et d'huître présentent des sensibilités, vis à vis du Phe, voisines de celle de l'amphipode *Gammarus minus* et du moucheron *Chironomus tentans* qui ont respectivement une EC50 de 460 et $490 \mu\text{g l}^{-1}$ (Millemann *et al.*, 1984).

Pour les trois composés, la concentration de 25 % de la solution saturée est bien inférieure à la NOEC et justifie son utilisation pour l'étude des synergies entre ces composés.

Effets de synergies entre les HAP (Figure IV-2).

La toxicité du Phe augmente en présence de B(a)P ou 2MP à des concentrations inférieures à leur NOEC (Fig. IV-2A). La EC50 du Phe passe de 83,5 % à 75 % avec l'ajout du 2MP et à 43 % en présence de B(a)P. Ces résultats permettent d'observer un effet de synergie entre le Phe et le 2MP, mais surtout entre le Phe et le B(a)P.

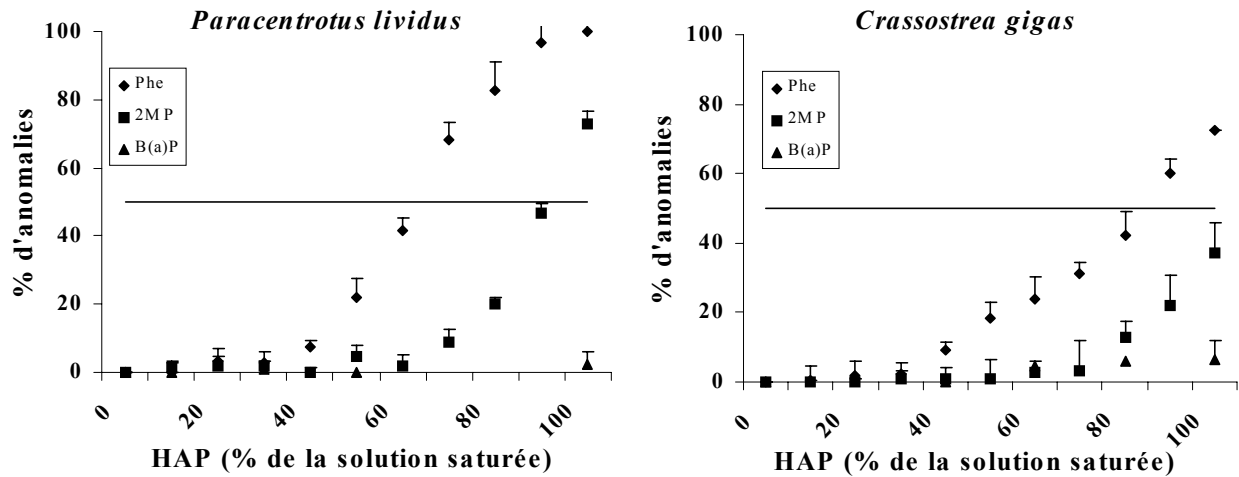


Figure IV-1 : Pourcentages d'anomalies larvaires (\pm E.T.) chez *Paracentrotus lividus* et *Crassostrea gigas* en fonction du pourcentage de la solution saturée de Phe, 2MP ou B(a)P.

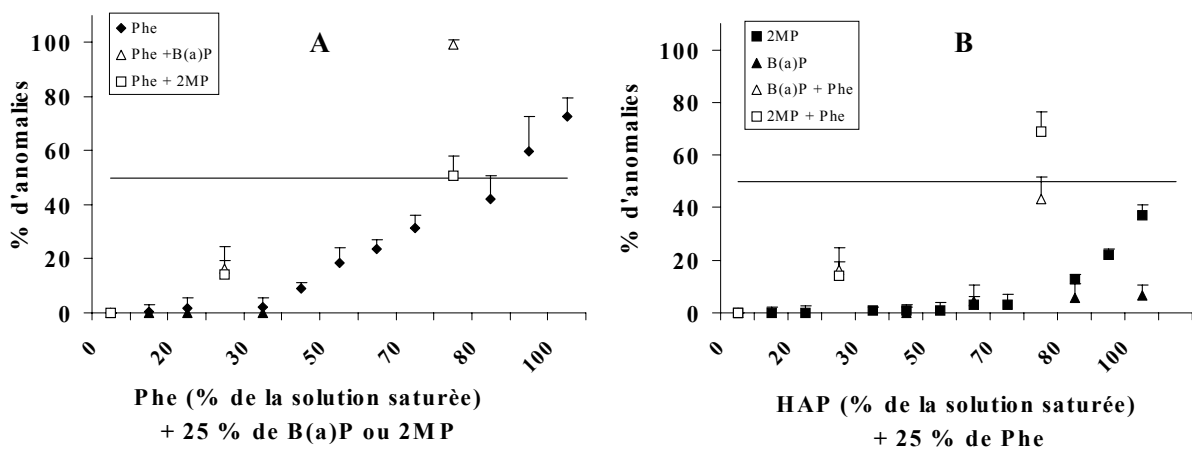


Figure IV-2 : Effets de synergie pour le Phe avec 25 % de B(a)P ou de 2MP (A) et pour le B(a)P et le 2MP avec 25 % de Phe (B) sur les pourcentages d'anomalies larvaires chez *C. gigas*.

De la même façon, on peut constater des effets de synergies importants lorsque du Phe (à la concentration de 25 %) est ajouté aux solutions de 2MP et B(a)P. Dans le cas du 2MP, la EC50 passe de plus de 100 % (composé seul) à 59 % ; de la même façon, le B(a)P qui seul ne présente aucune toxicité, exerce des effets délétères (40 % d'anomalies larvaires) à 75 % de saturation. Verrhiest *et al.* (2001) ont observé le même phénomène avec le Benzo(k)fluoranthène, qui seul ne présente pas de toxicité vis à vis de *Daphnia magna*, mais devient toxique en présence de phénanthrène et fluoranthène.

A l'inverse, Minoz et Tarzona (1993) ont observé que le mélange de quatre HAP (phénanthrène, anthracène, naphthalène et acénaphthalène) a une toxicité moins importante que la somme des toxicités de chaque composé. Swartz et al. (1997) montrent des effets antagonistes entre l'acénaphthène, fluoranthène, pyrène et le phénanthrène.

Ces résultats mettent en évidence les limites des modèles développés pour évaluer la toxicité d'un mélange d'HAP (Swartz *et al.*, 1995) ; ces modèles sont basés sur la prédiction d'effets additifs entre les composés. Par conséquent, l'évaluation du risque environnemental d'un sédiment contaminé par les HAP, peut être sur ou sous-estimé, dans la mesure où la détermination de sa toxicité est basée, à l'heure actuelle, sur un tel modèle.

Conclusion

La toxicité des trois HAP testés est fonction de leur solubilité dans l'eau : Phe ($1000 \mu\text{g l}^{-1}$) > 2MP ($900 \mu\text{g l}^{-1}$) > B(a)P ($4 \mu\text{g l}^{-1}$). Bien que l'embryon de *Paracentrotus lividus* présente des EC50 légèrement plus faibles que celles observées avec l'embryon de *Crassostrea gigas* les sensibilités sont très voisines ; elles sont équivalentes ou supérieures à celles des organismes les plus couramment utilisés dans les tests en milieu dulçaquicole (*Gammarus minus*, *Chironomus tentans* et *Daphnia magna*).

Des effets de synergies existent, notamment avec le B(a) et le Phe : le premier, seul, n'est pas toxique mais il induit un pourcentage élevé d'anomalies larvaires en présence du second.

Cette étude montre bien la difficulté de prédire la toxicité d'un mélange d'HAP et la nécessité d'observations complémentaires à partir de bioessais réalisés à l'aide de modèles biologiques adaptés au milieu (d'eau douce ou marine) et d'un bon niveau de sensibilité.

Publication n°2 :

Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*)

O. Geffard, H. Budzinski, S. Augagneur, MNL. Seaman, E. His

Le sperme et les embryons de l'oursin Méditerranéen, *Paracentrotus lividus* et de l'huître Japonaise *Crassostrea gigas* ont été utilisés pour étudier la toxicité de deux sédiments marins, l'un contaminé par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et le second par les métaux. Les sédiments ont été utilisés lyophilisés. Trois traitements sédimentaires ont été employés : le sédiment total (contact), l'élutriat non filtré et filtré. Les deux sédiments sont toxiques vis à vis du sperme d'oursin, mais pas vis à vis du sperme de l'huître. L'embryotoxicité (% d'anomalies larvaires) est apparu le critère biologique le plus sensible pour ces études de toxicologie. D'une manière générale, le sédiment contact est de deux ordres de grandeur plus toxique que les élutriats. En ce qui concerne l'embryotoxicité, le sédiment contact et les élutriats, dans le cas du sédiment contaminé par les HAP, sont plus toxiques vis à vis des embryons d'huître, alors que pour le sédiment contaminé par les métaux, les effets sont plus marqués chez l'oursin. Les résultats confirment que l'utilisation du stade embryonnaire de l'huître *Crassostrea gigas* permet une meilleure évaluation de la toxicité du milieu marin que l'utilisation de tout autre stade de développement de cette espèce.

L'oursin Méditerranéen et l'huître Japonaise présentent des sensibilités comparables et peuvent être utilisés comme organismes tests, cependant les bioessais réalisés chez l'huître sont plus reproductibles avec de meilleurs résultats pour les témoins.

Mots clés : test d'embryotoxicité et de spermiotoxicité, *Paracentrotus lividus*, *Crassostrea gigas*, sédiments marins pollués



ASSESSMENT OF SEDIMENT CONTAMINATION BY SPERMIOXICITY AND EMBRYOTOXICITY BIOASSAYS WITH SEA URCHINS (*PARACENTROTUS LIVIDUS*) AND OYSTERS (*CRASSOSTREA GIGAS*)

OLIVIER GEFFARD,*† HELENE BUDZINSKI,‡ SYLVIE AUGAGNEUR,‡ MATTHIAS N.L. SEAMAN,§
 and EDOUARD HIS†

†IFREMER, DEL/PC, Station d'Arcachon, Quai Silhouette, 33120 Arcachon, France

‡Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels, Université de Bordeaux 1, 33405 Talence Cedex, France

§Institute of Marine Sciences, 24105 Kiel, Germany

(Received 28 April 2000; Accepted 30 December 2000)

Abstract—Gametes (sperm) and fertilized eggs (embryos) of the Mediterranean sea urchin, *Paracentrotus lividus*, and the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, were used to investigate the toxicity of two marine sediments, one polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and the other by heavy metals. The sediment samples were freeze-dried for storage, and three different treatments were used for analysis: whole sediment, unfiltered elutriate, and filtered elutriate. The two sediments were toxic to sea urchin spermatozoa but not to oyster spermatozoa, and embryotoxicity was almost always the more sensitive endpoint for toxicity assessment. As a rule, whole sediment was more toxic than the elutriates by nearly two orders of magnitude. With respect to embryotoxicity, the whole sediments and the elutriates of the PAH-contaminated sediment were more toxic to oyster embryos, whereas the elutriates of the sediment polluted by heavy metals had stronger effects on sea urchin embryos. The results confirm that bioassays with Japanese oyster embryos provide a more sensitive appraisal of toxicity in the marine environment than bioassays with other developmental stages. As a whole, Mediterranean sea urchins and Japanese oysters were similar in overall sensitivity and are therefore both equally suited as bioassay organisms, but tests with oysters are more reproducible because of the better performance of the controls.

Keywords—Embryotoxicity/spermioxicity bioassay *Paracentrotus lividus* *Crassostrea gigas* Polluted marine sediments

INTRODUCTION

Most contaminants of anthropogenic origin ultimately enter the marine environment. The degree of contamination has traditionally been appraised by chemical analyses that provide no estimate of the deleterious effects on the biota. An evaluation of the complex actions and bioavailability of contaminants (which depend on their chemical speciation) and the determination of the biological effects of unidentified substances require bioassays with live organisms [1,2]. The chemical and the biological approaches are both essential and complementary methods for the assessment of environmental contamination and its biological effects, from the molecular to the population level [3].

After entering brackish or marine waters, most contaminants of anthropogenic origin (particularly heavy metals, polychlorinated biphenyls [PCBs], and hydrocarbons) tend to adsorb to suspended particles, thereby ultimately settling at the bottom of the water body. The sediments of estuaries and coastal areas thus constitute an important reserve of contaminants and represent a potential source of pollution [1]. Toxicological assessments of coastal sediments are particularly important because they are located in rich ecosystems that serve as breeding and nursery grounds for a number of economically important fish and shellfish species.

Criteria for the choice of organisms for bioassays have been established by Stebbing et al. [2], who recommend the use of

multispecies tests capable of accounting for the differences in sensitivity of different taxa to different contaminants. The embryos and larvae of marine organisms are generally more sensitive to toxic substances than adults [2,4], and gametes and embryos of sea urchins and cupped oysters have been recognized as valuable tools in toxicological studies since Lillie [5] first studied *Arbacia* and Prytherch [6] tested *Crassostrea virginica*.

During the past decades, numerous studies have been published on the use of sea urchin and oyster gametes and embryos, concerning either the effects of individual contaminants, industrial effluents, and sediments or the assessment of sea and brackish water quality [7–16]. The utilization of bivalve larvae in assessments of marine pollution is subject of a recent review [4]. A few investigations have compared the sensitivity of bivalve and sea urchin embryos and larvae [17,18], but there is only a single study with contaminated sediments [17].

Ecotoxicological monitoring requires simple, inexpensive, and rapid methods that can be used as a matter of routine by laboratories without specialized equipment. There are several standard bioassays today for toxicants in water, but even though procedures to test the quality of sediments exist [19,20], there is as yet no rapid (24–48 h) and standardized bioassay for assessing marine sediment quality with sea urchin and oyster gametes, embryos, and larvae. The present study was designed to contribute toward the standardization of biological assessment of sediments by comparing two rapid and inexpensive bioassays: a spermioxicity test [16] and a simplification of the embryogenesis bioassay for water quality as-

* To whom correspondence may be addressed (ogeffard@ifremer.fr).

Table 1. Physical and chemical characteristics of Arès and Bidassoa sediments (PCB levels in Arès sediment after Pierard [43])

	Water content (%)	Organic matter (%)	Particulates <63 µm (%)	Contaminants (µg/g dry wt of sediment)													
				PAH ^a	PCB ^b	Ag	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Mn	Ni	Pb	Se	Sn	Zn
Arès	70.8	9.7	84.7	10.35	<0.006	0.0	3.5	0.3	39.5	20.4	0.1	324	16.9	44.3	0.9	2.5	145
Bidassoa	51.7	8.5	68.6	1.22	0.051	5.9	23.3	0.7	50.3	70.9	0.5	430	37.2	119	1.5	9.4	355

^a PAH = polycyclic aromatic hydrocarbon.

^b PCB = polychlorinated biphenyl.

sediment [19,21]; two bioassay species: the Mediterranean sea urchin (*Paracentrotus lividus*) and the Japanese oyster (*Crassostrea gigas*); and three sediment treatments: whole (bulk) sediment, which gives the best idea of risk to benthic organisms [22], and unfiltered and filtered elutriates, which are more appropriate to evaluate the effects of dredging activities and the resulting release of bioavailable pollutants [23].

Finally, we compared two contaminated sediments with high silt and organic matter content: one from the Bay of Arcachon (France), polluted by PAHs, which are known to be ubiquitous, persistent, genotoxic, and carcinogenic contaminants [24,25], and the other from the Bidassoa Estuary (French-Spanish border), polluted by heavy metals that are also ubiquitous in aquatic sediments [26].

MATERIALS AND METHODS

Sediments

Sampling and conservation. Sediment from the top 5 cm of the surface was collected at Arès (Arcachon Bay, France) in October 1996 and at Bidassoa Estuary (French-Spanish border) in April 1997. The samples were stored in the dark at 4°C overnight. After homogenization, one part was used to study particle size distribution, a second part was frozen at -30°C for chemical analysis, and a third part was freeze-dried and stored in sealed bottles in the dark at 4°C until June 1997, when ripe adult sea urchins and hatchery-conditioned oysters were simultaneously available for the experiments. Previous investigations [27] have shown that freeze-drying may enhance the toxicity of polluted sediments, but this is of minor relevance to the present comparative study, where we used this procedure to be able to conduct simultaneous experiments with both sediments and test species.

Physical and chemical analyses. The particle size distribution was determined by diffractometry. Water content was determined by drying to constancy at 50°C, and organic matter content was determined by drying at 70°C for 48 h followed by incineration at 450°C for 48 h. The PAHs were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (Hewlett-Packard 5890 series II, Avondale, PA, USA); for details, see His et al. [25]. For heavy metal analysis, the sediments were prepared by focused microwave acid digestion (Microdigest 301, Prolabo, Fontenay sous Bois, France) using ultrapure quality

acids (Merck Eurolab, Nogent sur Marne, France). After mineralization, the residue was dissolved in 2% nitric acid. Heavy metals were then measured by inductively coupled plasma-mass spectroscopy (Elan 5000 Perkin-Elmer [Norwalk, CT, USA] equipped with a cross-flow nebulizer and nickel cones). External calibration was with multielement standard solutions prepared by dilution of a 1-g/L standard (Merck IV, Merck Eurolab) with Milli-Q (18.2 MΩ) water (Bedford, MA, USA). We use a certified standard marine sediment reference material for trace metals and other constituents (PACS-1, National Research Council Canada, Ottawa, ON) for quality control.

Sediment characteristics. Both sediments were silty (grain size mostly smaller than 63 µm), and both had a high content of organic matter (Table 1). PAH levels were moderate in Bidassoa sediment and very high in Arès sediment. The latter included 13 species of pyrolytic origin and were due to the dumping of coal tar at the site; the principal components, accounting for half the total PAH level at Arès, were benzo-fluoranthenes, fluoranthene, and pyrene, with concentrations of 2.0, 1.9, and 1.1 µg/g, respectively (see His et al. [25] for details). The heavy metal content of Arès sediment was relatively low, whereas Bidassoa sediment was strongly contaminated with metals, particularly As, Cu, Pb, and Zn (Table 1).

For comparison, Table 2 gives the French Géode classification system, which defines sediment quality according to the degree of contamination with PCBs and eight metals. Géode background denotes the natural concentrations, and Géode median is calculated on the basis of samples taken at various ports in France. Sediments having values lower than double the median (termed level 1) are allowed to be dumped offshore. Sediments having values higher than four times the median (termed level 2) may not be dumped offshore. Sediments with intermediate values require further analyses, including bioassays, before a decision is made.

Sediment treatment. Three sediment treatments were used: whole sediment, unfiltered, and filtered elutriates. Whole sediment was prepared by resuspending freeze-dried sediment in filtered (0.2 µm) seawater (FSW) of 33 practical salinity units (psu). Sediment suspensions of 0 (control), 0.5, 1, 2.5, and 5 g/L were prepared in 500-ml flasks, and the volumes of suspension required for the spermotoxicity and embryotoxicity assays (5 and 30 ml, respectively) were transferred into the

Table 2. French Géode classification of sediment quality [42]

	PCB ^a	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Géode background	0	4.4	0.5	45	35	0.2	20	47	115
Géode median	0.00025	12.5	0.6	45	22.5	0.2	18.5	50	138

^a PCB = polychlorinated biphenyl.

test vessels (see the following discussion). To avoid any mechanical effects, the sediment was allowed to settle for 1 h before adding the biological material; this time period is sufficient to eliminate 99% of clay particles from suspension, reducing the turbidity of the water to negligible levels (M. Seaman, unpublished data).

Unfiltered elutriates were prepared by a modification of Melzian's method [23]: 25 ml of remoistened freeze-dried sediment were mechanically shaken (multiwrist shaker, 500 rpm) in FSW (100 ml total volume) for 8 h and allowed to settle for another 8 h. The elutriated concentrations of Arès and Bidassoa sediment corresponded to 313 and 302 g/L, respectively. This was diluted with FSW to the following concentrations: 0 (control), 1, 5, 10, 25, 50, and 100%. The identical procedure was followed in the case of filtered elutriates, except for an additional filtration step (0.7 µm, Whatman GF/F, Clifton, NY, USA). Salinity was adjusted to 33 psu, and pH was adjusted to between 7.5 and 8.5 [17,28].

Bioassays

Spawning and fertilization. Spermiotoxicity and embryotoxicity experiments were performed with material obtained from the same batches of mature adults in both species.

For *Paracentrotus lividus*, mature sea urchins were collected in the field (Bay of Arcachon) 1 h before the experiments. Spawning was induced by injecting 0.5 ml of a 0.5-M KCl solution through the perioral membrane. Eggs were collected by placing spawning females in individual 250-ml beakers with FSW of 33-psu salinity, the genital pore being submerged in the water. After 30 min of intense spawning, the eggs were sieved through a 212-µm sterile stainless-steel sieve to eliminate debris and allowed to settle for 10 min in a sterile graduated cylinder with 500 ml of FSW. To eliminate the less dense eggs, the upper 100 ml of water were discarded and replaced by another 100 ml of FSW, and this procedure was repeated once. The contents of the cylinder were mixed gently but thoroughly, using a Plexiglas rod with attached perforated disc, and four subsamples of 100 µl were removed to count the number of eggs under the microscope; the number of eggs was usually about 1,000/ml. Dry sperm from each male was collected separately with an automatic pipette and stored in sterile 10-ml tubes placed in a beaker with melting ice. Sperm mobility of the different males was checked under the microscope to select the most mobile spermatozoa for fertilization. For the embryotoxicity tests, 40 µl of dry sperm were mixed with 2 ml of FSW, and 0.5 ml of this suspension was added under continuous mixing to the eggs in a sterile graduated cylinder with 500 ml of FSW.

For *Crassostrea gigas*, adult oysters were conditioned in the hatchery and induced to spawn by thermal stimulation according to standard procedures [4,21]. For the spermiotoxicity assays, a dense sperm suspension was obtained by stripping the gonad of a spawning male. For the embryotoxicity tests, freshly spawned eggs and sperm were mixed in sterile glass beakers with FSW to achieve fertilization.

Spermiotoxicity experiments. Sperm (20 µl) of either species were incubated in sterile capped 10-ml Pyrex® culture tubes with 5 ml of each sediment or elutriate for 30 min under gentle agitation with a tissue culture rotator (10 rpm). This procedure was chosen to prevent the sperm from avoiding the sediment. In the case of whole sediment, agitation was stopped for 1 min at the end of the incubation period in order to permit the larger particles to settle and 30 µl of sperm was then used

to inseminate freshly spawned eggs in 3 ml of FSW in Nunc microwell plates (300 eggs per well, five replicates per treatment). The microwells thus contained an elutriate concentration corresponding to 1% of the given test solution; the experimental results show that this concentration has negligible effects. The gametes were incubated for 2 h at 21 ± 1°C (*P. lividus*) or 24 ± 1°C (*C. gigas*). After this period, 100 µl of 40% buffered formalin were added to each microwell, and 100 randomly selected eggs per well were examined under an inverted microscope to determine the percentage of segmented (fertilized) and unsegmented (unfertilized) eggs [29].

Embryotoxicity experiments. Fifteen minutes after fertilization, volumes corresponding to 600 fertilized eggs (600 µl) were transferred with an automatic micropipette having an enlarged tip into sterile capped 30-ml polystyrene vials containing the various sediment suspensions or elutriates (five replicates per treatment). The embryos were incubated for 48 h at 21 ± 1°C (*P. lividus*) or 24 h at 24 ± 1°C (*C. gigas*). After the incubation period, 100 µl of 40% buffered formalin were added to each vial, and the percentages of abnormalities were determined according to the criteria in His et al. [21] and Klöckner et al. [18] by direct observation of 100 randomly selected individuals per vial under an inverted microscope.

Statistical analysis

The means and their confidence limits of the numbers of fertilized eggs and of normally developed larvae were calculated [30]. To test the null hypothesis that the different treatments had no effect on fertilization rates and on larval development, the percentages of fertilized eggs and of normal larvae at each concentration were compared to the controls using a one-way analysis of variance (ANOVA) [30], after conducting Cochran's test for homogeneity of variance. If the data failed this test, an arcsine $P^{\frac{1}{2}}$ transformation was applied to the data; this was sufficient to achieve homogeneity. The concentrations causing 50 and 20% inhibition of fertilization or normal embryogenesis (effective concentrations; EC50 and EC20) were calculated by the method of Litchfield-Wilcoxon [31].

RESULTS

Spermiotoxicity

P. lividus. The numbers of unfertilized eggs in the various controls were between 13 and 22% (Table 3). Whole sediment prevented fertilization at concentrations between 1 and 5 g/L (Arès sediment being significantly less toxic), whereas levels of 75 to 150 g/L were required to impede fertilization in the elutriates (Fig. 1). Correspondingly, the elutriates had effective concentrations (EC20 and EC50 values) that were one or two orders of magnitude higher than those of whole sediment (Table 4). In all three cases (whole sediment, filtered, and unfiltered elutriate) and in both sediments, ANOVA showed that the sediment significantly impedes fertilization ($p < 0.001$).

C. gigas. In the controls, unfertilized eggs made up 5.0% of the sample in the experiment with Arès sediment and 7.2% in the case of Bidassoa sediment (Table 3). In the tests, fertilization rates were always at or near control levels (Fig. 1), and ANOVA showed that neither the sediments nor their elutriates had significant toxic effects on oyster spermatozoa ($p > 0.05$).

Table 3. Performance of the controls in bioassays with oysters (*C. gigas*) and sea urchins (*P. lividus*). Percentage of unfertilized eggs in spermioxicity controls and of abnormal larvae in embryotoxicity controls. Identical control values are given in cases where several bioassay series were conducted simultaneously

	Arès sediment			Bidassoa sediment		
	Whole sediment	Unfiltered elutriate	Filtered elutriate	Whole sediment	Unfiltered elutriate	Filtered elutriate
Spermioxicity						
<i>P. lividus</i>	21.6	21.6	21.6	24.8	13.2	NR ^a
<i>C. gigas</i>	5.0	5.0	5.0	7.2	7.2	7.2
Embryotoxicity						
<i>P. lividus</i>	12.8	14.8	14.8	3.6	9.8	7.0
<i>C. gigas</i>	12.8	13.3	13.3	6.4	5.4	4.0

^a NR = no results due to unaccountable mortalities.

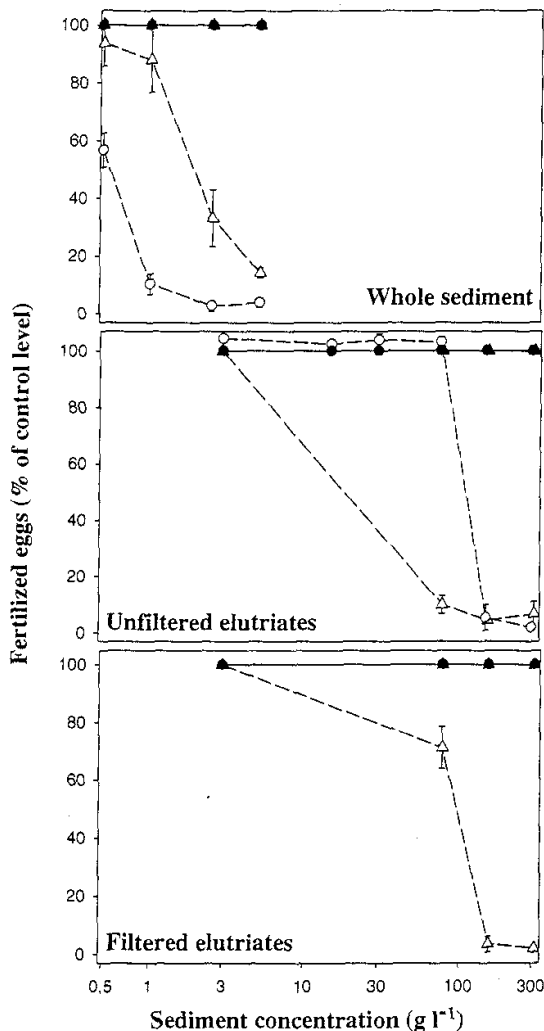


Fig. 1. Spermioxicity of whole sediment (top), unfiltered elutriates (center), and filtered elutriates (bottom) to sea urchins (*P. lividus*; Δ : Arès, \circ : Bidassoa) and oysters (*C. gigas*; \blacktriangle : Arès, \bullet : Bidassoa). Percentage of fertilized eggs (\pm 95% confidence intervals).

Embryotoxicity

P. lividus. Abnormalities in the control plutei ranged from 3.6 to 14.8% (Table 3). In contrast to the spermioxicity test, decanted whole sediment from Arès was significantly more toxic than that from Bidassoa (Fig. 2, top, and Table 4). The toxicity of the elutriates was again one or two orders of magnitude lower than that of decanted whole sediment (Fig. 2, center and bottom, and Table 4). In all cases, ANOVA showed that the sediments and elutriates significantly impede larval development ($p < 0.001$).

C. gigas. Abnormalities in the control veligers ranged from 4.0 to 13.3% (Table 3). Decanted whole sediment caused all, or almost all, larvae to develop abnormally at concentrations of less than 1 g/L (Fig. 2, top); in the elutriates, concentrations corresponding to between 30 and 150 g/L were required to induce such levels of abnormality (Fig. 2, center and bottom). This is reflected by the corresponding EC20 and EC50 values (Table 4). All sediments and elutriates had significant negative effects on larval development (ANOVA, $p < 0.001$).

DISCUSSION

This study was motivated by the continuing need to standardize biological assessments of sediments, for example, when supposedly toxic sediments are scheduled to be dumped at sea, as is the case with dredging spoils from ports and navigation channels. The first step in evaluating a sediment consists of chemical analysis, and various quality criteria have been defined for this purpose [26,32]. The choice of biological criteria for environmental risk assessment is more difficult. From a methodological point of view, it makes sense to employ tests with large numbers of organisms per test concentration because they permit statistically reliable calculations of the effective concentrations [33], and this condition is met by both of the developmental stages used in our study. Test organisms and developmental stages differ in their sensitivity to pollutants, and the precautionary principle dictates that assessments of the biological quality of sediments be based on those biological species, life stages, and bioassay methods likely to yield the most sensitive response [4].

We incubated our controls in FSW (at 0% sediment concentration) rather than using an unpolluted sediment for reference because previous studies with the same biological material and sediment treatment have shown that unpolluted non-suspended (decanted) sediment has no adverse effects on bivalve and sea urchin embryogenesis [34,35]. In studies on the effects of polluted sediments on marine organisms, it is important to discriminate between the action of suspended versus

Table 4. Toxicity of the different sediment treatments to spermatozoa and embryos of sea urchins (*P. lividus*) and oysters (*C. gigas*). Effective concentrations (EC20 and EC50) \pm 95% confidence intervals. In spermotoxicity assays with oysters, there was no effect at any of the sediment concentrations tested

Bioassay and species	Sediment	EC20 in g/L			EC50 in g/L		
		Whole sediment	Unfiltered elutriate	Filtered elutriate	Whole sediment	Unfiltered elutriate	Filtered elutriate
Spermotoxicity							
<i>P. lividus</i>	Arès	1.19 \pm 0.11	7.2 \pm 1.2	28.3 \pm 4.1	1.96 \pm 0.24	23.8 \pm 2.5	96.2 \pm 8.3
	Bidassoa	0.28 \pm 0.04	81.4 \pm 5.1	NR ^a	0.53 \pm 0.06	118.4 \pm 6.5	NR
Embryotoxicity							
<i>P. lividus</i>	Arès	0.49 \pm 0.05	16.2 \pm 3.6	33.2 \pm 5.4	0.79 \pm 0.09	42.3 \pm 5.2	49.6 \pm 2.1
	Bidassoa	0.44 \pm 0.07	9.1 \pm 2.4	7.8 \pm 2.5	2.21 \pm 0.32	30.8 \pm 3.9	27.3 \pm 4.3
<i>C. gigas</i>	Arès	0.52 \pm 0.05	5.3 \pm 1.2	9.1 \pm 3.1	0.72 \pm 0.08	22.4 \pm 2.6	21.8 \pm 4.1
	Bidassoa	0.39 \pm 0.07	2.2 \pm 0.9	2.9 \pm 0.7	0.65 \pm 0.12	79.8 \pm 8.6	44.8 \pm 1.6

^a NR = no results due to unaccountable mortalities.

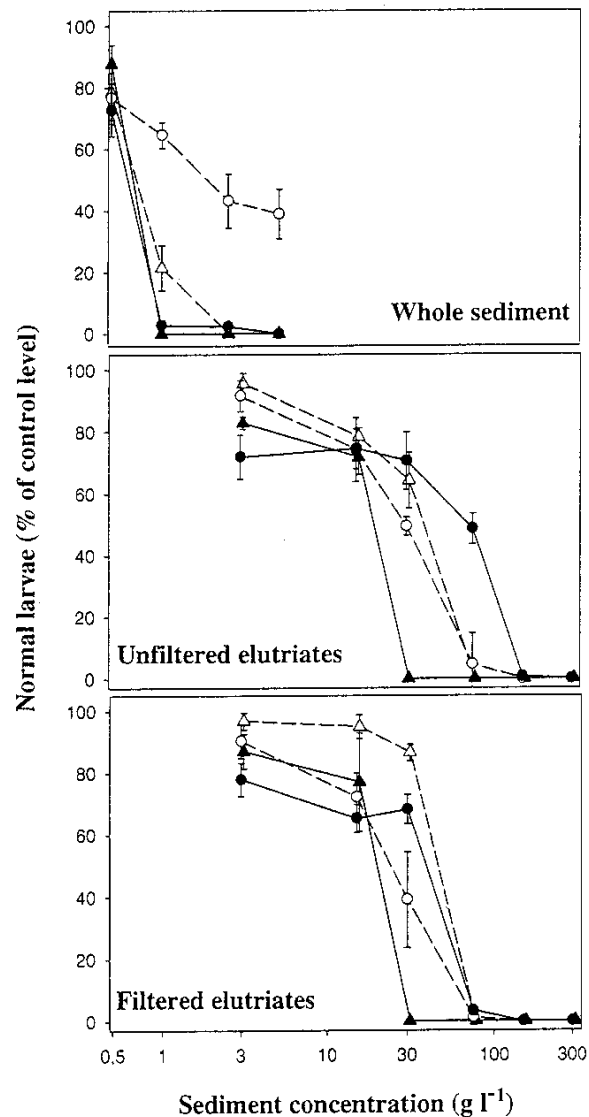


Fig. 2. Embryotoxicity of decanted whole sediment (top), unfiltered elutriates (center), and filtered elutriates (bottom) to sea urchins (*P. lividus*; Δ : Arès, \circ : Bidassoa) and oysters (*C. gigas*; \blacktriangle : Arès, \bullet : Bidassoa). Percentage of normal larvae (\pm 95% confidence intervals).

nonsuspended materials. Suspended particles do not have significant effects on fertilization, embryonal development, and survival in bivalves, but they may affect larval growth rates [4,36,37; M. Seaman and E. His, unpublished data]; on the other hand, sediment suspensions may inhibit fertilization in sea urchins [9].

Choice of bioassay

Embryotoxicity generally provided a more sensitive assessment of ecological risk than the spermotoxicity bioassay (81% of the combinations tested in this study). In particular, the test with oyster spermatozoa failed to provide any indication of toxicity. The results were mixed in the bioassays with sea urchins, but in those cases in which the spermotoxicity test proved more sensitive, the difference to the embryotoxicity test was usually minor. These findings are in agreement with those of Ringwood [29], Nacci et al. [12], and Veschenko and Zhadan [14], who considered that the embryotoxicity tests with oysters and sea urchins generally constitute a more sensitive endpoint than the spermotoxicity tests (as noted previously, these conclusions do not apply to tests with sediments in suspension that may inhibit fertilization in sea urchins; the methodology for sediment treatment is discussed further in the following).

Settlement and metamorphosis in oyster pediveliger larvae at the end of pelagic life have also been employed in sediment bioassays [38], but His et al. [25] found in investigations with Arès sediment that oyster embryos are much more sensitive; on the other hand, Watling [39] considered pediveliger settlement to be a more sensitive indicator of sediment toxicity.

Choice of species

In our study, the oyster (*C. gigas*) embryos were more sensitive than sea urchin (*P. lividus*) embryos in 7 out of 12 combinations, the latter were more sensitive in two cases, and in three cases the difference between the two species was insignificant. The performance of the controls was usually better in the oyster bioassays. The overall differences between the two species were not great, remaining well within an order of magnitude and confirming the findings of a study on seawater quality [17]. The choice of organism could therefore depend on other considerations, such as the availability of mature adults or the salinity of the area under study.

Japanese oysters are better suited for studies at low or fluctuating salinities because they are more euryhaline than sea

urchins, which require adjustment of the salinity prior to testing [32]; this can be a factor in evaluations of estuarine sediments because salinity may affect the bioavailability of heavy metals [40]. *Crassostrea gigas* has been introduced throughout the world for aquaculture purposes, and its economic importance, widespread availability, and generalized use in bioassays is greater than that of any sea urchin species [4]. Finally, a factor of importance in routine biomonitoring studies, where numerous assessments may be needed as quickly as possible, is the time required for the test and its evaluation: The oyster embryo bioassay is conducted in 24 h (vs 48 h for sea urchins), and the determination of abnormalities is easier and more rapid in oysters [18,21].

As a whole, bioassays with oyster embryos appear preferable to those with sea urchins for assessments of marine and estuarine sediment quality. The results of Chapman et al. [3] (tests of mussel embryogenesis, amphipod survival, and copepod reproduction) and Long et al. [41] (tests of embryogenesis in mussels and sea urchins and of survival in two amphipod and one polychaete species) equally indicate that bivalve embryo bioassays are the most sensitive and precise, having the smallest variation coefficient and the greatest power to discriminate between different sediments.

Methodology for sediment treatment

The biological effects of polluted sediments can be analyzed by studying either suspended or decanted sediment, filtered or unfiltered elutriate, or pore water in the sediment. Studies with sediment suspensions or with pore water generally require more sophisticated methodology and are less adequate for routine analyses requiring simple procedures. The freeze-drying of sediment, which we practiced here out of practical considerations, is valid only in the context of this type of comparative study and must not be employed in field evaluations; only fresh sediment, used as quickly as possible after sampling, is adequate for that purpose [40].

In our results, bulk sediment was always the far more sensitive indicator of ecotoxicity, having effective concentrations one or two orders of magnitude lower than those of the elutriates; in the case of the sea urchin spermotoxicity tests, however, this may have been due in part to mechanical effects of sediment that was resuspended by the agitation with the tissue culture rotator. Assessments of sediment toxicity with bivalve and sea urchin embryos are often conducted by testing the elutriate rather than the whole sediment. Since the elutriates cannot by themselves provide an adequate estimate of the potential ecotoxicity, however, assessments of the quality of polluted sediments should be conducted with the decanted whole sediment, or the tests with elutriates need to be corrected to reflect the true toxicity of the whole sediment.

Elutriate tests nevertheless retain their validity in studies on specific issues such as leaching processes. We found no significant difference between the effects of the filtered and unfiltered elutriates, and this indicates that any toxic effects are due exclusively to the soluble contaminant fraction. Since the filtration step may generate artifacts due to adsorption of pollutants, it should also be avoided in routine field investigations.

Criteria for sediment evaluation

The Bidassoa sediment (polluted by heavy metals) was more toxic than the Arès sediment (polluted by PAHs) in two-thirds of the tests. The overall differences between the two

sediments were not great, but according to our results, the dumping at sea of Bidassoa sediment would not be allowed by French standards. There is considerable uncertainty with regard to the concentrations of heavy metals that may pose significant ecological risks because metal bioavailability is determined by the concentration of acid-volatile substances formed in anoxic conditions [26]. With respect to the toxicity of sediment-associated PAH compounds, Pelletier et al. [24] showed that PAH toxicity is enhanced by photodegradation, and our results suggest that PAH contamination should be included among the quality criteria of sediment classification systems, such as the French Géode scale [42].

Recommendations

In light of our results, we suggest that further efforts toward a standardization of the testing of contaminated marine sediments need to be focused on embryotoxicity bioassays with bivalve larvae as the method of choice for routine investigations and that the assessments be conducted with decanted whole sediment rather than elutriates. In addition, it would make sense to include PAH content among the chemical criteria for sediment evaluation.

Acknowledgement—We thank C. Cantin for technical assistance and two anonymous referees for comments on the manuscript.

REFERENCES

1. Chapman PM, Long ER. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar Pollut Bull* 14:81–84.
2. Stebbing ARD, Akesson B, Calabrese A, Gentile JH, Jensen A, Lloyd R. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions du Conseil International Permanent pour l'Exploitation de la Mer* 179:322–332.
3. Chapman P, Dexter RN, Long ER. 1987. Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. *Mar Ecol Prog Ser* 37:75–96.
4. His E, Beiras R, Seaman MNL. 1999. The assessment of aquatic contamination: Bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv Mar Biol* 37:1–178.
5. Lillie FR. 1921. Studies on fertilization. X. The effects of copper salts on the fertilization reaction in *Arbacia* and a comparison of mercury effects. *Biol Bull* 41:125–143.
6. Prytherch HF. 1924. Experiments in the artificial propagation of oysters. Report of the U.S. Commissioner of Fisheries, Appendix XI (document 961). U.S. Government Printing Office, Washington, DC.
7. American Society for Testing and Materials. 1980. Standard practice for conducting static acute toxicity tests with larvae of four species of bivalve molluscs. E 724-80. In *Annual Book of ASTM Standards*, Vol 11.4. Philadelphia, PA, pp 246–262.
8. Cardwell RD, Woelke CE, Carr MI, Sanborn EW. 1976. Sediment and elutriate toxicity to oyster larvae. In Krenkel PA, Harrison Burdick JC III, eds, *Proceedings, Special Conference on Dredging and Its Environmental Effects*. American Society of Civil Engineers, New York, NY, pp 685–718.
9. Carr RS, Chapman DC. 1995. Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests—Extraction, storage, and handling techniques. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:69–77.
10. Chapman PM, Morgan JD. 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull Environ Contam Toxicol* 31:438–444.
11. Dinneen PA, Stober QJ, Crumley C, Nakatani RE. 1982. Development of a sperm cell toxicity test for marine waters. In Pearson JG, Foster RB, Bishop WE, eds, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, Vol 5. STP 766. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp 82–98.
12. Nacci DE, Jackim E, Walsh R. 1986. Comparative evaluation of three marine toxicity tests: Sea urchin embryo growth test, sea

- urchin sperm cell toxicity test and microtox. *Environ Toxicol Chem* 5:521–526.
13. Pagano G, Corsale G, Esposito A, Dinnel PA, Romana LA. 1989. Use of sea urchin sperm and embryo bioassay in testing the sublethal toxicity of realistic pollutant levels. In Grandjean E, ed, *Carcinogenic, Mutagenic and Teratogenic Marine Pollutants: Impact on Human Health and the Environment*. Gulf Publishing, Houston, TX, USA, pp 153–164.
 14. Vashchenko MA, Zhadan PM. 1993. Bioassays of bottom sediments from the Peter the Great Bay (Sea of Japan) with the use of several cells, embryos and larvae of sea urchin. *Okeanologiya* 33:121–125.
 15. Woelke CE. 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. *Wash Dep Fish Tech Rep* 9:1–93.
 16. Dinnel PA, Stober QJ. 1987. Application of the sea urchin sperm bioassay to sewage treatment efficiency and toxicity in marine waters. *Mar Environ Res* 21:121–133.
 17. His E, Heyvang I, Geffard O, de Montaudouin X. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res* 33:1706–1718.
 18. Klöckner K, Rosenthal H, Willführ J. 1985. Invertebrate bioassays with North Sea water samples: Structural effects on embryos and larvae of serpulids, oysters and sea urchins. *Helgol Meeresunters* 39:1–19.
 19. American Society for Testing and Materials. 1989. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. E 724-89. In *Annual Book of ASTM Standards*, Vol 11.04. Philadelphia, PA, pp 430–447.
 20. U.S. Environmental Protection Agency. 1994. Methods for assessing the toxicity of sediment-associated contaminants with estuarine and marine amphipods. EPA-600-R-94-025. Washington, DC.
 21. His E, Seaman MNL, Beiras R. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Res* 31:351–355.
 22. Burton GA. 1992. *Sediment Toxicity Assessment*. Lewis, Boca Raton, FL, USA.
 23. Melzian BD. 1990. Toxicity assessment of dredged materials: Acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. *Proceedings, International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities*. Goubault, Nantes, France, November 27–December 1, pp 49–64.
 24. Pelletier MC, Burgess RM, Ho KT, Kuhn A, McKinney RA, Ryba A. 1997. Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environ Toxicol Chem* 16:2190–2199.
 25. His E, Budzinski H, Geffard O, Beiras R. 1997. Effects of a hydrocarbon-polluted sediment on *Crassostrea gigas* (Thunberg) metamorphosis. *C R Acad Sci Paris Ser Sci Vie* 320:797–803.
 26. Ankley GT, DiToro MD, Hansen DJ, Berry WJ. 1996. Technical basis and proposal for deriving sediment quality criteria for metals. *Environ Toxicol Chem* 15:2056–2066.
 27. Beiras R, His E. 1995. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Mar Pollut Bull* 30:47–49.
 28. Calabrese A, Davis HC. 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea gigas*. *Biol Bull Mar Biol (Woods Hole)* 131:427–453.
 29. Ringwood AH. 1992. Comparative sensitivity of gametes and early development stages of a sea urchin (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Arch Environ Contam Toxicol* 22:288–295.
 30. Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco, CA, USA.
 31. Newman NC. 1995. *Quantitative Methods in Aquatic Toxicology*. CRC, Boca Raton, FL, USA.
 32. Van den Hurk P, Eertman RHM, Sronkhorst J. 1997. Toxicity of harbour canal sediments before dredging and after off-shore disposal. *Mar Pollut Bull* 34:244–249.
 33. Lawrence G. 1999. EC20 determinations for toxicity tests in aquatic risk assessment. *SETAC Europe News* 10:15–16.
 34. Amiard-Triquet C, et al. 1998. Fate and effects of micropollutants in the Gironde Estuary, France: A multidisciplinary approach. *Hydrobiologia* 373/374:259–279.
 35. Geffard O, Chiffolleau JF, His E. 2000. Evaluation de la contamination et de la toxicité des sédiments marins, du Gouf de Capbreton à la Bidassoa (Golfe de Gascogne). *Proceedings, VIIe Colloque International d'Océanographie du Golfe de Gascogne*, Biarritz, France, April 4–6, p 36.
 36. Davis HC, Hidu H. 1969. Effects of turbidity-producing substances in sea water on eggs and larvae of three genera of bivalve mollusks. *Veliger* 11:316–323.
 37. Seaman MNL, His E, Keskin M, Reins T. 1991. Influence of turbulence and turbidity on growth and survival of laboratory-reared bivalve larvae. *Int Counc Explor Sea Coop Res Rep* 56:6.
 38. Phelps HL, Warner KA. 1990. Estuarine sediment bioassay with oyster pediveliger larvae (*Crassostrea gigas*). *Bull Environ Contam Toxicol* 44:197–204.
 39. Watling HR. 1983. Comparative study of the effects of metals on the settlement of *Crassostrea gigas*. *Bull Environ Contam Toxicol* 31:344–351.
 40. Chapman PM. 1995. Sediment quality assessment: Status and outlook. *J Aquat Ecosyst Health* 4:183–194.
 41. Long ER, et al. 1990. Comparative evaluation of five toxicity tests with sediment from San Francisco Bay and Tomales Bay, California. *Environ Toxicol Chem* 9:1193–1214.
 42. Lamy Environment. 1996. Eaux marines—Pollution par immersion, Section II: Dispositions prises sur le plan national, Sous-Section II: Normes de rejets. Paris, France.
 43. Pierard C. 1995. Détermination des composés polychlorobiphényles dans l'environnement sédimentaire marin et estuarien. PhD thesis, Université de Bordeaux 1, Talence, France.

Publication n°3 :

Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître Japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg)

E. His, H. Budzinski, O. Geffard, R. Beiras

Une vase sableuse, dont les particules fines d'un diamètre inférieur à 63 µm représentent 85 % en poids du sédiment, a été récoltée sur une zone d'abandon de matériel ostréicole usagé recouvert de coaltar dans le bassin d'Arcachon. Ce sédiment s'est révélé fortement pollué par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ; leur teneur de plus de 10 000 ng g⁻¹ de sédiment atteint les valeurs très élevées qui caractérisent les zones portuaires les plus contaminées ; la nature pyrolytique des HAP rencontrés permet d'attribuer leur origine au coaltar provenant du matériel ostréicole abandonné. La mise en évidence de la toxicité potentielle de ce sédiment après lyophilisation a été effectuée à l'aide de pédivéligères de *Crassostrea gigas*. La métamorphose a été induite, en présence de sédiment total et d'extraits sédimentaires (filtré à 0,45 µm ou non filtré), par un neuromédiateur, l'épinéphrine. Aucune action défavorable n'a été mise en évidence sur les mortalités larvaires qui sont restées peu élevées. A l'inverse, les deux types d'extraits sédimentaires exercent une action inhibitrice sur la métamorphose de l'huître, qui augmente très nettement avec la concentration. Ceci démontre le danger que constituent les dépôts de matériel ostréicole coaltaré, sur une phase particulièrement sensible de la vie des huîtres, le passage de la vie pélagique à la vie benthique, et par suite, sur le recrutement de cette espèce dont les stades larvaires sont très souvent utilisés dans les bioessais.

Mots clés : sédiment lyophilisé, HAP, bioessai, pédivéligères, *Crassostrea gigas*, coaltar

Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie 1997 302:797-803

Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg)

Effects of a hydrocarbon-polluted sediment on Crassostrea gigas (Thunberg) metamorphosis

ÉDOUARD HIS^{1*}, HÉLÈNE BUDZINSKI², OLIVIER GEFFARD¹, RICARDO BEIRAS³

¹ Ifremer, quai Silhouette, 33120 Arcachon ;

² Ura 348 du CNRS, université de Bordeaux-I, 33405 Talence, France ;

³ Ecoloxia, Facultad de Ciencias, Campus Marcosense, Universidad de Vigo, 36200, Espagne

RÉSUMÉ

Une vase sableuse, dont les particules fines d'un diamètre inférieur à 63 µm représentent 84,7 % en poids du sédiment, a été récoltée sur une zone d'abandon de matériel ostréicole usagé recouvert de coaltar dans le bassin d'Arcachon. Ce sédiment s'est révélé fortement pollué par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) ; leur teneur de 10 348 ng/g⁻¹ de sédiment atteint les valeurs très élevées qui caractérisent les zones portuaires les plus contaminées ; la nature pyrolytique des HAPs rencontrés permet d'attribuer leur origine au coaltar provenant du matériel ostréicole abandonné. La mise en évidence de la toxicité potentielle de ce sédiment après lyophilisation a été effectuée à l'aide de pédivéligères de *Crassostrea gigas*. La métamorphose a été induite, en présence de sédiment total et d'extraits sédimentaires (filtré à 0,45 µm ou non filtré), par un neuromédiateur, l'épinéphrine. Aucune action défavorable n'a été mise en évidence sur les mortalités larvaires qui sont restées peu élevées. À l'inverse, les deux types d'extraits sédimentaires exercent une action inhibitrice sur la métamorphose de l'huître, qui augmente très nettement avec la concentration. Ceci démontre le danger que constituent les dépôts de matériel ostréicole coaltaré, sur une phase particulièrement sensible de la vie des huîtres, le passage de la vie pélagique à la vie benthique, et, par suite, sur le recrutement de cette espèce dont les stades larvaires sont très souvent utilisés dans les bioessais.

Mots clés : sédiment lyophilisé, HAPs, bioessai, pédivéligères, *Crassostrea gigas*, coaltar

ABSTRACT

A sediment (84.7% of particles smaller than 63 µm) from a mud flat where oyster farmers discard old coal-tarred material in the Bassin d'Arcachon, was found to be heavily polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), up to 10 348 ng/g⁻¹. The origin of these PAHs is attributed to the coal-tar (pyrolytic origin) from the oyster farming material. The sediment was freeze-dried, resuspended and tested on *Crassostrea gigas* pediveligers in the presence of epinephrine as an inductor of metamorphosis. Whole sediment, unfiltered and 0.45-µm filtered elutriates were tested over a 2-day period. No effect was

Note présentée par Lucien Laubier

Note remise le 26 mars 1997, acceptée après révision le 22 août 1997

*Correspondance et tirés à part

É. His et al.

observed on larval mortality. On the other hand, unfiltered and filtered elutriates drastically reduced larval metamorphosis. This indicates that the discarding of old coal-tarred material may have harmful effects on oyster recruitment and probably on the recruitment of other benthic species.

Key words: freeze-dried sediment, PAHs, bioassay, pediveligers, *Crassostrea gigas*, coal-tar

Abridged version (see p. 801)

Introduction

Des sédiments ont été prélevés sur un banc sablovasseux du bassin d'Arcachon, en bordure du chenal d'Arès (région nord de la baie), sur une zone d'abandon de matériel ostréicole usagé (piquets et lattes de bois servant au captage du naissain d'huîtres et recouverts de coaltar). Ces sédiments se sont révélés fortement pollués par les hydrocarbures.

Le bassin d'Arcachon, zone lagunaire dont la faune et la flore sont très diversifiées, est une véritable nourricerie naturelle pour de nombreuses espèces ; en particulier l'huître creuse japonaise *Crassostrea gigas* s'y reproduit en abondance.

Depuis les travaux de Woelke [1], l'utilisation des embryons de bivalves et des larves D (véligères à charnière droite, âgées de 1 à 2 j) a permis la mise en évidence de nuisances en milieu marin, tant au niveau des eaux [2, 3] que des sédiments [4, 5]. Les pédivéligères de *C. gigas* se sont aussi révélées très sensibles à l'action des altéragènes. En 1923, Prytherch [6] constate l'action bénéfique de concentrations en cuivre comprises entre 50 et 600 µg.L⁻¹ sur la métamorphose de *C. virginica*, tandis que les valeurs plus élevées sont toxiques. L'utilisation de larves compétentes à la métamorphose a été proposée récemment pour la conduite de bioessais en milieu marin [7].

Le rôle des neuromédiateurs comme inducteurs de la métamorphose a été mis en évidence [8-10] et les propriétés de la norépinéphrine ont été mises à profit dans les tests visant à dégager l'action des altéragènes tels que les sels mercuriques [11].

Dans le présent travail, les effets du sédiment d'Arès lyophilisé sont étudiés sur des pédivéligères de *C. gigas*. Le but est de rechercher une éventuelle action défavorable sur le recrutement d'une espèce sensible. Les deux techniques généralement préconisées (mise en évidence de l'influence du sédiment total d'une part et de celle d'extraits sédimentaires d'autre part) [12, 13] sont appliquées pour comparaison.

Techniques

Préparation du sédiment

Le sédiment a été prélevé le 6 mars 1996. Il a été lyophilisé et tamisé à 500 µm de façon à éliminer les débris gros-

siers (végétaux, fragments de coquilles de mollusques), puis homogénéisé. L'analyse granulométrique a été effectuée et la teneur en carbone a été mesurée sur quatre réplicats [14].

Le mode de conservation des sédiments par lyophilisation a été retenu. La stabilisation du matériel ainsi obtenue permet en effet la comparaison entre différents sites et dates de prélèvement, lorsque le matériel biologique n'est pas disponible (absence de géniteurs mûrs dans le cas des huîtres). De plus, la sensibilité des stades larvaires successifs, qui se succèdent dans le temps, peut aussi être évaluée sans problème.

Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

Les HAPs dosés dans cette étude sont présentés sur la figure 1. Les différents réplicats ($n = 4$) ont subi une extraction par microondes à l'aide du Maxidigest MX350 (Prolabo, Paris, France) selon la technique de Budzinski et al. [15]. Le dichlorométhane a servi de solvant pour l'extraction (30 mL pour 2 g de sédiment lyophilisé). Avant l'extraction, des hydrocarbures aromatiques perdeutériés, servant d'étalons internes de quantification (phénanthrène, fluoranthène, pyrène, chrysène, benzo(a)pyrène et benzo(ghi)peryène perdeutériés), ont été rajoutés à la matrice lyophilisée en quantité connue. L'extraction a duré 10 min, sous irradiation de 30 W. L'extrait organique a été désoufré par contact avec du cuivre activé, puis fractionné sur des micro-colonnes de cuivre et de silice selon un protocole adapté des travaux de Behar et al. [16], de façon à récupérer une fraction aromatique qui a été analysée par chromatographie en phase gazeuse/spectrométrie de masse.

Le chromatographe utilisé est un Hewlett Packard 5890 série II, en mode d'injection sans division, équipé du contrôle électronique de pression (temps de purge 1 min, débit de purge 60 mL/minute), température d'injection 270 °C, température interface 290 °C ; la programmation du four varie de 50 °C (2 min) à 290 °C (20 min), à 5° par minute. Le gaz vecteur est l'hélium à débit constant de 1,4 mL/minute. Le détecteur de masse est un Hewlett Packard 5972 opérant sous impact électronique (70 eV, tension de 1 800 V) en mode d'ions sélectifs correspondant aux ions moléculaires des composés aromatiques recherchés avec une fréquence de balayage de 1,8 scans/s. La colonne utilisée est une HP-5 (Hewlett Packard, Les Ulis, France) de 60 m × 0,25 mm d. i. × 0,25 µm d'épaisseur de phase.

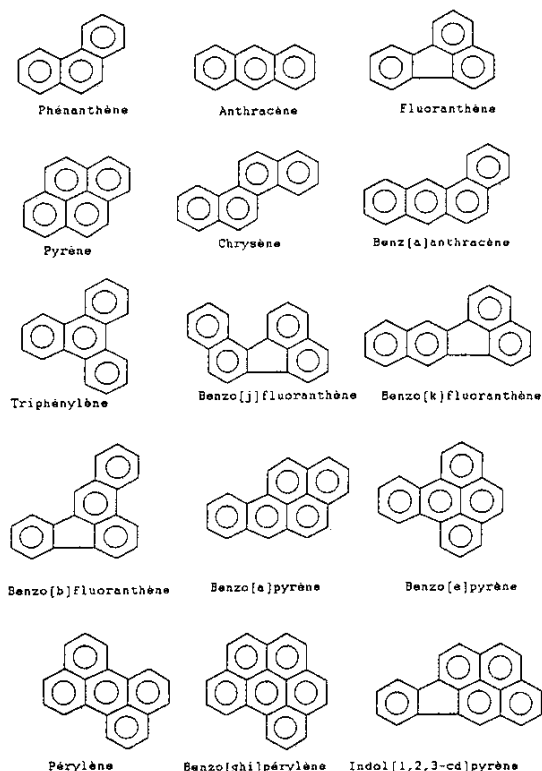


Figure 1. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques présents dans le sédiment d'Arès.

Mise en place des expériences

Les observations ont été effectuées dans les puits de 3 mL de plaques de microtitration. Le sédiment total a été mis en suspension aux concentrations de 0 (témoins) ; 0,5 ; 1,0 ; 2,5 et 5,0 g.L⁻¹, en eau de mer filtrée à 0,2 µm (salinité 33 ‰) ; puis il a été déversé dans les puits de 3 mL, après agitation manuelle de 10 s ; une décantation de 1 h a précédé la mise en place du matériel biologique [12]. Les extraits sédimentaires ont été préparés de la façon suivante [12] : 25 mL de sédiment homogénéisé et lyophilisé ont été agités 8 h dans 100 mL d'eau de mer filtrée à 0,2 µm à l'aide d'un agitateur-secoueur (500 secousses/minute) ; l'extrait a été récupéré après 6 h de décantation et déversé dans les puits de 3 mL soit à l'état brut (extrait non filtré), soit filtré à 0,45 µm (extrait filtré). Une gamme de dilutions en eau de mer filtrée à 0,2 25 %, 50 % et 100 %.

Des véligrès en provenance d'une éclosure industrielle à la hauteur moyenne de 250 µm ont été élevées au laboratoire jusqu'à une taille de 305 µm [17] ; toutes les larves ont atteint le stade pédivéligrè (tâche oculaire bien visible et présence du pied caractéristique). Des lots de 50 individus ont été préparés à la loupe binoculaire et déversés dans chacun des puits en présence des différentes préparations du sédiment, à raison de cinq puits

Sédiment pollué et métamorphose de *Crassostrea gigas*

pour chaque traitement. Une solution d'épinéphrine a été ajoutée dans chaque puits à la concentration finale de 10⁻⁴ M [10, 11] de façon à induire la métamorphose. Les plaques de microtitration ont été maintenues à l'obscurité pendant 48 h à la température de 24 ± 1 °C ; aucune nourriture n'a été apportée. Au bout des deux jours d'exposition, les pourcentages de mortalités ont été déterminés et les larves plantigrades ont été dénombrées dans chaque puits par observation directe à l'aide d'un microscope inversé d'Utermöhl.

Les effets du sédiment total et des deux types d'extrait sédimentaire sur les taux de mortalité et les taux de métamorphose ont été testés à l'aide d'une analyse de variance croisée à deux facteurs fixes [18]. L'action des différents traitements a été comparée par le test de comparaison multiple des moyennes LSD (*least square difference*). Au préalable, les variables exprimées en pourcentage ont été transformées en arcsin√p [19], l'homogénéité des variances a été vérifiée (test de Bartlett) et la normalité a été admise. Sédiment total et extraits sédimentaires ont été traités séparément.

Résultats

Caractéristiques du sédiment

Il s'agit d'une vase sableuse selon la classification de Bellair et Pomerol [20], d'une teneur en eau de 75 %, dont les lutites (fraction inférieure à 63 µm) présentent 84,7 % du poids total ; la moyenne se situe entre 30 et 50 µm (31,4 %). Le taux de carbone organique est de 4,26 ± 0,14 %.

Les concentrations en HAPs sont données dans le tableau I. Les pourcentages de variations obtenus pour les quatre replicats sont compris entre 4 et 17 % ; les plus éle-

Tableau I. Concentrations (ng/g⁻¹ de sédiment) des différents composés aromatiques du sédiment d'Arès.

Composés	Concentrations (ng/g ⁻¹)	C.V.
Phénanthrène	673 ± 29	4,3
Anthracène	50 ± 6	12
Fluoranthène	1 850 ± 90	4,9
Pyrène	1 135 ± 53	4,7
Benz(a)anthracène	714 ± 76	10,6
Chrysène + Triphénylène	977 ± 131	13,4
Benzofluoranthènes (BbF + BkF + BjF)	2 049 ± 327	15,9
Benzo(e)pyrène	796 ± 135	16,9
Benzo(a)pyrène	683 ± 82	12
Pérylène	212 ± 28	13,2
Indénol(1,2,3-cd)pyrène	623 ± 98	15,7
Benzo(ghi)pérylène	586 ± 99	16,9
ΣHAP	10 348 ± 1 097	10,6

C.V. : coefficient de variation.

É. His et al.

vés correspondent aux composés de plus haut poids moléculaire et peuvent être considérés comme satisfaisants, montrant que le sédiment d'Arès est homogène quant à sa teneur en HAPs.

Action sur les pédivéligrères et la métamorphose

Le sédiment total n'exerce aucune action sur les mortalités larvaires (tableau II). Des pourcentages compris entre 0,0 % et 2,0 ± 2,2 % ont été observés aux concentrations comprises entre 0,5 et 5,0 g.L⁻¹ contre 0,4 ± 0,8 % dans les témoins ; aucune différence statistiquement significative n'a pu être mise en évidence entre ces différentes données ($p = 0,10$). La même constatation a pu être faite avec l'extrait sédimentaire filtré (de 0,8 ± 0,8 % à 1,6 ± 1,9 % entre 25 et 50 % d'extrait sédimentaire et 2,2 ± 2,1 % en eau de mer filtrée seule ; $p = 0,56$). À l'inverse, l'extrait sédimentaire non filtré semble avoir favorisé la survie des pédivéligrères : le témoin (2,2 ± 2,1 %) étant statistiquement différent des traitements ($p < 0,01$) ; ces derniers ont permis d'observer des valeurs très voisines entre elles, inférieures à celle du témoin, quand on passe des teneurs de 25 % à 100 % (de 0,4 ± 1,2 % à 0,0 ± 0,0 %). En ce qui concerne la métamorphose (tableau III), les pourcentages obtenus en présence de sédiment total varient de 92,4 ± 10,0 % (5 g.L⁻¹) à 90,2 ± 4,8 % (0,5 g.L⁻¹) contre 91,0 ± 7,4 % dans les témoins ; il n'existe aucune différence statistiquement significative entre ces valeurs ($p = 0,46$). L'extrait sédimentaire non filtré exerce au contraire une action défavorable sur les pourcentages de stades plantigrades observés : ils diminuent très nettement quand la concentration augmente (passage de 50,2 ± 2,1 % à 9,6 ± 10,0 % aux teneurs de 25 % et 100 % respectivement, contre 88,8 ± 5,3 % dans les puits témoins). Enfin l'extrait sédimentaire filtré perturbe les fixations chez *C. gigas* à partir de la valeur de 50 % (28,5 ± 4,8 %) et le phénomène est exacerbé à la teneur de 100 % (7,4 ± 3,2 %). Une Anova à deux facteurs permet de mettre en

Tableau II. Pourcentages de mortalités des pédivéligrères de *Crassostrea gigas* exposées au sédiment d'Arès lyophilisé.

g.L ⁻¹	Sédiment total		Extrait sédimentaire	
	% de mortalité	%	non filtré	filtré
			% de mortalité	% de mortalité
0	0,4 ± 0,8	0	2,2 ± 2,1	2,2 ± 2,1
0,5	1,2 ± 2,5	25	0,4 ± 1,2	1,6 ± 1,9
1,0	2,0 ± 2,2	50	0,0 ± 0,0	0,8 ± 0,8
2,5	0,0 ± 0,0	100	0,0 ± 0,0	1,2 ± 2,5
5,0	1,0 ± 1,4			

Les valeurs en italique correspondent aux concentrations testées.

Tableau III. Influence du sédiment d'Arès lyophilisé sur la métamorphose chez *Crassostrea gigas*.

g.L ⁻¹	Sédiment total		Extrait sédimentaire	
	% de métamorphose	%	non filtré	filtré
			% de métamorphose	% de métamorphose
0	91,0 ± 7,4	0	88,8 ± 5,3	88,8 ± 5,3
0,5	90,2 ± 4,8	25	50,2 ± 2,1	88,2 ± 6,2
1,0	94,4 ± 2,3	50	22,3 ± 8,5	28,5 ± 4,8
2,5	91,2 ± 5,4	100	9,6 ± 10,0	7,4 ± 3,2
5,0	92,4 ± 10,0			

Les valeurs en italique correspondent aux concentrations testées.

évidence les effets statistiquement significatifs de la filtration ($p < 0,01$) et de la concentration ($p < 0,001$).

Discussion et conclusions

Il existe de nombreux sites contaminés qui posent de réels problèmes d'environnement car les sédiments représentent un réservoir majeur de polluants [21]. Le sédiment d'Arès se caractérise par des teneurs en HAPs très élevées (10 348 ng/g⁻¹ de sédiment pour la somme des 15 HAPs) et permet de considérer qu'il s'agit d'un site contaminé par les HAPs. À titre de comparaison, Readman et al. [22] signalent des teneurs de 14 000 ng/g⁻¹ dans l'estuaire de la Tamar (Grande Bretagne), et le site portuaire considéré comme très pollué de la baie du Lazaret (Toulon) se caractérise par des valeurs de 8 500 ng/g⁻¹ [23].

En ce qui concerne la distribution des différents éléments dosés (figure 2), les composés penta- et hexa-aromatiques sont bien représentés. La prédominance des composés de poids moléculaire élevé est caractéristique de l'origine pyrolytique des HAPs [24–26]. Ce phénomène indique une origine de ces hydrocarbures liée à une combustion incomplète à haute température. Le dépôt sur le site de prélèvement de matériel ostréicole usagé recouvert de coaltar (produit pétrolier chauffé à haute température), explique une telle contamination du sédiment. En effet ce produit est très riche en structures polyaromatiques [26].

La mise en évidence de la toxicité potentielle des sédiments est un élément fondamental de la surveillance de l'environnement marin car ils intègrent les atteintes de ce milieu naturel, permettant de rechercher les sources de nuisances [27]. Les bioessais sont particulièrement adaptés lorsqu'il s'agit d'étudier les conséquences du relargage lent et persistant des micropolluants par le compartiment sédimentaire [28]. Il faut utiliser, pour les tests, des organismes particulièrement sensibles et les larves de *C. gigas* constituent un matériel de choix [1, 29]. Ce n'est que

récemment [7] que les pédivéligères, considérées comme particulièrement vulnérables aux agressions, ont été utilisées dans les bioessais [11, 30]. Pourtant elles présentent de nombreux avantages. Leur comportement (nage dans la colonne d'eau ou reptation à la recherche d'un support de fixation) les expose à la phase dissoute et en suspension, mais aussi à la phase solide du compartiment sédimentaire. Dans les bioessais, un apport nutritionnel peut modifier les conditions d'exposition de l'organisme utilisé : il doit être évité autant que faire se peut [27]. Le changement de mode de vie qui se produit à la métamorphose, s'accompagne de remaniements anatomiques importants : les pédivéligères ne peuvent pas prendre en charge la nourriture particulaire [31] ; il n'est donc pas nécessaire de les alimenter.

Les études écotoxicologiques d'un site pollué impliquent des observations sur les modifications des communautés benthiques ; des expériences sur le passage de la vie pélagique à la vie benthique, c'est-à-dire sur le recrutement d'une espèce sensible comme *C. gigas* font parfaitement le lien entre bioessais et études de peuplement.

Parmi les travaux consacrés à la toxicité des hydrocarbures sur les larves de bivalves marins, Byrne et Calder [32] ont montré que la fraction soluble de certains hydrocarbures naturels (gisement de Florida Jay en Floride) se caractérise par une LC 50 à 10 j de 0,2 ppm chez *Merccenaria mercenaria* alors que la CL 50 à 4 j est de 1,2 ppm d'extrait aqueux chez *Crassostrea virginica* [33]. Une perturbation du captage chez l'huître américaine par les hydrocarbures, avec à l'inverse augmentation des fixations de *Balanus improvisus* et *B. eburneus*, a été constatée dans le milieu naturel [34]. L'action néfaste d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la formation des larves D de *C. gigas* a été récemment étudiée [35] ; il existe une corrélation entre la teneur des sédiments en HAPs et l'action défavorable qu'ils exercent sur l'embryogenèse et la formation des larves D de *Mytilus edulis* [36]. Les instances internationales [27, 28] préconisent la comparaison des réponses obtenues sur le sédiment total et sur les extraits sédimentaires tels que le surnageant.

Avec le sédiment total d'Arès lyophilisé, aucune action délétère n'a été mise en évidence, que ce soit sur la viabilité, ou sur la métamorphose de *C. gigas*. Il n'en est pas de même avec les extraits sédimentaires. Une différence des taux de mortalités entre les témoins et les trois concentrations d'extrait sédimentaire non filtré s'explique, à notre avis, par la manipulation des larves lors de la préparation des lots pour les expériences : certaines ont pu être blessées lors de leur manipulation. En effet cette différence n'existe plus si l'on se réfère aux témoins de la série qui concerne le sédiment total ; or, ils ont été préparés de

la même façon que les précédents, à partir de la même population larvaire. L'expérience acquise sur la biologie des véligères en milieu contrôlé montre que les différences des taux de mortalités entre les différents élevages d'une même population larvaire de l'ordre de ceux qui existent ici, sont peu significatives.

L'extrait sédimentaire, filtré à 0,45 µm ou brut, s'est révélé très actif sur les taux de métamorphose ; le nombre de stades plantigrades, observés en fin d'exposition, diminue fortement lorsque la concentration du milieu expérimental en surnageant augmente. Ceci met bien en évidence le danger que constitue l'abandon massif de matériel ostréicole coaltaré pour le biotope du bassin d'Arcachon. En effet, les extraits sédimentaires reflètent le mieux la réalité du terrain, en ce qui concerne le relargage des micropolluants par les sédiments remis en suspension lors des opérations de dragage, ou par action des vagues et des courants [37, 38].

Toutefois, les aires de dépôt actuellement utilisées sont peu étendues (deux sites d'environ 10 000 m², creusés à la cote - 2 m et recouverts de sédiment après comblement par le matériel usagé) ; l'impact de leur pollution sur l'ensemble du bassin d'Arcachon est donc limité. Ce sédiment présente cependant un intérêt comme modèle pour les études relatives à la mise en évidence de la toxicité potentielle de la phase sédimentaire polluée par les HAPs d'origine pyrolytique.

La recherche des limites de tolérance des différents stades larvaires vis-à-vis des altéragegens est indispensable si l'on veut comprendre pleinement les effets d'une pollution [39] et une meilleure appréciation des nuisances est obtenue lorsque les bioessais sont réalisés à l'aide de plusieurs espèces [28, 29]. Ceci n'est possible, ou n'est facilement réalisable, qu'avec un sédiment stabilisé, ce qui est le cas du sédiment lyophilisé ; de plus, ce mode de conservation augmente la biodisponibilité des micropolluants lors de la préparation des extraits sédimentaires [35]. Nous envisageons, dans cette optique, de comparer les résultats présentés ici à ceux qui peuvent être obtenus sur l'embryogenèse de *C. gigas* d'une part et sur celle d'un autre invertébré marin dont l'utilisation est aussi préconisée pour la conduite de bioessais, *Paracentrotus lividus* [29]. Cet échinidé est abondant dans le bassin d'Arcachon. De plus, l'analyse chimique en cours des métaux lourds contenus dans ce sédiment permettra d'attribuer ou non aux HAPs, la toxicité mise en évidence.

L'espèce et le stade larvaire le plus sensible, vis-à-vis d'un sédiment pollué par les hydrocarbures, seront ainsi définis, pour des études plus générales de surveillance de l'environnement marin.

ABRIDGED VERSION

Surface sediment was collected in March 1996 from a mud flat where oyster farmers usually discard old coal-tarred material, near the Chenal d'Arès (Bassin d'Arcachon). It was

freeze-dried, sieved at 500 µm to eliminate debris (wood, shells, etc.) and homogenized for analysis. The particle size distribution was measured; the fraction < 63 µm represented

É. His et al.

84.7% of total dry weight; the median grain size (31.4%) was between 30 and 50 μm . The total carbon content was $4.26 \pm 0.14\%$.

The polycyclic aromatic hydrocarbon content (PAH) was determined by gas chromatography/mass spectrometry (Hewlett Packard 5890 series II). Fifteen PAHs were analyzed on four replicates. Total PAH content was found to be $10\,348\text{ ng/g}^{-1}$, which is as high as the values found in marine sediments highly polluted by hydrocarbons (Tamar Estuary, UK, or Lazaret Bay, Toulon military harbour). Penta- and hexa-aromatic hydrocarbon contents indicated that the PAHs were of pyrolytic origin, which characterises coal-tar, confirming the origin of this pollution.

This sediment was tested on *Crassostrea gigas* oyster pediveligers.

Umboned larvae (250 μm) were reared under laboratory conditions and the experiments were carried out when pediveligers were ready (competent) to metamorphose as indicated by larval size (305 μm) and attainment of the eyed stage (100%). Lots of 50 individuals were counted under a binocular and delivered into 3-mL nucleon tissue-culture microwells filled with the sediment preparation to be assessed (five replicates per treatment). Metamorphosis was induced by adding freshly prepared epinephrine to each microwell (concentration 10^{-4} M).

Total freeze-dried sediment was resuspended in 0.2- μm filtered sea water (FSW 33%); the following concentrations were prepared: 0 (controls), 0.5, 1.0, 2.5 and 5 g l^{-1} FSW; the sediment was hand-shaken for 10 s in FSW and allowed to settle for an hour before adding the pediveligers. Two different elutriates were also prepared: 25 mL freeze-dried sediment in 100 mL FSW were shaken mechanically for 8 h, allowed to settle for the following 6 h and used directly (unfiltered supernatant) or after a 0.45- μm filtration (filtered supernatant). A range of sediment extract dilutions in FSW was tested: 0% (controls), 25, 50 and 100%.

RÉFÉRENCES

1. Woelke C. E. 1961. *Proc. Northwest Sym. Wat. Pollut. Res., US Dept. HEWPHS*, Portland, OR, 113-123
2. His E., Robert R. 1986. Utilisation des jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. *Haliotis* 15, 301-308
3. His E., Seaman M. N. L., Beiras R. 1997. A simplification of the bioassay embryogenesis and larval development of bioassay method for water quality assessment. *Wat. Res.*, 30, 351-355
4. Chapman P.M., Long E.R. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar. Pollut. Bull.* 14, 81-84
5. Swartz R. C. 1989. Marine sediment toxicity tests. In: *Contaminated Marine Sediments-Assessment and Remediation* : 115-129. Committee on Contaminated Marine Sediments, Marine Board, Commission on Engineering and Technical Systems, National Research Council, National Academic Press, Washington, DC
6. Prytherch H.F. 1924. Experiments in the artificial propagation of oysters. *Rep. U. S. Com. Fish.*, XI, 14 p.
7. Watling H.R. 1983. Comparative study of the effects of metals on the settlement of *Crassostrea gigas*. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 31, 344-351
8. Coon S.L., Bonar D.B., Weiner R.M. 1985. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by L-Dopa and catecholamines. *Aquaculture* 58, 255-262
9. Pawlik J.R. 1992. Chemical ecology of the settlement of benthic marine invertebrates. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 30, 273-335
10. Beiras R., Widdows J. 1995. Induction of metamorphosis in *Crassostrea gigas* larvae using neuroactive compounds. *Mar. Biol.* 123, 327-334
11. Beiras R., His E. 1994. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 113, 95-103
12. Chapman P.M., Swartz R.C., Roddie B., Phelps H.L., van den Hurk P., Butler R. 1992. An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91, 253-264
13. Carr R.S., Long S.E., Windom H.L., Chapman D.C., Thursby G., Sloane G.N., Wolfe D.A. 1996. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1218-1231

C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie / Life Sciences
1997. 320, 797-803

14. Etcheber H., Relexans J.C. 1983. Nature et répartition de la matière organique particulaire sur le plateau continental au large de l'estuaire de la Gironde. *Ann. Inst. Océanogr. Paris* 59, 5-19
15. Budzinski H., Papineau A., Baumard P., Garrigues P. 1995. Extraction assistée par chauffage microondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *C. R. Acad. Sci. Paris, 321, Série IIB*, 69-76
16. Behar F., Leblond C., Saint Paul C. 1989. Analyse quantitative des effluents de pyrolyse en milieu ouvert fermé. *Rev. Inst. Français Pét.* 44, 387-411
17. Helm M.M., Millican P.F. 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11, 1-12
18. Sokal R. R., Rohlf F.J. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco
19. Underwood A.J. 1981 Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 19, 513-605
20. Bellair P., Pomerol C. 1977. *Éléments de géologie*. Armand Colin, Paris, 528 p
21. Burton G.A., Scott K.J. 1992. Sediment toxicity evaluations. Their niche in ecological assessments. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2068-2075
22. Readman J., Mantoura R., Llewellyn C., Preston M., Teeves A. 1986. The use of pollutants and biogenic markers as source discriminants of organic inputs to estuarine sediments. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 27, 29-54
23. Garrigues P., Raoux C., Lemaire P., Mathieu A., Ribera D., Narbonne J. F., Lafaurie M. 1990. In situ correlation between polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and PAH metabolizing system activities in mussels and fish in the Mediterranean sea : preliminary results. *J. Environ. Anal. Chem.* 38, 379-387
24. Youngblood W., Blumer M. 1975. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment: homologous series in soils and recent marine sediments. *Geochem. Cosmochim. Acta* 39, 1303-1314
25. Wise S., Hilpert L., Rebbert R., Sander L., Schantz M., Chesler S., May W., Fresenius Z. 1988a. Standard reference materials for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chem.* 332, 576-582
26. Wise S., Benner B., Byrd G., Chesler S., Rebbert R., Schantz M. 1988b. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coal tar standard reference material. *Anal. Chem.* 332, 887-894
27. Anonyme. 1993. Workshop on sediment toxicity assessment. *Soc. Environ. Toxicol. Chem.* (Hill I. R., Matthiessen P., Heimbach F., eds.), 8-10 novembre 1993, Renesse, Hollande, 105 p.
28. Anonyme. 1989. Report of the ICES Advisory Committee on Marine Pollution. *ICES Coop. Res. Rep.* 167, 26-29
29. Stebbing A.R.D., Akesson B., Calabrese A., Gentile J.H., Jensen A., Lloyd R. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapp. P.-v Réuni. Cons. Int. Explor. Mer* 179, 322-332
30. Phelps H.L., Warner A. 1990. Estuarine sediment bioassay with oyster pediveliger larvae (*Crassostrea gigas*). *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 44, 197-204
31. Bayne B.L. 1976. *Marine Mussels, Their Ecology and Physiology* (B. L. Bayne, ed.), Cambridge University Press, Cambridge, 81-119
32. Byrne C.J., Calder J.A. 1977. Effect of water soluble fraction of crude, refined and waste oils on the embryonic and larval stages of the quahog clam *Mercenaria sp.* *Mar. Biol.* 40, 225-231
33. Sigler M., Leibovitz L. 1982. Acute toxicity of oil and bilge cleaners to larval American oysters (*Crassostrea virginica*). *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.* 29, 137-145
34. Smith C. M., Hackney C.T. 1989. The effects of hydrocarbons on the settling of the oyster, *Crassostrea virginica*, in intertidal habits in Southern North Carolina. *Estuaries* 12, 42-48
35. Beiras R., His E. 1995. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 47-49
36. Magnusson K., Ekelund R., Dave G., Granmo A., Förlin L., Wennerberg L., Samuelsson M.-O., Berggren M., Broström-Lundén E. 1996. Contamination and correlation with toxicity of sediment samples from the Skagerrak and Kattegat. *J. Sea Res.* 35, 223-234
37. Lee G.F., R.A. Jones 1984. Water quality significance of contaminants associated with sediments: an overview. In *Fate and Effects of Sediment Bound Chemicals in Aquatic Systems* (K.L. Dickson, A.W. Maki, W.A. Brungs, eds.), Pergamon Press, New York, 3-33
38. van den Hurk P. 1994. Effects of natural sediment properties on test results in bioassays with oyster larvae (*Crassostrea gigas*) on sediment elutriates. *J. Aquat. Ecos. Hlth* 3, 185-191
39. Lough R.G. 1975. A reevaluation of the combined effects of temperature and salinity on survival and growth of bivalve larvae using response surface techniques. *Fish. Bull.* 7, 86-94

Chapitre V: Evaluation de la qualité des sédiments et choix de sédiments modèles

Ce chapitre comprend les résultats d'une publication et d'une note, concernant la possibilité d'utiliser les embryons de *C. gigas* pour les études de biomonitoring sur la qualité des sédiments marins et estuariens.

- 1- Relationships between contaminant levels in marine sediments and their biological effects upon embryos of oysters, *Crassostrea gigas*. (Publication n°4).
- 2- Etude du mode d'action du sédiment contact vis à vis des embryons de *Crassostrea gigas* au cours du test d'embryotoxicité. (Note n°2).

Les études sur la toxicité des sédiments marins ont donné lieu à une importante production scientifique. Parmi les différents traitements sédimentaires couramment utilisés, deux ont été retenus pour cette étude : le "sédiment contact" et l'élutriat. Le premier permet d'étudier les effets des sédiments vis à vis des organismes benthiques, alors que le second reflète la toxicité des xénobiotiques sédimentaires relargués dans l'eau lors de la remise en suspension des sédiments.

La première étude (Publication n°4) présente une comparaison de la toxicité des deux traitements sédimentaires, à partir de dix sédiments côtiers, estuariens ou portuaires et à l'aide du test d'embryotoxicité chez *C. gigas*. Les sédiments ont été utilisés frais et lyophilisés, afin d'évaluer l'impact de ce mode de stockage sur leur toxicité. Le test d'embryotoxicité chez *C. gigas*, avec le sédiment contact, s'est révélé parfaitement utilisable pour évaluer la qualité des sédiments. Pour les élutriats obtenus à partir des sédiments frais, le test semble manquer de sensibilité étant donné les faibles niveaux de contamination observés. Dans plusieurs cas, l'ammoniac, toxique pour les embryons de *C. gigas*, a donné lieu à des faux positifs.

La note n°2 présente les résultats des expériences conduites pour tenter de comprendre le mécanisme d'action du sédiment total (sédiment contact) lors du test embryo-larvaire chez *C. gigas*.

Trois sédiments modèles ont été choisis à l'issue de cette étude pour les recherches ultérieures sur la conservation des sédiments et la biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Le sédiment d'Arès et de la Bidassoa sont respectivement caractérisés par une contamination en HAP et en métaux. La boue portuaire de Dunkerque contient les deux types de contaminant à des niveaux très élevés.

Publication n°4 :

Relationships Between Contaminant Levels in Marine Sediments and their Biological Effects upon Embryos of Oysters, *Crassostrea gigas*

O. Geffard, H. Budzinski, E. His, MNL. Seaman, P. Garrigues.

Dix sédiments côtiers ont été caractérisés sur le plan physico-chimique et toxicologique à l'aide des embryons de l'huître *Crassostrea gigas*. Le sédiment contact est d'un à quatre ordres de grandeur plus toxique que l'élutriat, ce dernier ayant des teneurs en contaminants plus faibles. Une analyse en composante principale montre que les effets biologiques observés avec le sédiment contact sont corrélés aux teneurs en métaux et en HAP ; dans le cas des élutriats, les effets biologiques sont principalement corrélés aux teneurs en ammoniac et en carbone organique dissous (COD). Les sédiments lyophilisés et leurs élutriats sont respectivement plus toxiques, d'un ordre de grandeur, que les sédiments frais et leurs élutriats. La lyophilisation entraîne vraisemblablement une augmentation de la bio-disponibilité des polluants et/ou le relargage de composés organiques non identifiés pouvant avoir des effets toxiques.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, sédiment contact, élutriat, test d'embryotoxicité, qualité des sédiments.

Soumise à *Environmental Toxicology and Chemistry*

Relationships Between Contaminant Levels in Marine Sediments and
their Biological Effects upon Embryos of Oysters, *Crassostrea gigas*

OLIVIER GEFFARD,*† HELENE BUDZINSKI,‡ EDOUARD HIS,† MATTHIAS N.L. SEAMAN§ and PHILIPPE
GARRIGUES‡

† IFREMER, DEL/PC, Station d'Arcachon, Quai Silhouette, 33120 Arcachon, France.

‡ Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels, Université de Bordeaux 1,
33405 Talence, France.

§ Institute of Marine Sciences, 24105 Kiel, Germany.

ABSTRACT

Sediments from ten coastal locations were analyzed with respect to their physical and chemical characteristics, and their biological quality was assessed by bioassays with embryos of oysters, *Crassostrea gigas*. Whole sediments were one to four orders of magnitude more toxic than their elutriates, because the latter have lower contaminant concentrations. Principal components analysis revealed that the biological effects of whole sediment depended mostly on the levels of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), while in the case of the elutriates the toxicity was mainly correlated with the concentrations of ammonia (NH₄) and of dissolved organic carbon (DOC). Freeze-dried sediments and their elutriates were up to one order of magnitude more toxic than fresh sediments and elutriates, respectively, presumably because the freeze-drying procedure increases pollutant bioavailability or release unidentified organic molecules able to have toxic effects.

Key words : *Crassostrea gigas*, whole sediment, elutriate, embryotoxicity test, sediment quality

* Corresponding author ; Olivier Geffard, IFREMER, Quai du Commandant Silhouette, 33120 Arcachon, France

Tel : (33) 5 56 83 85 60

Fax : (33) 5 56 83 89 80

Email : ogeffard@ifremer.fr

INTRODUCTION

Marine and coastal habitats are constantly subjected to the introduction of anthropogenic pollutants, most of which adsorb to suspended particles and subsequently accumulate in the sediments. Coastal sediments may thus acquire pollutant concentrations 5000 times higher than those of the water column [1], and thereby pose a threat to living organisms. Benthic organisms are directly exposed to contaminants that are adsorbed to the particles or dissolved in the pore water, and pelagic organisms are affected either via the food web or by the return of contaminants into the water column through diffusion and resuspension by wave action or dredging activities [2].

Coastal areas serve as reproductive and nursery grounds for many invertebrate and fish species. Protection of this biodiversity requires evaluations of the biological effects of sediments in marine, coastal and estuarine areas. Chemical analyses of sediments are inadequate to assess their biological quality. This quality can only be studied by means of bioassays with live organisms [3-5], such as benthic amphipods [6], polychaetes [7] and bivalves [6]. The test organisms are exposed to the sediment in question for a number of days, and its toxicity is estimated according to various criteria (rates of mortality, reproduction or growth, or changes in behaviour).

Nevertheless, this type of bioassay has various inconvenient aspects, such as long duration (10 to 48 days), low sensitivity [8], inadequacy for routine studies, and the uncertain biological effects of physical characteristics of the sediment (e.g. particle size) [9]. Finally, the small number of individuals employed (10 to 20) creates statistical problems [10]. A variety of more simple and rapid tests (30 min to 48 h) has been developed in recent decades, such as Microtox [11], the test of mortality in *Daphnia* and *Nitocra* [8], and tests of spermotoxicity and embryotoxicity in bivalves and sea urchins [4, 12-14].

The test of embryotoxicity in bivalves, particularly in oysters *Crassostrea gigas*, is one of the most sensitive [15]. It was initially developed by Woelke [16] to assess the toxicity of industrial effluents, and was later proposed by Chapman & Morgan [4] to determine the biological quality of marine sediments. The bivalve embryo bioassay is usually conducted with an water extract (or elutriate) of the sediment, or with the pore water [4, 14, 17-19]. It has recently been modified by exposing oyster embryos directly to different concentrations of the whole (or raw) sediment [20]; this test has proven to be more reproducible than the same test with sea urchins, and it was therefore decided to employ it in the present study for the following purposes:

To compare the toxicity of whole sediment and of elutriate in sediment samples from ten coastal locations; to evaluate the effect of freeze-drying the sediment (for storage purposes) on its toxicity; to study the relationships between the contamination levels of the sediments and their biological effects. To this end, we determined the chemical and physical characteristics of ten sediment samples and assessed the toxicity of the fresh and freeze-dried whole sediments and of their respective elutriates to embryos of oysters, *C. gigas*.

MATERIAL AND METHODS

Sediments

Sampling and conservation

Ten sediments (eight from coastal or estuarine sites, and two port sludges) were collected on March 24-26, 1999 (Fig. 1); the sediment from a nature reserve, Ile aux Oiseaux, having low contaminant levels and known to be non-toxic in this type of bioassay, was chosen as reference. At the coastal and estuarine sites, sampling was limited to the oxidized surface layer (top 1-2 cm), which is most likely to be resuspended by water motion. The two port sludges were collected with a stainless steel Van Veen grab. Immediately after sampling, the sediment was sieved at 2 mm to eliminate debris, and then homogenised and filled into glass bottles. One part of each sediment was freeze-dried, and another part was stored in the dark in an air-tight container at 4°C for less than a week prior to its use in the bioassays and for physico-chemical analyses.

Sediment treatments

The bioassays were conducted with whole sediment and with elutriates of both, fresh and freeze-dried samples. Whole sediment was prepared by resuspending fresh or remoistened freeze-dried sediment in filtered (0.2 µm) seawater (FSW) having a salinity of 33. Sediment suspensions of 0 (control), 0.5, 1, 2.5 and 5 g l⁻¹ were prepared in 500 ml flasks, mixed for 10 s, and 30 ml of suspension were transferred into the test vessels (see below). To avoid mechanical effects from suspended particles, the sediments were allowed to settle for 2 h before the biological material was introduced.

Elutriates were prepared by a modification of Melzian's [21] method: fresh, or remoistened freeze-dried sediment were mechanically shaken (multi-wrist shaker, 500 rpm) in FSW at a ratio of 1:4 (sediment/water) for 8 h, and allowed to settle for another 8 h. The supernatant was siphoned off and mixed with FSW to the following concentrations: 0 (control), 1, 5, 10, 25, 50 and 100% of

elutriate. Salinity was adjusted to 33 and pH was adjusted between 7.5 and 8.5 [22]. Elutriate samples for analysis of metals were filled into acid-washed polypropylene bottles and then acidified; samples for analyses of polychlorinated hydrocarbons (PAH), dissolved organic carbon (DOC), particulate organic carbon (POC), suspended particulate matter (SPM) and ammonia (NH₄) were collected in glass bottles.

Physical and chemical analyses

Whole Sediment

Particle size distribution was determined by diffractometry, water content was determined by drying to constancy at 50°C; and organic carbon content was measured by the method described in Abril et al. [23].

The following polyaromatic hydrocarbons (PAH) were analyzed: phenanthrene (Phe), anthracene (An), fluoranthene (Fluo), pyrene (Pyr), benz(a)anthracene (BaA), triphenylene + chrysene (Triph + Chrys), benzo(b)fluoranthene + benzo(k)fluoranthene + benzo(j)fluoranthene (BbF + BkF + BjF), benzo(e)pyrene (BeP), benzo(a)pyrene (BaP), perylene (Per), indeno(1,2,3-cd)pyrene (IP), benzo(ghi)perylene (BPer) and dibenz(a,h)anthracene (DahA). Microwave-assisted extraction (10 min at 30 W) of 2 g of freeze-dried sediment was performed as described by Budzinski et al. [24] with dichloromethane (30 ml) as solvent. Perdeuterated aromatic compounds (phenanthrene, fluoranthene, chrysene, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene and benzo(ghi)perylene perdeuterated) were used as internal standards and added prior to the extraction. The organic extract was desulphurized with activated copper, purified on a micro-column containing alumina, and fractionated on a micro-column containing silica, in order to collect only the aromatic compounds. These compounds were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The measurements were validated with certified sediment (SRM 1941a, NIST, Gaithersburg, MD, USA)

For heavy metal analyses, aliquots of freeze-dried sediment (0.5 g) were placed in acid-washed glass tubes and digested by addition of 5 ml of HNO₃ and 3 ml of HCl. This process was conducted until dryness, and the residues were then resuspended in 10 ml of 1N HCl. The acid solutions thus obtained were analysed by flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) for copper (Cu) and zinc (Zn), or electrothermal AAS with Zeeman effect (Hitachi Z8200) for cadmium (Cd). The measurements were validated with certified sediment (SD-M-2/TM IAEA Monaco).

Elutriate

Dissolved and particulate organic carbon (DOC and POC) were determined according to Abril et al. [23], suspended particulate matter (SPM) and ammonia concentrations were assessed according to Aminot and Chaussepied [25].

PAH analyses were performed on 100 ml samples of elutriate. Addition of the perdeuterated compounds was followed by three liquid-liquid extractions with 40 ml of dichloromethane. The extract was dried with sodium sulfate (Na_2SO_4) and reconcentrated under nitrogen to a volume of 0.5 ml. The extract was then fractionated on a micro-column containing silica to recover the aromatic compounds; these were determined by the same methods as those extracted from the sediment.

Analyses of Cd, Cu and Zn were performed by electrothermal atomic absorption spectrometry (Perkin-Elmer model 3030 and Varian model SpectrAA-800) after preconcentration by liquid-liquid extraction [26]. Quality assurance testing relies on the control of blanks and on the accuracy and reproducibility of data relative to standard reference materials from the National Research Council of Canada (CASS-3). The performances are reported in Table 1

Bioassays

Adult Japanese oysters, *Crassostrea gigas*, were conditioned in the hatchery and induced to spawn by thermal stimulation according to standard procedures [15, 27]. Eggs and sperm were mixed in sterile glass beakers with filtered seawater (FSW) for 15 min to achieve fertilization. For the sediment bioassays, volumes corresponding to 1200 fertilized eggs were transferred with an automatic micropipette having an enlarged tip into sterile 30 ml polystyrene vials containing respectively the different sediment concentrations (5 replicates per treatment); the elutriate bioassays were conducted in the same way, but with samples of 300 eggs in 3 ml vials. The embryos were incubated for 24 h at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. After the incubation period, buffered formalin were added to each vial and the percentages of abnormalities were determined according to the criteria in His et al. [27] by direct observation through an inverted microscope of 100 randomly selected individuals per vial. In the samples with whole sediments, the larvae were colored with Rose Bengal to facilitate observation.

Statistical analysis

To test the null hypothesis that the different treatments had no effect on larval development, the percentages of normal larvae at each concentration were compared to the controls using a one-way ANOVA [28] after conducting Cochran's test for homogeneity of variance. If the data failed this test, an arcsin $P^{1/2}$ transformation was applied to the data; this was sufficient to achieve homogeneity. The concentrations causing 20% inhibition of normal embryogenesis (effective concentrations; EC20) were calculated with a non linear regression analysis program (Macro Hill version 2) according to Vindimian et al. [29], after Abbot's correction [30]. The relationship between sediment contamination levels and biological effects were determined by correlation analysis and principal components analysis (PCA).

RESULTS

Sediments and elutriates

Physical and chemical characteristics (Table 2)

The various sediments had water contents between 50 and 76%. They were silty, having more than 50% of particles smaller than 63 μm . The finest sediments had highest levels of organic carbon (Table 2). The elutriates of fresh sediment had DOC levels of 5 to 6.6 mg l^{-1} (except for Dunkerque and Adour-1, with more than 10 mg l^{-1}), whereas the elutriates of freeze-dried sediment had DOC levels that were three times higher. Freeze-dried sediment elutriates generally had higher POC levels as well, but the difference was less pronounced. SPM and NH_4 levels varied considerably between the various sediment treatments; the ammonia levels in both Dunkerque elutriates and in elutriate of fresh Adour-1 sediment surpassed the threshold of toxicity (200 $\mu\text{mol/l}$) to oyster larvae (Table 2).

Contaminants in whole sediment (Table 3)

The total PAH content varied by two orders of magnitude between sediments, from about 250 to about 25000 ng g^{-1} . The individual PAH concentrations in the various sediments were strongly correlated ($r > 0.91$). The proportions of the various PAHs and the fact that the variation coefficients between sediments are always inferior to 30% indicate that the PAH of all sediments are mainly of pyrolytic origin (see the discussion). The concentrations of some PAH (Phe, Flu, Pyr,

BaA, Chrys, BaP and DahA) in Arès, Argiles, and Dunkerque sediments exceeded the ERL (Effect Range Low) levels defined by Long et al. [31].

The levels of Cu and Zn surpassed the ERL in Bidassoa, Dunkerque and Arcachon sediments, as did the Cd concentration in Dunkerque sediment (Table 3). Judging by the criteria in Long et al. [31], the sludge from the port of Dunkerque was the most polluted sediment, as the ERL level was exceeded for all of the components for which an ERL value exists. The next most contaminated sediments were Arès and Argiles (70 and 60% of compounds exceeding ERL, respectively), followed by Bidassoa sediment, and by sludge from Arcachon (20% of compounds exceeding ERL).

Contaminants in elutriate (Table 4)

The PAH concentrations in elutriates obtained from fresh sediment were correlated ($r = 0.91$) with those in the sediment (cf. Table 3), but they also depended on the levels of suspended particulate matter in the elutriates (cf. Table 1) – the ratio of elutriate PAHs to sediment PAHs was correlated with SPM levels ($r = 0.71$). The PAH levels in elutriates of freeze-dried sediment were only half as high as in those from fresh sediment, and they did not depend on levels of suspended particles ($r = 0.09$), but the respective PAH concentrations in the two sediment treatments were correlated ($r = 0.98$). Heavy metal concentrations were determined only in the elutriates obtained from fresh sediment. As in the case of PAHs from fresh sediment, the concentrations of Cd and Zn depended on the level of SPM ($r = 0.74$ and $r = 0.85$, respectively), but the ratio of elutriate Cu to sediment Cu was unrelated to SPM levels ($r = 0.01$).

Embryotoxicity (Table 5)

All of the fresh sediments except for that from Ile aux Oiseaux had a toxic effect on the oyster embryos. Dunkerque sludge was the most toxic, with an effective concentration of 0.2 g l^{-1} , and Adour-1 was the least toxic, with an EC₂₀ of 4.9 g l^{-1} . The toxicity of the elutriates, equally expressed in g l^{-1} , was about two orders of magnitude lower, with most of the elutriates being non-toxic at the tested concentrations.

The freeze-dried sediments had greater effects than the fresh ones, and the sludge from the port of Dunkerque with an EC₂₀ of 0.01 g l^{-1} was about two orders of magnitude more toxic than any of the others. The elutriates were also more toxic than those of fresh sediment, but one to four orders of magnitude less toxic than the whole sediment.

There was a significant correlation between the EC20 of fresh and of freeze-dried whole sediments ($r = 0.72$), but there was no correlation between the toxicity of their elutriates ($r = 0.14$).

Relationship between the characteristics of the sediments, and their biological effects

The relationship between the physico-chemical characteristics and the toxicity of whole sediments was examined by principal components analysis (Fig. 2). Axis 1 basically represented the contamination of the sediment by PAHs and heavy metals, as well as the biological effects (EC20), and axis 2 represented the physical characteristics of the sediment (water, silt and organic carbon content). There was no significant correlation between the latter parameters and the toxicity, whereas a significant correlation existed between the EC20 of fresh sediment and the levels of metals and PAH ($r = -0.67$ in both cases). The relationship was very similar in the case of freeze-dried sediments, but the correlation was not significant ($r < -0.51$ for metals and $r = -0.35$ for PAH).

A look at the relationship between the EC20 of fresh sediment (cf. Table 4) and the number of components having concentrations that exceed the ERL values determined by Long et al. (cf. Table 3) equally showed that the toxicity of the whole sediments depended mainly on the degree of their contamination by PAHs and heavy metals (Fig. 3).

A PCA for the elutriates obtained from fresh sediments produced very different results (results not show), showing that their toxicity depended solely on the concentrations of NH_4 ($r = -0.96$) and DOC ($r = -0.94$), and not on the degree of contamination by pollutants ($r < 0.28$). A PCA for the elutriates of freeze-dried sediment was not conducted, due to the lack of chemical data.

DISCUSSION

Physical and chemical characteristics

The grain size and carbon content levels in the ten sediments employed in this study are quite typical of ports and of estuarine and coastal sites [32]. The PAH are of pyrolytic origin in all of the samples, since the ratios of Phe:An, Fluo:Pyr and BeP:BaP are always inferior to 10, 1, and 2, respectively (cf Table 3; [33]).

The high variability in ammonia concentrations in the elutriates is similar to that found by van den Hurck [34], and the levels are one to three orders of magnitude lower than those found in the pore water of coastal sediments [35]. The levels of suspended particulate matter were similar to those usually found in the coastal environment [36]; by themselves, these turbidity levels are generally beneficial to oyster larvae [37]. The elutriation procedure therefore reproduces relationships that may exist between SPM and contaminants in the natural environment (e.g.

adsorption processes), but the relationship between resuspension of particles and quantity of contaminants entering the water column needs to be studied.

Toxicity

The higher level of toxicity of whole sediment, as compared to elutriate, agrees with the results obtained by Chapman & Fink [38] and by Geffard et al. [20] in freeze-dried sediments. The fact that the sediment from Ile aux Oiseaux proved to be innocuous demonstrates that sediment particles by themselves have no adverse (e.g. mechanical) effects on embryos of *C. gigas*, in contrast to sea urchin gametes, which are sensitive to such particles [18]. The toxicity of sediments to oyster embryos should therefore be due to the effects of pollutants presumably adsorbed to the sediment particles, which act upon the fertilized eggs and the blastula stage ("phase of emergence" of Galtsoff [39]) before the embryos become capable of swimming, a hypothesis which is planned to be verified in future experiments.

Freeze-drying

The higher toxicity of freeze-dried sediment in comparison to fresh sediment confirms the observation of Beiras & His [40], who were nevertheless unable to explain the phenomenon. In the present work, the chemical data (Table 1) show that freeze-drying always leads to increased levels of dissolved organic carbon (DOC), and that in most cases it also increases the levels of particulate organic carbon (POC) and ammonia (NH₄). DOC may increase the adsorption and the bioavailability of contaminants [41], but DOC may also be constituted by other (unidentified) organic toxicants. Therefore, even though the elutriates of freeze-dried sediments have lower PAH levels than those of fresh sediment (Table 3), freeze-drying and subsequent remoistening of the sediment may increase the bioavailability of the PAHs (e.g. by transformation from the adsorbed state to the dissolved state), and thus result in higher toxicity. Ammonia is itself a toxic compound, and even if its concentrations did not exceed the toxicity threshold in most of the elutriates, the increase in concentration consequent to freeze-drying may have given rise to synergic effects with other pollutants.

Relationship between chemical load and biological effects

Principal components analysis (PCA) showed that the toxicity of fresh whole sediment to *C. gigas* embryos was significantly linked to contaminant levels, and not to the sediment's content of water, fine particles, or organic carbon. Therefore, the oyster embryo bioassay is more appropriate for the assessment of the biological effects of sediment contamination than tests with various

benthic species whose performance depends on the characteristics of the sediment, such as *Americamysis bahia* (growth correlated with the fraction of fine particles; [42]), *Chironomus tentans* (survival depends on the quantity and quality of organic matter; [43]), the amphipod *Rhepoxynius abronius* (used very commonly in bioassays, although its rate of survival decreases with increasing levels of fine particles); [44]), and the Microtox test (which is very rapid, but also overestimates the toxicity of sediments rich in fine particles; [45]).

In the case of freeze-dried whole sediment (Fig. 2), the biological effects are related to the concentrations of contaminants, but the relationship is not significant. However, the toxicity of freeze-dried sediment is greater (lower EC20), and the EC20 values are significantly correlated to those of fresh sediment. This indicates that even though studies on the toxicity of freeze-dried sediment may have limited value from an ecological or environmental point of view, they allow to infer the probable toxicity of the fresh sediment.

In the elutriates obtained from fresh sediments, PCA showed that the toxicity depended solely on the concentrations of ammonia and DOC, even though the ammonia concentrations exceeded the toxicity threshold (EC20) of 200 $\mu\text{mol l}^{-1}$ or 2.8 mg l^{-1} (Geffard unpublished) in only two cases. Ammonia is sometimes the principal contaminant in studies on sediment quality [35], and oyster embryos are much more sensitive to this compound than most benthic species (e.g. the EC50 is 78.7 mg l^{-1} in the amphipod *Rhepoxynius abronius*) [46]. Oyster embryos are therefore inadequate for testing the toxicity of sediment pore water, which usually has ammonia levels beyond their toxicity threshold.

Comparison with Sediment Quality Guidelines

Our study indicates that an assessment of the biological quality of sediment is only valid when the sediment used is fresh, and only the biological results obtained with this treatment will be compared to sediment quality guidelines. The relationship between the contamination levels and the biological quality of sediments has been investigated by Long et al. [31] who defined the "potential toxicity" of sediments (Effects Range-Low, ERL, and Effects Range-Median, ERM); toxicity to amphipods (such as *Rhepoxynius abrotinus*) is rare at concentrations below ERL, occasional at concentrations between ERL and ERM, and frequent at concentrations above ERM. These guidelines are derived from a large database of concentrations associated with biological effects, and they are currently applied in monitoring [31, 46]. In the present study, the "potential toxicity" of the sediments (number of compounds exceeding ERL; see Table 2) is correlated to the actual toxicity to oyster embryos (Fig. 3); similar results have been obtained by MacDonald et al. at sea urchins [47] in a test of the spermotoxicity and embryotoxicity of pore water on sea urchins.

The oyster embryo bioassay therefore yields similar results on contaminated sediments as the amphipod test, but with the advantage of providing results within one day (instead of 10 days in *Rhepoxynius abronius*).

Sediment quality guidelines are, however, limited by the possible presence of unidentified pollutants, or by differences in pollutant bioavailability; this is illustrated by the relatively high toxicity of Nivelles sediment (Table 5), in which none of the quantified compounds exceeded the ERL. It is indeed impossible to account for each and every pollutants in sediment (and much less for each of the degradation products, which are sometimes even more toxic). Despite their undeniable use for the identification of pollutants and for the classification of impacted locations, they cannot obviate the need for bioassays with live organisms, but merely complement these.

Conclusions

Oyster embryos and larvae, which are among the marine organisms most sensitive to pollution [48], can be used to evaluate the possible toxicity of sediments to benthic organisms, as well as the effects in the water column when sediments are resuspended by turbulence or anthropogenic activities. In the case of tests of fresh whole sediment, the oyster embryo bioassay is equal or superior to other tests with regard to sensitivity, rapidity and cost.

In the case of the sediments used in the present study, however, this oyster embryo bioassay is not quite sensitive enough to assess the possible toxicity of the sediments upon their resuspension in the water column. Such an assessment would require more sensitive bioassays, e.g. the analysis of larval growth rates, of contaminant bioaccumulation in larvae, or of the levels of biomarkers such as metallothionein in the larvae, but studies of this type are more onerous [48, 49].

In studies with whole sediment, freeze-drying leads to increased toxicity of the samples. As the increase in toxicity is proportional to the toxicity of the fresh sediment, freeze-dried sediments can be used in comparative classifications of the potential toxicity of different sediments, but it must be kept in mind that the results cannot be extrapolated to *in situ* situation.

Based on the results of the present study, we intend to use three of the ten sediments for further investigations into the bioaccumulation of sediment-associated contaminants: Arés (contaminated by PAH), Bidassoa (contaminated by metals) and Dunkerque (contaminated by both).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. Coynel and Dr. H. Etcheber (University of Bordeaux) for conducting the determinations of organic carbon, C. Ledu (IFREMER La Tremblade) for supplying the mature oysters, and Dr. J.F. Chiffolleau (IFREMER Nantes), Dr C. Amiard-Triquet and A. Geffard (University of Nantes, ISOMer, SMAB) for the determinations of metals.

REFERENCES

1. Livett EA. 1988. Geochemical monitoring of atmospheric heavy metal pollution : theory and applications. *Adv Ecol Res* 18:65-177.
2. Luoma SN, Ho KT. 1993. Appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. In *Handbook of Ecotoxicology*, 1, 193-226, P. Calows (ed.), Blackwell, Oxford.
3. Stebbing ARD, Akesson B, Calabrese A, Gentile JH, Jensen A, Lloyd R. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions du Conseil International Permanent pour l'Exploitation de la Mer* 179:322-332.
4. Chapman PM, Morgan JD. 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull Environm Contam Toxicol* 31:438-444.
5. ASTM, 1992. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods (includes annexes on procedures for following organisms : *Ampelisca abdita*, *Eohaustorius estuarius*, *Grandidierella japonica*, *Leptocheirus plumulosus* and *Rhepoxinius abronius*). In. ASTM, 1993, Annual Book of Standards, 11.04, E1367-92. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia,
6. Eertman RHM, Groenink-van Emstede M, Sandde B. 1993. The effects of the polycyclic aromatic hydrocarbons fluoranthene and benzo(a)pyrene on the mussel *Mytilus edulis*, the amphipod *Bathyporeia sarsi* and larva of the oyster, *Crassostrea gigas*. BEON-Efecten, DGW-NIOO, 50p.
7. Carr RS, Williams JW, Fragata CTB. 1989. Development and evaluation of a novel marine sediment pore water toxicity test with polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environ Toxicol Chem* 8:533-543.
8. Dave G, Nilsson E. 1994. Sediment toxicity in the Kattegat and Skagerrak. *J Aquat Ecosys Health* 3:193-206.
9. Carr RS, Chapman DC. 1992. Comparison of solid-phase and pore-water approaches for assessing the quality of marine environment. *Chem Ecol* 7:19-30.
10. Lawrence G. 1999. EC20 determinations for toxicity tests in aquatic risk assessment. *SETAC Europe News* 10:15-16.
11. Chapman PM, Swartz RC, Roddie B, Phelps HL, van den Hurk P, Butler R. 1992. An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 91:253-264.
12. Dinnel PA, Pagano GG, Oshida PS. 1988. A sea urchin test system for marine environmental monitoring. *Echinoderm Biology*, Burke RD, Mladenov PV, Lambeet P, Parsley RL, eds, Balkema, Rotterdam, ISBN 90 6191 7557, 611-619.
13. Meador JP, Ross BD, Dinnel PA, Piquelle SJ. 1990. An analysis of the relationship between a sand-dollar embryo elutriate assay and sediment contaminants from stations in an urban embayment of Puget Sound, Washington. *Mar Environ Res* 30:251-272.
14. Miller BS, Pirie DJ, Redshaw CJ. 2000. An assessment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. *Mar Pollut Bull* 40(22),22-36.

15. His E, Heyvang I, Geffard O, de Montaudouin X. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res* 33:1706-1718.
16. Woelke CE. 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. Washington Dept. of Fisheries, Tech. Rep. 9, 1-93.
17. Cardwell RD, Woelke CE, Carr MI, Sanborn EW. 1976. Sediment and elutriate toxicity to oyster larvae. In *Proceedings of the Special Conference on Dredging and its environmental effects*, Krenkel PA, Harrison J, Burdick JC, III, eds., New York : American Society of Civil Engineers.
18. Carr RS, Chapman DC. 1995. Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests-extraction, storage, and handling techniques. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:69-77.
19. Carr RS, Montagna PA, Biedenbach JM, Kalke R, Kenneticutt MC, Hooten R, Cripe G. 2000. Impact of storm-water outfalls on sediment quality in Corpus Christi Bay, Texas, USA. *Environ Toxicol Chem* 19(3):561-574.
20. Geffard O, Budzinski H, Augagneur S, Seaman MNL, His E. 2001. Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environ Toxicol Chem* 20(7):1605-1611.
21. Melzian BD. 1990. Toxicity assessment of dredged materials: Acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In: *Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities*, Alzieu C, Gallenne B, eds., 49-64, Goubault Imprimeur, Nantes, France.
22. Calabrese A, Davis HC. 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea gigas*. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory (Woods Hole)* 131:427-453.
23. Abril G, Nogueira M, Etcheber H, Cabeçadas G, Lemaire E, Brogueira MJ. Behaviour of organic carbon in nine contrasting European estuaries. *Estuarine Coastal and Shelf Science* (in press).
24. Budzinski H, Papineau A, Baumard P, Garrigues P. 1995. Extraction assistée par chauffage microondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *C R Acad Sci Paris , 321, série IIb*, 69-76.
25. Aminot A, Chaussepied M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu Marin. CNEXO, BNDO/Documentation Brest, 395 pp.
26. Danielsson LG, Magnusson B, Westerlund S, Zhang K. 1982. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Anal Chim Acta* 144:183-188.
27. His E, Seaman MNL, Beiras R. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Res* 31:351-355.
28. Sokal RR, Rohlf FJ. 1981. *Biometry*. Freeman WH, San Francisco, CA, USA.
29. Vindimian E, Robaut C, Fillion G. 1983. A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *J Appl Biochem* 5:261-268.
30. Hamilton MA, Russo RC, Thurston RV. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environ Sci Technol* 11:714-719.
31. Long ER, MacDonald DD, Smith SL, Calder FD. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ Management* 19:81-97.

32. Byrne PA, Ohalloran J. 1999. Aspects of assaying sediment toxicity in Irish estuarine ecosystems. *Mar Pollut Bull* 39:97-105.
33. Baumard P, Budzinski H, Garrigues P. 1998. PAHs in Arcachon Bay, France: Origin and Biomonitoring with Caged Organisms. *Mar Pollut Bull* 36(8):577-586.
34. Van der Hurk P. 1994. Effect of natural sediment properties on test results in bioassays with oyster larvae (*Crassostrea gigas*) on sediment elutriates. *J Aquat Ecosys Health* 3:185-191.
35. Ankley GT, Katko A, Arthur JW. 1990. Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the Lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environ Toxicol Chem* 9:313-322.
36. Fernandes MB, Sicre MA, Boireau A, Tronczynski J. 1997. Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) Distributions in the Seine River and its Estuary. *Mar Pollut Bull* 34:857-867.
37. Seaman MNL, His E, Keskin M, Reins T. 1991. Influence of turbulence and turbidity on growth and survival of laboratory-reared bivalve larvae. ICES, C.M. 1991 / K:56.
38. Chapman PM, Fink R. 1984. Effects of Puget Sound Sediments and their elutriates on the life cycle of *Capitella capitata*. *Bull environ Contam Toxicol* 33:451-459.
39. Galtsoff PS. 1964. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *U. S. Fish and Wildlife Service, Fishery Bulletin* 64, 480p.
40. Beiras R, His E. 1995. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Mar Pollut Bull* 30:47-49.
41. Borgmann U. 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquat Ecosys Health & Management* 3:277-289.
42. Cripe GM, Carr RS, Foss SS, Harris PS, Stanley RS. 2000. Effects of whole sediment from Corpus Christy Bay on survival, growth and reproduction of the mysid *Americamysis bahia* (formerly *Mysidopsis bahia*). *Bull Environ Contam Toxicol* 64(3):426-433.
43. Lacey R, Watzin MC, McIntosh AW. 1999. Sediment organic matter content as a confounding factor in toxicity tests with *Chironomus tentans*. *Environ Toxicol Chem* 18(2):231-236.
44. DeWitt TH, Ditsworth GR, Swartz RC. 1988. Effects of natural sediment features on survival of the phoxocephalid amphipod, *Rhepoxynius abronius*. *Mar Environ Res* 25:99-124.
45. Ringwood AH, de Lorenzo ME, Ross PE, Holland AF. 1997. Interpretation of Microtox solid-phase toxicity tests: the effects of sediment composition. *Environ Toxicol Chem* 6:1135-1141.
46. Kohn NP, Word JQ, Niyogi DK, Ross LT, Dillon T, Moore DW. 1994. Acute toxicity of ammonia to four species of marine amphipods. *Mar Env Res* 38:1-15.
47. MacDonald DD, Car RS, Calder FD, Long ER, Ingersoll CG. 1996. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology* 5:253-278.
48. His E, Beiras R, Seaman MNL. 1999. The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv Mar Biol* 37:1-178.
49. Geffard A, Geffard O, Amiard-Triquet C, His E, Amiard JC. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment. *Mar Ecol Prog Ser* (in press).

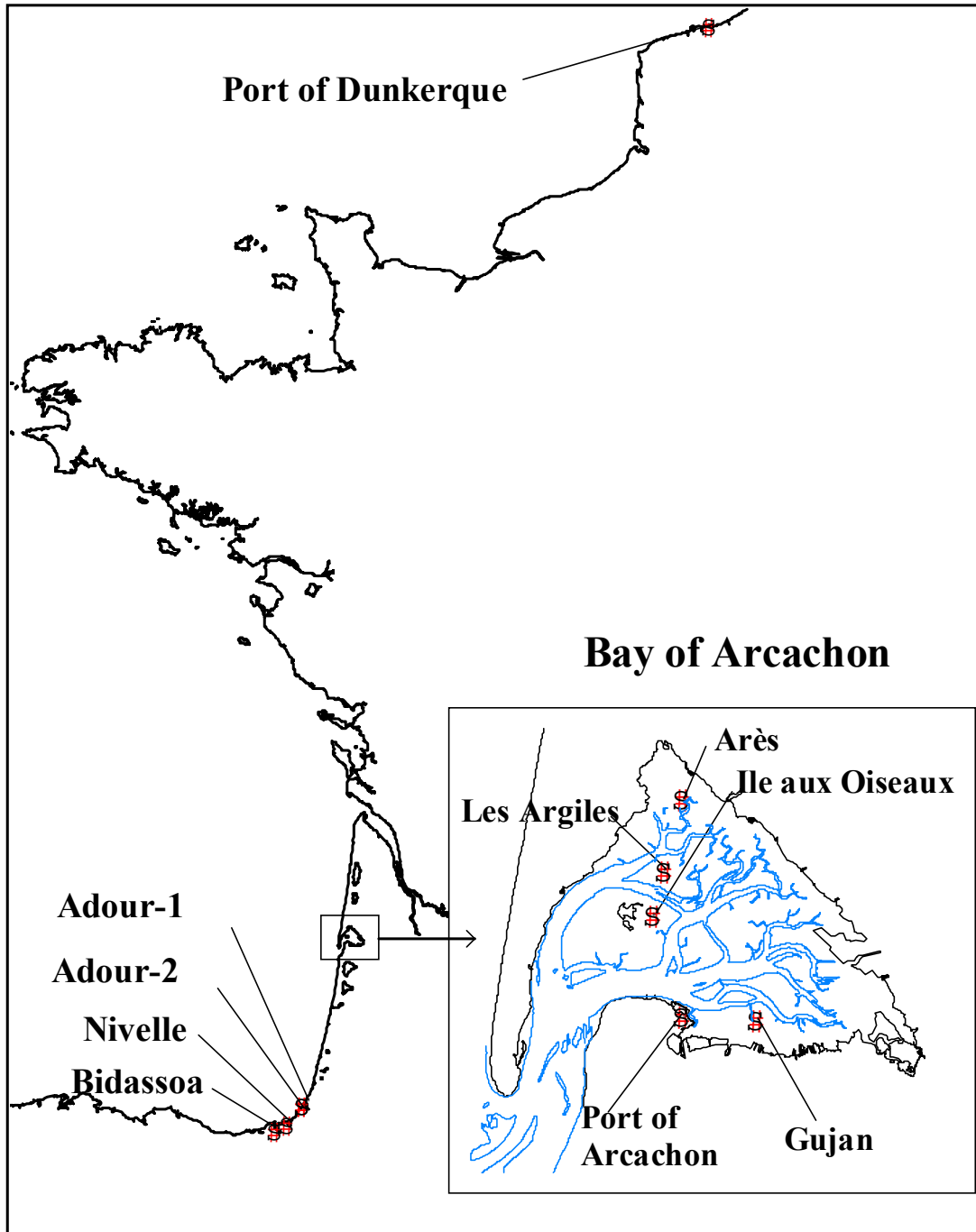


Figure1: Atlantic coast of France. Sampling stations.

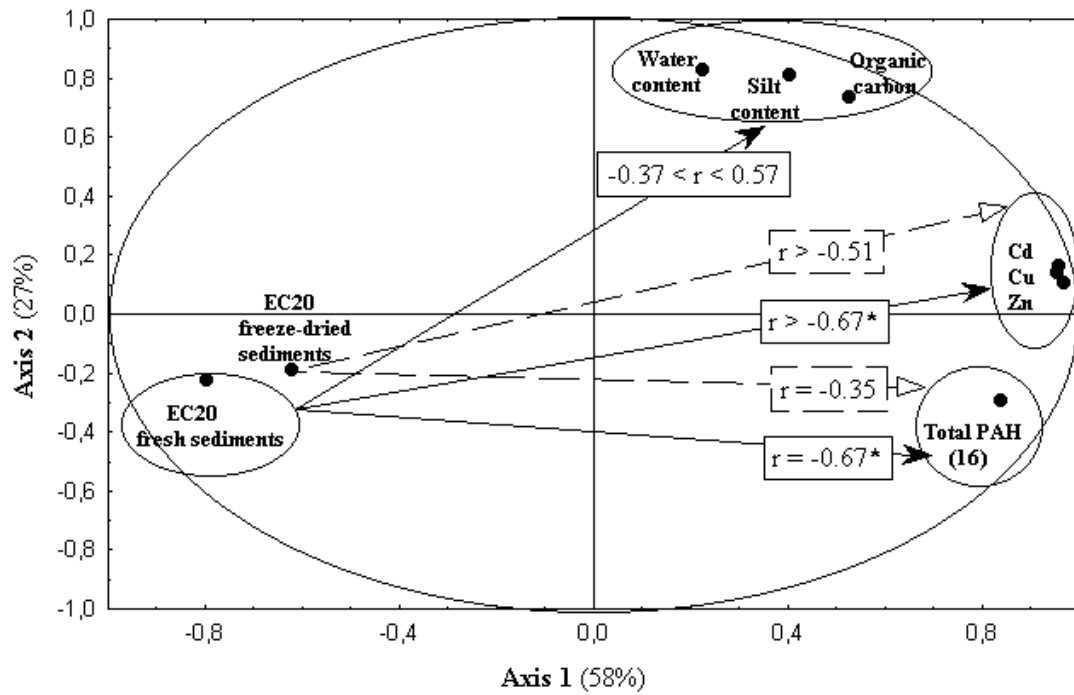


Figure 2 : Results of principal components analysis for fresh and freeze-dried sediments. * factors are significantly correlated.

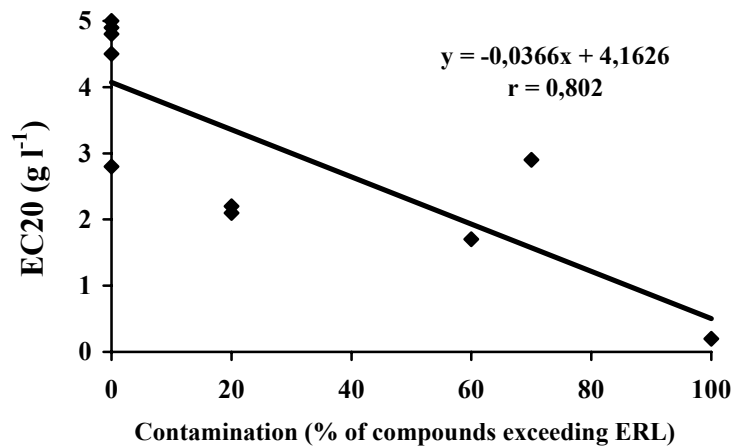


Figure 3 : Relationship between biological effects (EC20) and the percentages, for each sediment, of contaminants that have concentrations levels higher than ERL.

Table 1: Performances of the quality control

		Cd ng l ⁻¹	Cu µg l ⁻¹	Zn µg l ⁻¹	Pb µg l ⁻¹
Blank	Conc.	0.33	0.009	0.06	0.005
	S.D.	0.04	0.001	0.006	0.001
CASS-3	Certified conc.	30	0.517	1.24	0.012
	S.D.	5	0.06	0.25	0.004
	This study	31	0.539	1.4	0.019
	S.D.	3	0.02	0.2	0.008

Table 2 : Physical and chemical characteristics of the tested sediments and elutriates. Silt = grain size fraction <63µm; * = toxic concentrations of ammonia (>200 µmol l⁻¹).

Samples	Whole sediments			Elutriates of fresh sediment			
	Water content (%)	Silt content (%)	Organic carbon content (%)	Dissolved organic carbon (mg l ⁻¹)	Particulate organic carbon (mg l ⁻¹)	Suspended particulate matter (mg l ⁻¹)	Ammonia (NH ₄) (µmol l ⁻¹)
Adour-1	57.5	89.6	3.2	16.2	11.9	188	296*
Adour-2	51.3	51.1	2.7	6.6	5.9	67	156
Arès	57.8	54.8	1.5	6.4	8.9	115	19
Argiles	64.8	67.4	2.2	5.2	8.8	118	2
Bidassoa	61.5	75.7	4.0	6.2	10.4	163	13
	61.5	87.0	3.7	11.6	1.5	14	488*
Port of Dunkerque							
Gujan	49.1	52.3	1.5	5.0	3.8	55	66
Nivelle	55.3	69.0	3.2	5.0	6.8	120	41
Ile aux Oiseaux	60.4	75.2	2.1	6.6	3.7	51	1
Port of Arcachon	76.0	91.3	4.1	6.5	2.8	46	2

Samples	Elutriates of freeze-dried sediment			
	Dissolved organic carbon (mg l ⁻¹)	Particulate organic carbon (mg l ⁻¹)	Suspended particulate matter (mg l ⁻¹)	Ammonia (NH ₄) (µmol l ⁻¹)
Adour-1	37.6	6.7	58	175
Adour-2	18.1	5.6	46	112
Arès	27.4	19.2	170	56
Argiles	29.8	13.7	134	62
Bidassoa	28.5	12.2	98	135
	31.6	3.4	18	212*
Port of Dunkerque				
Gujan	28.4	5.5	34	113
Nivelle	19.1	10.3	64	177
Ile aux Oiseaux	16.8	5.1	36	17
Port of Arcachon	26.4	6.0	34	100

Table 3: Concentrations (in ng g⁻¹ dry weight) of PAH and of heavy metals in the sediments tested. Compounds for which Long et al, (1995) provide effect ranges are underlined; * = value exceeds ER-L (Effect Range Low); ** = value exceeds ER-M (Effect Range Medium). The last two lines give the concentration of individual PAH relative to the sum of the concentration of all the PAHs. The result is the mean and the coefficient of variation between sediments.

Samples	Polycyclic aromatic hydrocarbons								
	<u>Phe</u>	An	Fluo	Pyr	BaA	<u>Triph</u> + <u>Chrys</u>	<u>BbF</u> + <u>BkF</u> + <u>BjF</u>	BeP	BaP
Adour-1	37	4	70	77	27	44	68	30	31
Adour-2	221	29	374	311	195	246	474	181	259
Arès	*890	199	*1,917	*1,480	*777	*853	1,478	502	*803
Argiles	*402	78	*930	*697	*377	*444	739	260	*413
Bidassoa	99	10	157	136	65	124	208	79	81
Port of Dunkerque	*1,331	356	*2,681	**2,629	**2,080	*2,257	4,516	1,678	**2,251
Gujan	99	19	363	297	160	148	362	122	205
Nivelle	47	8	102	88	57	66	115	41	59
Ile aux Oiseaux	153	30	365	316	162	171	287	104	168
Port of Arcachon	117	28	403	369	183	239	477	179	248
Relative concentration (%)	6.8	1.3	14.9	13.1	7.3	8.6	15.8	5.9	8.2
C.V. (%)	24	26	19	13	13	12	13	12	15

Samples	Polycyclic aromatic hydrocarbons					Heavy metals			% of values exceeding ERL
	Per	IP	BPer	DahA	Σ PAH	Cd	Cu	Zn	
Adour-1	45	26	41	5	505	0.56	30.2	141	141
Adour-2	108	219	198	45	2,860	0.47	21.5	149	149
Arès	205	633	515,	*115	10,373	0.25	8.5	81	81
Argiles	118	272	253	59	5,048	0.28	7.8	78	78
Bidassoa	28	92	85	8	1,179	1.10	76.4*	*307	*307
Port of Dunkerque	613	2,087	1,765	**379	24,630	*1.85	136.8*	**568	**568
Gujan	60	179	134	21	2,175	0.25	6.9	77	77
Nivelle	22	45	40	8	705	0.30	25.7	117	117
Ile aux Oiseaux	49	123	101	14	2,050	0.22	7.6	73	73
Port of Arcachon	90	249	185	24	2,798	0.65	41.6*	*197	*197
Relative concentration (%)	2.8	7.2	6.1	1.1	100,0				
C.V. (%)	22	17	16	29					

Table 4: Concentrations (in $\mu\text{g l}^{-1}$) of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and heavy metals in the tested elutriates (n.d. = not determined).

Samples	Elutriates of fresh sediment				Elutriates of freeze-dried sediment
	PAH	Cd	Cu	Zn	PAH
Adour-1	0.3	n.d.	n.d.	n.d.	0.2
Adour-2	0.3	0.05	6.7	7.7	0.2
Arès	2.3	0.04	1.7	13.5	1.5
Argiles	1.0	0.04	2.1	10.4	0.6
Bidassoa	0.3	0.13	18.0	36.0	0.2
Port of Dunkerque	0.6	0.03	1.5	8.5	0.5
Gujan	0.7	0.03	5.7	9.0	0.2
Nivelle	0.2	0.03	10.5	9.6	0.1
Ile aux Oiseaux	0.2	0.02	0.6	5.4	0.1
Port of Arcachon	0.5	0.02	0.9	8.3	0.2

Table 5: Toxicity (effective concentrations, EC20, in g l^{-1}) of whole sediments and elutriates to oyster larvae (no tox. = no toxicity observed).

Samples	Fresh sediment		Freeze-dried sediment	
	Whole sediment	Elutriate	Whole sediment	Elutriate
Adour-1	4.9 ± 0.2	107 ± 4	1.4 ± 0.2	84 ± 4
Adour-2	4.8 ± 0.2	no tox.	2.9 ± 0.4	201 ± 31
Arès	2.9 ± 0.3	no tox.	1.8 ± 0.1	114 ± 7
Argiles	1.7 ± 0.3	no tox.	1.4 ± 0.2	34 ± 7.7
Bidassoa	2.1 ± 0.1	322 ± 13	0.9 ± 0.1	33 ± 2.5
Port of Dunkerque	0.2 ± 0.03	110 ± 6	0.1 ± 0.01	106 ± 13
Gujan	4.5 ± 0.1	no tox.	0.8 ± 0.05	8.6 ± 1.3
Nivelle	2.8 ± 0.1	no tox.	1.4 ± 0.3	138 ± 26
Ile aux Oiseaux	no tox.	no tox.	no tox.	no tox.
Port of Arcachon	2.1 ± 0.2	no tox.	0.3 ± 0.03	246 ± 20

Note n°2 :

Etude du mode d'action du sédiment contact vis à vis des embryons de
Crassostrea gigas au cours du test d'embryotoxicité

Des œufs fécondés d'huître *Crassostrea gigas* ont été exposés à différentes concentrations de sédiment contact, obtenus à partir du sédiment d'Arès, de la Bidassoa et de Dunkerque, soit pendant les 7 premières heures ou pendant la totalité du développement embryonnaire (24 h). Les 7 premières heures d'embryogenèse correspondent à la période durant laquelle les organismes sont en contact direct avec le sédiment, ils deviennent ensuite pélagiques.

Les anomalies larvaires observées sont similaires pour les deux périodes d'expositions, montrant ainsi que l'impact des sédiments sur les embryons a lieu principalement lors du contact direct entre les organismes et le sédiment. Les effets observés reflètent donc bien la qualité du sédiment.

Ces résultats confirment le choix de l'embryon de *C. gigas* pour les études sur la qualité des sédiments.

Introduction

Les sédiments côtiers, estuariens et portuaires sont les réservoirs ultimes pour de nombreux xénobiotiques, constituant un danger pour tous les organismes vivants. Aujourd'hui les autorités américaines estiment que 10 % de leurs estuaires et baies sont suffisamment contaminés pour avoir des effets néfastes sur les espèces vivants, mais également sur la santé des personnes qui consomment les poissons et crustacés présents dans ces milieux (McCauley *et al.*, 2000 ; Long, 2000). L'évaluation de la qualité biologique des milieux aquatiques et en particulier de leur phase sédimentaire est devenue une priorité pour de nombreux pays.

Des tests biologiques, plus ou moins standardisés, ont été développés pour évaluer la toxicité des sédiments. Ils utilisent différentes espèces comme les amphipodes (Chapman, 1990 ; ASTM, 1992 ; Matthiessen *et al.*, 1998), les polychètes (Carr *et al.*, 1989 ; Matthiessen *et al.*, 1998), les bivalves adultes (Eertman *et al.*, 1993 ; Burgess & Morrison, 1994) ou au stade d'œuf fécondé : test d'embryotoxicité (Chapman et Morgan, 1993 ; Meador *et al.*, 1990 ; Miller *et al.*, 2000). Ce dernier, reconnu pour sa grande sensibilité (His *et al.*, 1999a), a principalement été utilisé avec des extraits sédimentaires (eau interstitielle, éluat), puis il a été adapté au sédiment contact avec lequel il s'est révélé très sensible (Quiniou *et al.*, 1997 ; His *et al.*, 1999b ; Publications n°2 et 4). Ce test consiste à exposer des œufs fécondés directement à différentes concentrations de sédiments décantés. Durant les 7 premières heures du test, le développement embryonnaire se déroule au fond des récipients expérimentaux, en contact direct avec le sédiment, une fois le stade blastula atteint (Galstoff, 1964), les embryons deviennent ciliés, quittent le fond (phase d'émergence) et nagent dans la colonne d'eau où ils resteront, pendant les 17 dernières heures, jusqu'au stade de larve D.

But de l'étude

Le but de cette étude était d'identifier la période du développement embryonnaire au cours de laquelle la contamination de l'organisme, responsable des effets observés, se produit. Elle peut se faire soit lors du contact entre les organismes et le sédiment, soit pendant leur période de vie pélagique à la suite de la phase d'émergence ou les deux périodes.

Des expériences ont donc été conduites afin de déterminer cette période d'action du sédiment total sur le stade embryo-larvaire de *C. gigas*, à l'aide de trois sédiments types, sélectionnés au cours d'une précédente étude (Publication n°4). Les sédiments ont été lyophilisés avant leur utilisation dans la présente étude.

Des œufs fécondés de *Crassostrea gigas* ont été exposés à différentes concentrations de sédiment contact, comprises entre 0 et 5 g/l. Dix réplicats ont été réalisés par concentration et pour chaque sédiment. Une fois placés dans chacun des récipients expérimentaux, les œufs fécondés ont été mis à incuber à $24 \pm 1^\circ\text{C}$. Après 7 heures d'exposition (stade blastula atteint), la colonne d'eau a été siphonnée dans 5 des 10 réplicats, les embryons ont été récupérés et replacés dans de l'EMF pour les 17 dernières heures supplémentaires qui permettent d'atteindre le stade de larve D. De l'EMF a été replacée dans les pots, afin de pouvoir estimer le taux de récupération des embryons.

Au bout de 24 h dans tous les cas, les larves D sont tuées par adjonction de formol et le pourcentage d'anomalies larvaires est déterminé pour chaque lot.

Résultats et discussion (Figure V-1).

Pour le sédiment d'Arès et de la Bidassoa, la totalité des embryons a été récupérée, au bout de la première phase de l'exposition (7 heures). A l'inverse, pour le sédiment de Dunkerque et aux concentrations de 2,5 et 5 g l⁻¹, seul 10 % des embryons placés initialement ont pu être replacés en EMF. A ces concentrations (2.5 et 5 g l⁻¹), la toxicité est telle que 90 % des embryons n'ont pas atteint le stade blastula. Nous avons tenu compte de ces résultats pour évaluer les pourcentages d'anomalies au bout des 24 heures.

Avec le sédiment d'Arès et de Dunkerque, les effets biologiques se produisent uniquement pendant la période de contact direct avec le sédiment (7 premières heures), avant le passage dans la colonne d'eau (phase d'émergence). A l'inverse, avec le sédiment de la Bidassoa, aux concentrations de 2,5 et 5 g l⁻¹, si le maximum d'effets est obtenu la encore pendant les 7 premières heures, il semble qu'une action délétère se poursuive lorsque les individus ont gagné la colonne d'eau.

Au cours du test avec le sédiment contact, les effets toxiques résultent principalement du contact direct des embryons avec le sédiment pendant les 7 premières heures de leur développement. Il existe donc un transfert des contaminants sédimentaires vers les embryons dès le début de leur développement.

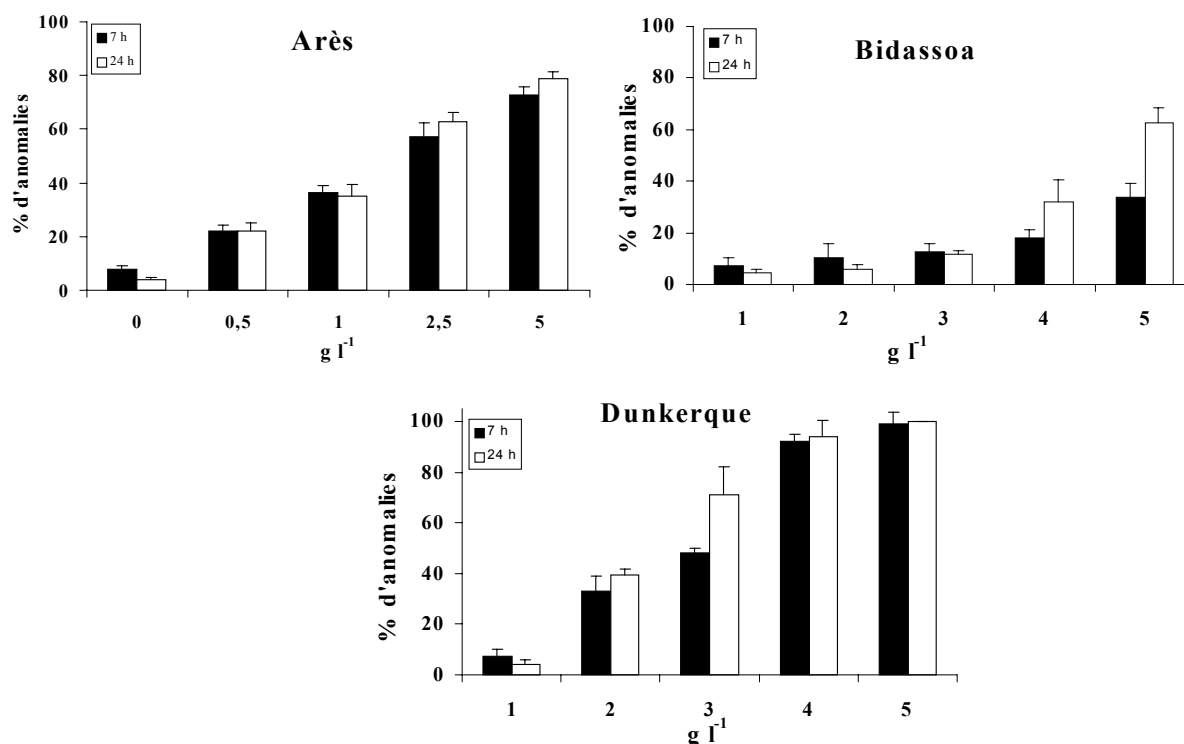


Figure V-1 : Pourcentages d'anomalies larvaires observés chez les larves *Crassostrea gigas*, après l'exposition d'œufs fécondés pendant les 7 premières heures (histogrammes noirs) ou la totalité (histogrammes blancs) de leur développement embryonnaire, en présence de différentes concentrations de sédiments contacts lyophilisés d'Arès, de la Bidassoa ou de Dunkerques.

Des résultats identiques ont été observés par Pavicic *et al.* (1994) qui ont montré que les embryons de la moule *Mytilus galloprovincialis* accumulent les métaux dès les premières heures de leur développement embryonnaire. A l'inverse, Ringwood (1993) a montré qu'au cours du développement embryonnaire du bivalve *Isognomon californicum*, aucune accumulation métallique n'est observée pendant les 6 premières heures, jusqu'au stade d'émergence (blastula-gastrula). Cette différence a été attribuée à la présence chez *I. californicum* d'une membrane de fécondation qui rend les œufs imperméables aux métaux jusqu'à leur phase d'émergence où elle disparaît. Ni les œufs fécondés de *C. gigas*, ni ceux de *M. galloprovincialis* ne possèdent de membrane de fécondation, ce qui constitue un critère supplémentaire de choix pour l'utilisation de ces deux bivalves dans les bioessais.

En conclusion, lors du test avec le sédiment contact, la contamination des embryons se fait essentiellement pendant leur contact direct avec le sédiment. Les effets observés reflètent donc bien la biodisponibilité des xénobiotiques sédimentaires et par suite la qualité du sédiment.

Par ailleurs, les élutriats sédimentaires permettent d'évaluer les effets de la remise en suspension des sédiments, lors des opérations de dragage par exemple. Or certains auteurs (Long *et al.*, 1990, en particulier), préparent les élutriats par agitation et simple décantation : le sédiment reste donc au fond des récipients expérimentaux, là où décantent ensuite les œufs fécondés comme lors de nos expériences. Comme le montre la présente étude, les résultats concernent donc d'avantage les effets du sédiment lui-même que ceux de l'élutriat. Pour évaluer les effets de ces derniers, comme nous le suggérons dans cette étude (Chapitre II, § II.1.2), il faut séparer le sédiment décanté de l'eau surnageante qui correspond bien à l'élutriat.

Chapitre VI : Choix du mode de conservation des sédiments

Ce chapitre traite de la conservation des sédiments, il comporte deux publications.

- 1- Effects of storage method and duration on the toxicity of marine sediments to embryos of oysters *Crassostrea gigas*. (Publication n°5).
- 2- Bioavailability and toxicity of sediment-bound chemicals in a tidal estuary. (Publication n°6).

L'objectif d'un test biologique est de déterminer la toxicité des sédiments de façon la plus réaliste possible sur le plan environnemental. Une des principales limites est la modification des caractéristiques physico-chimiques des sédiments lors de leur prélèvement, transport et stockage, pouvant entraîner un changement de la forme physico-chimique des xénobiotiques et par conséquent de leur biodisponibilité et de leur toxicité.

Le test d'embryotoxicité chez l'huître *Crassostrea gigas* a été sélectionné pour sa simplicité, rapidité et sensibilité. Toutefois, dans l'objectif de le standardiser, il est indispensable de connaître l'impact du stockage des sédiments sur ce test.

La première étude (Publication n°5) concerne les effets de trois modes (4°C, la congélation et la lyophilisation) et quatre périodes (10, 20, 60 et 120 jours) de conservation sur la toxicité des trois sédiments modèles (Arès, Bidassoa et Dunkerque) vis à vis des embryons de *Crassostrea gigas*. La congélation et la lyophilisation augmentent de façon considérable la toxicité des sédiments contacts et des élutriats. La durée de stockage n'affecte principalement que la toxicité des élutriats obtenus à l'aide des sédiments conservés à 4°C.

Des recommandations sur le mode de la conservation des sédiments sont données en fonction des objectifs.

La lyophilisation exacerbe la toxicité des sédiments, mais stabilise également leur qualité au cours du temps. Ce mode de conservation a été utilisé pour mettre en évidence des variations saisonnières de la mobilité des métaux et la toxicité du sédiment du Cheyzin (Gironde) au cours de l'année 1997 (Publication n°6).

Publication n°5 :

**Effects of Storage Method and Duration on the Toxicity of Marine Sediments
to embryos of oysters *Crassostrea gigas***

O. Geffard, E. His, H. Budzinski, JF. Chiffolleau, A. Coynel, H. Etcheber

Aujourd'hui, de nombreux tests biologiques existent pour déterminer la qualité des sédiments. L'objectif de ces tests est d'estimer la toxicité *in situ* des sédiments, cependant une des principales limites est la modification géochimique du sédiment lors de son échantillonnage, sa manipulation et sa conservation.

Les effets du stockage sur la toxicité des sédiments vis à vis des embryons et des larves de *Crassostrea gigas* ont été étudiés. Trois modes de conservation (frais, congelé et lyophilisé) et quatre périodes (10, 20, 60 et 120 jours) ont été comparés, ceci pour trois sédiments (l'un contaminé par les métaux, un second par les HAP et le dernier par les deux types de polluants). Dans chaque cas, la toxicité du sédiment a été évaluée à l'aide du sédiment contact et de l'élutriat.

La congélation et la lyophilisation augmentent de façon considérable la toxicité du sédiment contact et de l'élutriat. Pour les élutriats, cette augmentation s'accompagne de teneurs plus fortes en carbone organique dissous, en ammoniac et en HAP par rapport à celles observées dans les élutriats obtenus à l'aide des sédiments frais, après 10 jours de stockage.

La durée de stockage affecte seulement la toxicité des élutriats obtenus à partir des sédiments conservés à 4°C. Leur toxicité augmente avec la durée de stockage et est corrélée à leur teneur en ammoniac.

Mots clés : sédiment, toxicité, test embryo-larvaire, *C.gigas*, méthode et durée de conservation.

Soumise à *Marine Pollution Bulletin*

**Effects of Storage Method and Duration on the Toxicity of Marine Sediments
to embryos of oysters *Crassostrea gigas*.**

Geffard O^{1*}, His E¹, Budzinski H², Chiffoleau JF³, Coynel A⁴, Etcheber H⁴

¹ IFREMER, DEL/PC, Station d'Arcachon, Quai Silhouette, 33120 Arcachon, France

² Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie des Systèmes Naturels, Université de Bordeaux 1, 33405 Talence, France

³ IFREMER DEL/PC, Centre de Nantes, 44311 Nantes, France

⁴ Laboratoire de Géologie et d'Océanographie, Université de Bordeaux 1, 33405
Talence, France

Abstract

Several bioassays are used to determine the biological quality of sediments. However, although the final objective of bioassays should be to estimate *in situ* toxicity of sediments, this objective is not currently achieved in the marine environment, one of the main limitations of sediment toxicity tests being the disruption of sediment geochemistry during sampling, handling and preservation.

In the present study, the storage effects on the estimation of marine sediment toxicity to oysters *Crassostrea gigas* embryos and larvae were investigated. We compared three storage methods (fresh, frozen and freeze-dried), and four storage periods (10, 20, 60 and 120 days) for three different sediment types respectively contaminated by heavy metals, by polycyclic aromatic hydrocarbons and by both pollutants. The toxicity was assessed using whole sediment and elutriate treatments.

Freezing and freeze-drying considerably increased the toxicity of whole sediments and elutriates as compared to the toxicity obtained with fresh sediments. Concerning the elutriates, the toxicity found with frozen and freeze-dried sediments was correlated with DOC, ammonia and PAH contents. However, the toxicity of fresh sediments kept at 4° C increased with increasing duration of storage and was also correlated to the level contents of ammonia in the elutriates.

Key words: sediment, toxicity, embryo-larval test, *C.gigas*, method and duration of storage

* : Corresponding author

Tel : 33 5 56 83 85 60

Fax : 33 5 56 83 89 80

Email : ogeffard@ifremer.fr

Introduction

Traditionnellement, les sédiments contaminés ont été évalués dans le cadre de projets de dragage et de mise en décharge. Après les années 1980, les études chimiques ont été étendues à de nombreuses estuaires et zones côtières et ont révélé plusieurs zones hautement contaminées qui pourraient constituer une menace pour la santé environnementale. L'analyse chimique peut fournir une estimation des niveaux de contamination des sédiments, mais sa qualité biologique ne peut être évaluée qu'en utilisant des bioessais (Stebbing *et al.*, 1980 ; Chapman et Long, 1983). Actuellement, plusieurs essais biologiques existent pour déterminer la toxicité des sédiments (Chapman et Morgan, 1983 ; Carr *et al.*, 1989 ; Chapman, 1990 ; Matthiessen *et al.*, 1998), utilisant différents organismes tels que des amphipodes, des polychètes et des adultes ou embryons de bivalves. Parmi ces tests, l'essai bio-embryonnaire de l'huître *Crassostrea gigas* est reconnu comme l'un des plus sensibles (Taylor, 1978, 1981a, 1987b ; Stebbing *et al.*, 1980 ; His *et al.*, 1999 ; McPherson & Chapman, 2000). Initialement utilisé par Woelke (1972) pour évaluer les effluents industriels, il a été adapté pour déterminer la qualité biologique des sédiments (Chapman et Morgan, 1983 ; Meador *et al.*, 1990 ; Geffard *et al.*, 2001a).

L'objectif final d'un test biologique doit être d'estimer la toxicité *in situ* des sédiments, mais l'une des principales limitations des bioessais en laboratoire est la perturbation de la géochimie des sédiments lors de l'échantillonnage, du traitement et de la préservation (Lamberson *et al.*, 1992).

La méthode recommandée pour le stockage est généralement de conserver les sédiments pendant 2 semaines ou moins à 4°C dans le noir (ASTM, 1994) ; cependant, cette recommandation n'est pas basée sur des considérations biologiques, mais résulte d'un accord supposant que les modifications de la nature géochimique des sédiments doivent être minimisées dans ces conditions (Thompson *et al.*, 1980 ; DeFoe et Ankley, 1998). Rarement, la durée de stockage des sédiments utilisés dans des tests de toxicité est spécifiée, allant de quelques jours (Swartz *et al.*, 1979 ; Burton, 1992 ; ASTM, 1992 ; Magnusson *et al.*, 1996) à plusieurs années (Burgess *et al.*, 1993). Quelques auteurs ont étudié les effets de la méthode et de la durée de stockage sur la toxicité des sédiments naturels contaminés ou enrichis (Schuytema *et al.*, 1989 ; Dave et Nilsson, 1996 ; Moore *et al.*, 1995 ; DeFoe et Ankley, 1998 ; Beiras *et al.*, 1998 ; Norton *et al.*, 1999). Parmi ces études, il n'est pas facile de trouver une caractéristique claire sur les effets de la méthode et de la durée de stockage sur la toxicité des sédiments. Certains auteurs ont trouvé que la toxicité des sédiments diminuait, ou qu'elle augmentait (Phelps et Warner, 1990 ; Dillon *et al.*, 1994), ou qu'elle ne changeait pas, ou qu'elle était imprévisible (Thompson *et al.*, 1980 ; Becker et Ginn, 1995). Cependant, peu d'études identifient l'origine des variations de la qualité des sédiments en fonction de la méthode et de la durée de stockage.

The objective of the present study is to expand the current knowledge by determining the effects of storage method and duration on the results of the *Crassostrea gigas* embryo-larval bioassay. Three characteristic sediments were selected, as defined by Geffard *et al.* (2001b) : two from coastal zones (Arès and Bidassoa) contaminated by PAHs and heavy metals respectively and a port sludge from Dunkerque that is contaminated by both pollutants.

We assessed the effects of three storage methods (fresh, frozen, freeze-dried) and four storage periods (10, 20, 60, and 120 days) on the toxicity of either the bulk sediments and the elutriates. The first ones gave the best idea of the risk for benthic organisms and the latter allows to evaluate the toxicity of sedimentary contaminants released into the seawater column when sediments are resuspended.

Materials and Methods

Sediment : sampling and conservation

Three sediments were collected on the 7th to 9th of February 2000, two from coastal locations (Arès and Bidassoa, Atlantic Coast, South of France) and one from the port of Dunkerque (Atlantic Coast, North of France). In the case of coastal areas, superficial sediments (oxic fraction, 1st cm) were scraped using a plastic blade and placed immediately in a plastic box. The port sludge was collected with a stainless steel Van-veen grab. The fresh sediments were wet sieved (< 2 mm) to discard the debris and homogenised. Then, to assess the effects of the mode of preservation on sediment toxicity, the sediments were kept in a refrigerator (at 4°C in the dark), frozen (-20°C) and or freeze-dried for 10, 20, 60 and 120 days before the assays.

Systematically, toxicity, grain size distribution, particulate organic carbon (POC), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metals were determined in the sediments; toxicity, dissolved organic carbon (DOC), ammonia (NH₄⁺), PAHs and metals and grain size distribution of the suspended particulate matter (SPM) were also measured in the elutriates.

Sediment treatment

Two sediment treatments were used: whole sediment and elutriate. The whole sediment was prepared by resuspending separately fresh, frozen and freeze-dried sediment in filtered (0.2 µm) seawater (FSW) of 33 salinity. Sediment suspensions of 0 (control), 0.5, 1, 2.5 and 5 g/l were prepared in 500 ml flasks, shaken for 10 s and 30 ml of suspension were transferred into the test vessels (see below). To avoid any mechanical effects, the sediments were allowed to settle for 2 h before adding the biological material (Geffard *et al.*, 2001b).

Elutriates were prepared according to a modification of the method described by Melzian (1990): fresh, frozen or remoistened freeze-dried sediment were mechanically shaken (multi-wirst shaker, 500 rpm) in FSW at a volume ratio of 1:4 (sediment/water) for 8 h, and allowed to settle for another 8 h. Elutriates were then obtained by collecting the supernatants. An aliquot of each elutriate was diluted with FSW to the following concentrations: 0 (control), 1, 5, 10, 25, 50 and 100 % and was used to bioassays. A second aliquot of the elutriate was put into an acid-washed polypropylene bottle and then acidified for metals analyses, and a third one into a cleaned glass bottle for dissolved organic carbon (DOC), NH_4^+ , PAH analysis and for the SPM granulometric distribution determination.

The elutriates were used without any filtration, as explained above, except in the first series of tests (after 10 days of storage) designed partly to compare the contaminant levels and the toxicity of unfiltered and filtered elutriates obtained with fresh and freeze-dried sediments.

Physical and chemical analysis

Sediments :

Water contents were measured by the wet-dry weight method (water weight/dry weight \times 100). The particle size distribution was determined by diffractometry (Malvern laser). The particulate organic carbon (POC) contents were evaluated by the method described in Abril *et al.* (in press). The sediments were decarbonated by acidification with HCl (2N) and were kept dried until analysis. The OC content was determined with a LECO CS 125 analyser.

PAH and metal concentrations in the sediments were determined only at the first preservation time (Day 2). The following PAHs were analysed: phenanthrene (Phe), anthracene (An), fluoranthene (Fluo), pyrene (Pyr), benz(a)anthracene (BaA), triphenylene + chrysene (Triph + Chrys), benzo(b)fluoranthene + benzo(k)fluoranthene + benzo(j)fluoranthene (BbF + BkF + BjF), benzo(e)pyrene (BeP), benzo(a)pyrene (BaP), perylene (Per), indenol(1,2,3-cd)pyrene (IP), benzo(ghi)perylene (BPer) and the dibenz(a,h)anthracene (DahA). Two grams of freeze-dried sediment were extracted using microwave assisted extraction as described by Budzinski *et al.* (1995) using the dichloromethane (30 ml) as solvent of extraction. Perdeuterated aromatic compounds (perdeuterated phenanthrene, fluoranthene, chrysene, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene and benzo(ghi)perylene perdeuterated) were used as internal standards to determine the PAH concentrations in sediments. They were added prior to the extraction. The conditions of the extraction were 10 min at 30 W. The organic extract was desulphurized using activated copper. It was then purified on a micro-column containing alumina and fractionated on a micro-column

containing silica to collect only the aromatic compounds. Then, aromatic compounds were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

For heavy metals, aliquots of freeze-dried sediment (0.5 g) were placed in acid-washed glass tubes and digested by addition of 5 ml of HNO₃ and 3 ml of HCl (Aminot and Chaussepied, 1983). This process was conducted until dryness and then the residues were resuspended in 10 ml of 1N HCl. In acid solutions, metals were analysed by flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) for copper (Cu) and zinc (Zn), or electrothermal AAS with Zeeman effect (Hitachi Z8200) for cadmium (Cd). The assays were validated using certified sediment (SD-M-2/TM IAEA Monaco).

Elutriates :

The dissolved organic carbon contents were evaluated using the methods described by Abril *et al.* (in press). After filtration on precombusted Whatman GF/F glass fibre filters (porosity 0.7 µm), samples were acidified with ultrapure H₃PO₄ and analysed by high temperature catalytic oxidation (HTCO) method using a Shimadzu TOC 5000 instrument.

The particle size distribution of the SPM was determined by diffractometry. The ammonia concentrations were determined by the method described in Aminot and Chaussepied (1983).

Contaminant levels of elutriates were analysed at each preservation time (2, 15, 60 and 120 days). The same PAH series as those measured in the sediments, (see above) were measured. After adding the perdeuterated aromatic compounds (phenanthrene, fluoranthene, chrysene, benzo(e)pyrene, benzo(a)pyrene and benzo(ghi)perylene perdeuterated) in 100 ml of each elutriates, the PAHs were extracted by a liquid-liquid extraction using dichloromethane as solvent (40 ml). This extraction was carried out three times. The three organic phases were recovered and dried with anhydrous sodium sulfate (Na₂SO₄) that was eliminated by filtration. Then, the extract was fractionated on a micro-column containing silica to collect only the aromatic compounds which were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry.

The trace metals (Cd, Cu and Zn) were preconcentrated using the APDC-DDDC/freon method (Danielsson *et al.*, 1982) and then determined by graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman correction. Quality assurance testing relied on standard reference materials from the National Research Council of Canada (CASS-3).

Bioassays

Adult japanese oysters, *Crassostrea gigas*, were conditioned in hatchery conditions and induced to spawn by thermal stimulation according to standard procedures (His *et al.*, 1997, 1999). Freshly spawned eggs and sperm were mixed in sterile glass beakers with FSW to achieve

fertilization. 15 min after fertilization, volumes corresponding respectively to 1200 and 300 fertilized eggs were transferred with an automatic micropipette having an enlarged tip into sterile 30 ml (1200) or 3 ml (300) polystyrene vials containing respectively the various sediment or elutriate concentrations (5 replicates per treatment). The embryos were incubated for 24 h at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. After the incubation period, buffered formalin was added to each vial and the percentages of abnormalities were determined according to the criteria of His *et al.*, (1997) and technique described by Geffard *et al.* (2001b), by direct observation of 100 randomly selected individuals per vial under an inverted microscope.

Statistical analysis

In order, to test the null hypothesis that the different treatments had no effect on larval development, the percentages of normal larvae at each concentration were compared to the controls using a one-way ANOVA (Sokal and Rohlf, 1981) after conducting Cochran's test for homogeneity of variance. If the data failed this test, an arcsin $P^{1/2}$ transformation was applied to the data; this was sufficient to achieve homogeneity

The concentrations causing 10% inhibition of normal embryogenesis (effective concentrations; EC10) were calculated with a non linear regression analysis Program (Macro Hill version 2), according to Vindimian *et al.* (1983), after Abbot's correction (Hamilton *et al.*, 1977).

Results

Sediment and elutriate characteristics.

Sediments

Physical and chemical characteristics of the sediments are shown in Table 1. The sediment water contents varied from 44 (Dunkerque) to 78 % (Arès). Arès sediment had the lowest heavy metal concentrations and the highest PAH levels. For three of four metals, Bidassoa sediment had the highest concentrations.

The three sediments show an unimodal grain size distribution (Table 2). In all conditions, Dunkerque sediment was more fine-grained than Arès sediment, which was in turn more fine-grained than Bidassoa sediment. The storage mode and duration did not affect the grain size distribution of Arès and Bidassoa sediments, but after freeze-drying, the Dunkerque sediment, the size of particles constituting the principal sediment fraction was higher (22 μm) as compared with fresh or frozen sediments (8 μm).

Arès and Bidassoa sediments had organic carbon contents of 3.5 % (dry weight), whereas the organic carbon levels were 1.2 % (dry weight) in Dunkerque sediment. The different storage methods and durations did not involve any variations of the organic carbon concentrations (data not shown).

Elutriates

Grain size distribution of SPM (Table 3): Suspended particulate matter of the elutriates obtained from fresh sediments show an unimodal grain size distribution. The SPM present in elutriate obtained from Bidassoa sediment was more fine-grained than those of other elutriates. After freezing (except for Dunkerque) and freeze-drying of the sediments, the SPM in the elutriates showed a bimodal grain-size distribution with one lower and one higher than the main modal size observed in the elutriates obtained with the corresponding fresh sediments. The duration of storage did not affect the grain size distribution of the SPM in the elutriates.

DOC concentration (Table 4): In the elutriates obtained from fresh sediments, the DOC levels vary between 7 (Bidassoa) and 17 mg/l (Dunkerque) as compared with those obtained from freeze-dried sediments, where DOC levels vary from 30 (Dunkerque) to 80 mg/l (Bidassoa). The duration of storage did not provide any modifications of the DOC concentrations in the elutriates.

Ammonia (Fig. 1): After the first time of storage, the levels of NH_4^+ were always higher in the elutriates obtained from frozen and freeze-dried sediments than in those from fresh sediments. The lowest ammonia concentrations were observed with Bidassoa and Dunkerque fresh sediments (23 and 26 $\mu\text{mol/l}$ respectively) and the highest with Arès and Bidassoa frozen sediments (396 and 275 $\mu\text{mol/l}$ respectively).

The storage duration affected only the ammonia concentrations of the elutriates obtained from the Arès and Bidassoa sediments kept at 4°C. After a storage time of 120 days, the ammonia level reached 1000 $\mu\text{mol/l}$ in the first case and 1150 $\mu\text{mol/l}$ in the second. The black line in the Fig. 1 represents the NOEC (No Observed Effect Concentration), i.e. the threshold of NH_4^+ toxicity to larvae of *Crassostrea gigas*. The concentrations of NH_4^+ in the elutriates obtained from Arès and Bidassoa fresh sediments (after a storage duration of 20 and 60 days, respectively) were higher than NH_4^+ NOEC level.

PAH concentrations (Fig. 2): The PAH concentrations in the unfiltered elutriates obtained from fresh sediments were higher than those from freeze-dried sediments. Inversely, with Arès and Bidassoa sediments, the PAH concentrations in the filtered elutriates obtained from freeze-dried sediment were higher than those from fresh sediments. The values ranged from 30 to 90 ng/l and from 11 to 46 ng/l, respectively. The filtered elutriates of fresh and freeze-drying Dunkerque sediments presented similar PAH concentrations (111 and 104 ng/l respectively). Generally, the duration of storage did not markedly affect the PAH concentrations in the unfiltered elutriates.

Heavy metal concentrations (Fig. 3): The heavy metal concentrations in the elutriates usually corresponded to those in the whole sediments. Storage methods and durations of the sediments did not strongly affect the elutriate contaminations except in the case the Bidassoa where the Zn concentrations highly decreased when the sediment was stored at -20°C . The lowest metal concentrations were observed in the elutriates of Arès sediments.

There were not significant differences between heavy metal contaminations in the filtered elutriates obtained from fresh and freeze-dried sediments (data not shown).

Sediment and elutriates toxicity (Fig.4)

The mode of sediment storage involved high variations of the sediment toxicity (Fig 4A). After 2 days of storage, the EC10 were significantly lower ($p < 0.0014$) with frozen and freeze-dried sediments than with fresh sediments. The highest percentages of abnormal larvae were obtained with frozen and freeze-dried Dunkerque sediments (EC10 between 0.1 and 0.24 g/l).

Concerning the fresh sediments, the storage duration did not significantly affect the percentage of abnormal larvae ($p = 0.18$). For Arès and Bidassoa sediments, after a storage time of 60 and 120 days at -20°C respectively, the toxicity significantly ($p < 0.0001$) increased (EC10 decreased). Among the freeze-dried sediments, only Bidassoa sediment showed an EC10 significantly lower ($p < 0.0001$) after a storage time of 120 days,

With elutriates (Fig 4B), the storage method represented an important factor. Freezing and freeze-drying significantly ($p < 0.001$) increased the toxicity of elutriates. Filtration did not affect the toxicity of elutriates, the percentage of abnormal larvae remained constant between the filtered and unfiltered elutriates for each sediment.

The preservation duration principally affected the toxicity of elutriates obtained from Arès and Bidassoa sediments kept at 4°C in the dark. The EC10 significantly decreased ($p < 0.0001$) with increasing storage periods, they varied from 97 to 25 % elutriate for Arès and from 95 to 20%

elutriate for Bidassoa. Inversely, biological effects remained relatively constant for elutriates of frozen and freeze-dried sediments, except for Arès freeze-dried sediment, where the toxicity decreased and then increased significantly ($p < 0.0001$) after a duration storage of 60 and 120 days respectively.

Discussion

Oyster embryos and larvae are currently used to assess the biological quality of marine, coastal or estuarine seawater and sediments, because they present several advantages: they withstand a broad range of environmental conditions (temperature 18 to 26°C), salinity from 25 to 35, His *et al.*, 1989) and pH (7 to 8.5, Calabrese and Davis 1966); they have a rapid embryonic development and they are very sensitive to many contaminants (His *et al.*, 1999). They have been recently proposed as a tool in routine monitoring studies on the biological quality of sediments (Geffard *et al.*, 2001a and b). However, although oysters can be kept in mature condition all year long, in fact it is sometimes difficult to get “spawners” from industrial or experimental hatcheries in fall. If sediments are to be assessed for their eventual toxicity, samples must be stored sometimes for a more or less long period.

With the purpose of standardising the embryo-larval bioassay, it is very fundamental to understand the storage impact on the test results. The aim of this study was to determine the best storage method and durations of a sediment with the minimum changing in toxicity to embryos and larvae of the oyster *C. gigas*.

Among the 3 sediments studied, those from Arès and Bidassoa presented a characteristic contamination by PAH and trace metals respectively, with concentrations that exceeded Effects Range-Low values (Concentrations above which biological effects become noticeable) defined by Long *et al.* (1995). The third sediment (Dunkerque) contaminated by both pollutants.

Choice of the best storage method

Freezing and freeze-drying increased the toxicity of the whole sediments and elutriates, as compared with fresh sediments, whatever the type of contaminants of concern PAH, metals or both. These results are in agreement with those of Beiras and His (1995), Beiras *et al.* (1998) and Geffard *et al.* (2001b), who showed that the biological effects were always higher with freeze-dried sediments than with fresh sediments. However, several studies have shown that freezing has minimal impact on the toxicity of a sediment (Carr *et al.*, 1989 ; Norton *et al.*, 1999) or decreases

the bioavailability and toxicity of organic compounds contained in the sediment (Schuytema *et al.*, 1989).

Freezing and freeze-drying did not affect the grain size distribution of the sediments (except for Dunkerque sediment, where the size of particles was higher after the freeze-drying than before, probably due to flocculation of the particles). With elutriates, when these two preservation techniques induced important modifications of the grain-size distribution of the SPM and highly increased the DOC levels as compared with elutriates obtained from fresh sediments. This probably results from the leaching of organic carbon during elutriation of previously frozen sediment. Since many contaminants (in particular organic compounds) may adsorb to organic carbon, consequently these storage methods may increase the level of dissolved contaminant in elutriates and increase their bioavailability and their toxicity to oyster embryos and larvae. The results show that elutriates that had the highest DOC increases, presented also the highest toxicity increases.

Chemical data confirm the latter observation. According to Geffard *et al.* (2001b), the figure 4 shows that the percentages of abnormal larvae remained constants when the elutriates were filtered or not, indicating that toxic effects are exclusively linked to the soluble contaminant fraction. The PAH concentrations in the filtered elutriates are higher with freeze-dried sediments than with fresh sediments (except for Dunkerque, where values are similar). These results show that the freeze-drying of the sediments increases the leaching of PAHs in the elutriates, this partly explaining the toxicity increase. However, the increase of DOC levels in the elutriates may equally reflect the leaching of unmeasured organic compounds that may be highly toxic to oyster embryos.

According to Chien *et al.* (1990), freezing and freeze-drying of sediments involved an increase of the ammonia concentrations in elutriates. Figure 1 shows that in the case of Arès and Bidassoa frozen sediments, the ammonia concentrations in elutriates were higher than the threshold toxicity of this compound to oyster larvae. These results can equally explain the observed toxicity increases.

As reported in Standard Sediment Toxicity Test Guidance (ASTM 1989, 1992), this study confirms that the best storage method of the sediments is in a refrigerator at 4°C in the dark. However, for methodology studies or when PAHs polluted sediments are concerned, freeze-drying, may be used to increase the soluble fraction of organic contaminants in the elutriates, instead of using an organic solvent with the fresh sediments.

Choice of the optimal storage duration.

Except for the elutriates obtained from sediments stored at 4°C, it does not appear clearly that the storage duration of sediments modifies the results of toxicity tests to *C. gigas* embryos and larvae and dramatically change the interpretations of the toxicity test results. Variations do not show marked trends over time. According to the studies of Dave and Nilsson (1996) and DeFoe and Ankley (1998), it can be concluded that toxicity variations are partly explained by the inherent biological variability of the test organism used to evaluate the biological quality of these sediments. The physical and chemical characteristics of sediments and elutriates support this interpretation, because they remained relatively constant from 10 to 120 days.

The biological heterogeneity problem occurs in numerous bioassays, a long-storage period is very useful in ecotoxicological studies, because this allows to test a maximum number of sediment samples with the same biological material (the same batch of mature adults) and to eliminate the biological variability.

For elutriates obtained from Arès and Bidassoa sediments kept at 4°C, the duration storage represents an important factor. The biological effects increase with increasing duration of storage and they are largely linked to the ammonia concentrations in the elutriates. The increase of ammonia in elutriates is presumably due to bacterial degradation of organic matter. Figure 1 shows that the ammonia levels in the elutriates of Arès and Bidassoa fresh sediments, after a storage period of 20 and 60 days respectively, were higher than the NOEC of this compound. The increase of this toxicant is sufficient to explain the observed toxicity increase. Similar observations have been found by Moore *et al.* (1995) who showed that survival and growth decrease in juvenile *Neanthes arenaceodentata* appeared only when the concentrations of ammonia were the highest.

Ammonia is toxic for many marine organisms (Kohn *et al.*, 1994) and has been identified as the main toxic in several studies about sediment biological quality (Ankley *et al.*, 1990 ; Huber *et al.*, 1997 ; Van Sprang and Janssen, 1997).

Recommendations

In light of our results and with the aim of assess the *in situ* hazard of the sediments, we recommend that sediments for use in bioassays should be stored at 4°C. Nevertheless, for methodological studies or to increase the quantity of PAH soluble in the elutriates, we can use the freeze-drying instead of organic solvent.

Concerning the storage duration, even if sediments should be test as soon as possible, our results show that sediments may be stored for up to 120 days. This period is largely sufficient to use

a great number of sediment samples and to induce gonad maturation in the spawners required to carry out the tests.

When elutriates are to be tested to assess the impact of dredging activities for example, it is better to conduct the tests with sediments which have not been kept in storage (4°C) for more than 20 days.

Our results confirm that ammonia can be the main toxic in the studies on the biological quality of the sediments and emphasize the importance of monitoring the elutriates ammonia concentrations in each test.

References :

- Abril, G., Nogueira, M., Etcheber, H., Cabeçadas, G., Lemaire, E. & Brogueira MJ. "Behaviour of organic carbon in nine contrasting European estuaries". *Estuarine Coastal and Shelf Science* (in press).
- Aminot, A. & Chaussepied, M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu Marin. CNEXO, BNDO/Documentation Brest, 395 pp.
- Ankley, G.T., Katko, A. & Arthur, J.W. 1990. Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the Lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **9**, 313-322.
- ASTM, 1989. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. *ASTM*, E 724 -89, *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, PA, 334 351.
- ASTM, 1992. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods (includes annexes on procedures for following organisms : *Ampelisca abdita*, *Eohaustorius estuarius*, *Grandidierella japonica*, *Leptocheirus plumulosus* and *Rhepoxinius abronius*). In . *ASTM*, 1993, Annual Book of Standards, 11.04, E1367-92. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia,
- ASTM, 1994. Standard guide for collection, Storage, Characterization and Manipulation of Sediment for Toxicological Testing. E1391-94, *ASTM Annual Book of Standard ASTM*, Philadelphia, PA.
- Becker, D.S. & Ginn, T.C. 1995. Effects of storage time on toxicity of sediments from Puget Sound, Washington. *Environmental Toxicology and Chemistry* **14**, 829-835.
- Beiras, R. & His, E. 1995. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Marine Pollution Bulletin* **30**, 47-49.
- Beiras, R., His, E. & Seaman, M.N.L. 1998. Effects of storage temperature and duration on toxicity of sediments assessed by *Crassostrea gigas* oyster embryo bioassay. *Environmental Toxicology and Chemistry* **17**(10), 2100-2105.
- Budzinski, H., Papineau, A., Baumard, P. & Garrigues P. 1995. Extraction assistée par chauffage microondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris* , **321**, série Iib, 69-76.
- Burgess, R.M., Schweitzer, K.A., McKinney, R.A. & Phelps, D.K. 1993. Contaminated marine sediment: water column and interstitial toxic effect. *Environmental Toxicology and Chemistry* **12**, 127-138.
- Burton, G.A. 1992. Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, London, 211p.
- Calabrese, A. & Davis, H.C. 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Biol Bull mar biol Lab Woods Hole* **131**, 427-453.

- Carr, R.S., Williams, J.W. & Fragata, C.T.B. 1989. Development and evaluation of a novel marine sediment pore water toxicity test with polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 533-543.
- Chapman, P.M. 1990. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Science of the Total Environment* **97/98**, 815-825.
- Chapman, P.M. & Long, E.R. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin* **14**, 81-84.
- Chapman, P.M. & Morgan, J.D. 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **31**, 438-444.
- Chien, Y.H., Chen, S.S. & Chen, C.G. 1990. Effects of freeze storage and centrifugal force on inorganic nitrogen content in interstitial water of submerged sediment. *J fish Soc Taiwan* **17**(3), 199-206
- Danielsson, L.G., Magnusson, B., Westerlund, S. & Zhang, K. 1982. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Analytica Chimica Acta* **144**, 183-188.
- Dave, G. & Nilsson, E. 1996. Sediment storage: A critical factor in sediment quality assessments. *Development and Progress in Sediment Quality Assessment: Rationale, Challenges, Techniques and Strategies*, pp. 153-163.
- DeFoe, D.L. & Ankley, G.T. 1998. Influence of storage on toxicity of freshwater sediments to benthic macroinvertebrates. *Environmental Pollution* **99**, 123-132.
- Dillon, T.M., Moore, D.W. & Jarvis, S.A. 1994. The effects of storage temperature and time on sediment toxicity. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **27**, 51-53
- Geffard, O., Budzinski, H., Augagneur, S., Seaman, M.N.L. & His, E. 2001a. Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**(7), 1605-1611.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., Seaman, M.N.L. & Garrigues, P. 2001b. Relationships Between Contaminant Levels in Marine Sediments and their Biological Effects upon Embryos of Oysters, *Crassostrea gigas*. *Environmental Toxicology and Chemistry* (submitted paper).
- Hamilton, M.A., Russo, R.C. & Thurston, R.V. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. *Environmental Science & Technology* **11**, 714-719.
- His, E., Robert, R. & Dinet, A. 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Marine Biology* **100**, 455-463.
- His, E., Seaman, M.N.L. & Beiras, R. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Water Research* **31**, 351-355.
- His, E., Beiras, R. & Seaman, M.N.L. 1999. The assessment of marine pollution – Bioassays with bivalve embryos and larvae. *Advances in marine Biology* **37**, 1-178.
- Huber, M., Pelletier, C., Charles, J.B. & Burgess, R.M. 1997. Ammonia tolerance of the bivalve *Mulinia lateralis* sublethal toxicity test. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **59**, 292-297.
- Kohn, N.P., Word, J.Q., Niyogi, D.K., Ross, L.T., Dillon, T. & Moore, D.W. 1994. Acute toxicity of ammonia to four species of marine amphipods. *Marine Environmental Research* **38**, 1-15.
- Lamberson, J.O., Dewitt, T.H. & Swartz, R.C. 1992. Assessment of sediment toxicity to marine benthos. In *Sediment Toxicity Assessment* (G.A. Burton, Jr, ed.), pp. 183-211. Lewis, Boca Raton, U.S.A.
- Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L. & Calder, F.D. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* **19**, 81-97.

- Magnusson, K., Ekelund, R., Dave, G., Granmo, A., Forlin, L., Wennberg, L., Samuelsson, M.O., Berggren, M. & Broström-Lunden, E. 1996. Contamination and correlation with toxicity of sediment samples from the Skagerrak and Kattegat. *Journal of Sea Research* **35**, 223-234.
- Matthiessen, P., Bifield, S., Jarrett, F., Kirby, M.F., Law, R.J., McMinn, W.R., Sheahan, D.A., Thain, J.E. & Whale, G.F. 1998. An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, UK by means of bioassays. *Marine Environmental Research* **45**(1), 1-15.
- McPherson, C.A., Chapman, P.M. 2000. Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. *Mar Pollut Bull* **40**(8), 656-665.
- Meador, J.P., Ross, B.D., Dinnel, P.A. & Piquelle, S.J. 1990. An analysis of the relationship between a sand-dollar embryo elutriate assay and sediment contaminants from stations in an urban embayment of Puget Sound, Washington. *Marine Environmental Research* **30**, 251-272.
- Melzian, B.D. 1990. Toxicity assessment of dredged materials : acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In: *Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities*. (C. Alzieu and B. Gallenne, eds.), 49-64, Goubault Imprimeur, s. a. , Nantes, France.
- Moore, D.W., Dillon, T.M. & Gamble, E.W. 1995. Long-term storage of sediments : implications for sediment toxicity testing. *Environmental Pollution* **89**(2), 147-154.
- Norton, B.L., Lewis, M.A. & Mayer, F.L. 1999. Storage duration and temperature and the acute toxicities of estuarine sediments to *Mysidopsis bahia* and *Leptocheirus plumulosus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **63**, 157-166.
- Phelps, H.L. & Warner, K.A. 1990. Estuarine sediment bioassay with oyster pediveliger larvae (*Crassostrea gigas*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **44**(2), 197-204.
- Schuytema, G.S., Nebeker, A.V., Griffis, W.L. & Miller, C.E. 1989. Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin. *Environmental Toxicology and Chemistry* **8**, 883-891.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1981. *Biometry*. W.H. Freeman, San Francisco, CA, USA.
- Stebbing, A.R.D., Akesson, B., Calabrese, A., Gentile, J.H., Jensen, A. & Lloyd, R. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapp P-v Réuni Cons int Explor Mer* **179**, 322-332.
- Swartz, R.C., Deben, W.A. & Cole, E.A. 1979. A bioassay for the toxicity of sediment to marine macrobenthos. *J Water Pollut Control Fed* **54**, 944-950.
- Taylor, D. 1978. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 5. Copper. Imperial. Chem. Industries. Rapport BL/A/1900, 21p.
- Taylor, D. 1981a. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 13. Zinc. Imperial. Chem. Industries. Rapport BL/A/2143, 25p.
- Taylor, D. 1981b. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 2. Cadmium. Imperial. Chem. Industries. Rapport BL/A/2073, 2^{ème} ed, 46p.
- Thompson, E.A., Luoma, S.N., Cain, D.J. & Johansson, C. 1980. The effects of sample storage on the extraction of Cu, Zn, Fe, Mn and organic material from oxidized estuarine sediments. *Water, Air and Soil Pollution*. **14**, 215-233.
- Van Sprang, P.A. & Janssen, C.R. 1997. Identification and confirmation of ammonia toxicity in contaminated sediments using a modified toxicity identification evaluation approach. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**(12), 2501-2507.
- Vindimian, E., Robaut, C. & Fillion, G. 1983. A method for cooperative and non cooperative binding studies using non linear regression analysis on a microcomputer. *J Appl Biochem* **5**, 261-268.
- Woelke, C.E. 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. Washington Dept. of Fisheries, Tech. Rep. 9, 1-93.

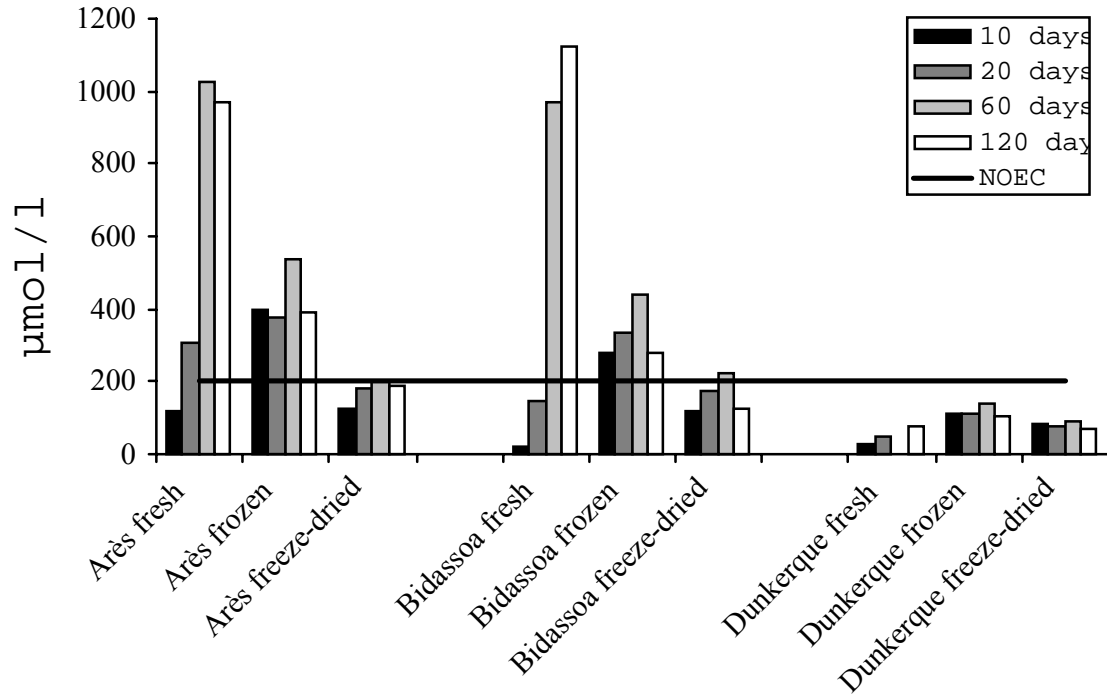


Figure 1 : Ammonia concentrations (NH_4^+ ; $\mu\text{mol/l}$) in the Arès, Bidassoa and Dunkerque sediment elutriates (fresh, frozen and freeze-dried), after a storage period range from 10 to 120 days.

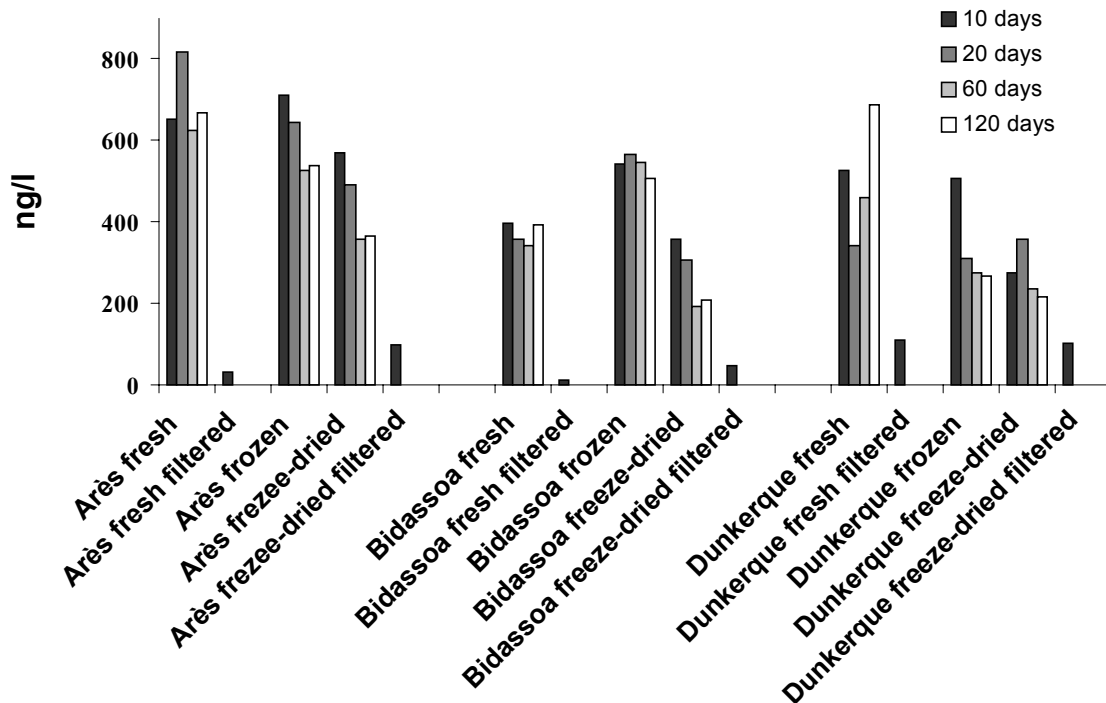


Figure 2 : Concentrations of PAHs (total of 16 compounds ; ng/l) in the unfiltered and filtered elutriates obtained from Arès, Bidassoa and Dunkerque sediments (fresh, frozen and freeze-dried), after a storage period from 10 to 120 days.

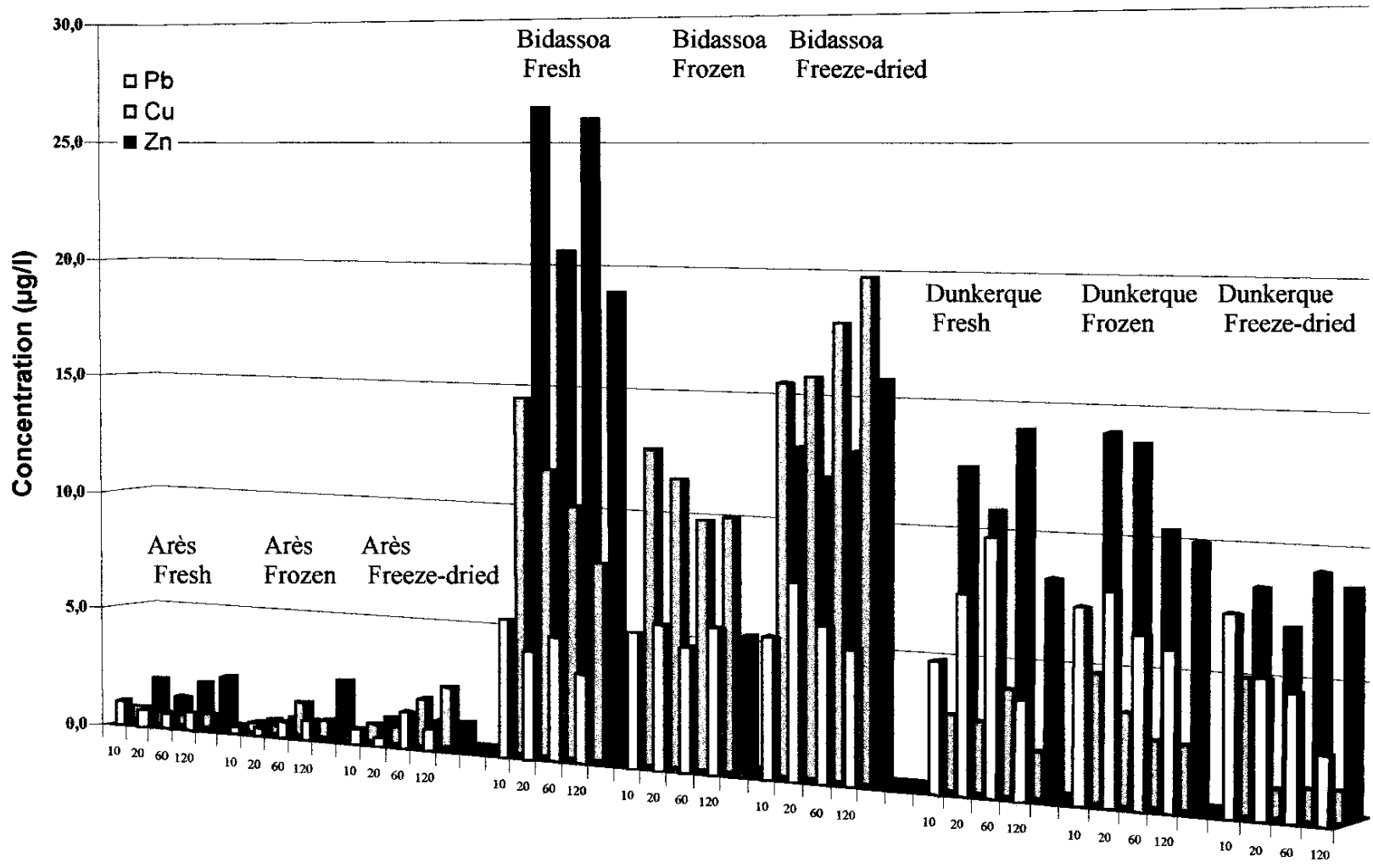


Figure 3 : Concentrations of trace metals (Cd, Cu and Zn µg/l) in the unfiltered elutriates obtained from Arès, Bidassoa and Dunkerque sediments (fresh, frozen and freeze-dried), after a storage period from 10 to 120 days.

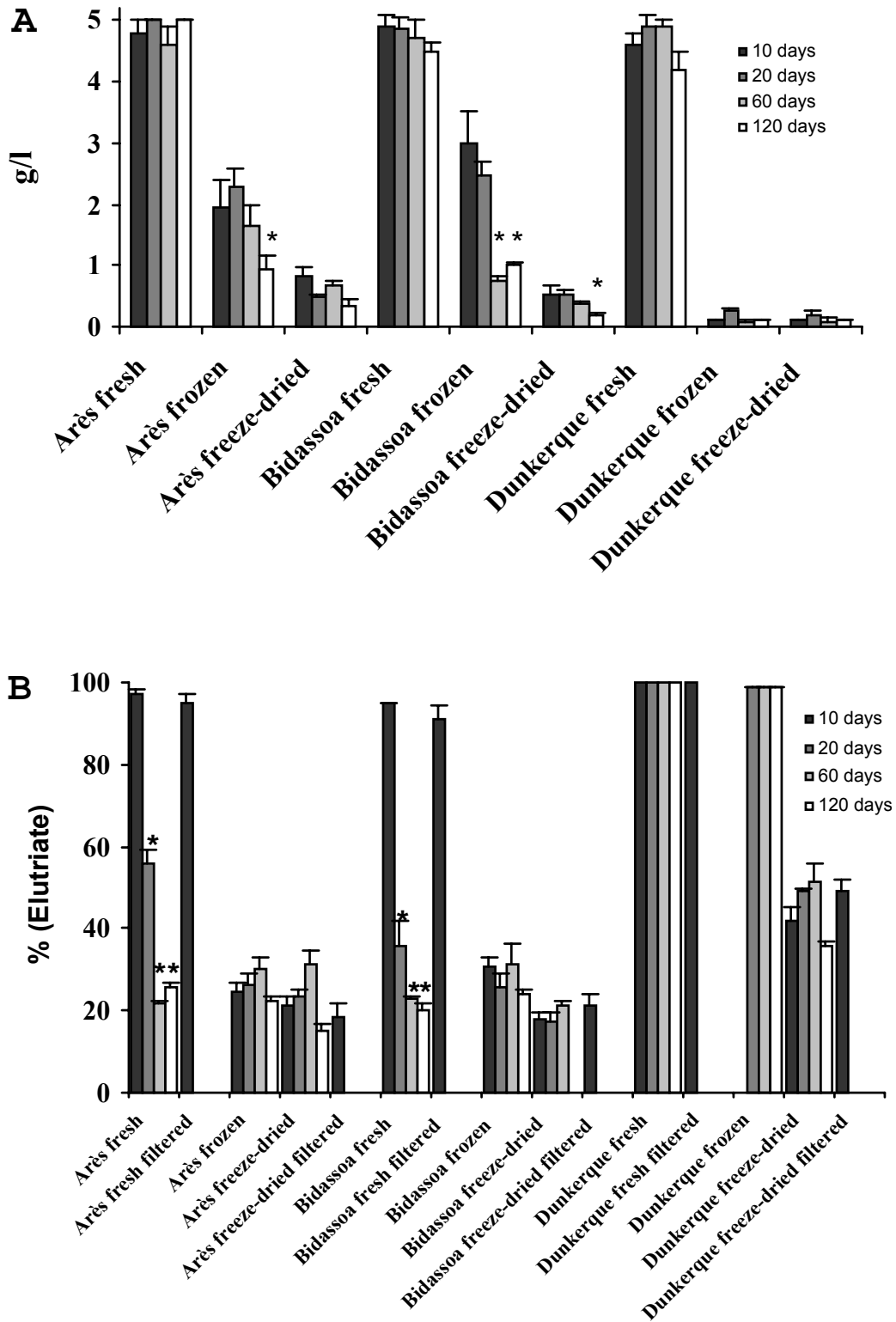


Figure 4 : Toxicity ($EC_{10} \pm S.D.$) of the sediments (A) and of the elutriates (B) for the various storage modes and durations. * : indicates significant variation of toxicity as compared with the toxicity at the beginning of the study (10 days of preservation).

Table 1. Physical and chemical characteristics of the three studied sediments.

	% of water	Cd µg/g	Cu µg/g	Zn µg/g	Pb µg/g	ΣHAP ng/g
Arès	78	0.30	10.7	83	11	4987*
Bidassoa	66	0.93	78.0*	264**	73*	942
Dunkerque	44	0.85	48.3	195*	160**	2992*

* : Values higher than ER-L (Effect Range Low ; Long et al., 1995).** : Values higher than ER-M (Effect Range Medium ; Long et al., 1995). For PAH, * : at least one compound had a concentration higher than the ER-L level.

Table 2 Size (µm) of particles constituting the principal sediment fraction.

	10 Days	20 Days	60 Days	120 Days
Arès fresh	35	30	35	30
Arès frozen	35	30	30	35
Arès freeze-dried	35	35	35	35
Bidassoa fresh	41	41	48	48
Bidassoa frozen	41	41	41	41
Bidassoa freeze-dried	41	41	41	41
Dunkerque fresh	8	8	8	8
Dunkerque frozen	8	8	8	8
Dunkerque freeze-dried	22	22	22	22

Table 3 : Size of particles (µm) constituting the principal fraction of the SPM in the different elutriates. One value : there was only one majority fraction (unimodal distribution) ; Two values : there is two majority fraction (bimodal distribution).

	10 Days	20 Days	60 Days	120 Days
Arès fresh	16.5	19	26	23
Arès frozen	3.1 – 41	4.2 – 41	4.8 – 41	5.7 – 41
Arès freeze-dried	3.6 – 48	3.6 – 41	3.6 – 41	4.2 – 41
Bidassoa fresh	6.6	7.7	9.2	10.4
Bidassoa frozen	2.3 – 41	5.7 – 38	4.2 – 30	6.6 – 41
Bidassoa freeze-dried	1.9 – 41	2.6 – 41	1.7 – 48	4.2 – 41
Dunkerque fresh	6.6	16.5	16.5	12.2
Dunkerque frozen	6.6	9.0	9.0	14.2
Dunkerque freeze-dried	5.6 - 48	7.7 - 163	10.4 - 35	12.2 - 65

Table 4 : Concentrations of dissolved organic carbon (DOC ; mg/l) in the various elutriates.

	10 Days	20 Days	60 Days	120 Days
Arès fresh	9	8	15	13
Arès frozen	41	38	36	41
Arès freeze-dried	77	77	75	94
Bidassoa fresh	7	7	12	12
Bidassoa frozen	50	56	33	52
Bidassoa freeze-dried	80	76	64	69
Dunkerque fresh	17	18	11	19
Dunkerque frozen	21	27	15	23
Dunkerque freeze-dried	30	35	31	35

Publication n°6 :

Bioavailability and Toxicity of Sediment-bound Chemicals in a Tidal Estuary

O. Geffard, A. Geffard, H. Budzinski, C. Crouzet, R. Menasria, C. Amiard-Triquet

La toxicité d'un sédiment de l'estuaire de la Gironde, connu pour sa contamination en Cd, Cu et Zn a été évaluée tous les mois (de Mars à Octobre), utilisant concomitamment des méthodes géochimiques pour déterminer la mobilité des contaminants et des tests biologiques avec des larves d'invertébrés (l'huître *Crassostrea gigas*, l'oursin *Paracentrotus lividus*, le copépode *Tigriopus brevicornis*). Les tests de désorption mettent en évidence une plus grande mobilité du Cd comparé au Cu et Zn. Les concentrations de Cu et Zn dans les sédiments, la quantité de ces métaux disponibles pour le biota et l'écotoxicité des sédiments vis à vis des larves d'invertébrés ont montré des variations temporelles similaires. Des effets biologiques faibles ont été observés au printemps, alors qu'ils sont bien marqués en été et automne. Des corrélations positives ont été montrées entre le taux de mortalité chez *T. brevicornis*, les anomalies chez les larves de *C. gigas* et les quantités de métaux sédimentaires remobilisées à pH 4. A l'inverse, aucune variation temporelle n'a été observée pour les teneurs en HAP totaux dans les sédiments. Cependant, des corrélations négatives ont été observées entre les EC50 déterminées chez les larves d'huître et les teneurs en pérylène dans les sédiments. Les corrélations et les résultats toxicologiques obtenus suggèrent un rôle possible du pérylène, mais surtout des métaux sédimentaires, et en particulier du Cu et du Zn sur les réponses biologiques. Bien qu'ils soient des métaux essentiels, la toxicité du Cu et du Zn sur les organismes marins ne doit pas être négligée.

Mots clés : Biodisponibilité, spéciation chimique, tests d'écotoxicité, hydrocarbures aromatiques polycycliques, métaux sédimentaires

Soumise à *Estuaries*

BIOAVAILABILITY AND TOXICITY OF SEDIMENT-BOUND CHEMICALS IN A TIDAL ESTUARY

GEFFARD O.¹, GEFFARD A.^{2,3}, BUDZINSKI H.^{2,4}, CROUZET C.⁵, MENASRIA R.^{2,6},
AMIARD J.C.^{2,3} & AMIARD-TRIQUET C.^{2,3}

¹IFREMER, Quai Commandant Silhouette, F-33120 Arcachon, Fr.

²CNRS, GDR 1117 Ecotoxicologie et Chimie Marine

³Service d'Ecotoxicologie, ISOMer, SMAB, 2, rue de la Houssinière, BP 92208, F- 44322 Nantes Cedex 3, Fr.

⁴Laboratoire de Physico-toxicochimie des Systèmes Naturels, UPRES A 5472 CNRS, Université de Bordeaux I, F-33
405 Talence, Fr.

⁵BRGM, DR/PCI, F-45060 Orléans Cedex 2, Fr.

⁶Institut Océanographique, 195 rue Saint Jacques, F-75005 Paris, Fr.

Key words : Bioavailability, Chemical speciation, Ecotoxicity tests, Polycyclic aromatic hydrocarbons, Sediment-bound metals

Abstract.- Sediment toxicity has been examined monthly in the Gironde estuary (March to October 1997), France, a site contaminated by trace metals such as Cd, Cu and Zn, using concurrently geochemical procedures to assess mobility of contaminants and ecotoxicity tests with Invertebrate larvae (oyster *Crassostrea gigas*, sea-urchin *Paracentrotus lividus*, copepod *Tigriopus brevicornis*). A higher mobility of Cd compared to Cu and Zn was evidenced through desorption tests. Both the gross concentrations of Cu and Zn in sediments and the quantities of these metals available to biota showed a temporal evolution and changes in the ecotoxicity of sediments to invertebrate larvae were generally observed concomitantly. Low damages were registered in spring and higher ones in summer and fall. Positive correlations were shown between mortality in copepods or abnormalities in oyster larvae and quantities of metals re-mobilized from sediment at pH 4. On the contrary, no clear temporal tendency was shown for total PAH levels in sediments. However, negative correlations were generally shown between calculated EC50 in oyster larvae and perylene levels in the sediments. These correlations and previous toxicological data suggest a possible role of perylene but moreover of sediment-bound metals (secondarily of the perylene), particularly Cu and Zn, in biological responses. Although they are essential metals, the potential toxicity of Cu and Zn to marine life must not be neglected.

INTRODUCTION

The study of metal distribution in aquatic environments reveals that the highest concentrations are usually found in sediment, whether deposited or in suspension. The quantities of metal thus concentrated present a special hazard for organisms particularly for benthic species which interact strongly with the substratum (Vale and Sundby 1998). It is generally recognized that the ecotoxicological significance of a given pollutant input is determined by its physico-chemical forms in the sediment rather than by its accumulation rate in sediments (Kersten and Förstner 1989 ; Amiard 1992 ; Luoma 1995). Trace metals present in aquatic systems may be associated to different geochemical fractions of sediments : adsorbed onto clay minerals, chelated with organic particulate matter, associated with carbonates, adsorbed and/or coprecipitated with Fe and Mn oxyhydroxides or precipitated in the form of sulphides. These forms largely condition mobility and then bioavailability of sediment-bound metals. On the other hand, metals incorporated in the crystalline matrix, do not participate to water chemistry and thus do not represent any hazard to biota (Amiard 1992 and literature cited therein).

In order to assess the fraction of sediment-bound metal readily bioavailable, *in vitro* studies have been proposed to mimic digestive conditions in bivalves (Amiard et al. 1995 ; Ettajani et al. 1996). For Pb, even with 0.1N HCl, desorption is considerably increased in comparison with release observed under physiological conditions reproduced *in vitro* (Amiard et al. 1995). Thus, the biological significance of leaching with HCl solution as concentrated as 1N is highly questionable, even if correlations between extractable Pb and marine bivalves have been shown in some cases (e.g. Luoma and Bryan 1978, Bourgoïn et al. 1991). Although different enzymes or pH induced the desorption of 3 to 24 % of sediment-bound As, the accumulation of this element in the soft tissues of oysters remained low after exposure to contaminated particles (Ettajani et al. 1996).

These results demonstrate that the mobility evidenced even in realistic conditions provides only an assessment of “potential bioavailability”. As mentioned above for sediments, the interactions of soluble metals with intracellular compartments are highly dependent on their chemical forms in the soluble phase (Morrison 1989) on the one hand. On the other hand, aquatic organisms have developed adaptation strategies to limit metal accumulation and toxicity (Mason and Jenkins 1995).

Even if the bioavailability of a trace element is suspected, prediction of an adverse effect is then complicated. According to Luoma (1995), bioavailability may be easier to interpret if a bioassay is included with study of the chemistry of an ecosystem. Sediment bioassays are a relatively new approach to assessing the significance of the high concentrations of toxicants

sequestered in sediments (Hill et al. 1993 ; Luoma 1995 and literature cited by these authors). It is well established that the early life stages of many marine animals are several order of magnitude more sensitive to pollutants than the adults. Thus invertebrate larvae are in widespread use as test biological material (Luoma 1995 ; His et al. 1999a and literature cited therein). Moreover, experiments which investigate the change from pelagic to benthic life, for instance the recruitment of oysters Crassostrea gigas, constitute an interesting link between bioassays and population studies (His et al. 1997).

From a methodological point of view, the storage of sediment devoted to ecotoxicity tests has been a source of discussion (Luoma 1995 ; Beiras and His 1995 ; Beiras et al. 1998). The reproducibility of tests involving larvae of the oyster Crassostrea gigas, the sea-urchin Paracentrotus lividus and the copepod Tigriopus brevicornis (Amiard-Triquet et al. 1998) is fairly good. However, potential seasonal changes in sensitivity are still a topic of discussion and in the framework of a temporal follow-up as designed in the present study, preservation through freeze-drying appeared as the best procedure, allowing to test all the sediment samples against the same biological material. This mode of preservation which tends to increase the toxicity of sediments (Beiras and His 1995) is then conservative from the point of view of environmental assessment.

Important Cd contamination has been observed in the Gironde estuary, France and high levels of Cu and Zn were also present (RNO 1995). Thus it has been chosen as a test site for the comparison of the different methodologies above-mentioned aiming at the determination of sediment toxicity (Amiard et al. 1996 ; Amiard-Triquet et al. 1998). Geochemical studies have provided estimates of Cd mobility particularly with decreasing pHs and increasing salinity, a result in agreement with the relative abundance of exchangeable Cd bound to carbonates shown by sequential extractions. When in vitro assays tended to be more realistic with regard to the digestion process in bivalves, Cd extraction at low pH was lowered but was still important (Amiard-Triquet et al. 1998). Moreover, toxicity of Gironde sediments to larval stages of different marine species brought indirect evidence of the bioavailability of sediment-bound pollutants. Mobility, bioavailability of pollutants as well as significant responses of several biomarkers (malonaldehyde concentration, acetylcholinesterase and catalase activities) suggested a potential environmental hazard in this estuary (Amiard-Triquet et al. 1998). The present work has been designed to enlarge both the period of the study which has covered approximately the whole period of larval recruitment (March to October) and the spectrum of contaminants examined, including Cu and Zn. Aromatic compounds which could contribute to sediment toxicity have also been taken into account, whereas PCBs, organophosphorous and organonitrogenous compounds were not considered since low levels are present in the studied area (Lartiges 1994; Piérard 1995).

MATERIAL AND METHODS

Sediment sampling

Sediments were sampled monthly from March to October 1997 from a site (Le Cheyzin) on the left bank of the Gironde estuary, Fr., 25 km upstream from the mouth of the river. Superficial sediments (oxic fraction, 1st cm) were scraped using a plastic blade and placed immediately in a plastic box which was filled brim-full to eliminate air bubbles. Samples were then transported to the laboratories with icepacks in an isothermic container.

Analysis of Aromatic compounds

Sediments were freeze-dried and then sieved at 2 mm. It (1g) was treated using microwave assisted extraction as described elsewhere (Budzinski et al. 1995 ; Letellier et al. 1997) using the dichloromethane as solvent. The organic extract was desulphurized using activated copper. It was then purified on a micro-column containing alumina and fractionated on a micro-column containing silica in order to collect separately the saturated and aromatic compounds according to a procedure adapted from Behar et al. (1989).

Aromatic fractions were analysed by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using a HP 5890 series II gas chromatograph (splitless injection, purge delay: 1 min and purge flow : 60 ml min⁻¹; injector temperature: 270°C; interface temperature: 290°C; oven temperature: from 50°C (2 min) to 290°C (20 min) at 2°C min⁻¹) coupled to a HP MSD 5972 mass spectrometer (electron impact: 70 eV; voltage: 2000 V; source temperature: 150°C) operated under the SIM (selected ion monitoring) mode using the molecular ions of the compounds being studied at 1.2 scan s⁻¹. A 60 m x 0.25 mm i. d. x 0.1 µm film thickness capillary column, coated with phenyl (5%)-methylpolysiloxane (CPSIL8CB, Chrompack, Les Ulis, France), was used with helium as the carrier gas at a constant flow of 1 ml min⁻¹.

Some coelutions have to be noted between structural isomers: (i) 9-methylphenanthrene coelutes with 1-methylanthracene ; (ii) triphenylene with chrysene; (iii) benzo(b)fluoranthene with benzo(k)fluoranthene and benzo(j) fluoranthene; (iv) dibenz(ah)anthracene with dibenz(ac)anthracene.

Perdeuterated aromatic compounds were used as internal standards for quantitative analyses in each aromatic series. They were added prior to the extraction. The response factors of the PAHs selected for study relative to the perdeuterated PAHs were regularly determined by the use of the Standard Reference Material, SRM 2260 (NIST, Gaithersburg, MD, USA).

In order to test the accuracy of the quantification method, the SRM 2260 was regularly run on the GC/MS system. Moreover, the entire analytical procedure was applied several times to the certified marine sediment, SRM 1941a (NIST, Gaithersburg, MD, USA). The recoveries, for five replicates on SRM 1941a, were between 95 and 103% and the reproducibility of the technique ranged from 5% to 10% depending on the compounds.

Mobility of sediment-bound metals

Sediment samples devoted to desorption tests were stored in the dark at 4°C and used within a week after field expedition. All desorption tests were carried out in triplicate. Each sediment sample (50 mg) was dispersed into buffers (prepared with acetic acid 1 % and adjusted to adequate pHs by adding suprapure ammonia) in order to reach pHs of 4, 5.5 and 7. The length of contact was 2 h at ambient temperature (19-21°C). Then sediments were recovered by centrifugation and rinsed with the buffer at pHs identical to those of the tests.

All the monthly samples devoted to the determination of metals in the residual fraction were frozen as soon as they arrived to the laboratory. After collecting the last sample, chemical extraction was carried out for all the samples at the same time. Metals in the residual phase were determined in triplicate according to the method of Shannon and White (1991).

Metal analyses were carried out in initial sediment samples as well as sediment samples submitted to the different treatments. The percentages of desorption and the percentages in the residual phase were calculated from the concentrations of metals in raw and treated sediments.

Trace metal analysis

Sediment samples were digested according to the recommendations of Charlou and Joanny (1983). In acid solutions thus obtained, metals were quantified by flame (Cu, Zn) or electrothermal (Cd) AAS with Zeeman effect for the correction of background (Hitachi Z 8200). In each monthly series, a standard sediment (SD-MEDPOL-1/TM) was treated identically. Moreover, the analytical method has been validated through international intercalibration exercises. The results of the last published one (Coquery et al. 2000) are shown in Table 1.

Ecotoxicity tests

Sediment samples devoted to ecotoxicity tests were freeze-dried and tested all together at the end of the experiment. Test organisms were larval stages of the copepod Tigriopus brevicornis, the oyster Crassostrea gigas and the sea-urchin Paracentrotus lividus.

Tigriopus brevicornis

Copepods were collected in a relatively un-polluted area (Le Croisic, South of Brittany, Fr.) and cultivated in the laboratory. Tests were carried out in 50 ml crystallising dishes, each containing 20 individuals selected according to their stage of development (Copepodite, 1st to 7th day). Copepods were starved all over the exposure period (7 days). The temperature was 20°C and the photoperiod 12h/12h. Control tests were carried out with reference seawater collected off Roscoff, North of the Brittany, France. Ecotoxicity tests were based upon the use of sediment leachates. Reference seawater (50 ml) was agitated with each tested sediment (50 g) for 20 mn (700 rpm) then water was recovered for testing by using centrifugation (5000 g for 5 mn). Five replicates were made for each sediment from the Gironde estuary (April to October) and for controls, and cumulated mortalities over 7 d were registered. The percentages of mortality were corrected taking into account the lethality in controls (average : 7.8%, SD : 1.36) according to the method proposed by Abbott (In: Hamilton et al. 1977).

Crassostrea gigas and Paracentrotus lividus.

Adults were induced to spawn by thermal stimulation (C. gigas) or by injection of 1 ml of 0.5 M KCl through the peri-oral membrane (P. lividus). The fertilized eggs were exposed to the different treatments 15 minutes after fertilization and were incubated for 24 h at 24 ± 1°C (C. gigas) or 48 h at 21 ± 1°C (P. lividus) in 25 ml transparent polypropylene vessels (600 eggs ; five replicates). After the incubation period, 100 µl of 4 % buffered formalin were added to each vessel, and percentages of abnormalities (unsegmented or malformed embryos and abnormal larvae) were determined by direct observation of 100 individuals (chosen at random from the 600 in each vessel) by means of an Utermöhl inverted microscope, according to His et al. (1997) in C. gigas and Klöckner et al. (1985) in Psammechinus miliaris (for details, see His et al. 1999b)

Two sediment treatments were used : total sediment and unfiltered elutriates. For the first treatment, re-moistened freeze-dried sediment was resuspended in 33 ‰ 0.2 µm filtered sea water (FSW). The following concentrations were tested : 0 (controls) ; 0.5 ; 1 and 2.5g l⁻¹ in FSW. Sediment and FSW were hand-shaken for 10 s and allowed to settle for 1 hour before adding the biological material, to avoid any mechanical effect. Unfiltered elutriates were prepared according to a method modified from Melzian (1990) : 25 ml of re-moistened freeze-dried sediment were mechanically shaken (multi-wirst shaker, 500 rpm) in FSW (100 ml total volume) for 8 h, and allowed to settle for another 8 h. Elutriates were diluted with FSW to the following concentrations : 0 (controls), 1 ; 5 ; 10 ; 25 ; 50 and 100%. Salinity and pH were respectively adjusted to 33 ‰ (with

a mixture of salt and deionised water) and between 7.5 and 8.5 (with pure NaOH solution). These are optimal values for the normal development of bivalve and sea urchin embryos (Calabrese and Davis 1966 in C. gigas; His et al. 1999b in P. lividus).

In order to test the null hypothesis that different treatments had no effect on the larval development, percentages of abnormal larvae at each concentration were compared to controls using a one-level ANOVA (Sokal and Rohlf 1981 ; Underwood 1981). Prior to the ANOVA, Cochran's test for homogeneity of variance was used (Winer 1971). If the data failed this test, arcsin $P^{1/2}$ transformations were applied ; this was sufficient in our study to achieve homogeneity. Whenever the null hypothesis was rejected ($\alpha =$ or > 0.05), the treatments were separated by an a posteriori test, Tukey's HSD procedure due to the number of treatments which was > 3 (Day and Quinn 1989).

According to Krassoï et al. (1996), the NOEC (No Observed Effect Concentration), LOEC (Lowest Observed Effect Concentration) and EC50 (50% Effective Concentration) were determined. The EC50s were calculated after Abbott's correction (Hamilton et al. 1977) using a non linear regression model (Statistica, Statsoft), with the following formula :

$$\text{Effect} = b_0 / (1 + b_1 * \exp(b_2 * \text{Concentration}))$$

RESULTS

Polyaromatic compound content in sediments

The relative importance of individual aromatic compounds is shown in Fig. 1. The standard deviations are not very important which indicates a relatively stable situation all over the period of the field study. A correlation matrix was built to examine the statistic links between the different aromatic compounds considering all the monthly samples. All of them were positively correlated, significantly at the 95% and more often at the 99% level with the exception of perylene which did not show any significant correlation with an other compound. Thus temporal changes in PAH levels were depicted separately for perylene and other compounds (Fig. 2). No clear temporal tendency was evidenced with high values for perylene in March and August and a high value for other PAHs in May.

Metal content in sediments

Temporal changes of metal levels in sediments are shown in Fig. 3. Cd levels had slightly decreased within the period of the field study except in September. On the contrary, both Cu and Zn levels were relatively low at the beginning of the study (April to June) and markedly higher in

summer and fall. Results about metals immobilized in the crystalline matrix (residual fraction) showed a strong contrast between Cd on the one hand, and Cu and Zn on the other hand (Table 2). The distribution of all three of the studied metals was very similar for the monthly samples analyzed all over the period of the study.

From the results of desorption tests (Table 2), Cd showed a mobility consistently higher than for Cu and Zn. For both Cd and Zn, the percentages of desorption decreased with increasing pHs. However statistical comparisons are not suitable to compare the levels of desorption according to either metals or pHs since in some cases, no desorption occurred. For Cd, the percentage of desorption increased slightly all over the study at the three pHs tested (not shown) but since the gross concentration decreased, the quantities re-mobilized remained relatively steady as shown by the small standard deviations associated to the general average calculated for the lowest pH tested (Table 2). On the other hand, no temporal variations were observed considering remobilization of Cu and Zn. Thus, due to the temporal changes of their gross concentrations (Fig. 3), the quantities of these metals potentially available to biota were higher in summer and fall than in spring. Consequently, the general averages of re-mobilized quantities of Cu and Zn had standard deviations relatively higher than for Cd (Table 2).

Ecotoxicity tests

Tigriopus brevicornis.- Mean mortality percentages (n=5) for each month have been calculated after Abbott's correction. The temporal variability is shown in Fig. 4. The sediments collected from April to June did not exert such a high toxic effect as those collected from July to October.

Crassostrea gigas.- Temporal changes in the mean percentages of abnormal larvae after exposure to different doses of total sediment and elutriate are shown respectively in Figs. 5 A and B. In all cases, except for the larvae exposed to sediment elutriates in June, an embryotoxic effect was shown (ANOVA, $p < 0.0001$). The toxicity of sediments was high in March, decreased from April to June, then increased again as observed previously in copepods. In March, and in July to October, the highest doses tested (2.5 g of total sediment and 100% of elutriate) induced about 100% of abnormal larvae.

Paracentrotus lividus.- Embryotoxicity of sediments is shown in Fig. 6 according to the date of sampling, the mode (A- Total sediment; B- Elutriate) and the level of exposure. The seasonal difference was not so marked in sea-urchin larvae that in other species. Except in June and

secondarily in May, the level of abnormal larvae is always high but at its maximum, it rarely reached 100%.

Interspecific comparisons

For the whole three species (Figs. 4 to 6), the toxicity of sediments was relatively low in May and June compared to the data obtained later (July to October). In April a strong response was observed in P. lividus larvae compared to both copepod and oyster larvae, particularly when the exposure was through sediment elutriate (Fig. 6B). In March, oyster and sea-urchin larvae only were tested and revealed a strong ecotoxicity of sediments (Figs. 5 and 6).

Over the period when sediment ecotoxicity was high (July to October), whatever the mode of exposure (total sediment or elutriate), the highest percentages of abnormalities were observed in *C. gigas* larvae compared to those of P. lividus; similarly, the EC50s (50% Effective Concentrations) were lower (Table 3) but the NOECs (No Observed Effect Concentrations) and the LOECs (Lowest Observed Effect Concentrations) were higher. When the sediment ecotoxicity was low (April to June), the effects were similar in both species after exposure to total sediment. On the contrary, the response was much marked in P. lividus larvae exposed to elutriates. Once again the NOECs were higher for C. gigas larvae whatever the treatment.

Relationships between biological and chemical factors

The temporal changes in Cu and Zn concentrations (Fig. 3) showed some similarities with the changes in biological responses (Figs. 4 to 6). Since only a fraction of sediment-bound metals is actually available, the relationship between metals and biological responses was examined taking into account the results of desorption tests. Considering that all three of the studied metals can contribute to sediment toxicity, the total quantity of Cd, Cu and Zn re-mobilized at the lowest pH tested (4) were added ($\mu\text{Atg.g}^{-1}$). This is not completely artificial since the metabolism of these elements shares at least partly similar pathways. In particular, they can contribute concomitantly to metallothionein induction which provides a defense against their toxicity to biota, including bivalve larvae (Ringwood and Brouwer 1993) and copepods (Barka et al. 2001). As mentioned above, quantities of re-mobilized Cu and Zn, like gross concentrations, showed an increase during spring then reached a plateau in summer and fall. Thus a correlation matrix was built to examine the relationships between this factor and toxicological data. Since the levels of perylene in sediments were not correlated to those of the other PAHs, correlations between toxicological factors and PAHs were calculated separately for this compound.

In the case of the copepod T. brevicornis, only the raw elutriate was tested, thus the single toxicological factor available for this species was the percentage of mortality. In the case of oyster or sea-urchin larvae, several concentrations were tested, allowing to calculate the EC 50. It must be kept in mind that in the first case, a positive correlation indicates an increase of effect with increasing exposure, whereas on the other hand, the EC50 decreases with increasing exposure (negative correlation).

T. brevicornis.- A significant positive correlation has been shown between the percentages of mortality and the quantities of Cd, Cu and Zn re-mobilized at pH 4 whereas a significant negative correlation was shown when PAHs (perylene excluded) were considered, both of them being significant at the 95% level (Table 4). Mortality and levels of perylene were correlated positively but the correlation coefficient was not significant. There was a significant negative correlation between the percentages of mortality in T. brevicornis and EC50s in C. gigas (Table 4). Due to the difference in the toxicological factor used in the correlation (see above), this means that the response of both species to sediments were highly similar.

C. gigas.- Negative correlations were shown between the quantities of Cd, Cu and Zn re-mobilized at pH 4 and EC50s calculated in C.gigas larvae, after exposure to elutriates and total sediment. No significant correlations were determined between toxicological parameters and levels of PAHs (perylene excluded) in sediments whereas a consistent negative correlation (probability at the level of 83%) was observed with perylene concentrations. The results obtained with either treatment with total sediment or with elutriates were significantly correlated (Table 4).

P. lividus.- No significant correlations were shown between toxicological parameters and either the quantities of Cd, Cu and Zn re-mobilized at pH 4 or the levels of PAHs (perylene or others) in sediments. In contrast with C.gigas, no correlations were observed between results in copepods and in sea-urchin larvae. The single significant correlation was between results obtained with the two sediment treatments (total sediment and elutriates ; Table 4).

DISCUSSION

The gross concentrations determined in the sediments of Le Cheyzin (Gironde estuary, Fr.) are in agreement with the status attributed to this site of a contaminated area. Compared to numerous data available for sediments of the Mediterranean coast or the Bay of Seine, Fr., only few sites had indeed concentrations equal or higher (3 sites among 161 for Zn; 14/161 for Cd; 42/161 for Cu) (RNO 1995, 1998).

Temporal changes were observed in metal contents of sediments in the Gironde estuary, the trends being similar for Cu and Zn whereas Cd data were noticeably different. Cd, Cu and Zn are

divalent transition metals, thus one might expect similar behaviours in estuarine waters. In the Gironde estuary, 80% of the upstream trace metal input is in solid particulate form, whereas the metal output to the Atlantic Ocean takes place mostly in dissolved form (80%). Donard and Bourg (1986) have proposed a model to explain this particulate → dissolved evolution, taking into account hydrodynamic, biological and chemical processes. In the Tamar estuary, apparent minor differences between the behaviour of labile copper and that of labile zinc have been attributed to the time of sampling within the tidal cycle which was somewhat shifted for the zinc survey (Van den Berg 1993). If the fate of the three metals of interest in the present study is similar, the sources may be different. Cd and Zn originate at least partly from the same source, an industrial contamination in the Lot river, a secondary tributary of the Gironde estuary, but this origin was highly predominant for Cd (Boutier et al. 1989) whereas both natural and anthropogenic sources of zinc are very important and diversified (Amiard and Amiard-Triquet 1993). On the other hand, the Gironde basin is devoted to vineyards in which Cu sulphide is widely used as fungicide.

Geochemical differences between the studied metals were also evidenced when their presence was examined in the residual phase, from which metals (in the present study Cu and Zn) cannot be re-mobilized. The low concentrations of Cd in the residual phase are in agreement with *in vitro* desorption tests which have shown a higher mobility of Cd compared to Cu and Zn (even if informations have not been acquired about the distribution of metals among other geochemical fractions such as the carbonate-associated fraction or the phasis of Fe and Mn oxyhydroxides due to the lack of reliability of sequential extractions; e.g. Martin et al. 1987). However, due to the differences in gross concentrations of each metal, the quantities re-mobilized which are the most susceptible to exert a noxious effect on marine organisms are lower for Cd (0.23 mg kg⁻¹ on an average) compared to Cu (1.3) and Zn (27).

According to Stebbing et al. (1980) recommendations, ecotoxicity tests involving three different species belonging to different taxonomic groups (crustaceans, bivalves, echinoderm) have been carried out. Two sediment treatments have been used: 1) tests in the presence of total sediment (with oyster and sea-urchin larvae), reflecting the toxicity of the whole sediment (Geffard et al. 2001); 2) elutriates (with all species), this treatment reflecting the toxicity of the contaminant fraction which can be released from sediments during resuspension (e.g. dredging operation; Melzian 1990). In turbulent environments such as tidal coastal areas and estuaries, exchanges between sediment deposited or in suspension occur continuously, a situation which has been clearly demonstrated in the Gironde estuary (Allen et al. 1980).

Ecotoxicity tests showed concomitant changes in the sensitivity of oyster, sea-urchin larvae (with the two sediment treatments) and copepods with low damages in spring and higher ones in

summer and fall. Correlations were shown between mortality in copepods or EC50s in oyster larvae on the one hand and quantities of metals re-mobilized from sediment at low pH on the other. Despite of the similarity with results obtained in oyster larvae, no consistent correlations were shown between metals and toxicological factors in sea-urchin.

Similar tests have been carried out previously in the Gironde estuary (August 1994). No toxicity was revealed using oyster larvae as tests organisms at a period of the year when the ecotoxicity of sediment was maximum in the present study. This could be due to the different pre-treatments of sediment : kept at 4°C in the dark and used within one week in 1994 ; freeze-dried in 1997, a procedure which is known to enhance toxicity (Beiras and His 1995). On the contrary deleterious effects were shown in both copepods and sea-urchin larvae (Amiard-Triquet et al. 1998). The results of the present study are in agreement with these findings : due to their low threshold of sensitivity (LOECs), sea-urchin larvae respond even to sediments exhibiting a low ecotoxicity (in spring) whereas oyster larvae respond more markedly to sediments with higher toxicity. For both treatment tested in this study (total sediment and elutriates), the NOECs (No Observed Effects Concentration) and the LOECs (Low Observed Effects Concentrations) were indeed always lower for sea-urchin larvae. On the contrary, when acute effects were taken into account, the EC50s were lower in oyster larvae in most of the monthly tests, particularly when they were exposed to total sediment. The overall differences between oysters and sea-urchins were not great, confirming the findings of a study on seawater quality (His et al. 1999b).

If we compare metal and PAH concentrations in sediment from the Gironde estuary with sediment quality 'guidelines' developed by Long et al. (1995), Zn seems the most likely compound which can be responsible for the higher toxicity observed in summer and fall compared to spring. In April to June, the concentrations of Zn, ranging from 120 to 140 mg kg⁻¹, were lower than the ER-L value (Effect Range-Low value: 150 mg kg⁻¹). In July to October, the concentrations of Zn which ranged from 210 to 250 mg kg⁻¹ were intermediate between ER-L and ER-M values (Effect Range-Medium value: 410 mg kg⁻¹). Concentrations within the same order of magnitude (above 270 mg kg⁻¹) have been reported (Watzin et al. 1994 and references cited therein), as responsible for lethal or sublethal effects on a variety of taxa. These special effects of Zn are in agreement with the relative bioavailibility of metals here-studied, the highest re-mobilized quantities being determined for Zn. Watzin et al. (1994) have tested the toxicity of estuarine sediments spiked with Zn under field conditions. Zn concentrations were most certainly high (8,150 mg kg⁻¹, dry weight) compared to environmental concentrations (in the present study : 188 mg kg⁻¹ on an average). They were responsible of a decreased recruitment for different taxa, including harpacticoid copepods and copepod nauplii, compared to control sediments. Exoskeletons of dead copepods were frequently

found, suggesting postrecruitment mortality rather than avoidance behavior as the source of the observed decrease.

For Cu, the ER-L and ER-M values were respectively 34 and 270 mg kg⁻¹ (Long et al. 1995), whereas concentrations in the sediment of the Gironde estuary were only nearing the lowest value at the period when the maximum ecotoxicity was shown (28 to 34 mg kg⁻¹ from July to October). The margin was more important for Cd, with ER-L and ER-M values of 1.2 and 9.6 mg kg⁻¹ vs a maximum value of 0.65 mg kg⁻¹ (April) in the estuarine sediment used in the present study. The same was true for total PAHs with ER-L and ER-M values of 4,022 and 44,792 ng g⁻¹ compared to a maximum of 1,436 ng g⁻¹ in May in the Gironde estuary. This value is also lower than the threshold effect concentration (TEC) of 290 µg g⁻¹ OC (organic carbon; equivalent to 2,900 ng g⁻¹ in total sediment) recently proposed for PAH mixtures (Swartz 1999).

Contrary to what was observed with metals, no clear seasonal tendency and possible toxicity were shown when PAH levels (perylene excluded) in sediments were examined. However, negative correlations were established between EC50s in oyster larvae and perylene levels in the sediments. It has been observed that the level of perylene in sediments was not correlated with the level of other PAHs, indicating that its origin and fate are most likely different as reported previously by Budzinski et al. (1997).

Even if correlations do not imply a relation of causality, they suggest a possible role of perylene but moreover of sediment-bound metals, particularly Cu and Zn, in biological responses. Due to their low levels in the Gironde estuary (Lartiges 1994; Piérard 1995), other chemicals such as PCBs, organophosphorous or organonitrogenous compounds cannot be suspected to have any deleterious impact on biota. Since they are essential metals, the potential toxicity of Cu and Zn is generally neglected. Nevertheless, the experimental doses which are responsible of noxious (or even lethal) effects are often lower than the highest concentrations registered in polluted areas, juveniles and larvae being the most susceptible organisms (Amiard-Triquet 1989). The present study confirms that bioassays based on larvae (particularly oyster larvae) are indeed very sensitive and provide a useful tool to study the changes in sediment toxicity. In the future, it may be planned to precise what substances are responsible for sediment ecotoxicity by separating the different classes of compounds (Bombardier and Bermingham 1999; Thomas et al. 1999).

REFERENCES

- Allen, G.P., J.C., Salomon, P. Bassoullet, Y. Du Penhoat, and C. De Grandpré. 1980. Effects of tides on mixing and suspended sediment transport in macrotidal estuaries. Sedimentary Geol 26:69-90.
- Amiard, J.C. 1992. Bioavailability of sediment-bound metals for benthic aquatic organisms, p. 183-202. In: J.P. Vernet JP (ed), Impact of Heavy Metals on the Environment. Elsevier, Amsterdam.
- Amiard, J.C., C. Amiard-Triquet. Zinc. P, 733-744. In: Morton Com (ed) Academic Press Inc. New York.
- Amiard, J.C., H. Ettajani, A.Y.Jeantet, C. Ballan-Dufrançais, and C. Amiard-Triquet. 1995. Bioavailability and toxicity of sediment-bound lead to a filter-feeder bivalve Crassostrea gigas (Thunberg). BioMetals 8:280-289.
- Amiard, J.C., S. Gauthier-Clerc, S. Heuvelin, and F. Rainglet. 1996. Etude in vitro de la biodisponibilité du cadmium fixé sur des sédiments estuariens, p. 3-53. In : CNRS/Université de Nantes (eds), Comparaison des diverses méthodologies pour estimer le pouvoir toxique des sédiments. Rapport de fin de contrat au Ministère de l'Environnement.
- Amiard-Triquet, C. 1989. Bioaccumulation et nocivité relatives de quelques polluants métalliques à l'égard des espèces marines. Bulletin d'Ecologie 20 (2):129-151.
- Amiard-Triquet, C, S. Altmann, J.C. Amiard, C. Ballan-Dufrançais, P. Baumard, H. Budzinski, C. Crouzet, P. Garrigues , E. His, A.Y.Jeantet, R. Menasria, P. Mora, C. Mouneyrac , J.F. Narbonne, and J.F. Pavillon. 1998. Fate and effects of micropollutants in the Gironde estuary, France : a multidisciplinary approach. Hydrobiologia 373/374:259-279.
- Barka, S., J.F. Pavillon, and J.C. Amiard. 2001. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the Copepod Tigriopus brevicornis. Comparative Biochemistry and Physiology 128C:479-493.
- Behar, F., C. Leblond, and C. Saint Paul. 1989. Analyse quantitative des effluents de pyrolyse en milieu ouvert et fermé. Revue de l'Institut Français de Pédologie. 44:387-411.
- Beiras, R. and E. His. 1995. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon polluted sediments to Crassostrea gigas embryos. Marine Pollution Bulletin 30 (1):47-49.
- Beiras, R, E.His, and M.N.L. Seaman. 1998. Effects of storage temperature and duration on toxicity of sediments assessed by Crassostrea gigas oyster embryo bioassay. Environmental Toxicology and Chemistry 17 (10):2100-2105.
- Bombardier, M., N. Bermingham. 1999. The SED-TOX index : Toxicity directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard; concept and application. Environmental Toxicology and Chemistry 18 (4):685-698.
- Bourgoin, B.P., M.J.Risk, and A.E. Aitken. 1991. Factors controlling lead availability to the deposit-feeding bivalve Macoma balthica in sulphide-rich oxic sediments. Estuarine and Coastal Shelf Science 32:625-632.
- Boutier, B., J.F. Chiffolleau, J.M. Jouanneau, C. Latouche, and I. Philipps. 1989. La contamination de la Gironde par le cadmium. Rapport scientifique et technique de l'IFREMER, n° 14, 105 p
- Budzinski, H., A. Papineau, P. Baumard, and P. Garrigues. 1995. Extraction assistée par chauffage micro-ondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. Compte-Rendus de l'Académie des Sciences de Paris 321 (Série IIb):69-76.
- Budzinski, H., I. Jones, J. Bellocq, C. Piérard, and P. Garrigues. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. Marine Chemistry 58:85-97.
- Calabrese, A. and H.C. Davis. 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of Mercenaria mercenaria and Crassostrea virginica. Biological Bulletin 131:427-453.

- Charlou, J.L. and M. Joanny. 1983. Dosage du mercure et d'autres métaux (Pb, Zn, Cu, Cd, Co, Mn) dans les sédiments marins par absorption atomique, p. 285-295. In: A. Amino and M. Chaussepied (eds), Manuel des Analyses Chimiques en Milieu Marin. CNEXO, Brest
- Coquery, M., S. Azemard, and S.J. de Mora. 2000. World-wide intercomparison exercise for the determination of trace elements and methylmercury in estuarine sediment sample IAEA-405, 114 p. Rep. IAEA/AL/127, IAEA/MEL/70, International Atomic Energy Agency, Monaco.
- Day, R.W. and G.P. Quinn. 1989. Comparisons of treatments after an analysis in ecology. Ecological Monograph 59 (4):433-463.
- Donard, O. and A.C.M. Bourg. 1986. A biogeochemical model for toxic trace metal fluxes in the macrotidal Gironde estuary. Rapport des Procès Verbaux du Conseil International pour l'Exploration de la Mer 186:263-270.
- Ettajani, H., C. Amiard-Triquet, A.Y. Jeantet, and J.C. Amiard. 1996. Fate and effects of soluble or sediment-bound arsenic in oysters (Crassostrea gigas Thun.) Archives of Environmental Contamination and Toxicology 31:38-46.
- Geffard, O., H. Budzinski, S. Augagneur, M.N.L. Seaman, and E. His. 2001. Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity with sea urchins (Paracentrotus lividus) and oysters (Crassostrea gigas). Environmental Toxicology and Chemistry 20 (7): 11605-1611.
- Hamilton, M.A., R.C. Russo, and R.V. Thurston. 1977. Trimmed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. Environmental Science and Technology 11:714-719.
- Hill, I.R., P. Matthiessen, and F. Heimbach. 1993. Sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. In : I.R. Hill, P. Matthiessen & F Heimbach (Eds) SETAC (105 p)
- His, E., M.N.L. Seaman, and R. Beiras. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. Water Research 31:351-355.
- His, E., R. Beiras, and M.N.L. Seaman. 1999a. The assessment of marine pollution - Bioassays with bivalve embryos and larvae. Advances in Marine Biology 37:1-178.
- His, E., I. Heyvang, O. Geffard, and X. de Montaudouin. 1999b. A comparison between oyster (Crassostrea gigas) and sea urchin (Paracentrotus lividus) larval bioassays for toxicological studies. Water Research 33:1706-1718.
- Kersten, M., and U. Förstner. Speciation of trace elements in sediments, p. 246-309. In: G.E. Batley (ed) Trace Metal Speciation Analytical Methods and problems CRC Press. Boca Raton.
- Klößner, K., H. Rosenthal, and J. Willführ. 1985. Invertebrate bioassays with North Sea water samples. I. Structural effects on embryos and larvae of serpulids, oysters and sea urchins. Helgoländer wissenschaftlichen Meeresuntersuchungen, 39 : 1-19
- Krassoi, R., D. Everett and I. Anderson. 1996. Protocol for using doughboy scallop Chlamys asperrima (Mollusca : Pectinidae) L. to test the sublethal toxicity of single compounds and effluents. Tech. Rep. Ser. 17, Pulp and Paper Research Advisory Board, Australia, 46p.
- Lartiges, S. 1994. Analyse et devenir de pesticides organophosphorés et organoazotés dans l'environnement aquatique. Thèse de doctorat, N° 1155, Université de Bordeaux I, France.
- Letellier, M., H. Budzinski, P. Garrigues, and S. Wise. 1997. Focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in open cell from reference materials (sediment, soil, air particulates). Spectroscopy 13:71-80.
- Long, E.R., D.D. McDonald, S.L. Smith, and F.D. Calder 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. Environmental Management 19:81-97.
- Luoma SN 1995. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays : limitations and research needs, p. 609-646. In : A. Tessier and D.R. Turner (eds.) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. Wiley and Sons, Chichester.

- Luoma, S.N. and G.W. Bryan. 1978. Factors controlling the availability of sediment-bound lead to the estuarine bivalve Scrobicularia plana. Journal of the Marine Biological Association UK 58:793-802.
- Martin, J.M., P. Nirel, and A.J. Thomas. 1987. Sequential extraction techniques : promises and problems. Marine Chemistry 22:313-341.
- Mason, A.Z. and K.D. Jenkins. 1995. Metal detoxification in aquatic organisms, p. 479-582. In : A. Tessier and D.R. Turner (eds.) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. Wiley and Sons, Chichester.
- Melzian, B.D. 1990. Toxicity assessment of dredged materials : acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests, p. 49-64. In C. Alzieu and B. Gallenne (eds.) Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities. Goulbault Imprimeur, s. a., Nantes, France.
- Morrison, G.M.P. 1989. Trace element speciation and its relationship to bioavailability and toxicity in natural waters, p. 26-38. In G.E. Batley (ed) Trace element speciation : analytical methods and problems. CRC Press, Boca raton, Fl, USA.
- Piérard, C. 1995. Détermination des composés polychlorobiphényles dans l'environnement sédimentaire marin et estuarien. Thèse de Doctorat, N° 1346, Université de Bordeaux I, France.
- Ringwood, A.H. and M. Brouwer. 1993. Expression of constitutive and metal inducible metallothionein in oyster embryos (Crassostrea virginica). Comparative Biochemistry and Physiology 116B (3):523-529.
- RNO 1995. Surveillance du milieu marin. Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER) et Ministère de l'Environnement.
- RNO 1998. Surveillance du milieu marin. IFREMER et Ministère de l'Environnement.
- Stebbing, A. R. D., B. Akesson, A. Calabrese, J. H. Gentile, A. Jensen, and R. Lloyd, 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. Rapport des Procès Verbaux du Conseil International pour l'Exploration de la Mer 179:322-332.
- Shannon, R.D. and J.R. White. 1991. The selectivity of a sequential extraction procedure for the determination of iron oxyhydroxides and iron sulfides in lake sediments. Biogeochemistry 14:193-208.
- Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. 1981. Biometry. W.H. Freeman, San Francisco.
- Swartz, R.C. 1999. Consensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. Environmental Toxicology and Chemistry 18 (4):780-787.
- Thomas, K.V., J.E. Thain, and M.J. Waldock. 1999. Identification of toxic substances in United Kingdom estuaries. Environmental Toxicology and Chemistry 18 (3):401-411.
- Thompson, M. and R. Wood. 1993. The international harmonized protocol for the proficiency testing of (chemical) analytical laboratories. IUPAC/ISO/AOAC, Journal of Pure and Applied Chemistry 65:2123-2144.
- Underwood, A.J. 1981. Techniques of analysis of variance in experimental marine biology and ecology. Oceanography and Marine Biology Annual Review 19:513-605.
- Vale, C. and B. Sundby. 1998. The interactions between living organisms and metals in intertidal and subtidal sediments, p. 19-29. In W.J. Langston and M.J. Bebianno (eds) Metal Metabolism in Aquatic Environments. Chapman & Hall, London.
- Van. Den . Berg, C.M.G. 1993. Complex formation and the chemistry of selected trace elements in estuaries. Estuaries 16:512-520.
- Watzin, M.C., P.F. Roscigno, and W.D. Burke. 1994. Community-level field method for testing the toxicity of contaminated sediments in estuaries. Environmental Toxicology and Chemistry 13 (7):1187-1193.
- Winer, B.J. 1971. Statistical principles in experimental design. McGraw-Hill, Tokyo.

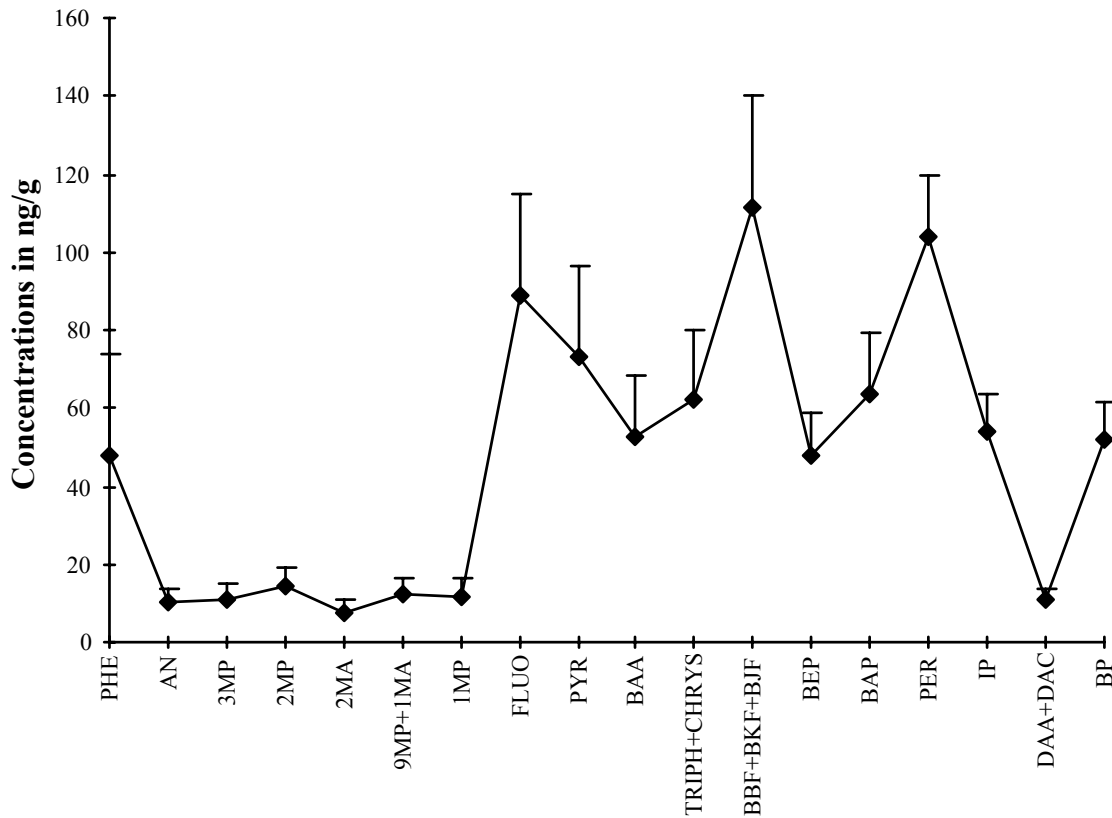


Figure 1. Relative importance of different aromatic compounds in sediments originating from the Gironde estuary (mean for 8 monthly samples and standard deviation). PHE : phenanthrene; AN : anthracene; 3MP : 3-methylphenanthrene; 2MP : 2-methylphenanthrene; 2MA : 2-methylanthracene; 9MP+1MA : 9-methylphenanthrene + 1-methylanthracene; 1MP : 1-methylphenanthrene; FLUO : fluoranthene; PYR : pyrene; BAA : benz(a)anthracene; TRIPH+CHRYS : triphenylene + chrysene; BBF+BKF+BJF : benzo(b)fluoranthene + benzo(k)fluoranthene + benzo(j)fluoranthene; BEP : benzo(e)pyrene; BAP : benzo(a)pyrene; PER : perylene; IP : indeno(1,2,3-cd)pyrene; DAA+DAC : dibenz(ah)anthracene + dibenz(ac)anthracene; BP : benzo(ghi)perylene.

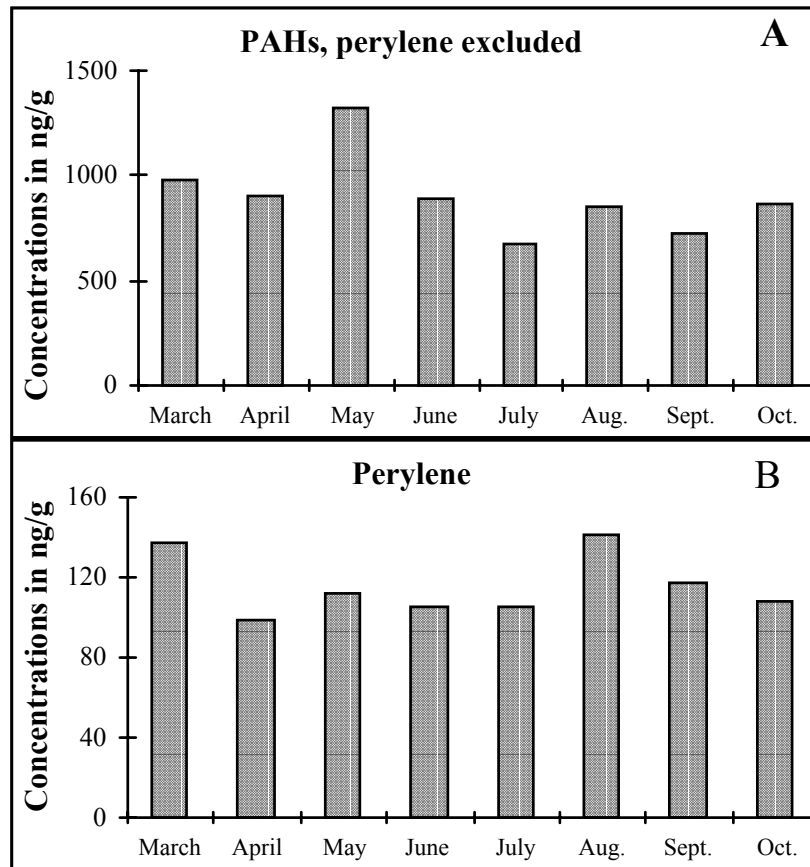


Figure 2. Temporal changes of aromatic contaminant levels in sediments from the Gironde estuary. Concentrations expressed in relation to the dry weight of sediments. A, all aromatic compounds without perylene were considered. B, only perylene was considered.

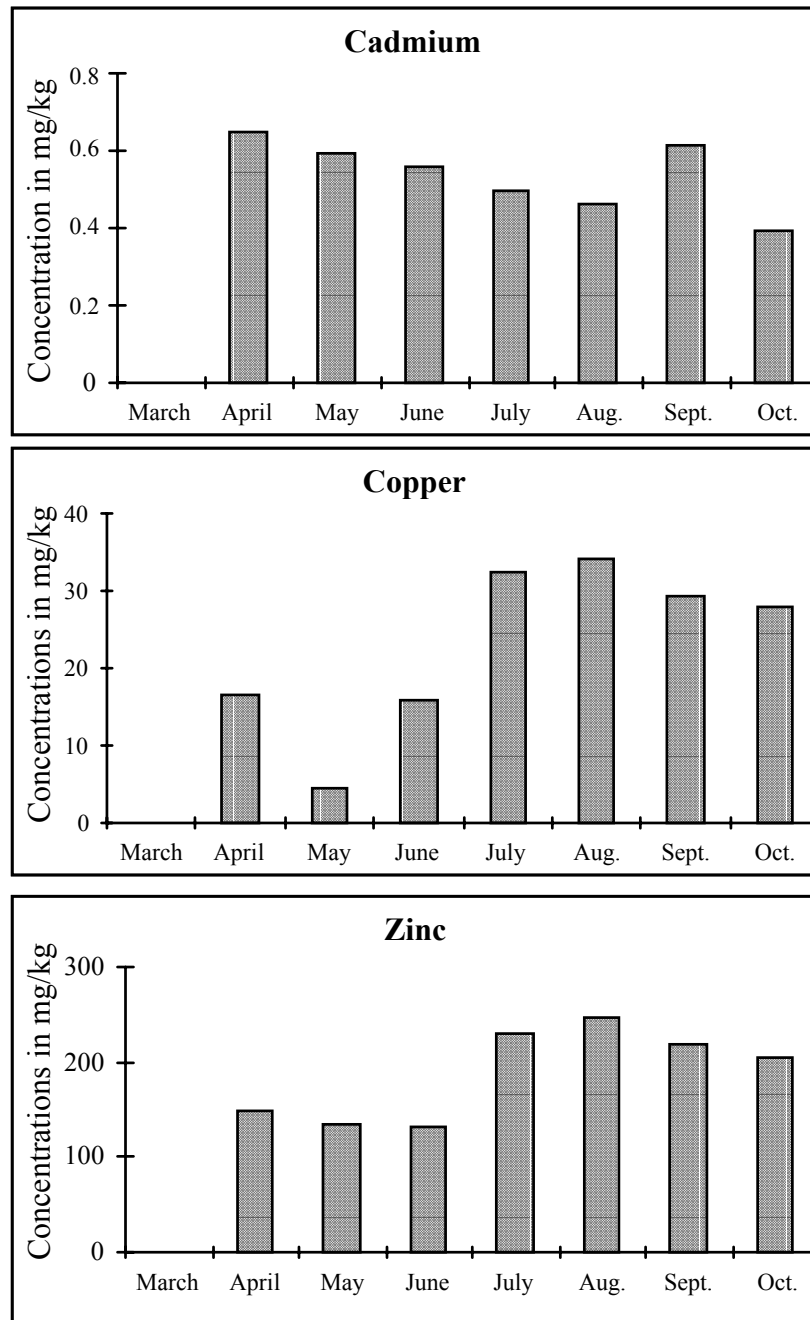


Figure 3. Temporal changes of cadmium, copper and zinc levels in sediments from the Gironde estuary. Concentrations expressed in relation to the dry weight of sediments.

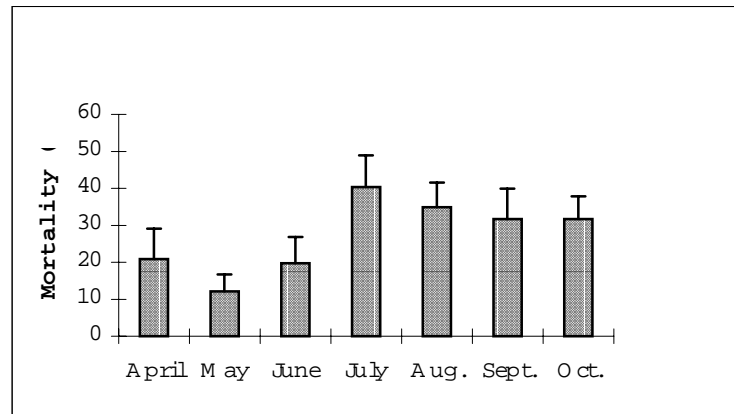


Figure 4. Mean mortality percentages (shown with standard deviations) in *Tigriopus brevicornis* exposed to leachates from sediment samples collected monthly in the Gironde estuary.

Figure 5A

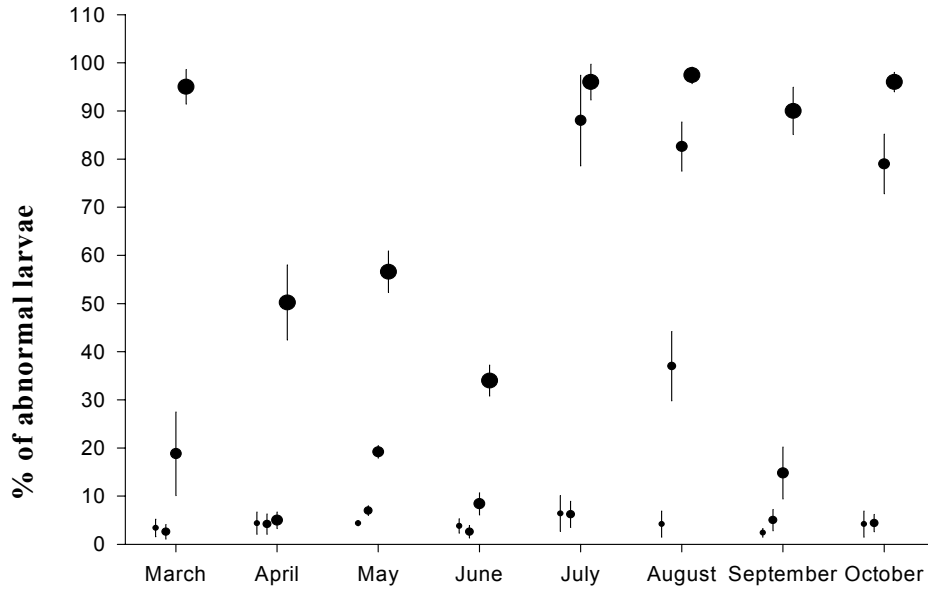


Figure 5B

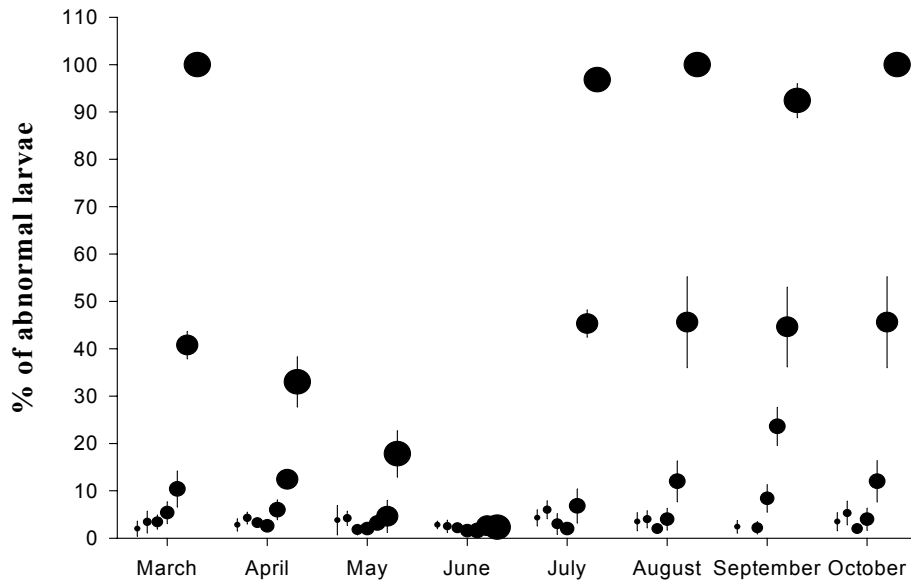


Figure 5. *Crassostrea gigas*.- Temporal changes in the mean percentages of abnormal larvae after exposure to different concentrations of total sediment (0, 0.5, 1, 2.5 g.L⁻¹ : A) and sediment elutriate (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100% : B). The size of symbols increases with increasing concentrations.

Figure 6A

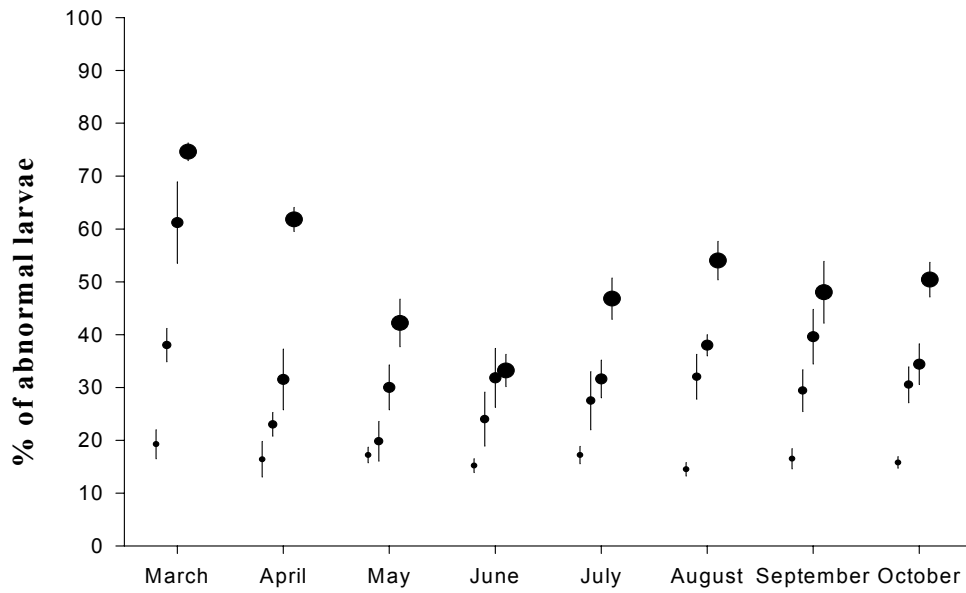


Figure 6B

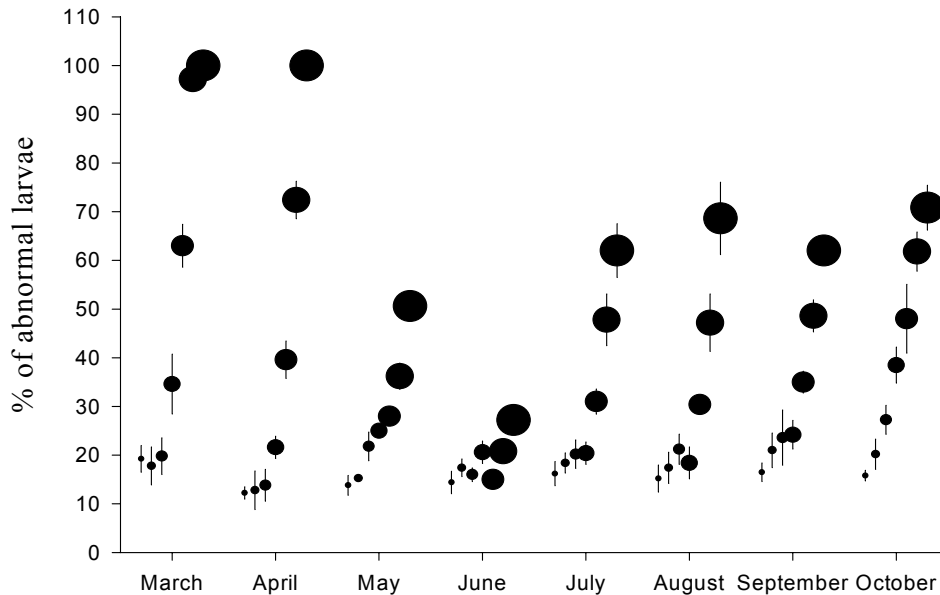


Figure 6. *Paracentrotus lividus*.- Temporal changes in the mean percentages of abnormal larvae after exposure to different concentrations of total sediment (0, 0.5, 1, 2.5 g.L⁻¹ : A) and sediment elutriate (0, 1, 5, 10, 25, 50, 100% : B). The size of symbols increases with increasing concentrations.

Table 1. Intercalibration exercise (Coquery et al. 2000): determination of Cd, Cu and Zn in sediment (mean and confidence interval at 95 %, mg.kg⁻¹ dw).

	Cd	Cu	Zn
Marine sediment IAEA-405			
Certified value	0.73 (0.05)	47.7 (1.2)	279 (7)
Our value	0.79 (0.04)	45.3 (1.4)	262 (5)
Z-Scores*	0.7	-0.4	-0.5

* $Z \leq |2|$: performance is acceptable (Thompson and Wood, 1993)

Table 2. Distribution and mobility of sediment-bound metals monthly samples collected in the Gironde estuary (le Cheyzin). Mean and standard deviations (between brackets).

	Cadmium	Copper	Zinc
Metal in the residual fraction (%)	3 (1.5)	73 (3)	54 (2)
Desorption at different pHs (%)			
4	43 (11)	8 (12)	13 (3)
5.5	22 (14)	7 (12)	3 (4)
7	13 (12)	6 (12)	1 (3)
Quantities remobilized at pH 4 (mg.kg ⁻¹ dw)	0.23 (0.04)	1.3 (1.2)	27 (7)

Table 3. NOEC (No Observed Effect Concentration), LOEC (Low Observed Effect Concentration) and EC50 (50 % Effective Concentration) determined after exposure of oyster and sea-urchin larvae to total sediment or sediment elutriates. nd: not determined because the lowest concentration tested (0.5 g total sediment . L⁻¹) induced a significant effect compared to control.

Sediment elutriates	Oyster <i>Crassostrea gigas</i>			Sea-urchin <i>Paracentrotus lividus</i>		
	NOEC (%)	LOEC (%)	EC50 (%)	NOEC (%)	LOEC (%)	EC50 (%)
March	10	25	55.7	1	5	23.8
April	10	25	> 100	5	10	33.8
May	50	100	> 100	1	5	> 100
June	100	> 100	> 100	25	50	> 100
July	25	50	53.8	10	25	76.4
August	10	25	55.0	10	25	61.7
September	5	10	54.3	1	5	82.6
October	10	25	55	1	5	45.5

Total sediment	NOEC (g.L ⁻¹)	LOEC (g.L ⁻¹)	EC50 (g.L ⁻¹)	NOEC (g.L ⁻¹)	LOEC (g.L ⁻¹)	EC50 (g.L ⁻¹)
March	0.5	1	1.3	nd	0.5	0.98
April	1	2.5	2.6	0.5	1	2.4
May	0.5	1	2.5	0.5	1	> 5
June	1	2.5	3.2	nd	0.5	> 5
July	0.5	1	0.8	nd	0.5	> 5
August	nd	0.5	0.6	nd	0.5	3.3
September	0.5	1	1.1	nd	0.5	3.1
October	0.5	1	0.9	nd	0.5	3.5

Table 4. Pearson correlation coefficients values between toxicological and chemical factors in the Gironde estuary. Underlined values are significant at the 95 % level.

Variables	Pearson correlation coefficient
Mortality in copepods versus	
Σ HAP (perylene excluded)	<u>-0.82</u>
Perylene	0.37
Cd + Cu + Zn quantities remobilized from sediment at pH 4	<u>0.89</u>
EC50 in oyster larvae, (elutriate)	<u>-0.92</u>
EC50 in oyster larvae, (total sediment)	<u>-0.88</u>
EC50 in sea-urchin larvae, (elutriate)	-0.33
EC50 in sea-urchin larvae, (total sediment)	-0.19
Abnormalities in oyster larvae, (elutriate ; EC50) versus	
Σ HAP (perylene excluded)	0.55
Perylene	-0.54
Cd + Cu + Zn quantities remobilized from sediment at pH 4	<u>-0.82</u>
EC50 in oyster larvae, (total sediment)	<u>0.97</u>
EC50 in sea-urchin larvae, (elutriate)	0.23
EC50 in sea-urchin larvae, (total sediment)	0.19
Abnormalities in oyster larvae, (total sediment ; EC50) versus	
Σ HAP (perylene excluded)	0.39
Perylene	-0.60
Cd + Cu + Zn quantities remobilized from sediment at pH 4	<u>-0.78</u>
EC50 in sea-urchin larvae, (elutriate)	0.32
EC50 in sea-urchin larvae, (total sediment)	0.24
Abnormalities in sea-urchin larvae, (elutriate ; EC50) versus	
Σ HAP (perylene excluded)	0.23
Perylene	0.05
Cd + Cu + Zn quantities remobilized from sediment at pH 4	0.04
EC50 in sea-urchin larvae, (total sediment)	<u>0.79</u>
Abnormalities in sea-urchin larvae, (total sediment ; EC50) versus	
Σ HAP (perylene excluded)	0.20
Perylene	-0.19
Cd + Cu + Zn quantities remobilized from sediment at pH 4	0.13

Chapitre VII : Biodisponibilité des HAP et des métaux sédimentaires

Ce chapitre regroupe les études menées sur la biodisponibilité des HAP et des métaux sédimentaires vis à vis des embryons et des larves de *Crassostrea gigas*, avec les trois sédiments modèles frais et vis à vis de *Mytilus galloprovincialis* avec le sédiment du Cheyzin lyophilisé. Ce chapitre est organisé en quatre publications.

- 1- Bioavailability and Toxicity of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons and metals to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. (Publication n°7).
- 2- The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae. (Publication n°8).
- 3- Relationships between metal bioaccumulation and métallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. (Publication n°9).
- 4- Responses of *Crassostrea gigas* larvae exposed to elutriate from metal-rich sediment: growth, metal bioaccumulation and induction of métallothionein. (Publication n°10).

L'utilisation de bioessais permet d'évaluer la toxicité de la fraction biodisponible des polluants sédimentaires, mais non d'identifier les contaminants responsables des effets biologiques observés. Pour ceci, il est nécessaire de déterminer leur bioaccumulation chez les organismes et/ou d'utiliser un biomarqueur d'exposition.

La première étude (Publication n°7) montre la bioaccumulation des HAP et des métaux d'origine sédimentaire par les embryons de *C. gigas* exposés au sédiment contact et à l'élutriat d'Arès et de la Bidassoa. La biodisponibilité des xénobiotiques relargués dans l'eau lors de la remise en suspension des trois sédiments modèles et du sédiment du Cheyzin a également été abordée à l'aide du test de croissance larvaire qui s'est révélé plus sensible que le test d'embryotoxicité (Publications n°8 et 9). La biodisponibilité des HAP et des métaux change selon le mode de contamination (sédiment contact, élutriat filtré ou non et algues contaminées) et l'âge de la larve (24 h ou plusieurs jours). L'utilisation des MT augmente de façon considérable la sensibilité des tests biologiques et permet de mettre en évidence de façon très précoce l'exposition des embryons et des larves de bivalves à une contamination métallique (Publications n°7, 9 et 10).

Publication n°7 :

Bioavailability and Toxicity of Sediment-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Metals to *Crassostrea gigas* Embryos and Larvae

O. Geffard, A. Geffard, E. His, H. Budzinski

Dans les systèmes aquatiques, les sédiments représentent un important réservoir pour les contaminants et constituent un danger pour les organismes benthiques et pélagiques. L'objectif de ce travail a été de déterminer la biodisponibilité et la toxicité des HAP et métaux sédimentaires pour les embryons et les larves de *Crassostrea gigas* exposés à deux traitements sédimentaires, le sédiment contact et l'élutriat. Les pourcentages d'anomalies larvaires, les accumulations en contaminants et l'induction de métallothioneines (dans le cas d'une contamination métallique) chez les larves ont été étudiés. Les contaminants sédimentaires sont biodisponibles, comme le montrent leur accumulation chez les larves de *C.gigas* et les anomalies induites au cours du développement embryonnaire. La teneur critique en HAP dans les larves, au-dessus de laquelle des effets sont observés, est de 0.3 µg/g (poids sec). Cette valeur est en accord avec celles observées chez beaucoup d'espèces de vertébrés et d'invertébrés. La biodisponibilité des HAP est gérée par leur solubilité et seule la fraction soluble est disponible pour les embryons. La biodisponibilité des métaux pour les larves est confirmée par l'induction de métallothioneine (MT) qui est corrélée aux teneurs en métaux cytosoliques. La MT constitue une réponse plus précoce que le test d'embryotoxicité pour évaluer la contamination métallique dans l'environnement. Cette étude confirme le choix des embryons d'huîtres comme outil sensible pour évaluer la qualité d'un sédiment.

Mots clés : sédiments contaminés par les HAP et métaux, *Crassostrea gigas*, embryotoxicité, bioaccumulation, biomarqueur

Soumise à *Marine Pollution Bulletin*

Bioavailability and Toxicity of Sediment-associated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Metals to *Crassostrea gigas* Embryos and Larvae.

O. Geffard^{a*}, A. Geffard^b, E. His^a, H. Budzinski^c.

^a IFREMER, DEL/PC, quai du Commandant Silhouette, 33120 Arcachon, France

^b Service d'Ecotoxicologie, ISOMer, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes, France

^c Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels, Université de Bordeaux 1, 33405 Talence, France.

Abstract

Sediments represent an important sink for contaminants in the aquatic systems and may pose a threat to pelagic and benthic organisms. The objective of this research was to determine the bioavailability and the toxicity of sediment associated-PAHs and heavy metals to embryos and larvae of the oyster *Crassostrea gigas*, exposed to two sediments fractions, the whole sediment and the elutriate. The percentages of abnormal larvae, the contaminant accumulation and the induction of metallothionein (in the case of metal contamination) in the larvae have been investigated. Sediment-associated PAHs and heavy metals are available for exposure, as indicated by their accumulation in *C.gigas* larvae and by the abnormalities induced during larval development. The critical body concentration of PAHs (Fluo, Pyr, BaA, Triph, Chrys, BbF, BkF, BJK, BeP, BaP, Per, IP, BPer and the DahA) in larvae is $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$, above which abnormalities were observed. This value is in agreement with concentrations observed for most vertebrate and invertebrate species. The bioavailability of PAH is ruled by their solubility and only the soluble fraction of PAH is accumulated to the embryos. The bioavailability of metals for larvae was substantiated by an induction of MT that was correlated with the cytosolic metal concentrations. The MT induction constitute a more precocious response than the embryo-toxicity test for evaluating the environmental contamination by metal. This study recommend the choice of oysters embryos as a sensitive tool to evaluate the quality of a sediment.

Keywords : PAH and metals contaminated sediments, *Crassostrea gigas*, embryotoxicity, bioaccumulation, biomarkers.

* Corresponding author

Tel : (33) 5 56 83 85 60

Fax : (33) 5 56 83 89 80

Email : ogeffard@ifremer.fr

Introduction

Sediments represent an important sink for contaminants in the aquatic systems and may pose a threat to pelagic and benthic organisms. Various bioassays are proposed to assess the biological effects of contaminated sediments, using amphipods, polychaetes, oligochaetes or bivalves (Carr et al., 1989; Chapman, 1990; ASTM, 1992; Eertman et al., 1993; Burgess and Morrison, 1994; Matthiessen et al., 1998). Among the bioassays the embryotoxicity test with the oyster *Crassostrea gigas* has been recognized as one of the most sensitive (Stebbing, 1980; His et al., 1999). Promoted by Woelke (1972) to evaluate industrial effluents, it was later adapted to study the biological effects of polluted marine sediments (Cardwell et al., 1976; Chapman and Morgan, 1983; Long et al., 1990; Miller et al., 2000; Geffard et al., 2001a). For assay practices, different sediments treatments are proposed : the whole sediment, the pore water and the elutriate treatments. Although the bioassays allow to evaluate the toxicity of sediment-associated contaminants, they do not to identify the compounds inducing the biological effects observed.

The bioavailability of contaminants depends of several factors : physical (grain size of the sediment and suspended particulate matter), chemical (solubility, reactivity of compounds, complexing agents), and biological (benthic or pelagic organisms ; mode of exposure) factors (Borgmann, 2000). One of the best methods to assess the bioavailability of sediment-associated contaminants is to observe their accumulation in the organisms. This method takes into account all factors that control the bioavailability of the contaminants (Connell et al., 1999; Borgmann, 2000).

In marine ecotoxicology, several biomarkers have been applied. Different categories of biomarkers have been identified, e.g. biomarkers of exposure and response or general and specific biomarkers.

Specific biomarkers may also be used in conjunction with internal concentration determinations of pollutants to assess sublethal effects of metals (Geffard et al., 2001c), particularly metallothioneins (MT). MT protein had been detected in *Mytilus galloprovincialis* (Pavicic et al., 1985) and *Crassostrea virginica* larvae (Roesijadi et al., 1996, 1997), but after exposure to nevertheless experimentally unrealistic high concentrations. Recently, the induction of MT in *M. galloprovincialis* larvae, exposed to natural contaminated sediments, was also observed (Geffard et al., 2001c).

The aim of this study was to show the bioavailability and the toxicity of sediment-associated PAHs and heavy metals to embryos and larvae of the oyster *Crassostrea gigas*, exposed to the whole sediment and their elutriates. Two sediments sites, one contaminated by metals and another by PAHs were studied. The final aim being to study the biological accumulation of heavy metals

and PAHs from sedimentary origin, and the possible induction of MT in *C. gigas* larvae, in the case of Bidassoa heavy metal polluted sediment.

Material and methods

Sampling and conservation of sediments

In previous studies (Geffard et al., 2001b), ten sediments sampled during spring 1998 from polluted sites were used in *C. gigas* embryo-toxicity experiments after physical and chemical characterization. Two of them, chosen according to their type of contamination, were used in the present study. Sediments from the top 2 cm of the surface were collected at Bidassoa Estuary (French-Spanish border) in April 2000 and at Arès (Arcachon Bay, France) in July 2000 and wet sieved at 2 mm to eliminate debris. They were then homogenized and stocked into glass bottles at 4 °C in the dark during less than a week prior to be used in the bioassays.

Sediment treatments

Whole sediments : Sediment suspensions of 0 (control), 0.6, 1.25, 2.5 and 5 g/l (wet settled sediment), in filtered (0.2 µm) seawater (FSW) of 33 ‰ salinity, were prepared in 2-liter glass beakers. The sediments were allowed to settle for 2 h before adding the biological material to avoid any mechanical effects (Geffard et al., 2001b). The seawater used in the present study was obtained from the Bay of Arcachon, which is devoted to an important activity of oyster-farming based on Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) and was thus assumed to have good “biological quality” (His et al., 1999)

Elutriates were prepared by a modification of Melzian’s method (1990). The sediments were shaken mechanically (multi-wirst shaker, 500 rpm) in glass beakers, in FSW at a ratio of 1:4 (wet sediment/water) for 8h and allowed to settle for 8h before recuperating the supernatant (elutriate). The elutriated concentrations of Arès and Bidassoa sediment corresponded to 326 g/l and 340 g/l, respectively. The two elutriates were diluted with FSW to the following concentrations : 0 (control), 6.25, 12.5, 25, 50 and 100%.

For analytical studies Arès elutriate was filtered at 0.7 µm (GF/F Whatman) to evaluate the PAH concentration in the soluble fraction of its elutriate.

Larval rearing

Mature oysters (*Crassostrea gigas*) were conditioned in hatchery conditions and induced to spawn by thermal stimulation according the standard procedures (His et al., 1997, 1999). Females in the laying process were isolated in 1 liter of FSW, while spawning males were placed in a small amount (around 100 ml) of FSW to obtain a sperm-dense solution. The oocytes and sperm of different bivalves were observed under an inverted microscope, and the best reproductive pair was selected (regular oocytes and very mobile spermatozoa) for the experiment. The oocytes were fertilized using 5 ml of the sperm-dense solution. Fifteen minutes after fertilization, the embryos were counted and placed in 2-liter beakers (60 000 fertilized eggs/l) filled by the different media to be tested (3 replicates per treatment).

The embryos were incubated at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h until D larvae stage were obtained (His et al., 1997). After incubation, the larvae were recovered through a sieve (32 μm) and counted. In order to, they were then washed with 0.9% aqueous ammonium formiate (Holland and Hannant, 1973; elimination of NaCl), freeze-dried and stored for analysis.

Only larvae from treatments with abnormalities less than 20 % were analyzed. The EC20 was chosen because studies have shown that an effect of between 20 and 30 % is commonly observed at the NOEC (Crane & Newman, 2000).

Embryo toxicity evaluation

After each incubation period, about one hundred larvae per treatment were subsampled and killed with 100 μl of 40% buffered formalin to determine the percentages of abnormalities, according to His et al. (1997).

Sample preparation for chemical analyses

Analysis were performed on whole sediment, elutriates, and larvae. The methods for sediment PAH extraction is described in detail by Budzinski et al. (1995). The PAHs elutriate contents were determined in unfiltered and 0.7 μm filtered elutriates, according to Geffard et al. (2001b).

Freeze-dried larvae were homogenized with a hand-held glass grinder in the presence of dichloromethane. Prior the microwave assisted extraction (Budzinski et al., 1995), internal standards (Pyrene, Benzo(e)pyrene, Benzo(a)pyrene, Benzo(g,h,i)perylene perdeuterated), were added in each sample. The extraction conditions were 10 min at 30 W. The organic extract was then filtered, purified on a micro-column containing alumina and fractionated on a micro-column containing silica to collect only the aromatic compounds.

For the PAH extraction, the quality assurance testing was based on the control of blanks. The quantity of each organic compound in the blanks was subtracted from their quantity in each sample, however, only it was < 10 % of its value in the sample. In other cases, the results were not used.

Metals and Metallothionein:

Aliquots of freeze-dried sediment (0.5 g) were taken from the well-homogenised total sample and placed into acid-washed glass tubes. Hot mineralisation (95°C) was performed by addition of 5 ml of 3N HNO₃ and 3 ml of 12N HCl. This process was conducted until dryness and the residues were then resuspended in 10 ml of 1N HCl for metal analysis (Aminot and Chaussepied, 1983). The assays were validated using certified sediment (SD-M-2/TM IAEA Monaco). For the elutriates, the method used is described in Geffard et al. (2001c). Analyses of Cd, Cu and Zn were performed after preconcentration by liquid-liquid extraction, using method described by Danielsson et al. (1982).

Metal and metallothionein extractions in larvae were performed simultaneously. The three replicates of lyophilized larvae were homogenized with a hand-held glass grinder in 0.02 M Tris-NaCl buffer, pH 8.6, at a ratio of 10 ml of buffer/g of larvae (wet weight). Proteolytic reactions and oxidation of MT molecules were avoided by working at 4 °C in the presence of β-mercaptoethanol (10 mmol/l) added to the Tris buffer. Cytosolic (S1) and insoluble (P1) fractions were previously separated by centrifugation (25 000 g, 55 min at 4 °C) after heating at 75 °C for 15 min. A second fraction (S2) containing the MT was thus obtained, as well as a second insoluble fraction (P2) containing heat-sensitive compounds. S2 supernatants were frozen at – 80 °C until MT analysis.

Before metal analysis, an acid digestion step at 60 °C was required for the soluble (S1) and insoluble (P1) fractions. This step lasted for 12 h and involved the addition of Suprapur nitric acid (Carlo Erba) at a ratio of 1 ml/ml of S1 supernatant and 1ml/0.5g of larvae (P1). The solutions obtained were supplemented to a known volume with deionized water.

Chemical analyses

The PAHs were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry according to a protocol described by Baumard and Budzinski (1997). The tri-aromatic compounds (Phe and An) were not used in this study, because their quantities in the blanks were too elevated (between 1 and 3 ng for Phe; 0.1 and 0.2 ng for the An).

Consequently, analyzed PAHs were the following: Fluoranthene (Fluo), Pyrene (Pyr), Benzo(a)Anthracene (BaA), Triphenylene + Chrysene (Triph + Chrys), Benzo(b)Fluoranthene +

Benzo(k)Fluoranthene + Benzo(j)Fluoranthene (BbF + BkF + BjK), Benzo(e)pyrene (BeP), Benzo(a)pyrene (BaP), Perylene (Per), Indenol(1,2,3-cd)pyrene (IP), Benzo(ghi)perylene (BPer) and the Dibenzo(a,h)anthracene (DahA),

After the acid digestion phase, metals were analyzed by flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) for Cu and Zn, or electrothermal AAS with Zeeman (Hitachi Z8200) for Cd (Amiard et al 1987). The total bioaccumulation of metals (QCd, QCu and QZn for Cd, Cu and Zn) in larvae were calculated by summing up the amounts measured in the soluble (QS1) and insoluble (QP1) fractions. The MT larval contents were measured in the S2 fraction by differential pulse polarography (Geffard et al. 2001c).

Statistical analysis

For each series of results, the comparisons of values were tested by *t*-test or one-way ANOVA after homogeneity of variances was checked (Cochran's test), except for PAH concentrations in the larvae, where there is no replicates. Significant differences (at the 95 % level) were then determined by Tukey's test. Linear regressions were performed between metal content and MT in the larvae and correlation coefficients (*r*) determined using Excel software.

Results

Characterisation of the sediments and elutriates (Table 1)

The total PAH concentrations varied by two orders of magnitude between the Arès (31,665 ng/g dry weight) and the Bidassoa sediment (915 ng/g dry weight).

In the unfiltered Arès elutriate, the total PAH concentration was six times higher (0.94 ng/ml) than in the filtered one (0.16 ng/l).

In the unfiltered Bidassoa elutriate, the concentrations of Cd, Cu and Zn were 0.1, 14 and 26 µg/l respectively. Metal concentrations in filtered Bidassoa elutriate are not known, because the sample was lost.

Embryotoxicity of the sediment treatments (Fig 1)

The percentages of abnormal larvae in controls ranged from 5 to 9.3 %. Arès and Bidassoa whole sediments had similar effects (27 % and 32 % abnormalities respectively at 5g/l, the highest concentration tested).

At 100%, the Bidassoa elutriate (340 g/l) had greater effects (43 % abnormalities) than the Arès elutriate (27 % abnormalities). At 50% elutriate (163 and 170 g/l for Arès and Bidassoa

respectively) Arès (17 % abnormalities) and Bidassoa (14.6 % abnormalities) elutriates had significant biological effects, the values being however under the 20% threshold level of toxicity.

PAH bioaccumulation and distribution in larvae with the Arès sediment

PAHs in larvae increased with increasing concentrations of both treatments (whole sediment and elutriate, Fig 2). In controls, the PAH concentrations in larvae ranged from 0.04 to 0.06 µg/g. At the highest tested concentrations, PAHs in the larvae were 307 ng/g dry weight (whole sediment) and 370 ng/g dry weight (elutriate); in both cases, the PAH bioaccumulation factors (ratio between the PAH concentration in larvae and PAH concentration in sediment treatments), were negatively correlated with the log Kow : the correlation coefficients (r^2) were 0.73 (whole sediment), 0.66 (unfiltered elutriate) and 0.51 (filtered elutriate)

The relative concentrations (%) of the tetra (Fluo + Pyr + BaA + Triph + Chrys; m/z of 202 and 228), penta (BbF + BkF + BjF + BeP + BaP + Per; m/z of 252) and hexa-aromatic (IP + Bper + DahA; m/z of 276 and 278) PAHs in Arès sediment, unfiltered and filtered elutriate are indicated on figure 3A. In all cases, the tetra-aromatic PAHs were more abundant (\cong 50%) than the penta-aromatic PAHs (\cong 35%) which were, in turn, more abundant than the hexa-aromatic PAHs (\cong 15%). Sediment and unfiltered elutriate presented similar PAH profiles. On the contrary, the lowest molecular weight PAHs were more abundant in the filtered elutriate.

The average tetra, penta and hexa-aromatic PAH percentages (\pm S.D.) in larvae exposed to the different whole sediment concentrations are shown in figure 3B. The lowest molecular weight PAHs are more abundant in larvae (80 % of total PAHs) than in the sediment itself (45% of the total PAHs). With both elutriates, the PAH distribution in larvae and elutriates were similar (Fig 3C).

The ratio between BeP and BaP (Bep/BaP), an index of a possible PAH metabolization by larvae is < 1 in the different sediment treatments, but on the contrary > 1 in contaminated larvae (Table 2).

Metal bioaccumulation and MT induction in larvae with the Bidassoa sediment

The total and cytosolic metal concentrations in larvae reared in the presence of the two Bidassoa sediment treatments are in figure 4.

The concentration of total Cd (QCd; Fig 4A) in larval tissue increased as a function of the whole sediment and elutriate concentrations and became significant for concentrations above 2.5 g/l ($p = 0.0016$) in the presence of whole sediment and above 170 g/l in the presence of elutriate ($p = 0.0042$).

The concentration of total Cu (QCu; Fig 4B) in larvae increased as previously with increasing concentrations of the two sediment treatments. It was significantly different after exposure to a concentration of 2.5 g/l ($p = 0.0073$) with the whole sediment and of 85 g/l ($p = 0.0012$) with the elutriate. For Zn (QZn; Fig 4C), a significant increase was observed only after an exposure to the whole sediment ($p = 0.0008$) above 0.6 g/l.

In every case the total concentration in the ambient environment of each metal was significantly ($r > 0.75$) correlated with the concentration in the cytosolic fraction. But for Cd and Cu, the cytosolic bioaccumulation was more effective.

MT increased significantly ($p < 0.001$) in larvae exposed to 1.25 g/l Bidassoa whole sediment and above. On the contrary, in the presence of elutriate, the observed MT induction was not significant. ($p = 0.0832$).

The relationship between MT and metal concentrations in larvae was studied for each different metal, in the cytosolic fraction (Table 3). It was significant for Cd and Cu for both sediment treatments and for Zn only for the whole sediment.

Discussion

As previously mentioned (Geffard et al., 2001a), Arès sediment is characterized by a high PAH contamination and Bidassoa sediment by a heavy metal contamination. In Arès sediment, the different PAH level was higher than the ERL (effect range-low) values of Long et al. (1995), above which toxicity can be occasionally observed. In the same way, in Bidassoa sediment, the Cu and Zn concentrations were over the ER-L levels of the same authors.

On an analytical point of view, if we compare the contamination of the Arès and Bidassoa elutriates with the data of Law et al. (1997), and Fernandes et al. (1997) for natural brackish water and with those of Geffard al. (2001c) for elutriates of contaminated sediments, Arès and Bidassoa elutriates were characteristic of a PAH and a metal contamination respectively. Consequently, the contamination levels of the two tested elutriates are relevant with field data for sea waters in the most contaminated coastal areas.

Embryotoxicity of the sediments

In previous data (Chapman and Fink, 1984 ; and Geffard et al., 2001b), it was shown that the whole sediment treatments had biological effects at lower concentrations than the elutriates.

Biological effects being higher than the 20 % abnormalities threshold at the highest concentrations tested of Arès and Bidassoa whole sediment and elutriates, the larval rearing in such conditions, were not used in the present study for chemical and biochemical studies.

PAH bioavailability and toxicity (Arès sediment)

The PAH levels in the larvae increased with the whole sediment and elutriate concentrations tested, indicating that these pollutants were available during the *C. gigas* embryonic development (figure 2).

Connell et al. (1999) for PAHs and Borgmann (2000) for heavy metals have shown that the body concentration measurements of pollutants represent a powerful tool for predicting biological effects. In the present study and with the two sediment treatments, PAH internal concentrations of 0.3 µg/g (dry weight) in larvae represented the maximum level above which biological effects (abnormalities) could be observed, this value being the critical body PAH concentration for *C. gigas* larvae. Estimated in µmol/g wet weight of larvae, this concentration ($\cong 0.016$) is in agreement with the critical body burden for nonionic organic compound concentrations (0.01 – 6 µmol/g wet weight) above which sublethal effects are observed for most vertebrate and invertebrate species (Connell et al., 1999). This value corresponds also to the threshold level for adult mussels, above which, they cannot regulate but accumulate PAHs (Baumard et al., 1998).

The proportion of the tetra, penta and hexa-aromatic PAHs in the different sediment treatments and larvae were compared to study their different bioavailability and metabolism by *C. gigas* larvae.

Previous data on *C. gigas* embryotoxicity experiments with Arès sediment (Geffard et al., 2001a) showed that unfiltered and filtered elutriates had the same biological effects, suggesting that the toxicity was mostly due to soluble PAHs. This explains the observations on the chemical differences between unfiltered and filtered elutriates, with regard to the proportions of tetra, penta and hexa-aromatics PAHs in both elutriates, as compared to whole sediment concentrations.

In the unfiltered elutriate, 84 % of the total PAHs were adsorbed to suspended particulate matter involving that sediment and unfiltered elutriate present similar PAH distribution.

The filtered elutriate was enriched with lowest molecular weight PAHs as compared to whole sediment and unfiltered elutriate. During the elutriation procedure, the release of dissolved PAHs seemed to be ruled by the water solubility of the each compound, also represented by the

octanol-water coefficient (Kow, Karickhoff et al., 1979). The lowest molecular weight PAHs were more soluble than the heaviest ones and were probably more intensively released.

Concerning the bioassays with the whole sediment, despite the direct contact between embryos and the sediment, the PAH profiles in whole sediment and larvae were very different. The larvae were particularly enriched in the lowest molecular weight PAHs that represent 80 % of the total PAHs, indicating that the bioavailability of PAH is in this case also ruled by their solubility (Kow). These results are in agreement with those of Porte and Abaigés (1993) and Baumard et al. (1999) who found that the concentrations of the lowest molecular weight PAHs in bivalves and fishes are higher than those of the heaviest molecular weight compounds.

The bioavailability and toxicity of hydrophobic organic contaminants from sedimentary origin depends on the quantity and quality of organic matter in the sediment (Di Toro et al., 1991; Baumard et al., 1998; Fleming et al., 1998; Ferguson and Chandler, 1998). Arès sediment is characterized by a high organic matter concentration (9.7 %, Geffard et al., 2001a : Table 1); this may explain the weak bioavailability of heavier molecular weight PAH.

The PAH distribution in the larvae exposed to the unfiltered elutriates was slightly different from the distribution in the elutriate itself but similar to that of the filtered elutriate, indicating that the soluble fraction of PAHs only is available to the embryos. This explains our previous data (Geffard et al., 2001a) concerning the same effects observed on *C.gigas* larvae in the presence of both filtered and unfiltered elutriates, indicating that the toxic effects are exclusively induced by the soluble fraction of this type of contaminants.

If we consider the relative concentrations of BeP/BaP in the different sediment treatment and in the larvae, BeP concentrations in larvae are higher than BaP concentrations, as compared to whole sediment and unfiltered and filtered elutriates. Adult mussels exposed to the same concentrations of the two compounds, presented higher BeP than BaP concentrations (Baumard et al., 1998). This same greater BeP/BaP proportion in the larvae as compared to the relative proportion in the elutriate may be due to preferential metabolism of BaP in comparison to BeP. Despite the fact that metabolism of organic compound is lower in bivalves than in other taxa, these results show that oyster larvae can metabolise organic compounds ; Michel et al. (1995) and Borchet et al. (1997) showed that the bivalves *Mytilus galloprovincialis* and *Sphaerium corneum* accumulate and metabolise BaP and can produce various metabolites.

Heavy metals bioavailability and toxicity (Bidassoa sediment)

The bioavailability of metals (Cd, Cu and Zn) from the two sediment treatments was studied by determining the total metal larval contamination and by measuring the MT induction in larvae.

After a 24h exposure, metal concentrations in tissues as well in the cytosol (except for the Zn), increased as a function of the metal contamination level in the experimental medium where larvae were reared. As for PAH contamination, the critical body concentration for each metal was calculated ; it was respectively 0.6, 13 and 50 µg/g for the Cd, Cu and Zn. These values in *C. gigas* larvae, are under those found by Geffard et al. (2001c), for Cd and Zn in mussel *Mytilus galloprovincialis* larvae and by Radenac et al. (2001) in *Paracentrotus lividus* larvae ; it must be pointed out that in the sea urchin larvae the abnormality rates recorded by Radenac et al. (2001) were important in some batches; this may impede the data presented on the bioaccumulation of heavy metals by *P. lividus* larvae.

The bioavailability of sediment-associated metals are equally shown by an induction of the MT in oyster larvae, which clearly correlated to metal contamination levels (Table 3). The MT levels in the larvae exposed to Bidassoa whole sediment and unfiltered elutriate, increased, being only significant in the presence of whole sediment. This difference may be explained by a cytosolic metal concentration lower in larvae exposed to the elutriate, particularly for the Zn, as compared to those exposed to whole sediment (Fig. 4).

According to Pavicic et al. (1994) and Geffard et al. (2001c), the results obtained with the whole sediment confirm that MT constitute a more precocious response than the percentage of abnormal larvae used with the embryo-toxicity tests. The highest MT concentrations observed for whole sediment concentration of 1.25 and 2.5 g/l (Fig. 5) indicated that the maximal detoxification processes involve probably the MT induction.

In the presence of the Bidassoa unfiltered elutriate, despite the good correlation between the metal concentrations in the cytosolic fraction (Except for the Zn) and the MT levels of the larvae (Table 3), significant biological effects (% of abnormal larvae) appeared before significant MT induction. This may indicate that the metal contamination do not explain totally the toxicity observed, other toxic substances probably disturbing the embryonic development. For instance, the principal bias observed in bioassays with elutriates is ammonia that has been identified as the principal toxicant (Ankley et al., 1990; Huber et al., 1997; van Sprang and Janssen, 1997) in several

sediment quality studies. This compound is highly toxicity to marine organism (Kohn et al., 1994) particularly to embryos and larvae of *Cassostrea gigas* (Geffard et al., 2001a).

CONCLUSION

Sediment-associated PAHs and heavy metals are really available, as indicated by their accumulation in *C. gigas* larvae and by the abnormalities induced during larval development, confirming the choice of this biological model as a sensitive tool to evaluate the “biological quality” of contaminated sediments (Geffard. et al., 2001a and b).

The two adopted sediment treatments (whole sediment and elutriate) allow the evaluation of the sediment biological quality. The interpretation of the results concerning the bioavailability of contaminants is easier with the whole sediment treatment.

For the first time, PAH and metal critical body concentrations for *C. gigas* embryos and larvae, one of the most sensitive organism used in marine ecotoxicology, were determined.

On the other hand, MT induction in oyster larvae constitutes a very precocious tool for evaluating the environmental contamination by metal from sedimentary origin. Further investigations are needed to develop such a specific biomarker of a PAH contamination in this same sensitive bivalve species.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Ledu (IFREMER La Tremblade) for supplying the mature oysters and Dr C. Amiard-Triquet and Dr JC. Amiard (University of Nantes) for the determinations of MT.

REFERENCES

- Amiard, J.C., Pineau, A., Boiteau, H.L., Métayer, C., Amiard-Triquet, C., 1987. Application de la spectrométrie d'absorption atomique Zeeman aux dosages de huit éléments traces (Ag, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Se) dans les matrices biologiques solides. *Wat. Res.* 21,693-697.
- Aminot, A., Chaussepied, M., 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu Marin. CNEXO, BNDO/Documentation Brest, 395 pp.
- Ankley, G.T., Katko, A., Arthur, J.W., 1990. Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the Lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environ. Toxicol. Chem.* 9,313-322.
- ASTM, 1992. Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity tests with marine and estuarine amphipods (includes annexes on procedures for following organisms : *Ampelisca abdita*, *Eohaustorius estuarius*, *Grandidierella japonica*, *Leptocheirus plumulosus* and *Rhepoxinius abronius*). In . ASTM, 1993, Annual Book of Standards, 11.04, E1367-92. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia,
- Baumard, P., Budzinski, H., 1997. Internal standard quantification method and gas chromatography – mass spectrometry (GS-MS): a reliable tool for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analisis* 25,246-252.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., 1998. PAHs in Arcachon Bay, France: Origin and Biomonitoring with Caged Organisms. *Mar. Pollut. Bull.* 36,577-586.
- Baumard, P., Budzinski, H., Garrigues, P., Narbonne, J.F., Burgeot, T., Michel, X., Bellocq, J., 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) burden of mussels (*Mytilus sp.*) in different marine environments in relation with sediment PAH contamination, and bioavailability. *Mar. Environ. Res.* 47,415-439.
- Borchert, J., Karbe, L., Westendorf, J., 1997. Uptake and Metabolism of Benzo(a)pyrene Absorbed to sediment by the Freshwater Invertebrate species *Chironomus riparius* and *Sphaerium corneum*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 58,158-165.
- Borgmann, U., 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquatic Ecosystem Health & Management.* 3,277-289.
- Budzinski, H., Papineau, A., Baumard, P., Garrigues, P., 1995. Extraction assistée par chauffage microondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *C. R. Acad. Sci. Paris.*, 321, série IIb, 69-76.
- Burgess, R.M., Morrison, G.E., 1994. A short-term exposure, sublethal, sediment toxicity test using the marine bivalve *Mulinia lateralis* : statistical design and comparative sensitivity. *Environ. Toxicol. Chem.* 13,571-580.
- Cardwell, R.D., Woelke, C.E., Carr, M.I., Sanborn, E.W., 1976. Sediment and elutriate toxicity to oyster larvae. In Krenkel, P.A., Harrison, J., Burdick, J.C. (Eds.), *Proceedings of the Special Conference on Dredging and its environmental effects*, New York : American Society of Civil Engineers.
- Carr, R.S., Williams, J.W., Fragata, C.T.B., 1989. Development and evaluation of a novel marine sediment pore water toxicity test with polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 8,533-543.
- Chapman, P.M., 1990. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci. total. Environment.* 97/98,815-825.
- Chapman, P.M., Fink, R., 1984. Effects of Puget Sound Sediments and their elutriates on the life cycle of *Capitella capitata*. *Bull. Environ. Comtam. Toxicol.* 33,451-459.

- Chapman, P.M., Morgan, J.D., 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 31,438-444.
- Connell, D.W., Chaisuksant, Y., Yu, J., 1999. Importance of Internal Biotic Concentrations in Risk Evaluations with Aquatic Systems. *Mar. Pollut. Bull.* 39,54-61.
- Crane, M., Newman, M.C. 2000. What level of effect is a no observed effect? *Environ Toxicol Chem* 19(2):516-519.
- Danielsson, L.G., Magnusson, B., Westerlund, S., Zhang, K. 1982. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Anal Chim Acta* 144:183-188.
- Di Toro, D.M., Zarba, C.S., 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.
- Eertman, R.H.M., Groenink-van Emstede, M., Sandde, B., 1993. The effects of the polycyclic aromatic hydrocarbons fluoranthene and benzo(a)pyrene on the mussel *Mytilus edulis*, the amphipod *Bathyporeia sarsi* and larva of the oyster, *Crassostrea gigas*. BEON-Efecten, DGW-NIOO, 50p.
- Ferguson, P.L., Chandler, G.T., 1998. A laboratory and field Comparison of Sediment Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Bioaccumulation by Cosmopolitan Estuarine Polychaete *Streblospio benedicti* (Webster). *Mar. Environ. Res.* 45(4/5),387-401.
- Fernandes, M.B., Sicre, M.A., Boireau, A., Tronczynski, J., 1997. Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) Distributions in the Seine River and its Estuary. *Mar. Pollut. Bull.* 34,857-867.
- Fleming, R.J., Holme, D., Nixon S.J., 1998. Toxicity of permethrin to *Choronomus riparius* in artificial and natural sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 17(7),1332-1337.
- Geffard, O., Budzinski, H., Augagneur, S., Seaman, M.N.L., His, E., 2001a. Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environ. Toxicol. Chem.* 20(7),1605-1611.
- Geffard, O., Budzinski, H., His, E., Seaman, M.N.L., Garrigues, P., 2001b. Relationships Between Contaminant Levels in Marine Sediments and their Biological Effects upon Embryos of Oysters, *Crassostrea gigas*. *Environ. Toxicol. Chem.* (submitted paper).
- Geffard, A., Geffard, O., His, E., Amiard, J.C., 2001c. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* (in press).
- His, E., Beiras, R., Seaman, M.N.L., 1999. The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv. Mar. Biol.* 37,1-178.
- His, E., Seaman, M.N.L., Beiras, R., 1997a. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Water. Res.* 31,351-355.
- Holland, D.L., Hannant, P.J., 1973. Addendum to a micro-analytical scheme for the biochemical analysis of marine invertebrate larvae. *J. Mar. Biol. Assoc.* 53,833-838.
- Huber, M., Pelletier, C., Charles, J.B., Burgess, R.M., 1997. Ammonia tolerance of the bivalve *Mulinia lateralis* sublethal toxicity test. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 59,292-297.
- Karickhoff, S.W., Brown, D.S., Scott, T.A., 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Wat. Res.* 13,241-248.
- Kohn, N.P., Word, J.Q., Niyogi, K., Ross, L.T., Dillon, T., Moore, D.W., 1994. Acute toxicity of ammonia to four species of marine amphipods. *Mar. Env. Res.* 38,1-15.
- Law, R.J., Dawes, V.J., Woohead, R.J., Matthiessen, P., 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Seawater around England and Wales. *Mar. Pollut. Bull.* 34,306-322.

- Long, H.R., Buchman, M.F., Bay, S.M., Bretler, D.J., Chapman, P.M., Hose, J.E., Lissner, A.L., Scott, J., Wolte, D.A., 1990. Comparative evaluation of five toxicity tests with sediment from San Francisco Bay and Tomales Bay, California. *Environ. Toxicol. Chem.* 9,1193-1214.
- Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D., 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ. Management.* 19,81-97.
- Matthiessen, P., Bifield, S., Jarrett, F., Kirby, M.F., Law, R.J., McMinn, W.R., Sheahan, D.A., Thain, J.E., Whale, G.F., 1998. An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, UK by means of bioassays. *Mar. Environ. Res.* 45(1),1-15.
- Melzian, B.D., 1990. Toxicity assessment of dredged materials : acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In Alzieu, C., Gallenne, B., (Eds.), *Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities*, 27 November-1 December 1989, Nantes, France. 49-64
- Michel, X.R., Beasse, C., Narbonne, J.F., 1995. In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28,215-222.
- Miller, B.S., Pirie, D.J., Redshaw, C.J., 2000. An assessment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. *Mar. Pollut. Bull.* 40(22),22-36.
- Pavicic, J., Skreblin, M., Kregar, I., Tusek-Znidaric, M., Stegnar, P., 1985. Formation of inducible Cd-binding proteins in selected organs and developmental stages of *Mytilus galloprovincialis*. *VII^{es} Journées Etud. Pollut.* C. I. E. S. M., Lucerne, 1984, 699-705.
- Pavicic, J., Skreblin, M., Kregar, I., Tusek-Znidaric, M., Stegnar, P., 1994. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to the elevated sea water metal concentrations-I.Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level *Comp. Biochem. Physiol.* 107(2),249-257
- Porte, C., Albaigés, J., 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans and fishes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26,273-281.
- Radenac, G., Fichet, D., Miramand, P., 2001. Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea urchin embryo. *Mar. Environ. Res.* 51,151-166.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E., 1996. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140,356-363.
- Roesijadi, G., Hansen, K.M., Unger, M.E., 1997. Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aquat. Toxicol.* 39,185-194.
- Stebbing, A.R.D., Akesson, B., Calabrese, A., Gentile, J.H., Jensen, A., Lloyd, R., 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapports et Procès-verbaux des Réunions du Conseil International Permanent pour l'Exploitation de la Mer* 179,322-332.
- Van Sprang, P.A., Janssen, C.R., 1997. Identification and confirmation of ammonia toxicity in contaminated sediments using a modified toxicity identification evaluation approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 16(12),2501-2507.
- Woelke, C.E., 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. Washington Dept. of Fisheries, Tech. Rep. 9,1-93.

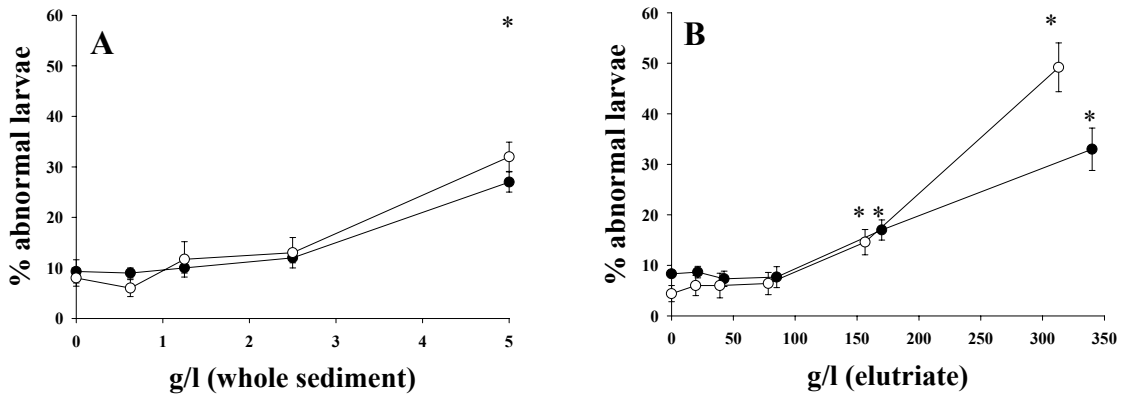


Figure 1 : Whole sediment (A) and elutriate sediment (B) *Crassostrea gigas* embryotoxicity. Percentages of abnormal larvae (\pm 95 % confidence intervals). ● : Arès sediment ; ○ : Bidassoa sediment. * : abnormal larvae (%) significantly higher than in controls.

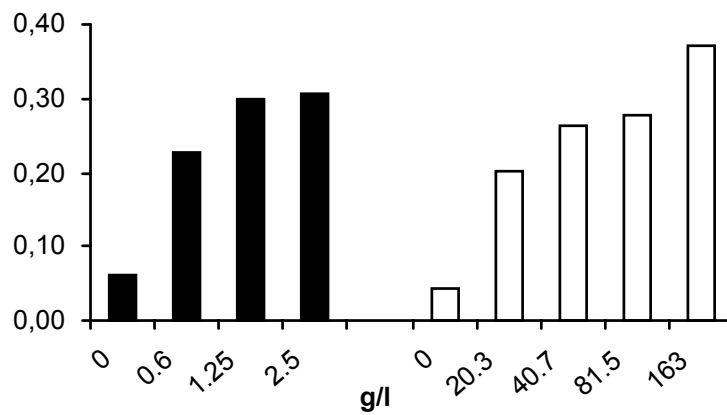


Figure 2 : Concentrations of total PAHs in *C. gigas* larvae (ng/g dry weight) after an exposure to a range of Arès whole sediment (black bars) and elutriate (white bars) concentrations.

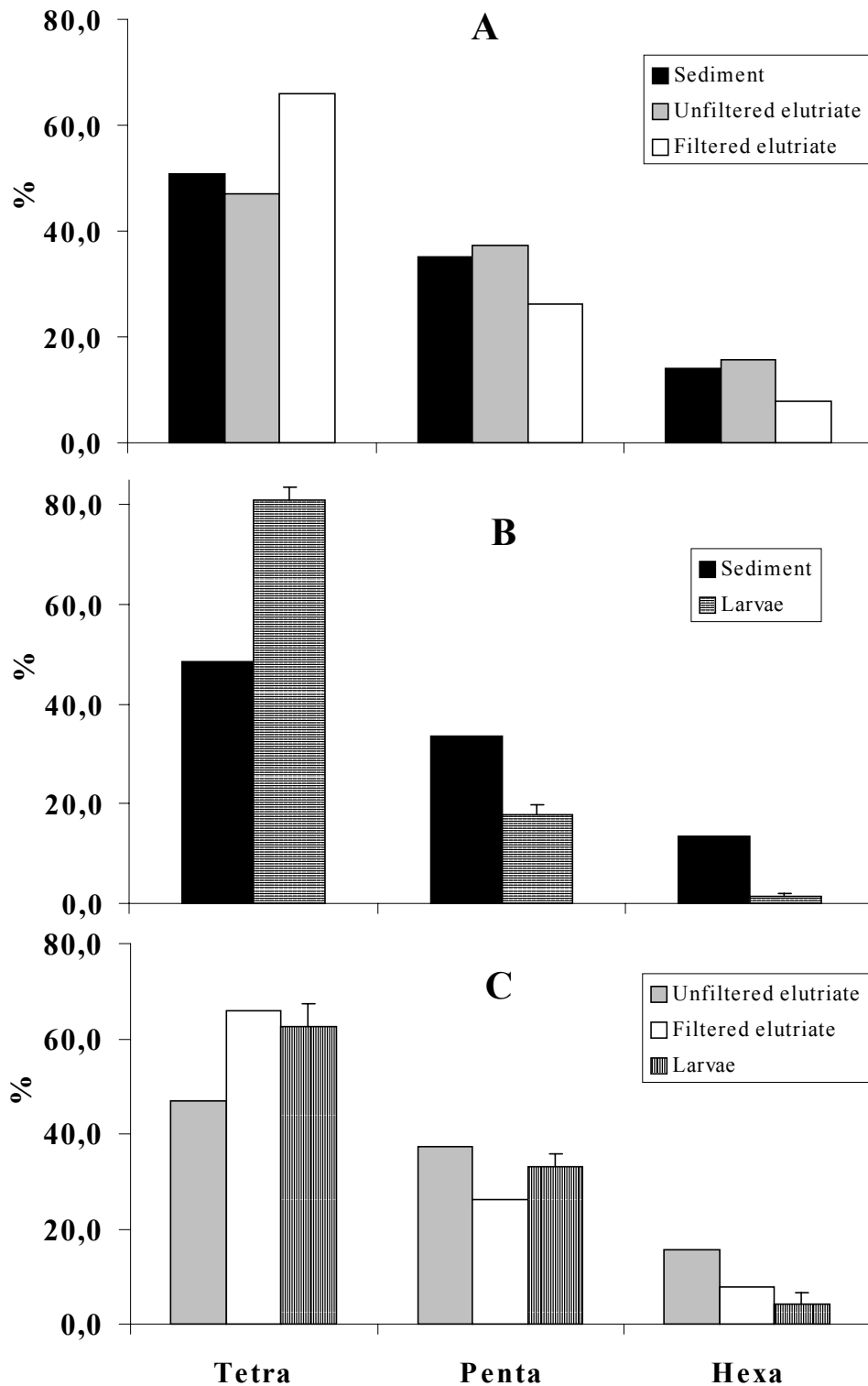


Figure 3 : Relative contents (%) of tetra, penta and hexa-aromatic compounds in the different Arès sediment treatments and larvae.

- A : In Arès sediment and its unfiltered and filtered elutriates
- B : In Arès sediment and larvae exposed to it
- C : In Arès unfiltered and filtered elutriates and in larvae exposed to unfiltered elutriate

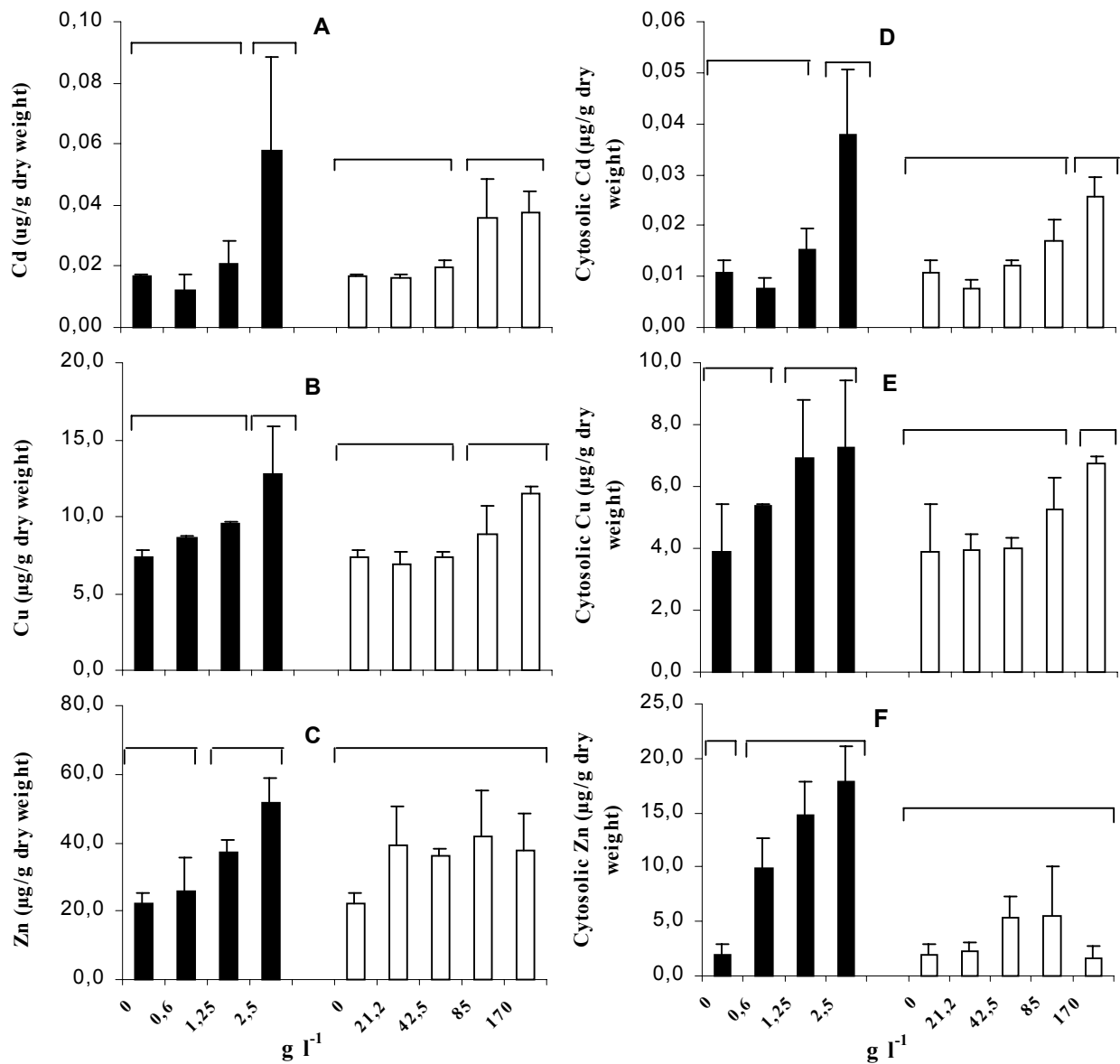


Figure 4 : Total Cd (A), Cu (B), Zn (C) concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight \pm SD) and cytosolic Cd (D), Cu (E) and Zn (F) concentrations ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight \pm SD) in oyster larvae after exposure to a range of Bidassoa whole sediment (black bars) and elutriate concentrations (white bars). Values not significantly different one from other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey test).

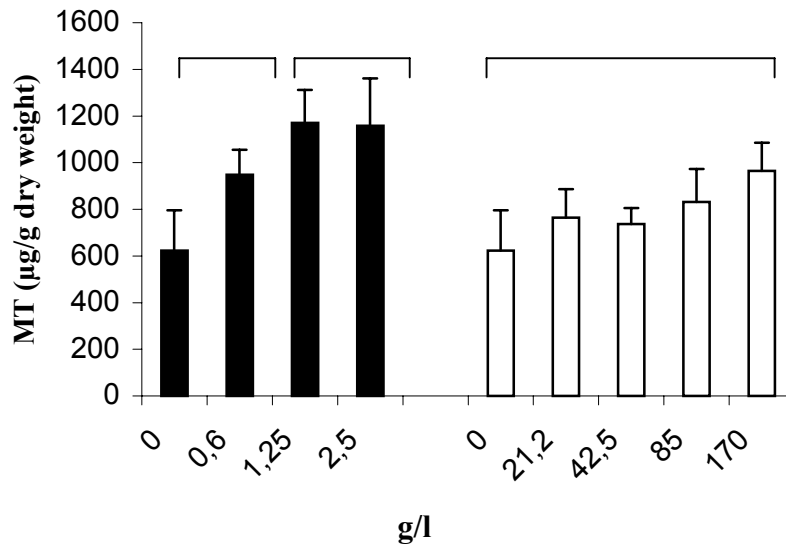


Figure 5 : Metallothionein contents ($\mu\text{g/g}$ dry weight \pm SD) in the oyster larvae reared in the presence of a range of *Bidassoa* whole sediment (black bars) and elutriate (white bars) concentrations. Values not significantly different one from other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey test).

Table 1: Concentrations of PAHs (in ascending order of molecular weight) in the sediments and elutriates obtained from Arès; sediment concentrations of heavy metals in the tested sediments. Compounds for which Long et al. (1995) provide effect ranges are underlined; * = value exceeds ER-L (Effect Range-Low); ** = value exceeds ER-M (Effect Range-Medium).

<i>Sample</i>	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (ng/g dry weight)							
	Fluo	Pyr	BaA	<u>Triph</u> + <u>Chrys</u>	<u>BbF</u> +<u>BkF</u>+ <u>BjF</u>	BeP	BaP	Per
<i>Sediments</i>								
Arès	**5,28	*3,95	**3,53	**3,322	5,331	1,757	**2,58	710
	5	1	6				5	
Bidassoa	112	89	56	75	154	66	72	43
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (ng/ml)								
<i>Elutriates</i>								
<i>Arès sediment</i>								
Unfiltered	0.152	0.149	0.059	0.082	0.164	0.065	0.084	0.025
Filtered	0.035	0.036	0.015	0.022	0.020	0.009	0.010	0.003
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (ng/g dry weight)								
<i>Sample</i>	Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (ng/g dry weight)				Heavy metals (ng/g dry weight)			
	IP	BP	DA	Σ PAH	Cd	Cu	Zn	
<i>Sediments</i>								
Arès	2,299	2,170	**720	31,665	0.08	9	80	
Bidassoa	68	13	65	813	0.84	*83	*328	
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (ng/ml)								
<i>Elutriates</i>								
<i>Arès sediment</i>								
Unfiltered	0.073	0.075	0.014	0.941	0.1	14	26	
Filtered	0.005	0.007	0.001	0.164				
<i>Bidassoa sediment</i>								

Table 2 : values of the BeP/BaP(benzo(e)pyrene concentration against benzo(a)pyrene concentration) in Arès sediment, in Arès unfiltered and filtered elutriate and in larvae exposed to these sediment treatments (mean of the ratio for each tested concentration \pm S.D).

Sediment	Unfiltered elutriate	Filtered elutriate	Larvae exposed to sediment	Larvae exposed to elutriate
0.66	0.76	0.95	2.3 ± 0.3	2.7 ± 0.3

Table 3 :Equation of the relation between cytosolic concentrations of Cd, Cu, Zn or Cd + Cu + Zn and MT in larvae after exposure to a range of whole sediment or elutriate concentrations of Bidassoa sediment. n : number of samples. r^2 : correlation coefficient. * and ** show that the relation is significantly correlated at 95 and 99 % respectively.

		Equation	n	r^2
Cd	Whole sediment	$Y = 13693x + 730.5$	12	0.304*
Cu	Whole sediment	$Y = 117.2x + 279.8$	12	0.733**
Zn	Whole sediment	$Y = 30.52x + 603.9$	12	0.438**
Cd	Elutriate	$Y = 8532.2x + 672.8$	15	0.262*
Cu	Elutriate	$Y = 100.1x + 330.9$	15	0.748**
Zn	Elutriate	$Y = -21.81x + 825.2$	15	0.106

Publication n°8 :

Effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of the pollutants from sedimentary origin.

O. Geffard, H. Budzinski, E. His

Le relargage, la bio-disponibilité et la toxicité des contaminants sédimentaires, lors de la remise en suspension d'un sédiment, ont été examinées en étudiant concomitamment leur effet sur le développement embryonnaire et la croissance des huîtres *Crassostrea gigas*, ainsi que leur accumulation par ces organismes. Trois sédiments types ont été sélectionnés (un contaminé par les HAP, un second par les métaux et le dernier par les deux types de polluants). Les organismes ont été soit directement exposés aux éluviats obtenus à partir de chaque sédiment, soit nourris à l'aide d'algues (*Isochrysis galbana*), contaminées avec les mêmes éluviats. Les éluviats utilisés dans cette étude montrent des niveaux de contamination similaires à ceux observés dans des zones côtières ou estuariennes contaminées. Le test de croissance larvaire est plus sensible que le test d'embryotoxicité. Les effets biologiques et les accumulations en contaminants sont plus importants chez les larves directement exposées aux différents éluviats que chez celles nourries à l'aide des algues contaminées. Dans le cas des HAP, la contamination des algues est suffisante pour entraîner un effet sur la croissance larvaire de l'huître *Crassostrea gigas*. Dans tous les cas, une fraction des contaminants adsorbés sur les particules en suspension est bio-disponible et accumulée par les larves. Ces travaux montrent que la remise en suspension d'un sédiment contaminé constitue un danger pour les organismes pélagiques et que le test de croissance larvaire chez *C. gigas* peut être utilisé pour l'étude des zones sensibles.

Mots clés : *Crassostrea gigas*, test de croissance larvaire, HAP, métaux lourds, bio-accumulation, bio-disponibilité

The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bio-accumulation by the larvae of the pollutants from sedimentary origin.

Geffard O.^{1*}, Budzinski H.², His E.¹

¹ IFREMER, DEL/PC, Station d'Arcachon, Quai Silhouette, 33120 Arcachon, France.

² Laboratoire de Physico-Toxicochimie des Systèmes Naturels, Université de Bordeaux 1, 33405 Talence, France.

ABSTRACT

The release, bio-availability and toxicity of contaminants, when sediments are resuspended have been examined, studying concurrently their effects on the embryogenesis and on the larval growth of the *Crassostrea gigas* larvae and their bio-accumulation in those organisms. Three characteristic sediments have been selected (one contaminated by PAHs, a second by heavy metals and the last by the both pollutants). The organisms were directly exposed to elutriates obtained from each sediment or fed on algae (*Isochrysis galbana*) contaminated by the same elutriates. The elutriates used in this study show contamination levels similar to those observed in coastal and estuary polluted areas. The larval growth test appeared to be more sensitive than the embryotoxicity test. Biological effects and contaminant bio-accumulations were more important when larvae were directly exposed to different elutriates than fed on contaminated algae. In the case of PAH, the contamination of algae was sufficient to lead to effect on the larval growth of the *Crassostrea gigas*. In each case, a fraction of contaminants adsorbed on suspended particles was bio-available and accumulated by the larvae. This study shown that resuspending polluted sediments constitutes a threat to pelagic organisms and than the *C. gigas* larval growth may be proposed as a test to protect the most sensitive areas.

Key words : *Crassostrea gigas*, larval growth test, PAH, heavy metals, bio-accumulation, bio-availability

* Corresponding author.

Tel : +33 (0) 5 57 72 29 87

Fax : +33 (0) 5 57 72 29 81

E-mail : ogeffard@ifremer.fr

INTRODUCTION

Persistent contaminants of anthropogenic origin ultimately enter in coastal areas and estuaries and may have short term (heavy metals, chlorophenol) or long term lethal effects (PCB, PAH ; Burton, 1992).

Sediment deposits, between continental and oceanic areas, may accumulate most of such contaminants constituting a threat for the biota (Chapman and Long, 1983). In the United States, it is estimated that roughly 10 % of the sediments from nation's lakes, rivers, estuaries and bays are contaminated with toxic chemicals that can adversely affect aquatic organisms, or impair the health of humans or wildlife who eat contaminated fish and shellfish (McCauley et al., 2000 ; Long, 2000).

Assessing the "biological quality" of the aquatic environment, and particularly that of the sedimentary compartment, is now a major necessity for many countries in the world. Benthic and epibenthic species are the most exposed to contaminants of sedimentary origin, and to those which are adsorbed on sedimentary particles as well as to those which are dissolved in the interstitial water. Bioassays, more or less standardized, to study the effects of the sedimentary contamination on benthic organisms have been developed during the two last decades, using amphipods, polychaetes, copepods, annelids and adults or embryos of bivalves (Chapman and Morgan, 1983 ; Carr et al., 1989, Eertman et al., 1993 ; Matthiessen et al., 1998 ; His et al., 1999a ; Geffard et al., 2001a).

On the other hand, contaminants from sedimentary origin may also constitute a threat for pelagic organisms, when they are released in the water column, dissolved in the water or adsorbed on particles (direct contamination), but also by contamination of the food chain (Burgess & Scott, 1992 ; Burgess et al., 1993).

The contamination of the water column occurs directly by diffusion, but also principally when sediments are resuspended, on one hand by natural factors such as bioturbation (Burgess et al., 1993 ; Peterson et al., 1996 ; Ciarelli et al., 1999, 2000), by storms, wave and tide action, principally in marine coastal areas which are particularly exposed to continental contaminants and on the other hand by human activities, in particular dredging operations (Chapman et al., 1998).

The remobilization of contaminants when sediments are resuspended is a complex phenomenon, constituted by release and removal mechanisms (Saulnier et Mucci, 2000). In general, a small part of metals only is released in the water column (Kwan et Dutka, 1996 ; Van den Berg et al., 2001) ; it is therefore necessary to develop sensible tools for assessing the long term effects of such contaminants.

Bivalve embryos and larvae, and particularly those of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, are one of the most used in marine bioassays, as a consequence of their high sensitivity to micro-pollutants (His et al., 1999b ; McPherson et Chapman, 2000). Embryos generally support the effects of the soluble fraction of contaminants (Geffard et al., 2001a), while larvae are also exposed to contamination by ingesting particles.

The biological quality of the environment is assessed by bioassays which however do not identify the contaminants responsible for the toxicity. On the other hand, the bio-availability of contaminants depends on many factors such as the properties of the contaminant itself, the characteristics of the environment and that of the organism used in the bioassay (Borgmann, 2000). One way for studying the bio-availability of contaminants is to evaluate their accumulation in organisms, taking into account in that way the different factors that control bio-availability (Connell et al., 1999 ; Borgmann, 2000).

The aim of the present study was to evaluate the toxicity and the bio-availability of contaminants from sedimentary origin, when contaminated sediments are resuspended, by using *C. gigas* embryotoxicity and larval growth experiments, and by measuring the bio-accumulation of the micro-pollutants in those organisms.

We selected three characteristic sediments as defined by Geffard et al. (2001b), two from coastal zones (Arès and Bidassoa) that are contaminated by PAH and heavy metals respectively and a port sludge from Dunkerque, that is contaminated by both pollutants.

Sediment elutriates were prepared ; one part of the oyster larvae were exposed to different concentrations of them (direct exposure) and the other part was fed on monocellular algae (*Isochysis galbana* Parke) cultivated at different elutriate concentrations (indirect contamination).

MATERIAL AND METHODS

Sediments

Sampling and conservation

Bidassoa and Arès sediments were sampled on July and August 1999 respectively with a plastic blade. Only the oxidized part (2 first centimeters) of the sediments was collected, corresponding to the fraction which may be resuspended during tidal movements or during storms. The port sludge (Dunkerque) was collected with a stainless steel Van Veen grab.

Immediately after sampling, the sediments were sieved at 2 mm to eliminate debris and then homogenized and stocked in glass bottles. One part of each sediment was freeze-dried for chemical analyses and another part was stored in the dark at 4°C for less than a week prior to be used in the bioassays.

Sediment treatment

Elutriates were prepared by a modification of Melzian's method (1990). The fresh sediments were mechanically shaken (multi-wirst shaker, 500 rpm) in filtered (0.2 µm) seawater (FSW) at a ratio of 1:4 (sediment/water) for 8 h, and allowed to settle for another 8 h before recuperating the supernatant (elutriate).

Larvae were exposed to unfiltered elutriate (UFE) and *I. galbana* were cultured in the presence of filtered elutriate (FE; 0.7 µm: GF/F Whatman), to avoid any bacterial development. Larval growth experiments were respectively conducted during 7, 9 and 10 days for Dunkerque, Arès and Bidassoa elutriates, depending on the larval survival. The elutriates were changed every two days, at this time, 250 ml of FSW (controls) and 250 ml of FE and of UFE were collected for analysis, which were kept for PAH analysis in washed and heated (450°C overnight) glass bottles, at -30°C ; for metal analysis acid washed polyethylene bottles were used and kept at 4° C after 1/1000 HCl acidification. The experiments were stopped when more than 10 % of mortality were observed

Bioassays

Spawning and fertilization

Experiments on embryogenesis and larval growth were performed with material obtained from the same batches of mature adults. Adult oysters were conditioned in the hatchery and induced to spawn by thermal stimulation (alternating immersion in seawater at 18 and 28°C) and by addition of ripe gametes in suspension (His et al., 1997, 1999a). Eggs and sperm were suspended in sterile glass beakers and gently stirred to facilitate fertilization, using a Plexiglass rod with attached perforated disc. After 15 min, fertilized eggs were counted and placed into the vessels containing the different elutriate concentrations.

Embryotoxicity experiments

Fifteen minutes after fertilization, 300 fertilized eggs were transferred with an automatic micropipette having an enlarged tip into sterile 3 ml Nunc microwell plates, containing the different elutriate concentrations (5 replicates per treatment; Geffard et al., 2001a, 2001b). The embryos were

incubated for 24 h at $24 \pm 1^\circ\text{C}$. After the incubation period, buffered formalin was added to each vials and 100 individuals per vial were directly observed under an Olympus CK inverted microscope in order to record the number of abnormal larvae. Therefore, no handling and sieving was needed. The abnormalities were determined according to the criteria in His et al. (1997).

Larval growth experiments

- Contamination of the larvae by the unfiltered elutriates

The experiments on larval growth were conducted to UFE concentrations for which no effects on oyster embryogenesis had been previously observed. (see further in the text). So, the tested elutriate concentrations ranged from 0 (control) to 25 % for Arès and Dunkerque sediments and from 0 to 50 % for Bidassoa sediment.

Fertilized eggs ($60\,000\ \text{l}^{-1}$) were placed in 2-liter beakers filled with the different elutriate concentrations to be tested and incubated at $24 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 h, at this time, the D larval stage was obtained. The larvae were recovered through a sieve ($32\ \mu\text{m}$), counted and replaced in 2-liter beakers at the density of 10 000 per liter for rearing and were daily fed on *Isochrysis galbana* (100 cell per μl of rearing) cultivated on Conway medium (Walne, 1970). All experimental solutions were renewed at 48-h intervals. At this time, the larvae were photographed with a Canon camera fitted to an inverted microscope and the larval height of 50 individuals per replicate (distance between the umbo and the ventral valve margin, Galtsoff, 1964), was measured (His et al., 1983).

- Contamination of the larvae by contaminated *Isochrysis galbana*

The larvae were reared in clean FSW and fed on algae cultivated in the presence of the of FE. *Isochrysis galbana* (Parke) used in the experiments was cultured in 2 liter Erlenmeyer flasks with 1.5 l of Conway medium (Walne, 1970) without any EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), to avoid chelation of metals from sedimentary origin. The Conway medium was prepared with FSW for the control and diluted elutriates for the tests to obtain final concentrations varying from 5 to 50 % of elutriate in the Erlenmeyer flasks.

The different algal cultures (uncontaminated and contaminated) were used only 3rd and 4th day, during their exponential period of growth, to avoid any contamination by bacteria pathogenic to bivalve larvae which may develop during the stationary period of algal growth.

The algal growth was daily measured with a Z1 Coulter Counter, each larval rearing being fed on the basis of 100 cells/ μl . In all cases, the highest quantity of elutriate introduced in each 2-l

rearing (with algal culture), was 3% of the larval rearing (60 ml of algal culture) and represented a maximum contamination of 1.5 % of filtered elutriate.

On the other hand, 500 ml of the algal culture were centrifuged every day (4000 rpm during 15 min) in polyethylene vessels, the culture medium being discharged and the algal cells freeze-dried and stocked till analysis.

Chemical analysis

PAH analysis

In Arès sediment, analyses were performed on whole sediment, UFE and FE, algae (*Isoschrysis galbana*) and oyster larvae.

The 12 following polycyclic aromatic hydrocarbons were analyzed: Fluoranthene (Fluo), Pyrene (Pyr), Benz(a)Anthracene (BaA), Benzo(b)Fluoranthene + Benzo(k)Fluoranthene + Benzo(j)Fluoranthene (BbF + BkF + BjF), Benzo(e)pyrene (BeP), Benzo(a)pyrene (BaP), Perylene (Per), Indeno(1,2,3-cd)pyrene (IP), Benzo(ghi)perylene (BPer) and the Dibenz(a,h)anthracene (DahA). Sediments were analyzed according to protocols described in Budzinski et al. (1995). The analytical method concerning elutriates has partly been adapted from Budzinski et al. (1995) and Baumard and Budzinski (1997) as previously described in details in Geffard et al. (2001b).

For algae and larvae frozen-dried, they were homogenized with a hand-held glass grinder in the presence of dichloromethane. Prior to the microwave assisted extraction (Budzinski et al., 1995), internal standards (perdeuterated PAHs), were added in each sample. The extraction conditions were 10 min at 30W. The organic extracts were then filtered, purified on a micro-column containing alumina and fractionated on a micro-column containing silica to collect only the aromatic compounds. In the case of larvae, the three replicates were mixed together to prevent from problems of sensitivity related to the analytical tool.

The PAHs were analysed by gas chromatography coupled to mass spectrometry according to a protocol described by Baumard and Budzinski (1997). The validation of measurements relies on the control of blanks and on the accuracy and reproducibility of data relative to standard reference sediment (SRM 1941a, NIST, Gaithersburg, MD, USA). The tri-aromatic compounds (Phe and An) cannot be used in this study, because their quantities in the blanks were too high (from 1.1 to 1.9 ng for Phe and from 0.1 to 0.2 ng for An), as compared to their levels in larvae and algae samples. So the subtraction between blank quantities and sample quantities was not relevant.

Metal analysis

The cadmium (Cd), copper (Cu), zinc (Zn) and lead (Pb) contents of sediments, elutriates (Bidassoa and Dunkerque), algae and larvae were measured. Sediments, elutriates and larvae were respectively analyzed according to protocols described in Aminot & Chaussepied (1983), Danielsson et al. (1982) and Geffard et al. (2001c). Concerning the algae, the freeze-dried samples were placed into acid-washed glass tubes and digested with 2 ml of HNO₃ (65 %; supra-pur) for 1h at 95°C. The solutions obtained were supplemented to a know volume with deionized water (Ettajani, 1994).

The acid solutions thus obtained were analyzed by flame atomic absorption spectrometry (AAS) for Cu and Zn, or electrothermal AAS with Zeeman effect for Cd and Pb. The measurements were validated with certified sediment (SD-M-2/TM IAEA Monaco), mussel (BCR/278R-N°188) and seawater (CASS-3).

Statistical analysis

For each series of results, the comparisons of values were tested by *t*-test or one-way ANOVA after homogeneity of variances was checked (Cochran's test), except for PAH larvae contents, because there was only one value per tested elutriate concentration. Significant differences (at the 95 % level) were then determined by Tukey's test.

RESULTS

Contamination of the sediments, FSW and elutriates

Arès

The sediment total PAH content (Table 1) was around 20.300 ng g⁻¹; the concentration of all compounds, for which Long et al. (1995) provided effect ranges, exceeded the ER-L values.

The total PAH content of the elutriates were around 2.700 and 250 ng l⁻¹ for the UFE and FE respectively. These values were respectively three and two order of magnitudes higher than those of the FSW (2 ng l⁻¹).

Bidassoa and Dunkerque

The contents (Table 2) of Cu, Zn and Pb in Bidassoa sediment were higher than the ER-L values. In the case of port sludge from Dunkerque, Cd, Cu and Zn, Pb concentrations were respectively higher than the ER-L and ER-M (Effect Range Medium for sediments) values (Long *et al.*, 1995).

The Cd, Cu, Zn and Pb concentrations in the FSW were 0.009, 0.7, 2.0 and 0.7 $\mu\text{g l}^{-1}$ respectively. The metal contamination of the UFE were one order of magnitude higher than the filtered ones, except for Zn.

Unfiltered elutriate embryotoxicity

The percentages of abnormal larvae in controls ranged from 5.2 to 7.5 %. The elutriates from Arès and Dunkerque were more toxic than Bidassoa elutriate (only 26 % abnormalities at 100 % elutriate). The NOEC (No Observed Effect Concentration) were 25, 50 and 25 % for Arès, Bidassoa and Dunkerque elutriates respectively; these values been used later for the experiments on *C. gigas* larval growth.

Effects on *C. gigas* larval Growth

Direct effects of the unfiltered elutriates

Arès and Dunkerque elutriates had severe effects on *C. gigas* larval growth (Fig.1); So, the rearing experiments were respectively stopped on day 7 and day 9 , before the usual 10 days, to avoid heavy mortalities. One of the aims of the experiments being to study the micro-pollutant bioaccumulation by larvae, with the subsequent necessity to get sufficient living material for analysis. When the percentages of mortality were higher than 10 % in the larval population, the contaminant bioaccumulations by larvae was not studied (It is the case for larvae fed on algae cultured in the presence of 50 % of Arès filtered elutriate , at day 9).

The Arès elutriate, contaminated by PAHs (Fig.1A) had significant ($p = 0.0001$) adverse effects on *C. gigas* larval growth after an exposure of 5 days at the higher concentration tested (25 %). On the contrary, in the presence of the Bidassoa elutriate (Fig.1B), a light reduction of the mean height of the larvae occurred at the highest concentration, but the differences with the controls were not significant ($p = 0.07$). In larvae reared in the presence of 25 % of Dunkerque elutriate (Fig.1C), growth was significantly reduced ($p = 0.0003$) from day 3 to the end of the experiments ; the same phenomenon occurred at the different concentrations tested on day 5 ($p < 0.0006$), the larval growth being totally inhibited at the concentrations of 5, 10 and 25 % on day 5 and day 7.

Effects of contaminated I. galbana on larval growth

The growth of the larvae reared in FSW and fed on *I. galbana* cultured in the presence of 50 % of Arès elutriate, (Fig.1D) was significantly reduced ($p = 0.00031$) on day 7 and all the larvae died on day 9; subsequently analysis could not be performed on them.

The larvae grew normally when fed on *I. Galbana* cultured in the presence of Bidassoa and Dunkerque elutriates at the different tested concentration (Fig. 1E and 1F); moreover, the larvae fed on algae cultured at 50 % of Dunkerque elutriate, grew significantly faster than the controls ($p = 0.0004$).

PAH bio-accumulation by algae and larvae

The algal PAH content increased significantly ($p = 0.0004$) at 10 % of elutriate and over (Fig. 2A), till the value of 472 ng g^{-1} at 50 % (34 ng g^{-1} in controls). The results present the mean of PAH levels in algae obtained from the different algal cultures, used in the study with Arès sediment.

Larvae bio-accumulated PAH more intensively when reared in the presence of Arès elutriate, as compared to larvae reared in FSW and fed on contaminated algae (Fig. 2B), with PAH contents of 140 ng g^{-1} in the first case and 36 ng g^{-1} in the second case at the highest tested concentrations.

The relative concentrations (%) of the tetra (Fluo + Pyr + BaA; m/z of 202 and 228), penta (BbF + BkF + BjF + BeP + BaP + Per ; m/z of 252) and hexa-aromatics (IP + Bper + DahA; m/z of 276 and 278) PAH in Arès sediment, its elutriates, in algae and in larvae are indicated on figure 3.

Tetra and penta-aromatic compounds dominated in Arès sediment and in the UFE (Fig. 3A), representing between 80 % and 90 % of the total PAH, the PAH profiles in both being similar. Concerning the FE and *I. galbana*, on the contrary, tetra-aromatic compounds were the most abundant ($\approx 50\%$), the PAH profiles being also practically similar. In the case of the algae, the hexa-aromatic compounds cannot be determined, because they were not detected

Larvae reared in the presence of UFE accumulated principally penta-aromatic compounds which represented 60 % of the total PAH (Fig. 3B), with PAH profiles totally different from that of the UFE ones in the case of the tetra and penta aromatic compounds, but similar for high molecular weight PAH (hexa aromatic compounds).

The larvae fed on *I. galbana* (Fig. 3C) cultured at 25 % of FE (only concentration at which a PAH transfer between algae and larvae could be noticed), accumulated principally tetra-aromatic compounds (80 % of the total PAH, Fig. 3C), with the same PAH profiles in algae and veligers.

Depending on the mode of contamination (direct by UFE or indirect by algae), the larvae presented very different PAH profiles (Fig. 3D).

Finally, the ratio between BeP and BaP (BeP/BaP), an index of a possible PAH metabolitization by larvae is <1 in sediment, UFE and FE (respectively 0.7, 0.7 and 0.9), but clearly > 1 in algae and contaminated larvae (Table 4).

Metals bio-accumulation by algae and larvae

Concerning Bidassoa and Dunkerque elutriates, heavy metals (Cd, Cu, Zn and Pb), were not significantly accumulated ($p > 0.160$) by algae and larvae (fed on contaminated algae, Fig. 4).

In the case of Dunkerque, due to the very low larval growth in the presence of 5, 10 and 25 % of elutriate, the larvae of the three different rearing beakers were collected to getting sufficient material for analysis, so statistical analysis could only be performed between individuals in controls and in the presence of 1% of UFE.

Concerning Cd (Fig. 4A), for Bidassoa sediment bio-accumulation in larvae was not significant ($p = 0.230$); the ratio between control larvae and contaminated larvae varied between 0.8 and 1.6. For Dunkerque sediment, the larval Cd content increased at 5% of UFE, with a maximum value of $0.4 \mu\text{g g}^{-1}$ (dry weight) at 25% of elutriate.

As regard to Cu (Fig. 4B), in the presence of both UFE, the metal content increased significantly ($p = 0.0001$) in function of the UFE concentration in the rearing medium; this occurred at 10 % of UFE in the case of Bidassoa and 5 % in that of Dunkerque.

Zn (Fig. 4C) was only bio-accumulated by the larvae reared at the highest Dunkerque UFE concentrations.

Pb (Fig. 4D) was significantly ($p = 0.0139$) bio-accumulated by the veligers with Dunkerque UFE only, as for Zn but more intensively, this occurred at 1 % of UFE and over. At the highest tested concentration of Dunkerque elutriate, Pb in larvae was 10 times higher than in the controls.

DISCUSSION

Based on the results of a previous study (Geffard et al., 2001 a), three sediments among ten were selected to be investigated in the present study, the bio-accumulation of sediment-associated contaminants. On the other hand, high ammonia contents in the elutriates, may impede the larval development in oysters (Geffard 2001a). Concerning the three sediments of the present study, the ammoniac contents of the Arès, Bidassoa and Dunkerque elutriates (100 %) were respectively 157, 148 et 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$, these values being under the NOEC (No Observed Effects Concentration) for *C. gigas* embryos (200 $\mu\text{mol l}^{-1}$; Geffard et al., 2001a).

Contamination levels of the three elutriates

According to the criteria defined by Long et al. (1995) and to our previous results (Geffard et al., 2001a, 2001b) Arès sediment is heavily contaminated by PAHs, Bidassoa sediment by metals and Dunkerque port sludge by both pollutants.

The seawater used in the present study was obtained from the Bay of Arcachon. In this sea water, only Fluo and Pyr may be detected. Its biological quality for oyster embryos and larvae is satisfactory, with PAH contents which were two and three orders of magnitudes lower than those of the Arès filtered and unfiltered elutriates respectively. These values (dissolved and total PAH) are one order of magnitude higher than those observed by Fernandes et al. (1997) in the Seine Estuary, but lower than the corresponding contents of the sea water in the Tyne and Tees Estuaries (Great Britain, Law et al. 1997).

The heavy metal contamination of the FSW used in the experiments is in the same range of magnitude than the Mediterranean sea waters in uncontaminated areas (Campanella et al. (2001). The heavy metal contents of the Bidassoa and Dunkerque elutriates are roughly 10 time higher than in control sea water. At the opposite, in filtered elutriates only contamination by Zn is notable. These data are in agreement with laboratory (Slotten et Reuter , 1995) and field values (Van den Berg et al., 2001) concerning an increase of the total sea water heavy metal contamination (with turbidity), but a weak increase of the sea water heavy metal soluble fraction, when sediments or port sludge are suspended in sea water.

Embryotoxicity of three elutriates

The NOEC (No Observed Effects Concentration) of the three elutriates on *C. gigas* embryogenesis (25 %, 50 % and 25 % for Arès, Bidassoa and Dunkerque sediments, respectively) confirm our results on the same sediments (Geffard et al. 2001b). However the Arès elutriate was

found to be more toxic than in the previous study, corresponding to a higher PAH contamination level, even if Arès sediment has been sampled in the same area. The PAH content was higher due to the natural heterogeneity of the sampling area.

Effects on *C. gigas* larval growth

Direct effects of the unfiltered elutriates on larval growth

Concerning the direct effects of the unfiltered elutriates on *C. gigas* larval growth, Arès and Dunkerque elutriates had adverse effects, as expected (NOEC of 25 % and 1 % respectively), at lower levels than on embryotoxicity (50 % and 25 % respectively). These results confirm also previous findings (Brereton et al, 1973, His & Robert, 1982) concerning the higher sensitivity of larval growth tests as compared to embryotoxicity tests.

Bidassoa and Dunkerque unfiltered and filtered elutriates had the same levels of metal contamination, the higher toxicity level on larval growth of the second, indicating the presence of other contaminants (PAHs in particular).

*Effects of a contaminated *I. Galbana* as food*

No effects could be observed on larval growth of veligers fed on *I. galbana* cultured in the presence of the two heavy metal polluted Dunkerque and Bidassoa elutriates. According to Ettajani (1994), in adults *Crassostrea gigas* exposed to metal contamination, the biological effects are more important after a direct exposure than in the case of a contamination by food.

On the contrary, *I. galbana* cultured in the presence of the PAH polluted elutriate (Arès), at realistic environmental levels (Law et al., 1997) and used as larval food impeded larval growth. This indicates a contaminant transfer by food, in the case of such organic pollutants.

PAH bio-availability to *I. galbana* and *C. gigas* larvae

When resuspending Arès sediment (elutriates), a part of the PAHs from sedimentary origin became bio-available for algae as well as for larvae, as indicated by the increasing contents in the two organisms with the increase of elutriate concentrations in the medium (Fig. 2).

During larval direct or indirect exposures (feeding experiments with polluted *I. galbana*), the PAH bio-accumulation in the veligers occurred at levels lower than those which impede the larval growth. Consequently, as proposed by Connell et al. (1999), studies on bio-accumulation may be used as a precocious pollution index. On the other hand, the value of 120 ng g⁻¹ (dry weight) of larva, obtained in the presence of 10 % of Arès elutriate, corresponds to the critical body burden

PAH concentration above which negative effects on larval growth are observed. This threshold level is to be compared with the higher value of 300 ng g⁻¹ (dry weight), corresponding to the concentration at which abnormalities (Geffard et al., 2001d) occur in *C. gigas*, indicating a lower sensitivity of embryos as compared to larvae, when larval growth is considered.

The relative ratios of tetra, penta and hexa-aromatic PAHs in the different sediment treatments and organisms were compared to study their different mobility, bioavailability and metabolism. As previously shown by Fernandes et al. (1997) on natural sea waters and by Geffard et al. (2001d) in sediment elutriates, 90 % of the PAH present are adsorbed to suspended particles, this is the reason why the unfiltered elutriate presents the same PAH profile than the sediment itself.

The mobility of PAH depends principally on their solubility which is characterized their octanol-water coefficient (Kow ; Karickhoff et al., 1979). This solubility of PAHs depends on their molecular weight: the more it is high, the less the compound is soluble (Landrum et al., 1987). This explains that the FE was enriched with the lowest molecular weight PAHs (tetra-aromatic compounds); during the elutriation procedure, the tetra-aromatic compounds were more dissolved (released) in the sea water than the penta and hexa-aromatic ones.

Except for hexa-aromatic PAHs, the contaminated algae and filtered elutriate PAH profiles are the same, indicating that *I. galbana* accumulated soluble PAH as a function of their contents in the culture medium. There were no correlations ($r^2 = 0.002$) between the accumulation factors of each compound (algal content/ filtered elutriate content) and their Kow coefficient ; this indicated that the solubility of the different PAH present in the filtered elutriate did not regulate their accumulation. The release of dissolved PAHs from sediment to sea water principally depends on the solubility of compounds (hydrophobicity) and on the organic matter levels of the sediments. In contrast, when dissolved PAHs are in sea water, algae accumulate them, without discrimination.

The contaminated larvae and unfiltered elutriate PAH profiles are different. Larvae accumulated essentially penta-aromatic compounds. There were no correlations ($r^2 = 0.09$) between the bio-accumulation factors of the different PAH and their Kow coefficient, indicating that their solubility did not essentially regulate their accumulation. Similar PAH profiles were found in adult *Mytilus galloprovincialis* from turbid areas (Baumard, 1997). It can be extrapolated that, part of the adsorbed PAH on suspended particles in marine areas are bio-available for *C. gigas* larvae which probably ingest such particles. Larval at the same larval stage as in the present study (mean height

150 µm) ingested particles between 0.2 and 12 µm in diameter (Baldwin and Newell, 1995). Previous studies concerning Arès sediment elutriate showed that 40 to 50 % of the suspended particles were under 12 µm in diameter, constituting the most probable way of larval contamination (Geffard et al., 2001e).

Larvae contaminated by algal food accumulated tetra-aromatic PAH principally, presenting PAH profiles similar to the contaminated *I. galbana* ones. Such profiles were noticed by Baumard (1997) in adult *M. galloprovincialis* and by Geffard et al. (2001d) in *C. gigas* D larvae principally exposed to contaminants in their soluble form. So a contamination by food reflects the different PAH present in their soluble form, which depends on the quantity and the solubility of the different PAH from sedimentary origin. In the case of the soluble fraction, all PAH are transferred by the food chain and accumulated in the same way; this is possible, because the algae do not seem to metabolize the PAHs.

According to Baumard *et al.* (1998) the BeP/BaP ratio can be used to illustrate a metabolism of PAHs by adult mussels. In the present study, this ratio is < 1 in Arès sediment and its two elutriates but largely > 1 in larvae directly reared in the presence of unfiltered elutriate or in larvae reared in FSW and fed on contaminated *I. galbana*. As previously shown (Geffard et al., 2001d), this can be interpreted to demonstrate the ability of *C. gigas* larvae to metabolize PAHs; this metabolism however may induce the production of metabolites which are more toxic than the PAHs themselves (Michel et al., 1995). This must be kept in mind in studies concerning the risk assessment of contaminated sediments when they are resuspended (dredging operations). Moreover, beside their bio-accumulation and their metabolism, some PAHs such as anthracene, fluoranthene and pyrene are highly phototoxic (Ankley et al., 1995 ; Pelletier et al., 1997 ; Hatch et Burton, 1998 ; Verrhiest et al., 2001). Pelagic organisms are more exposed to light effects than benthic organisms, and consequently also more exposed to phototoxicity effects due to PAHs, particularly when PAH contaminated sediments are resuspended. Heavy mortalities occurred in *Mulinia lateralis* larvae exposed to UV light when PAH contaminated adult bivalves were induced to spawn for the rearings (Pelletier et al., 2000). In the same way, Davenport and Spacie (1991) show that the toxicity of elutriates on *Daphnia magna* clearly increased by light exposure.

Metal bio-availability to *I. galbana* and to *C. gigas* larvae

For the two heavy metal contaminated elutriates (Bidassoa and Dunkerque), neither bio-accumulation, by algae and larvae fed on contaminated *I. galbana*, was found, this corresponding with the absence of contamination of filtered elutriates (except for the Zn).

As previously, part of the heavy metals from the sediments are released when these are resuspended, becoming bio-available and so being accumulated by the larvae.

Larvae reared in the presence of Bidassoa and Dunkerque elutriates accumulated significantly Cu and also Cd and Pb in the case of Dunkerque. These heavy metals being at higher level contents in unfiltered elutriates only, as compared to the filtered ones and to FSW, metal bio-accumulation by larvae seems to depend on the particles content of unfiltered elutriates.

According to results obtained with the larval growth tests, the biological effects and the bio-accumulation of metals by larvae were higher with Dunkerque elutriate (particularly Cd and Pb) than with Bidassoa one. However, the contamination levels in both elutriates are in the same order of magnitude. It was previously shown (Geffard et al., 2001e) that the suspended matter contents of the UFE were 140 mg l⁻¹ in Bidassoa and 20 mg l⁻¹ only in Dunkerque elutriates and that the particle size was similar in the two cases. However, the particulate organic carbon contents in Dunkerque UFE is lower as compared with Bidassoa one. These results may be shown that particulate heavy metals from Dunkerque UFE were more bio-available than those from Bidassoa UFE. According to Borgmann (2000), “metal contamination in larvae seems to be a better indicator of potential biological impact than concentration in the medium, because differences in metal bio-availability are automatically taken into account”. This approach is limited to essential metals such as Cu and Zn.

CONCLUSION

Resuspending marine, estuarine or port polluted sediments leads to the release of contaminants particularly as particles but also as dissolved contaminants (Zn and PAHs). Deleterious effects can be induced and may affect the biota, as indicated by the results obtained on embryo-toxicity and larval growth experiments in *C. gigas*, a bivalve species well known for many decades for its particular sensitivity to pollutants.

Larval growth test is more sensitive than embryo-toxicity test, allowing to take into account the risks due to contaminants adsorbed on suspended particles; so studies on *C. gigas* larval growth may be proposed as a good tool to determine bio-availability and bio-accumulation of pollutants from sedimentary origin and can be used to monitor the most sensitive areas, such as those where

aquaculture is present. It was shown that resuspending polluted sediments, with the concomitant direct and indirect contamination of the food chain, induces a risk for the sensible organisms, such as *Crassostrea gigas* larvae.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank C. Ledu (IFREMER La Tremblade) for supplying the mature oysters, Dr JF Chiffolleau (IFREMER Nantes), Dr C. Amiard-Triquet, Dr JC. Amiard and Dr A. Geffard (University of Nantes) for metal analyses.

REFERENCES

- Ankley GT, Erickson RJ, Phipps GL, Mattson VR, Kosian PA, Shetty BR, Cox JR. 1995. Effects of light intensity on the Phototoxicity of Fluoranthene to a Benthic Macroinvertebrate. *Environ Sci Technol* 29:2828-2833.
- Aminot A, Chaussepied M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu Marin. CNEXO, BNDO/Documentation Brest, 395 pp.
- Baldwin BS, Newell RIE. 1995. relative importance of different size food particles in the natural diet of oyster larvae (*Crassostrea virginica*). *Mar Ecol Prog Ser* 120:135-145.
- Baumard P. 1997. Biogéochimie des composés aromatiques dans l'environnement marin. Thesis, University of Bordeaux I, Bordeaux, France. 290p.
- Baumard P, Budzinski H. 1997. Internal standard quantification method and gas chromatography – mass spectrometry (GS-MS): a reliable tool for polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) quantification in natural matrices. *Analusis* 25:246-252.
- Baumard P, Budzinski H, Garrigues P. 1998. PAHs in Arcachon Bay, France: Origin and Biomonitoring with Caged Organisms. *Mar Pollut Bull* 36:577-586.
- Borgmann U. 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 3:277-289.
- Brereton A, Lord H, Thornton I, Webb JS. 1973. Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 19:96-101.
- Budzinski H, Papineau A, Baumard P, Garrigues P. 1995. Extraction assistée par chauffage microondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *C R Acad Sci Paris*, 321, série IIb, 69-76.
- Burgess M, Scott KJ. 1992. the significance of in-place contaminated marine sediments on the water column : processes and effects. in *Sediment toxicity assessment*. GA Burton Jr., Lewis Publishers, London, 129-165.
- Burgess RM, Schweitzer KA, McKinney RA, Phelps DK. 1993. Contaminated marine sediment : water column and interstitial toxic effect. *Environ Toxicol Chem* 12:127-138.
- Burton GA. 1992. *Sediment toxicity assessment*. Lewis Publishers, London, 211p.
- Campanella L, Conti ME, Cubadda F, Sucapane C. 2001. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. *Environ Pollut* 111:117-126.
- Carr RS, Williams JW, Fragata CTB. 1989. Development and evaluation of a novel marine sediment pore water toxicity test with polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environ Toxicol Chem* 8:533-543.
- Chapman PM, Long ER. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar Pollut Bull* 14:81-84.
- Chapman PM, Morgan JD. 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull Environm Contam Toxicol* 31:438-444.

- Chapman PM, Wang F, Janssen C, Persoone G, Allen HE. 1998. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can J fish Aquat Sci* 55:2212-2243.
- Ciarelli S, Kater BJ, Van Straalen NM. 2000. Influence of bioturbation by the amphipod *Corophium volutator* on fluoranthene uptake in the marine polychaete *Nereis virens*. *Environ Toxicol Chem* 19(6):1575-1581.
- Ciarelli S, Van Straalen NM, Klap VA, Van Wezel AP. 1999. Effects of sediment bioturbation by estuarine amphipod *Corophium volutator* on fluoanthene resuspension and transfert into the mussel (*Mytilus edulis*). *Environ Toxicol Chem* 18(2):218-328.
- Connell DW, Chaisuksant Y, Yu J. 1999. Importance of Internal Biotic Concentrations in Risk Evaluations with Aquatic Systems. *Mar Pollut Bull* 39:54-61.
- Danielsson LG, Magnusson B, Westerlund S, Zhang K. 1982. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Anal Chim Acta* 144:183-188.
- Davenport R, Spacie A. 1991. Acute phototoxicity of harbor and tributary sediments from lower Lake Michigan. *J Great Lakes Res* 17:51-56.
- Ettajani H. 1994. Transfert des éléments traces essentiels ou toxiques dans la chaîne trophique marine à mollusque. Thèse, Université de Tours, France, pp 199.
- Eertman RHM, Groenink-van Emstede M, Sandde B. 1993. The effects of the polycyclic aromatic hydrocarbons fluoranthene and benzo(a)pyrene on the mussel *Mytilus edulis*, the amphipod *Bathyporeia sarsi* and larva of the oyster, *Crassostrea gigas*. BEON-Efecten, DGW-NIOO, 50p.
- Fernandes MB, Sicre MA, Boireau A, Tronczynski Y. 1997. Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) Distributions in the Seine River and its Estuary. *Mar Pollut Bull* 34:857-867.
- Galtsoff PS. 1964. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *U S Fish and Wildlife Service, Fishery Bulletin* 64, 480p.
- Geffard O. 2001. Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : Développement de bioessais en laboratoire et *in situ*, étude de la biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thesis, University of Bordeaux I, Bordeaux, France.
- Geffard O, Budzinski H, Augagneur S, Seaman MNL, His E. 2001a. Assessment of sediment contamination by spermiotoxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environ Toxicol Chem* 20(7):1605-1611.
- Geffard A, Geffard O, His E, Amiard JC. 2001b. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar Ecol Prog Ser* (in press).
- Hatch A, Burton GA Jr. 1998. Effects of photoinduced toxicity of fluoranthene on amphibian embryos and larvae. *Environ Toxicol Chem* 17(9):1777-1785.
- His E, Beiras R, Seaman MNL. 1999b. The assessment of marine pollution – Bioassays with bivalve embryos and larvae. *Advances in marine Biology*. 37:1-178.
- His E, Heyvang I, Geffard O, de Montaudouin X. 1999a. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res* 33:1706-1718.
- His E, Robert R. 1982. Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole: toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de *C. gigas*. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 42 (2):117-125.
- His E, Maurer D, Robert R. 1983. Estimation de la teneur en acétate de tributyle-étain dans l'eau de mer par une méthode biologique. *J moll Stud* 12 A:60-68.
- His E, Seaman MNL, Beiras R. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Wat Res* 31:351-355.

- Karickhoff SW, Brown DS, Scott TA. 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Wat Res* 13:241-248.
- Kwan KK, Dukta BJ. 1996. Development of reference sediment samples for solid phase toxicity screening tests. *Bull environ Contam Toxicol* 56:696-702.
- Landrum PF, Nihart SR, Eadie BJ, Herche LR. 1987. Reduction in Bioavailability of Organic Contaminants to the Amphipod *Pontoporeia hoyi* by Dissolved Organic Matter of Sediment Interstitial waters. *Environ Toxicol Chem* 6:11-20.
- Law RJ, Dawes VJ, Woohead RJ, Matthiessen P. 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Seawater around England and Wales. *Mar Pollut Bull* 34:306-322.
- Long ER. 2000. Spatial extend of sediment toxicity in U.S. estuaries and marines bays. *Environ Monit Assess* 64(1):391-409.
- Long ER, MacDonald DD, Smith SL, Calder FD. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ Management* 19:81-97.
- Matthiessen P, Bifield S, Jarrett F, Kirby MF, Law RJ, McMinn WR, Sheahan DA, Thain JE, Whale GF. 1998. An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, UK by means of bioassays. *Mar Environ Res* 45(1):1-15.
- McCauley DJ, DeGraeve GM, Linton TK. 2000. Sediment quality guidelines and assessment : overview and research needs. *Environmental Science & Policy*. 3:133-144.
- McPherson CA, Chapman PM. 2000. Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. *Mar Pollut Bull* 40(8):656-665.
- Melzian BD. 1990. Toxicity assessment of dredged materials : acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In : *Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities*. (C. Alzieu & B. Gallenne, eds.), 49-64, Goubault Imprimeur, s.a., Nantes, France.
- Michel XR, Beasse C, Narbonne JF. 1995. In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:215-222.
- Pelletier MC, Burgess RM, Cantwell MG, Serbst JR, Ho KT, Ryba SA. 2000. Importance of maternal transfer of the photoreactive polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene from benthic adult bivalves to their pelagic larvae. *Environ Toxicol Chem* 19(11):2691-2698.
- Pelletier MC, Burgess RM, Ho KT, Kuhn A, McKinney RA, Ryba A. 1997. Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environ Toxicol Chem* 16:2190-2199.
- Peterson GS, Ankley GT, Leonard EN. 1996. Effects of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* 15:2147-2155.
- Raoux CY, Garrigues P. 1991. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in muddy sediments from the Mediterranean Sea in relation to grain size distribution of sediments. In *Org. Geochem. Advances and applications in the natural environment*, Manning, D.A.C., Ed.; Manchester University Press; pp552-556.
- Saulnier I, Mucci A. 2000. Trace metal remobilization the resuspension of estuarine sediments : Saguenay Fjord, Canada. *Applied Geochemistry* 15:203-222.
- Slotten DG, Reuter JE. 1995. Heavy metals in intact and resuspended sediments of a California reservoir, with emphasis on potential bioavailability of copper and zinc. *Mar Freshwater Res* 46 :257-265.
- Van Den Berg GA, Meijers GGA, Van Der Heijdt LM, Zwolsman JG. 2001. Dredging-related mobilisation of trace metals: a case study in the Netherlands. *Water Res* 35(8):1979-1986.
- Verrhiest G, Clément B, Blake G. 2001. Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates. *Ecotoxicology* 10(6) (in press).
- Walne PR. 1970. Present problems in the culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Helgoländer. Meeresunters*, 20:514-525.

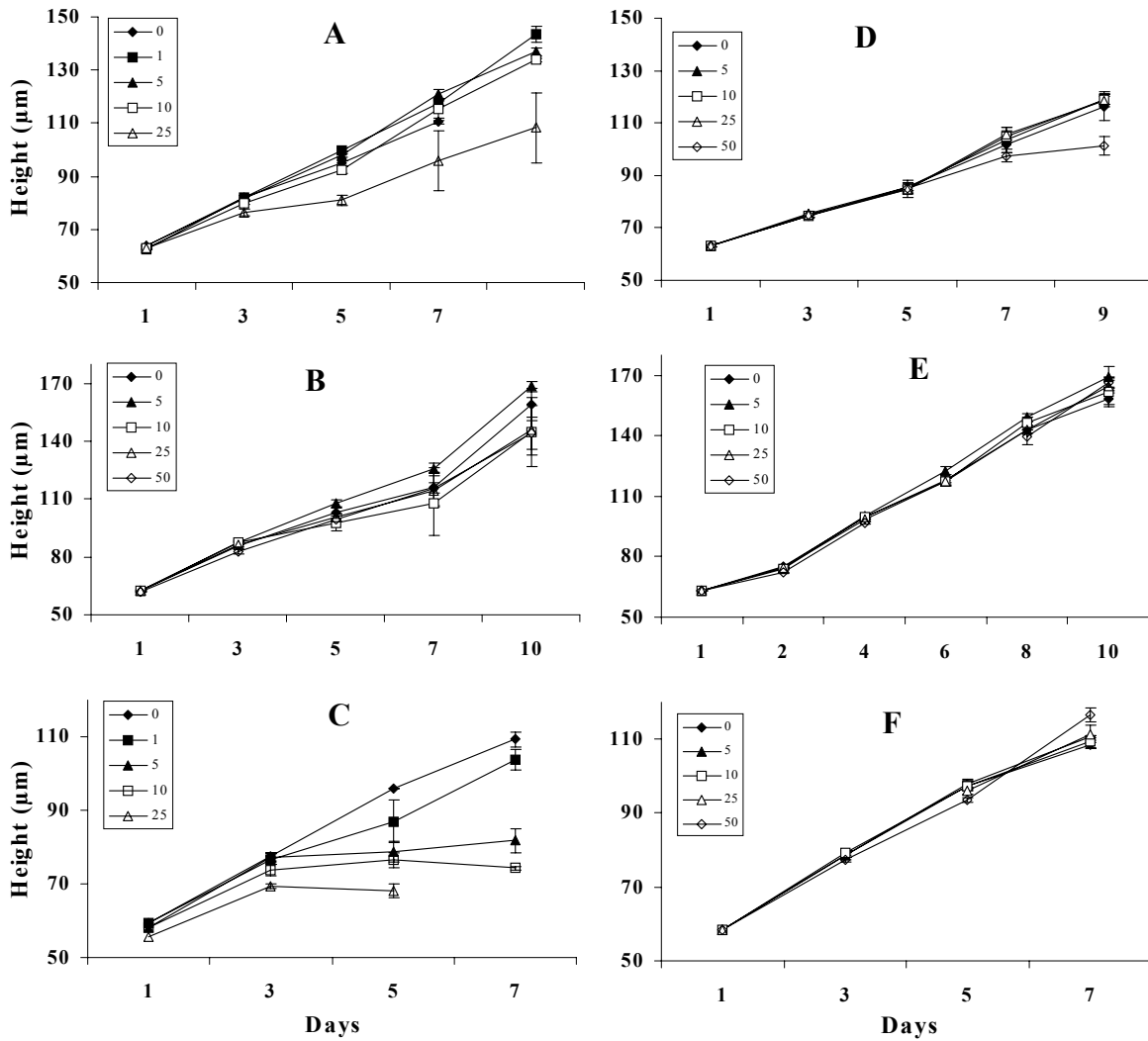


Figure 1 : *Crassostrea gigas* height ($\mu\text{m} \pm \text{S. D.}$) increase in larvae reared in the presence of different Arès (A), Bidassoa (B) and Dunkerque (C) elutriate concentrations and in larvae fed on *I. galbana* grown in the presence of different concentrations of the same Arès (D), Bidassoa (E) and Dunkerque (F) elutriates.

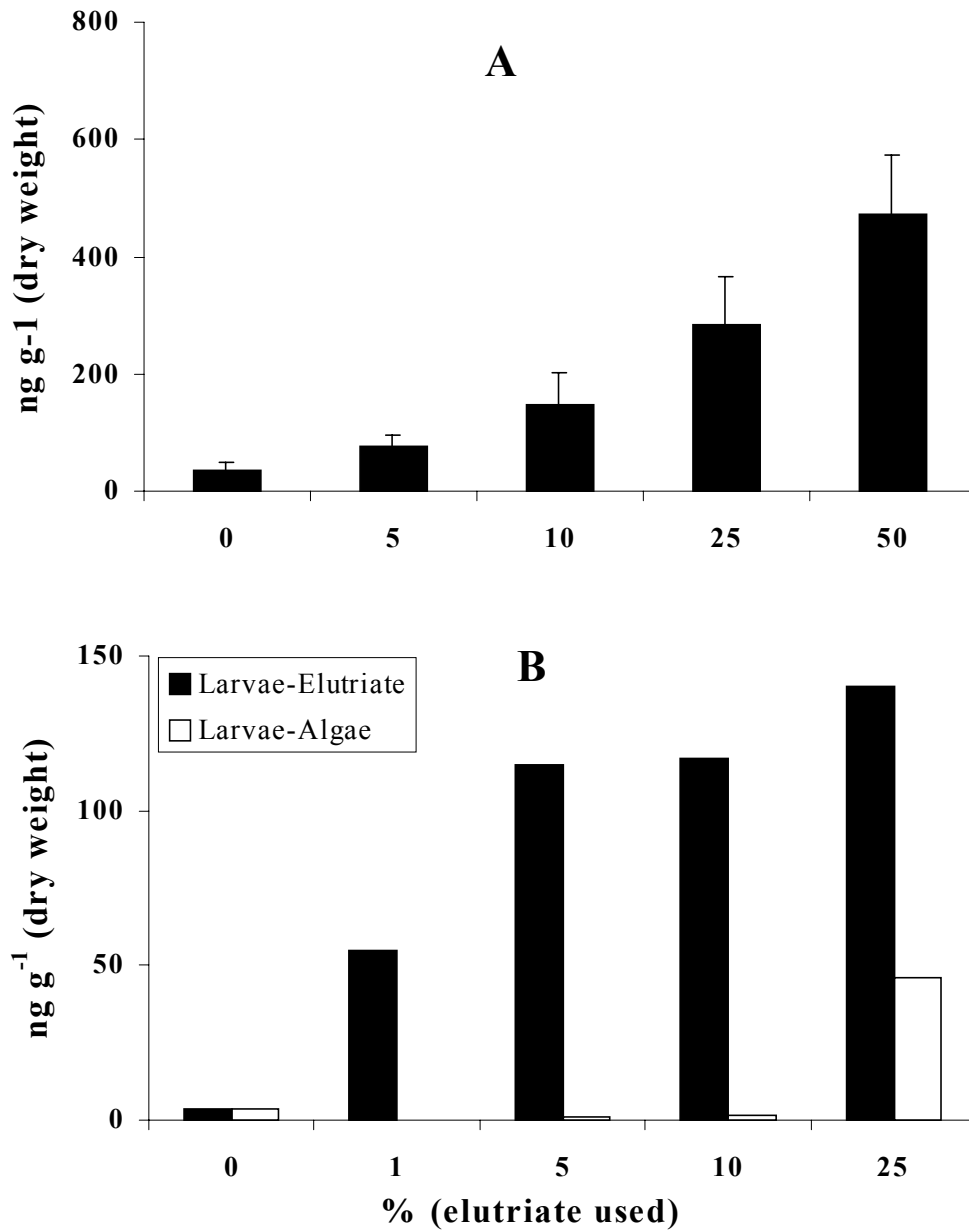


Figure 2 : Total PAH contents of *Isochrysis galbana* (A ; ng g⁻¹ dry weight) grown in the presence of Arès filtered elutriate and of larvae reared in the presence of unfiltered Arès elutriate and of larvae fed on contaminated algae (B ; ng g⁻¹ dry weight) during 9 days.

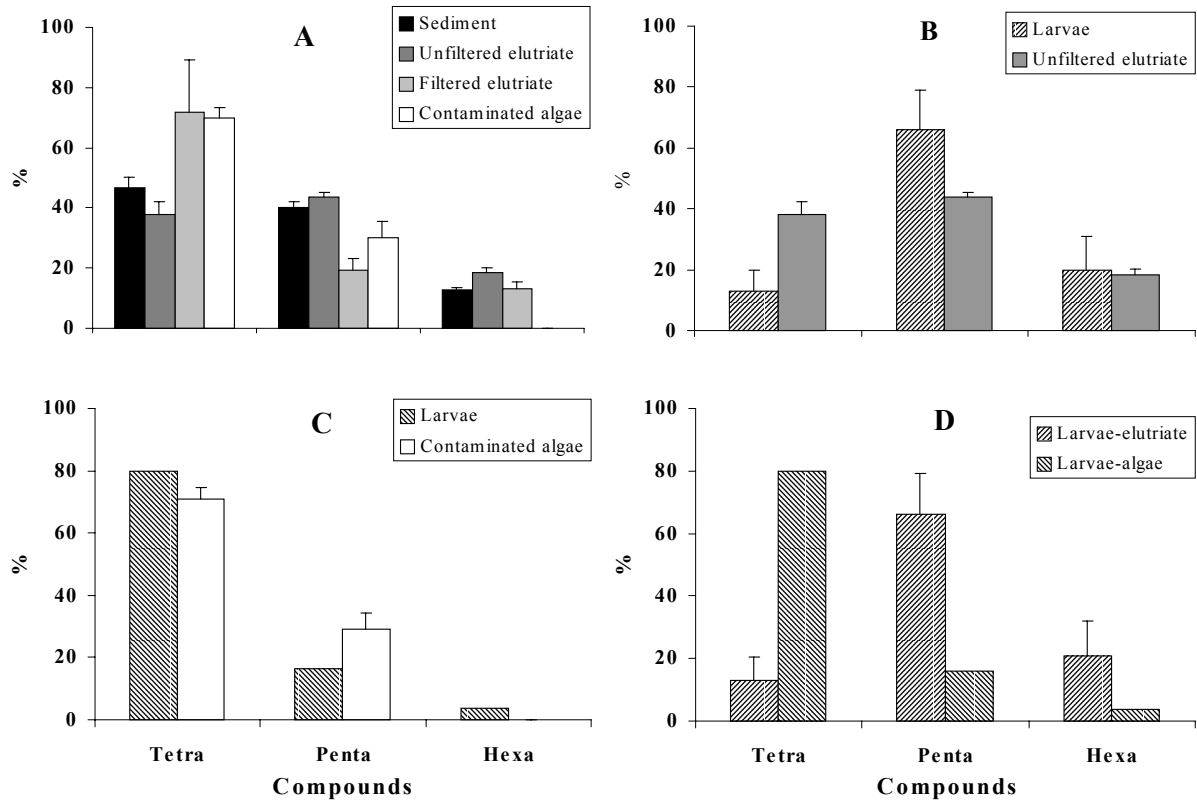


Figure 3: Relative contents (%) of tetra, penta and hexa-aromatic compounds in the different sediment treatments, in algae and in larvae :

- A: in Arès sediment, in the unfiltered and filtered elutriates and in *I. galbana*
- B: in larvae reared in the presence of Arès unfiltered elutriate, in unfiltered and filtered elutriates
- C: in larvae fed on contaminated *I. galbana* and in the algae.
- D: in larvae reared in the presence of Arès elutriate and in larvae fed on contaminated algae.

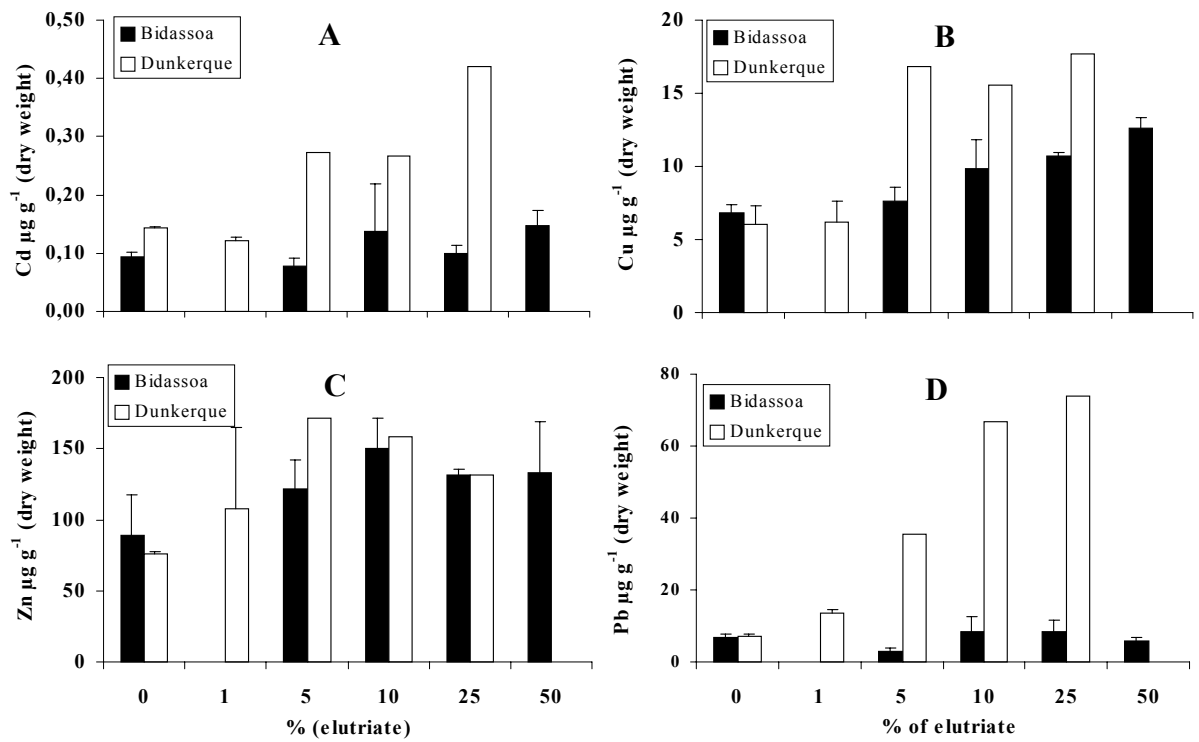


Figure 4 : Total Cd (A), Cu (B), Zn (C) and Pb (D) contents ($\mu\text{g g}^{-1}$ dry weight \pm SD) of *C. gigas* larvae after an exposure to a range of Bidassoa (white bars) and Dunkerque (black bars) unfiltered elutriates.

Table 1: PAH contents (in molecular weight ascending order) of Arès sediment, seawater (controls) and Arès unfiltered and filtered elutriates. Compounds for which Long *et al.* (1995) provided Effect Range values are underlined; * = values exceeding ER-L (Effects Range-Low) ;** = value exceeding ER-M values (Effects Range-Medium). nd: no detected.

	Polycyclic aromatic hydrocarbons										Σ PAH
	Fluo	Pyr	BaA	BbF+	BeP	BaP	Per	IP	BP	DA	
Sediment (ng g ⁻¹ dry weight)	*4034	**3328	**2146	4018	1264	**1953	505	1558	1063	**431	20.300
S.D.	1022	966	477	919	247	401	105	355	215	112	4819
Seawater (ng l ⁻¹)	2	1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	3
S.D.	5	1									6
<i>Elutriates</i> (ng l ⁻¹)											
unfiltered	277	309	42	406	150	198	57	217	178	46	2.656
S.D.	49	121	56	91	29	48	9	29	37	11	415
filtered	38	95	37	28	9	11	nd	23	11	nd	253
S.D.	5	29	15	9	2	2		5	4		40

Table 2: Heavy metal contents of Bidassoa and Dunkerque sediments, seawater (controls) and unfiltered and filtered elutriates. Compounds for which Long et al. (1995) provided effect range values are underlined; * = value exceeding ER-L values (Effects Range-Low); ** = value exceeding ER-M values (Effects Range-Medium).

Sediment	Heavy metals				
	Cd	Cu	Zn	Pb	
Bidassoa $\mu\text{g g}^{-1}$		0.8	*70	*268	*74
S.D: $\mu\text{g g}^{-1}$		0.1	11	31	9
Dunkerque $\mu\text{g g}^{-1}$		*2.2	*158	**542	**391
S.D: $\mu\text{g g}^{-1}$		0.05	10	36	24
Sea water $\mu\text{g l}^{-1}$		0.009	0.7	2.0	0.7
S.D: $\mu\text{g l}^{-1}$		0.001	0.2	0.5	0.2
Unfiltered elutriates					
Bidassoa $\mu\text{g l}^{-1}$		0.10	10.6	25.3	8.3
S.D: $\mu\text{g l}^{-1}$		0.03	3.3	5.3	2.7
Dunkerque $\mu\text{g l}^{-1}$		0.05	5.0	21.5	12.3
S.D: $\mu\text{g l}^{-1}$		0.01	1.1	4.1	2.0
Filtered elutriates					
Bidassoa $\mu\text{g l}^{-1}$		0.020	1.1	13.3	1.1
S.D: $\mu\text{g l}^{-1}$		0.010	0.3	6.3	0.3
Dunkerque $\mu\text{g l}^{-1}$		0.006	0.4	7.3	0.3
S.D: $\mu\text{g l}^{-1}$		0.004	0.3	4.5	0.2

Table 3 : Toxicity to *Crassostrea gigas* embryos of Arès, Bidassoa and Dunkerque sediment elutriates. Percentages of abnormal larvae (\pm S.D.). * = biological effects significantly higher than in controls.

Unfiltered elutriate (%)	Arès	Bidassoa	Dunkerque
0	6.8 (4.2)	5.2 (3.9)	7.5 (4.1)
1	7.2 (3.1)	6.9 (2.6)	6.6 (1.8)
5	7.8 (2.9)	4.9 (2.8)	6.8 (1.3)
10	6.3 (4.2)	6.5 (3.2)	6.2 (1.9)
25	13.0 (4.7)	7.5 (4.6)	11.0 (1.6)
50	100.0 (0.0)*	9.5 (4.2)	94.4 (4.4)*
100	100.0 (0.0)*	25.9 (3.2)*	100.0 (0.0)*

Table 4 : Relative contents of BeP/BaP in Arès sediment, and in Arès unfiltered and filtered elutriates and in contaminated *I. galbana*, in larvae reared in the presence of Arès unfiltered elutriate and in larvae fed on contaminated *I. galbana* (\pm S.D).

Sediment	Unfiltered elutriate	Filtered elutriate	Algae contaminated with 25 % of Filtered elutriate	Larvae exposed to unfiltered elutriate	Larvae exposed to contaminated algae
0.7 (0.01)	0.7 (0.03)	0.9 (0.1)	1.7 (0.1)	4.0	5.7

Publication n°9 :

Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate

A. Geffard, O. Geffard, E. His, JC. Amiard

La biodisponibilité du Cadmium (Cd), Cuivre (Cu) et Zinc (Zn) d'un éluviat, obtenu à partir d'un sédiment contaminé par les métaux, ont été étudiées à l'aide d'embryons et de larves de *Mytilus galloprovincialis*. Les concentrations en éluviat testées sont toujours inférieures aux seuils de toxicité pour lesquelles des anomalies de développement embryonnaire apparaissent. Les concentrations en Cd, Cu et Zn dans le sédiment, l'éluviat, et dans les larves ont été déterminées, ainsi que les indices de conditions et l'induction de métallothionéines (MT) chez les larves. L'indice de condition est affecté uniquement après 96 h d'exposition et principalement à la concentration en éluviat la plus forte (25 %, correspondant à 0.14 µg Cd l⁻¹ et 14 µg Zn l⁻¹). Une bioaccumulation en Cd, Cu et Zn est observée, pour les deux périodes d'exposition, dans les larves totales, ainsi que dans la fraction cytosolique de leurs tissus. Pour chaque condition, les plus fortes concentrations métalliques sont observées suite à l'exposition de 48 h, mettant en évidence un phénomène de dilution biologique. L'induction de MT chez les larves est observée après l'exposition de 96 heures et pour des concentrations en éluviat supérieures à 5 %. L'induction de MT est fortement corrélée avec les teneurs métalliques de la fraction cytosolique. Cette relation est significative pour les trois métaux considérés individuellement ou ensemble. Les résultats montrent que les trois métaux sont bio-disponibles pour les larves de *M. galloprovincialis* et que l'induction de MT est un indicateur de pollution métallique plus sensible que le test d'embryotoxicité.

Mots clés : éluviat sédimentaire, larves de *Mytilus galloprovincialis*, bioaccumulation métallique, métallothionéine

Acceptée dans *Marine Ecology – Progress Series*

Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate.

Alain Geffard ⁽¹⁾, Olivier Geffard ⁽²⁾, Edouard His ⁽²⁾ and Jean-Claude Amiard ⁽¹⁾.

- 1- Service d'Ecotoxicologie, SMAB, ISOMer, GDR CNRS 1117, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes Cedex 3 (France).
- 2- IFREMER, Quai du Commandant Silhouette, 33120 Arcachon (France).

Corresponding author : Alain Geffard

E-mail : Alain.Geffard@isomer.univ-nantes .fr

ABSTRACT

The bioavailability of Cd, Cu and Zn from a metal-contaminated sediment was studied using *Mytilus galloprovincialis* embryos and larvae exposed to sediment elutriates. The elutriate concentrations tested were always lower than the threshold at which abnormal larval development appears. The Cd, Cu and Zn contents of the sediment, of the elutriate and of the larvae, as well as the larval growth, the condition index (C. I.), and the induction of metallothionein (MT) in the larvae were measured. The condition index was only affected after 96 h of exposure, principally at the highest elutriate concentration (25 %, corresponding at 0.1435 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$ and 14 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$). Cd, Cu and Zn bioaccumulation was observed (48 and 96 h), in the whole larvae as well as in the cytosolic fraction of their tissues. Considering individual treatments (controls or different degrees of exposure), the lower metal concentrations were observed in larvae after 96 h exposure, corresponding to a phenomenon of biological dilution. Metallothionein induction in larvae was observed after 96 h exposure at lowest elutriate concentrations tested. MT induction was always strongly correlated with increasing metal contents in the cytosolic fraction. The relationships were significant for all the three studied metals considered individually or in addition. The results indicate that the three metals are bioavailable to *M. galloprovincialis* larvae and that MT induction is a more sensitive indicator of heavy metal pollution than are embryotoxicity or larval growth experiments.

Key words : sediment elutriate, *Mytilus galloprovincialis* larvae, metal bioaccumulation, metallothionein.

INTRODUCTION

Micropollutants resulting from anthropogenic activities adsorb to fine particles in the water column. The sedimentation of these particles then creates deposits which constitute micropollutant reservoirs with pollutant concentrations 1,000 to 5,000 times higher than those in water (Livett, 1988). The remobilization of sedimentary micropollutants, either by natural processes (resuspension during tidal movements and periods of high water turbulence) or artificial means (management-related and dredging operations) has been demonstrated in numerous studies (e.g. reviews by Chapman & Long, 1983; Burton, 1992).

Concentrations of sediment-associated contaminants alone are inadequate to assess the potential threats to the marine and estuarine environment posed by contaminated sediments. The bioassay is an essential tool for environmental assessment, and embryo-larval tests with marine bivalves (oysters of the genus *Crassostrea* and mussels of the genus *Mytilus*) have proved particularly sensitive (His *et al.*, 1999). This type of bioassay, first used by Woelke (1972) to evaluate industrial effluents, has also been proposed as a method to quantify the toxicity of contaminated sediments (Cardwell *et al.*, 1976; Chapman & Long, 1983; Melzian, 1990; Hill *et al.*, 1993; Lourens *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2000).

Metallothioneins (MT), biomarkers of metal exposure, have come into use more recently. MT is a cytosolic protein of low molecular weight that has been shown, both in the laboratory and *in situ*, to be induced by metal contamination in numerous taxa, including mammals, fish and marine invertebrates. It is generally admitted that the primary role of MT is the homeostasis of essential metals such as Cu and Zn. This protein is also involved in the detoxification of non essential metals such as Ag, Cd, Hg (Roesijadi, 1992; Amiard & Cosson, 1997; Cosson & Amiard, 2000). The use of bivalve MT as a biomarker of metal exposure has been reviewed recently (Langston *et al.*, 1998; Cosson, 2000). MT in adult mussels has been proposed as a biomarker of exposure by George & Olsson (1994) and is used in international biomonitoring programs (UNEP/RAMOGE, 1999).

MT-like protein has also been detected in bivalve larvae. Pavicic *et al.* (1985) found an induction of protein of low molecular weight similar to the mammalian metallothionein in unfertilized eggs and D larvae of *Mytilus galloprovincialis* after exposure to 0.1 $\mu\text{g Cd ml}^{-1}$ in seawater (In *M. galloprovincialis*, the D larvae is the first larval stage obtained 48 h after egg fertilization). The induction of MT in veliger has been studied in *Crassostrea virginica* by Ringwood & Brouwer (1995) and Roesijadi *et al.* (1995, 1996, 1997), but these studies are based upon exposures to experimental doses unrealistic compared to environmental concentrations present even in metal-rich areas.

The present study sought to demonstrate the bioavailability of sediment-bound metals to embryos and larvae of *M. galloprovincialis*. Experiments were carried out using a sediment from the Gironde estuary (Atlantic Coast, South of France), which is known to be contaminated by metals (Boutier *et al.*, 1989; RNO, 1995; Amiard -Triquet *et al.*, 1998a). On the contrary, low levels of HAPs ($<1000 \text{ ng g}^{-1}$, Budzinski *et al.*, 1997), PCBs (Pierard, 1995), and organophosphorous and organonitrogenous compounds (Lartiges, 1994) were determined in this area. This sediment had induced 25% of abnormality in *Crassostrea gigas* larvae exposed to sediment elutriate (Geffard, 2001). In the present study fertilized mussel eggs were exposed to diluted elutriates (in order to avoid abnormalities) for 48 and 96 h. The bioaccumulation of metals and MT levels were measured in each experimental series at the end of each exposure period.

MATERIALS AND METHODS

Sediment: samples and storage

Sediment was collected in October 1997 at Le Cheyzin (Gironde estuary, Atlantic Coast, South of France). Only oxidized (top 1cm) of sediment (about 1.5 kg) was removed for sampling, corresponding to the fraction most likely to be resuspended during tidal movements. Desorption studies (Amiard-Triquet *et al.*, 1998a) showed significant mobility of the metals contained in this sediment.

Aliquots of well homogenized sediment (500mg) were immediately prepared for metal analysis, and the remainder was freeze-dried, homogenised and stored in hermetically sealed bottles until bioassays were performed in March 1999. Water content was determined by drying to constant weight at 50°C and organic matter content was determined by drying at 70°C for 48 h followed by incineration at 450°C for 48 h.

Sediment treatment for analysis and bioassays

Elutriate was obtained by a modification of the method of Melzian (1990). Among the well-homogenized freeze-dried sediment (initial sample: $\approx 1.5 \text{ kg}$), 60 g were weighted, rehydrated shaken mechanically (multi-wrist shaker, 500 rpm) in 240 ml of filtered seawater (FSW; 0.2 μm filter) and then allowed to settle for another 8 h. A first portion of the elutriate obtained by siphoning was recovered in an acid-washed polypropylene bottle (Berman *et al.*, 1983) and then acidified at 1:1,000 by Suprapur hydrochloric acid (Carlo Erba). This portion was stored at 4°C in darkness for metal analysis. A second portion was diluted with FSW to test concentrations of 0 (control), 1, 5, 10, and 25%. These concentrations were chosen because previous experiments on

the same lyophilised sediment indicated that they did not disturb the embryonic and larval development of *Crassostrea gigas* (Geffard, 2001).

Larval rearing

Mature mussels (*Mytilus galloprovincialis*) were collected in the Bay of Arcachon on the day the experiment was performed. Egg laying was induced by heat shock (alternate immersions in seawater at 16 and 20°C). Females in the laying process were isolated in 1 liter of FSW, while spawning males were placed in a small amount (around 100 ml) of FSW to obtain a sperm-dense solution. The oocytes and sperm of different bivalves were observed under an inverted microscope, and the best reproductive pair was selected (regularly shaped female gametes and very mobile spermatozooids) for the experiment. The oocytes were fertilized using 5 ml of the sperm-dense solution. Fifteen minutes after fertilization, the embryos were counted and placed in 2-liter beakers (60,000 l⁻¹) filled with the different media to be tested (6 replicates per treatment).

The embryos were incubated at 21 ± 1°C for 48 h in the presence of the different elutriate concentrations tested (6 replicates per treatment) until D larvae were obtained. After incubation, one portion of the larvae was sacrificed for experimental purposes, and the remainder was maintained in rearing conditions for an additional 48 h. In both cases, the weight and mean shell height of veligers were determined according to the technique of His *et al.*, (1983). Size was determined by measuring on photographs the length across the valves. Fifty individuals were measured from each culture. The veligers maintained in rearing status were placed in 2-liter beakers (10,000 larvae l⁻¹; 3 replicates) and fed with cultures of *Isochrysis* and *Chaetoceros* (50,000 cells ml⁻¹ of a mixture of each alga) (Helm & Millican, 1977). A condition index (C.I.) was estimated for each of the rearing categories:

$$C.I. = \frac{\text{Mean weight of a lyophilised larvae } (\mu\text{g})}{\text{Mean shell height of a larvae } (\mu\text{m})} * 100$$

After counting, the larvae were washed with 0.9% aqueous ammonium formate isotonic with sea water (Holland & Hannant, 1973; elimination of NaCl), frozen, lyophilised and stored for chemical and biochemical analysis.

Chemical analysis

Pretreatment of sediments

Aliquots (0.5 g) of fresh sediment were taken from the well-homogenised total sample and placed in acid-washed glass tubes. These samples were then dried and weighted to determine metal

concentration as a function of dry weight. Hot mineralization (95°C) was performed by addition of 5 ml of HNO₃ and 3 ml of HCl. This process was conducted until dryness, and the residues were then resuspended in 10 ml of 1N HCl for analysis of the metals (Charlou & Joanny, 1983).

Pretreatment of elutriates

The extraction and concentration of metals (Cd, Cu, Zn) was performed in FSW (control) and raw elutriate according to the method of Boiteau & Métayer (1978) as modified by Amiard *et al.* (1991). At pH 9, Cd, Cu and Zn were complexed by dithizone in a chloroform phase. However, at pH 2, Cd and Zn enter into acid phase, while Cu remains in the chloroform phase (Charlot, 1966; Irving, 1977). Eight ml of ammonium citrate buffer (which increased pH from 8.0 to 9.0) and 2 ml of dithizone in chloroform solution were added to 100 ml of elutriate or FSW (control) and shaken for 30 min. The FSW (control) or elutriate was then siphoned, and the dithizone was washed away with deionized water before addition of 1 ml of Suprapur hydrochloric acid 1N. At this pH (≈ 2), the Cd and Zn bound to dithizone entered into acid phase where there were analysed, whereas Cu was measured directly in the dithizonate phase.

Extraction of metals and metallothionein from larvae

The tissular compartmentalization of metals and the partial purification of MT have been carried out according to the method described by Mouneyrac *et al.*, 1998. Each replicate of lyophilised larvae was homogenized with a hand-held glass grinder in Tris-NaCl buffer 0.02 M, pH 8.6, at a ratio of 5 ml of buffer per g of larvae (wet weight). Proteolytic reactions and oxidation of MT molecules were avoided by working at 4°C in the presence of β -mercaptoethanol (10 mmol l⁻¹) added to the Tris buffer. Cytosolic (S1) and insoluble (P1) fractions were separated by an initial centrifugation (25,000 g, 55 min at 4°C). MT was isolated from an aliquot of the S1 fraction by a second centrifugation (15,000 g, 10 min at 4°C) after being submitted to heat (75°C, 15 min). This second S2 supernatant containing the MT was frozen at -80°C until MT analysis. Before metal analysis, an acid digestion step at 60°C was required for the soluble (S1) and insoluble (P1) fractions. This step lasted 12 h and involved the addition of Suprapur nitric acid (Carlo Erba) at a ratio of 1:1 of S1 supernatant and 1 ml per 0.5 g of larvae (P1). The solutions obtained were supplemented to a known volume with deionized water.

Metal assays

Following the acid digestion phase, metals were analysed by flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) for Cu and Zn, or electrothermal AAS with Zeeman effect (Hitachi

Z8200) for Cd. The analytical method has been described previously by Amiard *et al.* (1987). Standard addition analysis was performed in an isomedium and concentration for each element were +125, 250 and 500 ng ml⁻¹ for Cu and Zn and +0.25, 0.5 and 1 ng ml⁻¹ for Cd. The assays were validated using certified sediment and mussel tissue samples (Table 1). The result are expressed using concentrations (mg kg⁻¹ dry weight). The total bioaccumulation of metals (Cd, Cu and Zn) in larvae was calculated by summing up the amounts measured in the soluble (S1) and insoluble (P1) fractions.

Assay of larval metallothionein

The MT assay was performed in the S2 fraction by differential pulse polarography. The thiol groups (SH) were determined using Brdicka reagent (Brdicka, 1933) according to the method described by Thompson & Cosson (1984). Measurements were performed at a constant temperature (4°C) on a polarograph with a PAR Model 174 analyser, a PAR/EG&G Model 303 electrode in SMDE mode and an RE0089 type X-Y recorder. The MT amounts measured were determined by a standard addition method using MT rabbit liver metallothionein standard (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) (no MT standard exists for mussels). The validity of this method was confirmed by Olafson & Olsson (1991). The results are expressed in mg kg⁻¹ dry weight.

Statistical analysis

For each series of results, the comparison of values was tested by *t*-tests or one-way ANOVA (Statistica software) after the homogeneity of variances was checked (Cochran's test). Significant differences (at the 95% level) were then determined by Tukey's test. Linear regressions were performed and correlation coefficients (*r*) determined using Excel software.

RESULTS

Characterization of sediment, FSW and elutriate

The water content in the sediment tested was 51%. The organic matter decreased from 7.12% in raw sediment to 3.6% after the preparation of the elutriate, indicating that about 50% of sediment organic matter has been remobilized as soluble compounds in the elutriate. Cd, Cu and Zn concentrations (expressed in µg g⁻¹ of dry weight) were respectively 0.67, 33 and 218 for sediment and 0.485 µg of Cd l⁻¹ and 35 µg of Zn l⁻¹ for elutriate (Table 2) (Samples for Cu determination were lost). Thus dilutions of the raw elutriate led to concentrations of 0.015, 0.0197, 0.0385, 0.062 and 0.14375 µg Cd l⁻¹; 7, 7.28, 8.4, 9.8 and 14 µg Zn l⁻¹ respectively for 0, 1, 5, 10 and 25%.

Larval rearing

No larval deaths and abnormality occurred in the different rearing conditions. No significant differences in shell height were observed in any of the categories after 48 h (Fig. 1A). However, after 96 h (Fig. 1B), mean shell height had increased significantly (Tukey's test, $p=0.013$) from 138 μm for controls to 149 and 151 μm for larvae exposed to 5 and 10% elutriate respectively. Mean shell height was only 141 μm for larvae exposed to 25% elutriate, a value not significantly different from that of controls. The mean weight of one larvae was calculated for the different categories. No significant differences were apparent in any of the categories at 48 h (Fig. 2A). At 96 h, mean weight decreased significantly ($p<0.05$) when the percentage of elutriate increased from 1 to 25% (Fig. 2B). The lowest value (0.422 μg) was obtained with 25% elutriate. After 48 h, the condition index (C.I.) had not changed relative to the elutriate level (Fig. 3A). However, at 96 h (Fig. 3B) it decreased in larvae exposed to 5% to 25% elutriate, although the decrease only became significant ($p<0.05$) for exposure to 10% elutriate.

Bioaccumulation of metals by larvae

The concentration of total Cd (Fig. 4A) in veligers increased as a function of the elutriate percentage. The increase became significant at 48 h for concentrations above 5%, showing values ranging from 0.15 mg.kg^{-1} (controls) to 0.45 mg.kg^{-1} (25% elutriate). After 96 h of exposure, the increase was significant ($p=0.0001$) for 10% elutriate and above, and Cd concentrations ranged from 0.06 mg.kg^{-1} (controls) to 0.39 mg.kg^{-1} (25% elutriate).

The total concentration of Cu (Fig. 4B) also increased in larvae as a function of the elutriate percentage. This effect was noted with 5% elutriate and above after 48 h exposure and for 10% elutriate and above after 96 h. At 48 h, Cu concentrations ranged from 5.11 mg.kg^{-1} (controls) to a maximum value of 11.6 mg.kg^{-1} (10% elutriate), and after 96 h, Cu concentrations ranged from 2.21 mg.kg^{-1} for controls to 10.35 mg.kg^{-1} for individuals exposed to 25% elutriate.

For Zn (Fig. 4C), a significant increase after 48 h was noted only at the highest elutriate percentage tested, showing values of 119 mg.kg^{-1} in controls and 316 mg.kg^{-1} with 25% elutriate. After 96 h, the increase was significant for 10% elutriate and above, showing values of 38 mg.kg^{-1} for controls and 224 mg.kg^{-1} with 25% elutriate.

For each percentage of elutriate tested, metal concentration was generally lower in specimens exposed for 96 h compared to those exposed for 48 h (except in the case of Cu with larvae exposed to 25% elutriate). However, for all three of the metals studied these differences were significant ($0.0009<p<0.0392$) only in control and in larvae exposed to 1 and 5% elutriates. For the three metals and each condition, the total quantities (S1+P1) per individual were always greater

($0.0001 < p < 0.0255$) after 96 h of exposure (not shown) indicating that despite of lowering of concentrations, metals were incorporated in larvae all over the exposure.

For the cytosolic fraction (Fig. 5A, 5B and 5C), generally metal concentrations increased significantly with increasing degree of exposure (percentage of elutriate). The concentrations of cytosolic Cd (Fig. 5A) increased significantly ($p < 0.05$) after 48 h with the highest percentages of elutriate tested (10 and 25%), showing values of 0.10 mg.kg^{-1} for controls and 0.27 mg.kg^{-1} with 25% elutriate. At 96 h, this rise was significant for 10% elutriate and above, showing values of 0.03 mg.kg^{-1} for controls and a maximum value of 0.11 mg.kg^{-1} with 25% elutriate.

Individuals exposed to elutriate for 48 h (Fig. 5B) showed Cu concentrations greater than that of controls, although the difference was not significant. Cu concentrations varied from 2.99 mg.kg^{-1} in controls to 5.24 mg.kg^{-1} with 10% elutriate. At 96 h, the increase was significant ($p = 0.0001$) for 10% and above, and cytosolic Cu concentrations ranged between 0.88 mg.kg^{-1} with 1% elutriate and 4.63 mg.kg^{-1} with 25%.

Cytosolic Zn (Fig. 5C) increased significantly after 48 h of exposure to 25% elutriate compared to individuals exposed to 5% elutriate, showing values between 56 mg.kg^{-1} (5% elutriate) and 212 mg.kg^{-1} (25% elutriate). After 96 h, the increase was significant for 10% elutriate and above, showing values of 11 mg.kg^{-1} in controls and 58 mg.kg^{-1} with 25% elutriate.

Considering each dose of elutriate, specimens exposed for 96 h exhibited lower metal concentrations than those exposed for 48 h, except in the case of Cu when specimens were exposed to 25% elutriate. These differences were generally significant except for Cu and Zn in specimens exposed to 10% elutriate ($p = 0.3412$, $p = 0.35$ respectively). As mentioned above for total metal quantities (S1+P1), the quantities of cytosolic metals were significantly ($0.0001 < p < 0.0414$) greater in individuals exposed for the longer period, except for Cd with 25% elutriate ($p = 0.2051$) and Zn for all exposure levels ($p > 0.0767$) (not shown).

The distribution of Cd among cytosolic and insoluble tissue fractions remained the same, regardless of the incorporation level after 48 h (Fig. 6A). However, at 96 h, Cd became predominant in the insoluble fraction when incorporation increased (Fig. 6B), reaching 75% of total Cd in larvae exposed to 25% elutriate. Cu was distributed equitably between the two tissue fractions and for both time periods (data not shown). For 48 h old larvae, cytosolic Zn increased as a function of the degree of contamination, reaching 60 to 70% in the most contaminated individuals (Fig. 7A). After 96 h, Zn was found mainly in the insoluble fraction, showing a maximum value of 80% for individuals exposed to 25% elutriate (Fig. 7B).

Metallothionein

MT concentrations are shown in Figure 8. During the first 48 h of exposure, MT concentration was not significantly affected by exposure of larvae to different doses of elutriates in their medium ($p=0.932$). In larvae exposed for 96 h, a significant ($p=0.0008$) increase of MT concentration was observed in specimens exposed to doses of 10% elutriate and above. As shown previously for metals, considering each dose of elutriate in the experimental medium, MT concentrations were significantly lower ($0.0001 < p < 0.0458$) after a 96 h exposure than after 48 h, except for larvae exposed to the highest dose of elutriate ($p=0.9908$). Contrary to results presented in concentrations, at 96 h the quantity of MT was not enhanced with increasing metal accumulation (not shown) : the quantity of MT was significantly ($p=0.001$) higher in larvae exposed to any elutriate percentages (0.58 to 0.69 ng.larvae⁻¹) compared to control (0.42 ng), but this quantity was similar in all specimens exposed to different percentages (1 to 25%) of elutriates.

Relationships between metals and metallothionein

All three of the elements studied (Cd, Cu et Zn) bind to MT and might therefore contribute concomitantly to MT induction, so the relationship between MT and metal levels has been examined taking into account metals individually or in addition (mgatom kg⁻¹ dry weight)

No significant correlation were observed between concentration of MT and that of cytosolic Cd, Cu, Zn or the mixture of these three metals during the first period of exposure (48 h) (results not shown). In larvae exposed for 96 h, strongly significant positives relationships were always observed (Table 3), as metals were considered individually or in addition.

DISCUSSION

The sediment from the Gironde estuary tested in the present study was a fine mud with relatively high levels of organic matter. Desorption tests have shown that 15, 35 and 55% of sediment-bound Cd were extractable at pHs 7.1, 5.5 and 4.1 respectively (Geffard, 2001). Similar results were obtained in sediments collected previously in the same estuary (Amiard-Triquet et al., 1998a). Moreover, bioassays carried out with the sediment used in the present study showed that the main metal contaminants (Cd, Cu and Zn) were bioavailable, as shown by the large number of larval abnormalities found at high concentrations of elutriate (100%) (Geffard, 2001). The seawater used in the present study was obtained from the Bay of Arcachon, which is devoted to an important activity of oyster-farming based on Pacific oysters (*Crassostrea gigas*), and was thus assumed to have good “biological quality” (His et al., 1999). For instance, as shown in table 2, metal concentrations were consistently lower in the Bay of Arcachon than in the Loire and Gironde

estuaries. From Cd and Zn concentrations in the raw elutriate and seawater, and the percentages of this elutriate tested here in the bioassays, it may be estimated that larvae were exposed to doses varying from 0.019 to 0.122 $\mu\text{g Cd l}^{-1}$; from 7.3 to 14 $\mu\text{g Zn l}^{-1}$. They are representative of the concentrations found in the Gironde estuary waters (Table 2). According to Boutier *et al* (1989), seawater must be considered contaminated if Cd concentrations exceed 0.03 $\mu\text{g l}^{-1}$. Nevertheless, the concentrations of both Cd and Zn were lower than those affecting embryogenesis in *Mytilus galloprovincialis* (EC₅₀ of 4,000 $\mu\text{g l}^{-1}$ for Cd and 145 $\mu\text{g l}^{-1}$ for Zn; see review by His *et al.*, 1999). The EC50 for Cu were comparatively very low, from 3.2 to 10 $\mu\text{g l}^{-1}$ (His *et al.*, 1999) that is to say in the same order of magnitude as Cu concentrations at the mouth of the Gironde (Table 2). The speciation of these metals in natural waters of the Gironde estuary as well as in the elutriate, and thus their potential toxicity, presumably differed from those of the metal salts used in other bioassays. It has been shown that a significant fraction of the organic matter initially present in the sediment was indeed remobilized concomitantly with metals during elutriation.

No mortality occurred during the experiments and no abnormal larvae were observed. No significant differences were registered considering the shell height, the weight and the condition index of larvae exposed to sediment elutriates for 48 h. At 96 h mean shell height was slightly greater at 5 and 10% elutriates, either as a result of hormesis phenomena (Stebbing, 1982) or due to the additional supply of small amounts of essential elements or soluble organic matter which may have enhanced larval growth. However, at 25% elutriate, the larval height was no longer different from that of controls. The 96 h old larvae reared at elutriate concentrations higher than 10% had a lower weight than controls, with a correspondingly lower condition index (C.I.) which may thus represent an early indicator of stress. Determination of the C.I. in veligers exposed to micropollutants may therefore constitute a more sensitive toxicity endpoint than larval growth test based on the determination of height, which is the criterion commonly used to assess sublethal toxicity (His *et al.*, 1999).

Metal levels in the whole larvae as well as in their cytosol (particularly Cd), increased with the degree of contamination in the experimental medium. The potential bioavailability of sediment-bound metals was also observed by Fichet *et al* (1998) in larvae of several invertebrate species. At similar doses of contaminants in the experimental medium, metal levels in larvae were lower at 96 h than 48 h. Such a phenomenon, termed « biological dilution », corresponds to a tissue growth which is faster than metal incorporation, leading to a decrease of the concentration. Similar negative relationships between metal concentration and weight (and/or age, and/or size) have been observed in adults from different species (Langston *et al.*, 1998), including mussels and oysters (Amiard *et al.*, 1986; Amiard & Berthet, 1996) and particularly spat of clams *Ruditapes philippinarum* (Amiard

et al., 1991) and oysters (Amiard *et al.*, 1994). Moreover, in the bivalve *Isognomon californicum*, Ringwood (1991) observed higher accumulation rate of Cd during embryogenesis than in veligers and pediveligers, leading to highest concentrations in embryos. As for metals, MT concentrations were lower in 96 h old larvae. The general growth of larval tissues was more important than the induction rate of this particular protein. Similarly, negative relationship between tissue weight and MT concentrations have been observed previously in adults belonging to different bivalve species such as *Crassostrea gigas* (Mouneyrac *et al.*, 1998) or *Macoma balthica* (Amiard-Triquet *et al.*, 1998b).

No MT induction was observed during embryogenesis (48 h) in larvae exposed to different doses of elutriates. This may be due to the fact that little uptake occurred in the soluble fraction, except to the highest doses for Cd and Zn. Pavicic *et al.* (1994) have observed MT induction during embryogenesis but in specimens exposed to high doses of Cd (2.75 mg l^{-1}). At the lower doses tested in our study, the amount of MT in oocytes (termed “maternal MT” by Roesijadi *et al.*, 1996 in *Crassostrea virginica*) could be sufficient to regulate the essential needs of the larvae, particularly with respect to Zn as well as to handle excessive amounts of Cd. In addition, considering MT concentrations, it is striking to observe an important decrease in 96 h old specimens compared to 48 h old ones. It must be duly noted that the tissular distribution of Cd and Zn is strongly modified during this period of life, highest concentrations of soluble metals being consistent with highest MT concentrations in 48 h old specimens. If larvae have to cope with metals, after this period of embryogenesis, native MT is no longer sufficient to handle additional metals, particularly Cd and Cu which have the greatest affinity for this protein (Viarengo & Nott, 1993). Therefore, between the age of two and four days, MT induction enables them to detoxify Cd and other essential elements present in excessive amounts. In 96 h old larvae, MT-concentration increase paralleled indeed increasing doses of sediment elutriate in their medium. However, in these 96 h old larvae, MT quantities were higher in exposed larvae than in controls but no significant differences were revealed between treatments (1 to 25% elutriate). The steadiness of MT quantities in 96 h old larvae exposed to a range of contaminant doses, as well as their relatively poor physiological status revealed by condition indices lower than in controls, could evoke a situation which has been termed previously « spillover » (Brown and Parsons, 1978). Such a phenomenon has been described in field experiments with the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* translocated along a polymetallic (Cd, Zn) pollution gradient : at the most polluted station, where mortality occurred, MT levels did not increase despite a very important metal accumulation whereas in lesser impacted sites, positive correlations were registered between metal and MT levels (Baudrimont *et al.*, 1999).

CONCLUSIONS

No assessment of potential noxious effects on living organisms may be derived from chemical analysis carried out to determine pollution of sediments. The complex actions and the bioavailability of contaminants depend on their speciation (Kersten & Förstner 1989, Luoma, 1995) and an accurate assessment requires bioassays (Chapman & Long, 1983; Burton, 1992; Miller *et al.*, 2000).

By determining veliger contamination and MT induction, bioassays with D larvae of *Mytilus galloprovincialis* carried out in the present study showed that contaminated sediment from the Gironde estuary releases metal micropollutants into the water column. As indicated by Bayne (1985), “the molecules that probably offer the greatest potential for monitoring of biological effects...are enzymes, and the functional proteins such as metallothioneins”. Bivalve embryos and larvae are the marine organisms of choice for bioassays. In a review of the literature, His *et al.* (1999) classified the various larval stages by their sensitivity to micropollutants:

growth > embryogenesis > D larvae > unboned larvae > pediveliger.

In agreement with the conclusions of Bayne (1985) and Pavicic *et al.* (1994), the present study confirms the greater sensitivity of MT induction as compared to larval growth (based on larvae height) and even the C.I. in veligers.

With regard to regulations for the protection of the coastal environment, the assessment of sediment quality, which is essential to any management activity, is mainly based today on tests with various marine organisms. The “Sediment Quality Triad” of Chapman *et al.* (1987) is one of the most sophisticated methods for this purpose. If measures are to be taken to protect the economically important aquaculture sector, it is obviously necessary to use the most sensitive instruments available, such as an early indicator of stress. This is particularly true for enclosed bodies of water in which the natural reproduction of bivalves constitutes the basis for an entire area of the economy. A striking example of this is tributyltin (TBT) in antifouling paints, which caused reproduction failures in *Crassostrea gigas* over a period of about five years, almost leading to the disappearance of oyster culture in the Bay of Arcachon (His, 1996).

In closed bays with extensive reproduction, it is possible to monitor cohorts of larvae in the natural environment, both for their growth and biochemical composition (His & Maurer, 1988). However, except in special cases, it is difficult to identify the possible causes of reproductive failure (*i.e.* poor larval growth, with important size differences within the same cohort), which may result

from various environmental factors and/or one or more micropollutants in the environment (*e.g.* His *et al.*, 1999). As it is quite possible to isolate bivalve larvae in quantities allowing biochemical analysis, it should be easy to identify unfavourable causes due to metal micropollutant effects by measuring MT induction in veligers.

LITERATURE CITED

- Amiard JC, Amiard-Triquet C, Berthet B, Métayer C (1986) Contributions to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. I field study. *Mar Biol* 90:425-431
- Amiard JC, Berthet B (1996) Fluctuations of cadmium, copper, lead and zinc concentrations in field populations of the pacific oyster *Crassostrea gigas* in the bay of Bourgneuf (Atlantic coast, France). *Ann Inst Océanogr Paris*, 72 (2) : 195-207
- Amiard JC, Cosson RP (1997) Les métallothionéines. In : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds) *Biomarqueurs en écotoxicologie-Aspects fondamentaux*. Masson, Paris, p 53-66
- Amiard JC, Métayer C, Baud JP, Ribeyre F (1991) Influence de divers facteurs écologiques sur la bioaccumulation d'éléments métalliques (Cd, Cu, Zn, Pb) chez les jeunes palourdes (*Ruditapes philippinarum*) au cours du prégrossissement en nourricerie. *Rev Sci Eau* 4 : 441-452
- Amiard JC, Métayer C, Baud JP, Ribeyre F (1994) Influence of some ecological and biological factors on metal bioaccumulation in young oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) during their spat rearing. *Wat Res* 28 (1) 219-231
- Amiard JC, Pineau A, Boiteau HL, Métayer C, Amiard-Triquet C (1987) Application de la spectrométrie d'absorption atomique Zeeman aux dosages de huit éléments traces (Ag, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Se) dans les matrices biologiques solides. *Wat Res* 21:693-697
- Amiard JC, Queguiner F, Camus Y (1991) Variations spatiales des concentrations métalliques (Cd, Cu, Pb) des eaux de la mer d'Iroise. *Oceanologica acta* 14:141-150
- Amiard-Triquet C, Altmann S, Amiard JC, Ballan-Dufrançais C, Baumard P, Budzinski H, Crouzet C, Garrigues P, His E, Jeantet AY, Menasria R, Mora P, Mouneyrac C, Narbonne JF, Pavillon JF (1998a) Fate and effects of micropollutants in the Gironde Estuary, France : a multipoluridisciplinary approach. *Hydrobiologia* 373/374:259-279
- Amiard-Triquet C, Rainglet F, Larroux C, Régoli F, Hummel H (1998b) Metallothioneins in arctic Bivalves. *Ecotox Environ Saf* 41:96-102
- Baudrimont M, Métivaud J, Maury-Brachet R, Ribeyre F, Boudou A (1997) Bioaccumulation and metallothionein response in the Asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ Toxicol Chem* 16:2096-2106
- Bayne BL (1985) Ecological consequences of stress. 4 Biochemical Measurements. In : Bayne BL, Brown DA, Burns K, Dixon DR, Ivanovici A, Livingstone DR, Lowe DM, Moore MN, Stebbing ARD, Widdows J (eds) *The Effects of Stress and Pollution on marine Animals*. Praeger Publishers, New York, p 81-140
- Berman SS, Sturgeon RE, Desaulniers JAH, Mykytiuk AP (1983) Preparation of the sea water reference material for trace metals, NASS-1. *Mar Pollut Bull* 14:69-73
- Boiteau HL, Métayer C (1978) Microdosage du plomb, du cadmium, du zinc et de l'étain dans des milieux biologiques par spectrométrie d'absorption atomique après minéralisation et extraction. *Analisis* 6:350-358
- Boutier B, Chiffolleau JF, Jouanneau JM, Latouche C, Philipps I (1989) La contamination de la Gironde par le cadmium : origine, extension, importance. *IFREMER, Rapp Sci Tech* 14
- Brdicka A (1933) Polarographic studies with the dropping mercury method. A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solution of ammonium chloride. *Collect Czech Chem Commun* 5:112-128
- Brown DA, Parsons TR (1978) Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 35:880-884

- Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Piérard C, Garrigues P (1997) Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar Chem* 58:85-97
- Burton GA Jr (1992) Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, London
- Cardwell RD, Woelke CE, Carr MI, Sanborn EW (1976) Sediment and elutriate toxicity to oyster larvae. In Krenkel PA, Harrisson J, Burdick JC (eds) Proceedings of the Special Conference on Dredging and its environmental effects, 3rd ed. American Society of Civil Engineers, New York, p 684-718
- Chapman PM, Dexter RN, Long ER (1987) Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. *Mar Ecol Prog Ser* 37:75-96
- Chapman PM, Long ER (1983) The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar Pollut Bull* 14:81-84
- Charlot G (1966) Les méthodes de la chimie analytique. Analyse quantitative minérale. Masson, Paris
- Charlou JL, Joanny M (1983) Dosage du mercure et d'autres métaux (Pb, Zn, Cu, Cd, Co, Ni, Cr, Mn) dans les sédiments marins par adsorption atomique. In : CNEXO (ed) Manuel des analyses chimiques en milieu marin, BNDO, Brest, 285-295
- Cossa D, Lassus P (1989) Le cadmium en milieu marin, biogéochimie et écotoxicologie. *Rapp Sci tech. IFREMER*
- Cosson RP (2000) Bivalve metallothioneins as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals : limits and perspectives. *Cell mol Biol* 46 (2) : 295-309
- Cosson RP, Amiard JC (2000) Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals. In : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds) Use of biomarkers for environmental quality assessment. Science Publishers, Plymouth, p 79-111
- Fichet D, Radenac G, Miramand P (1998) Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae: bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Mar Poll Bull* 36 (7-12) : 509-518
- Geffard A (2001) Réponses du biota à la contamination polymétallique d'un milieu estuarien, la Gironde, Fr: Exposition, imprégnation, induction d'une protéine de détoxification, la métallothionéine, impact au niveau individuel et populationnel. Thèse de doctorat, Université de Nantes, Nantes, 252p.
- George SG, Olsson PE (1994) Metallothioneins as Indicators of Trace Metal Pollution. In : Kramer KJM (ed) Biomonitoring of coastal waters and estuaries. CRC Press, Boca Raton, p 151-178
- Helm MM, Millican PF (1977) Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11:1-12
- Hill IR, Matthiessen P, Heimbach F (1993) Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments. In: Hill IR, Matthiessen P, Heimbach F (eds). SETAC, 105p.
- His E (1996) Embryogenesis and larval development in *Crassostrea gigas* : experimental data and field observations on the effects of tributyltin compounds . In : Champ M, Seligman P.F (eds) Organotin. Chapman & Hall, London, New York, p 239-258
- His E, Beiras R, Seaman M (1999) The assessment of aquatic contamination : bioassays with bivalve larvae. *Adv Mar Biol* 37:1-178
- His E, Maurer D (1988) Shell growth and gross chemical composition of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in the field. *Aquaculture* 69:185-194
- His E, Maurer D, Robert R (1983) Estimation de la teneur en acétate tributyle-étain dans l'eau de mer par une méthode biologique. *J moll Stud* 12A : 60-68
- Holland DL, Hannant PJ (1973) Addendum to a micro-analytical scheme for the biochemical analysis of marine invertebrate larvae. *J Mar Biol Assoc UK* 53:833-838

- Irving HMNH (1977) Dithizone. Analytical Sciences Monograph n°5. The Chemical Society, London
- Kersten M, Förstner U (1989) Speciation of trace elements in sediment. In : Batley GE (ed) Trace Element Speciation Analytical Methods and Problems. CRC Press, 246-309
- Langston WJ, Bebianno MJ, Burt GR (1998) Metal handling strategies in molluscs. In : Langston WJ, Bebianno MJ (eds) Metal Metabolism in Aquatic Environments, Chapman & Hall, London, p 219-283
- Lartiges S (1994) Analyse et devenir de pesticides organophosphorés et organoazotés dans l'environnement aquatique. Thèse de Doctorat, No. 1155. Université de Bordeaux I, Bordeaux, 193 p
- Livett EA (1988) Geochemical monitoring of atmospheric heavy metal pollution : theory and applications. Adv Ecol Res 18:65-177
- Lourens JM, Vonck AP, Guchte CV, Hartnack J, Stronkhorst J (1995) Sediment toxicity testing of lightly contaminated dredged material in the Netherlands. J Aquat Ecosyst Health 4 : 271-275
- Luoma SN (1995) Prediction of metal toxicity in nature from bioassays : limitations and research needs. In : Tessier A, Turner DR (eds) Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic System, John Wiley & Sons, Vol 3 pp 609-646
- Melzian BD (1990) Toxicity assessment of dredged materials : acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In : Alzieu C, Gallenne B (eds). Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities. Goubault Imprimeur, s. a. , Nantes, France, p 49-64
- Miller BS, Pirie DJ, Redshaw CJ (2000) An assessment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. Mar Pollut Bull 40(22) : 22-36
- Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C (1998) Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. Mar Ecol Prog Ser 162 :125-135
- Olafson RW, Olsson PE (1991) Electrochemical detection of metallothionein. Methods Enzymol 205:205-213
- Pavicic J, Skreblin M, Kregar I, Tusek-Znidaric M, Stegnar P (1985) Formation of inducible Cd-binding proteins in selected organs and developmental stages of *Mytilus galloprovincialis*. VII^{es} Journées Etud. Pollut. C. I. E. S. M., Lucerne, 1984, 699-705
- Pavicic J, Skreblin M, Kregar I, Tusek-Znidaric M, Stegnar P (1994 a) Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to the elevated sea water metal concentrations-1. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. Comp Biochem Physiol 107:249-257
- Pierard C (1995) Détermination des composés polychlorobiphényles dans l'environnement sédimentaire marin et estuarien. Thèse de Doctorat, No. 1346. Université de Bordeaux I, Bordeaux, 226 p
- Ringwood AH, Brouwer M (1995) Patterns of metalloprotein expression in oyster embryos. Mar Environ Res 39:101-105
- R.N.O (1984) Résultats des contrôles : colonne d'eau 1982. Bulletin du R.N.O, n°19, CNEXO, 1983
- R.N.O (1995) Surveillance du milieu marin. Travaux du R.N.O, IFREMER, Edition 1995
- Roesijadi G (1992) metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. Aquat Tox 22 : 81-114
- Roesijadi G, Hansen KM, Fuentes ME (1995) Cadmium-induced expression of metallothionein and suppression of RNA to DNA ratios during molluscan development. Toxicol Appl Pharmacol 133:130-138

- Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME (1996) Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol Appl Pharmacol* 140:356-363
- Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME (1997) Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aquat Toxicol* 39:185-194
- Stebbing ARD (1982) Hormesis - The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Sci Total Environ* 22:213-234
- Thompson JAJ, Cosson RP (1984) An improved Electrochemical Method for the Quantification of Metallothioneins in Marine Organisms. *Marine Environ Res* 11:137-152
- UNEP/RAMOGGE (1999) Manual on the biomarkers recommended for the MED POL Biomonitoring programm. UNEP, Athens, 92p
- Viarengo A, Nott JA (1993) Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp Biochem Physiol* 140C:355-372
- Woelke CE (1972) Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. Washington Dept. of Fisheries, Tech. Rep. 9:1-93

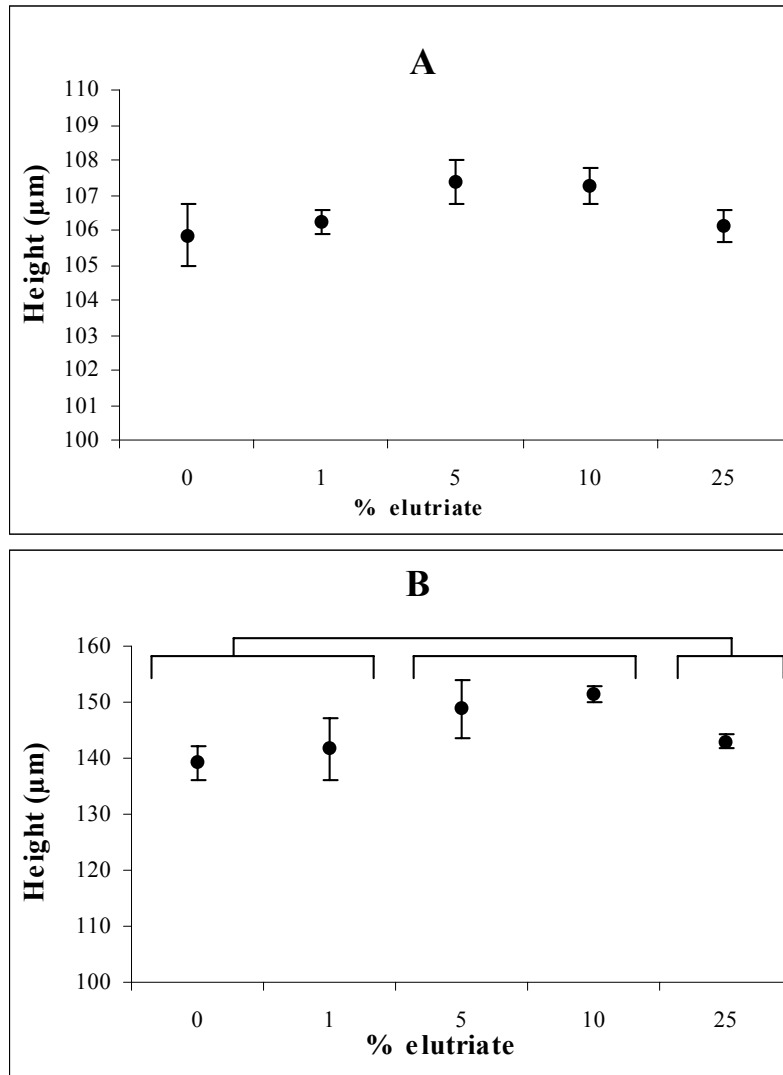


Figure 1 : Height ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) of *Mytilus galloprovincialis* larvae after exposure to a range of sediment elutriate percentages during 48 h (A) and 96 h (B). Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120,000 and 20,000 larvae at 48 and 96 h respectively.

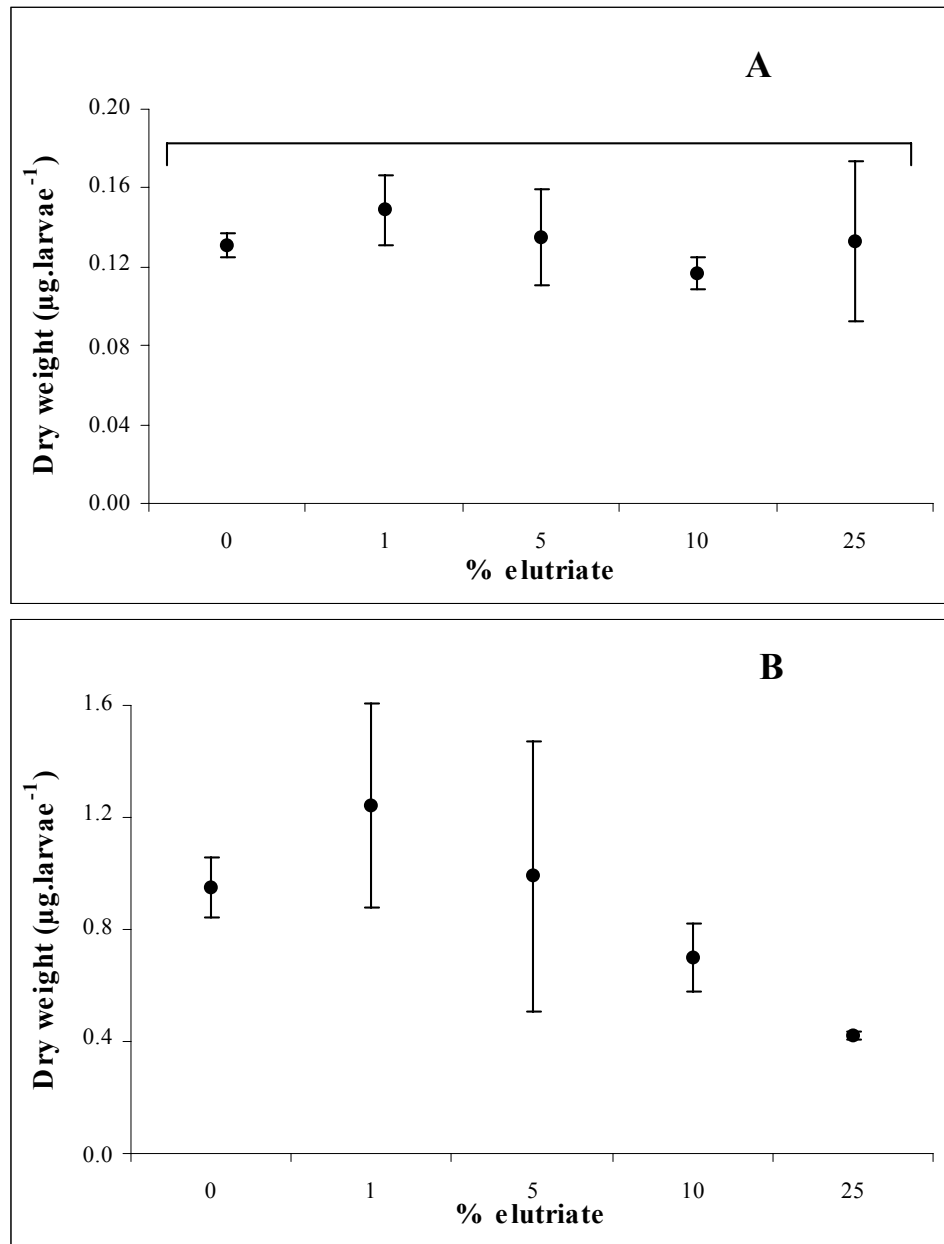


Figure 2 : Dry weight per larvae ($\mu\text{g} \pm \text{SD}$) after exposure of 48 h (A) and 96 h (B) to a range sediment elutriate concentrations. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120,000 and 20,000 larvae at 48 and 96 h respectively.

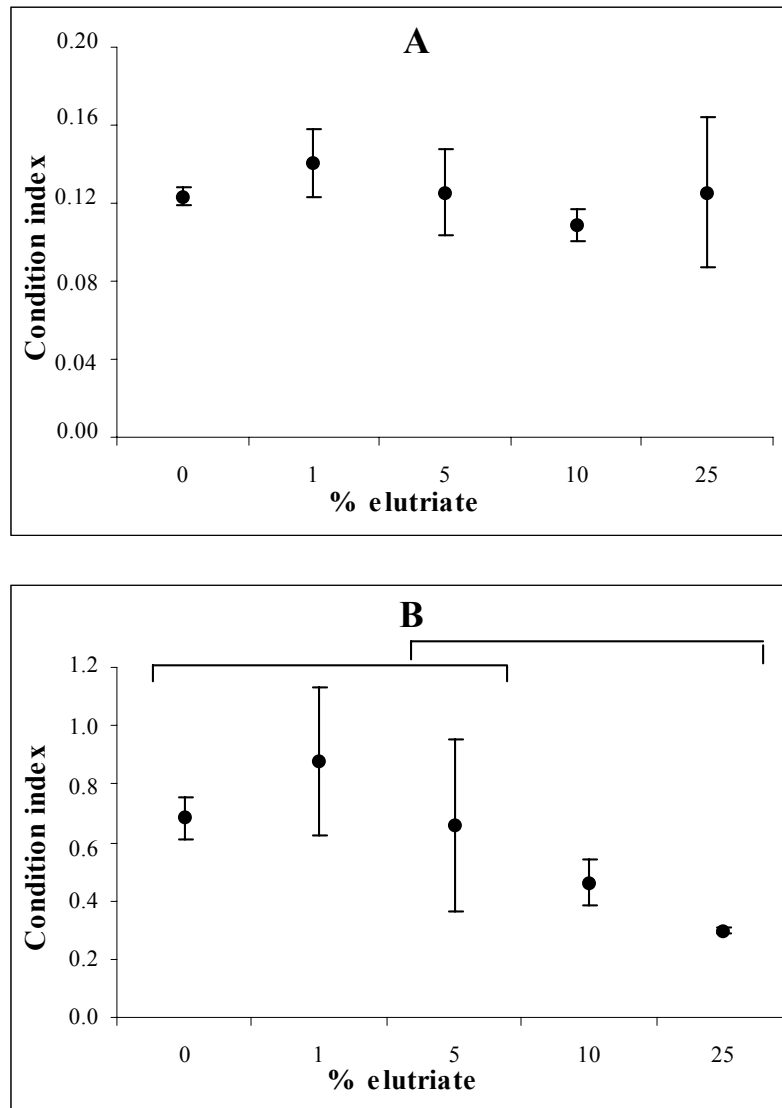


Figure 3 : Condition index (\pm SD) of *Mytilus galloprovincialis* larvae after exposure to a range of sediment elutriate percentages during 48 h (A) and 96 h (B). Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120,000 and 20,000 larvae at 48 and 96 h respectively.

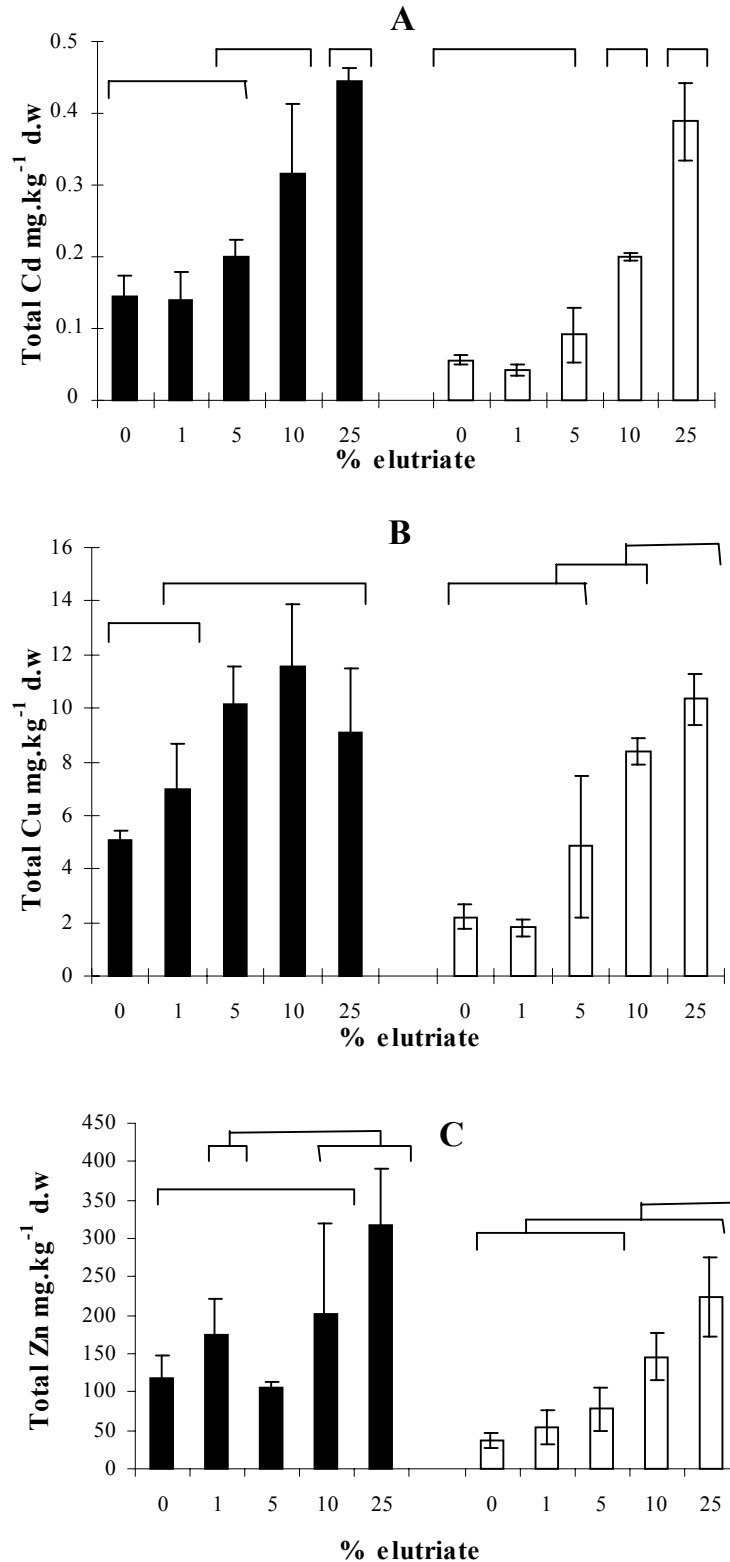


Figure 4: Total metal (S1+P1; Mean± SD) concentrations (Cd, A; Cu, B; Zn, C) in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 h (black bars) and 96 h (white bars) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120,000 and 20,000 larvae at 48 and 96 h respectively.

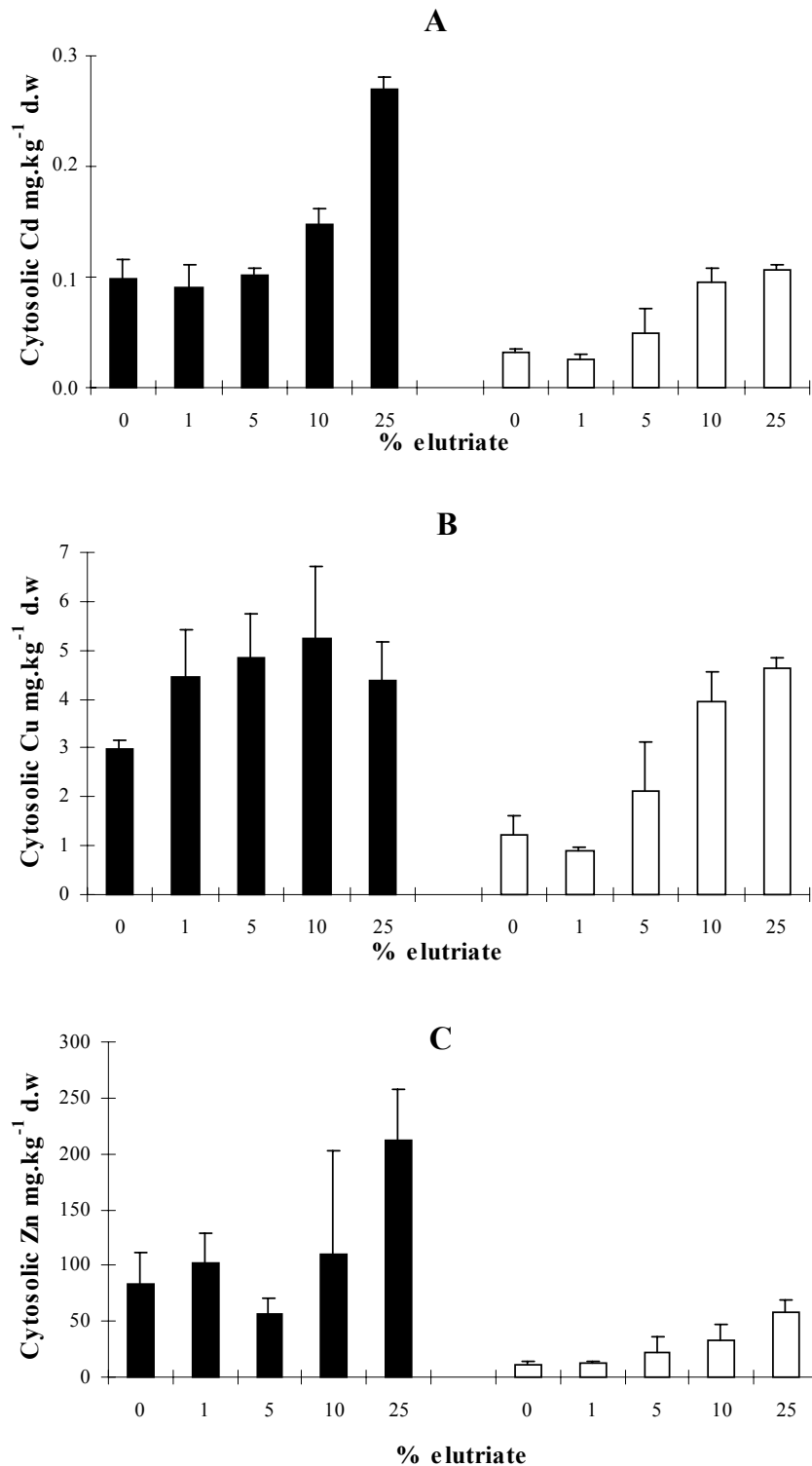


Figure 5 : Cytosolic metal (S1; Mean \pm SD) concentrations (Cd, A; Cu, B; Zn, C) in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 h (black bars) and 96 h (white bars) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120,000 and 20,000 larvae at 48 and 96 h respectively.

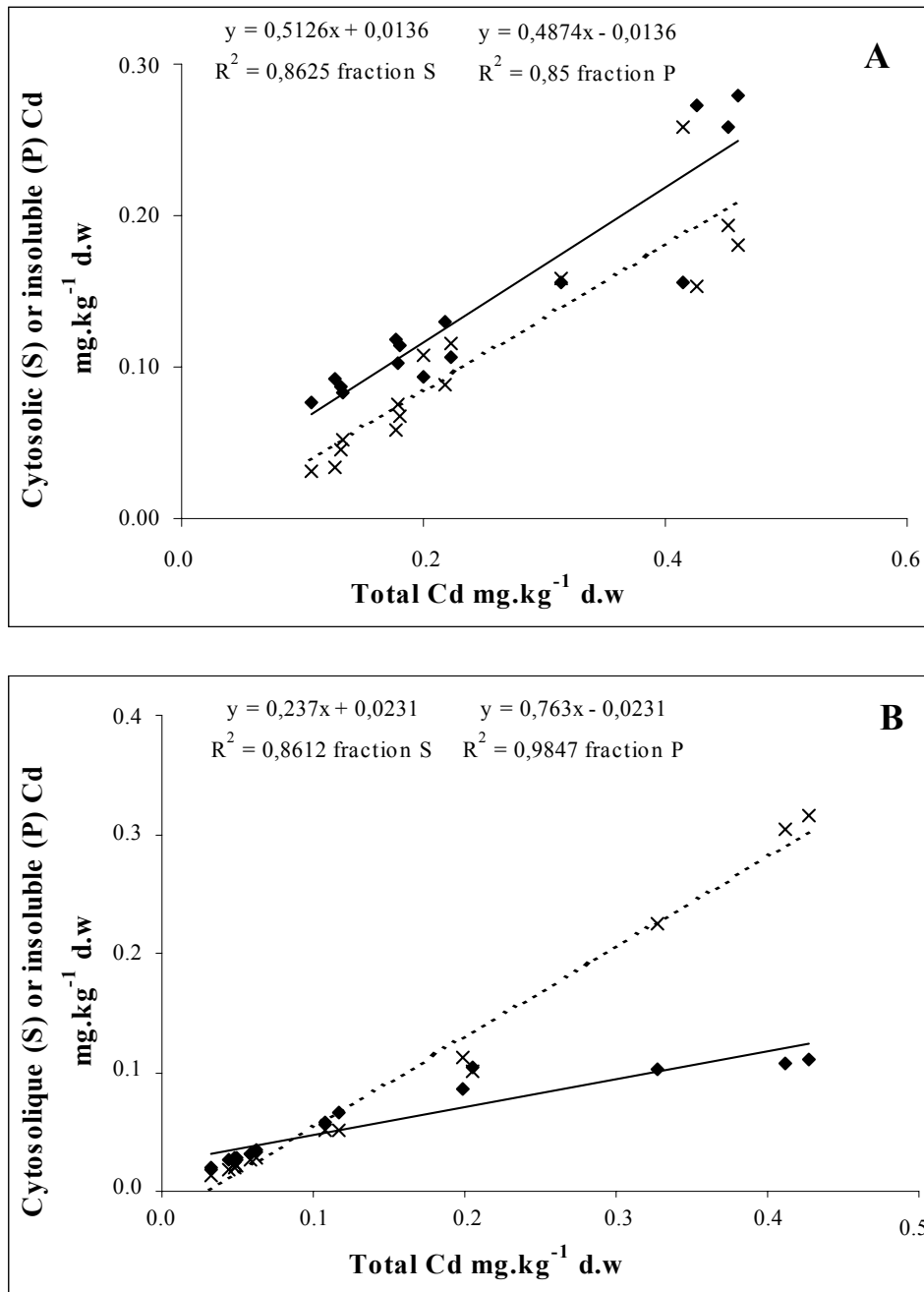


Figure 6 : Relationships between total and cytosolic (S1; dotted lines) or insoluble (P1; continuous lines) Cd in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 (A) or 96 h (B) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Equations and correlation coefficients were determined for each fraction. Each replicates containing about 120,000 and 20,000 larvae at 48 and 96 h respectively.

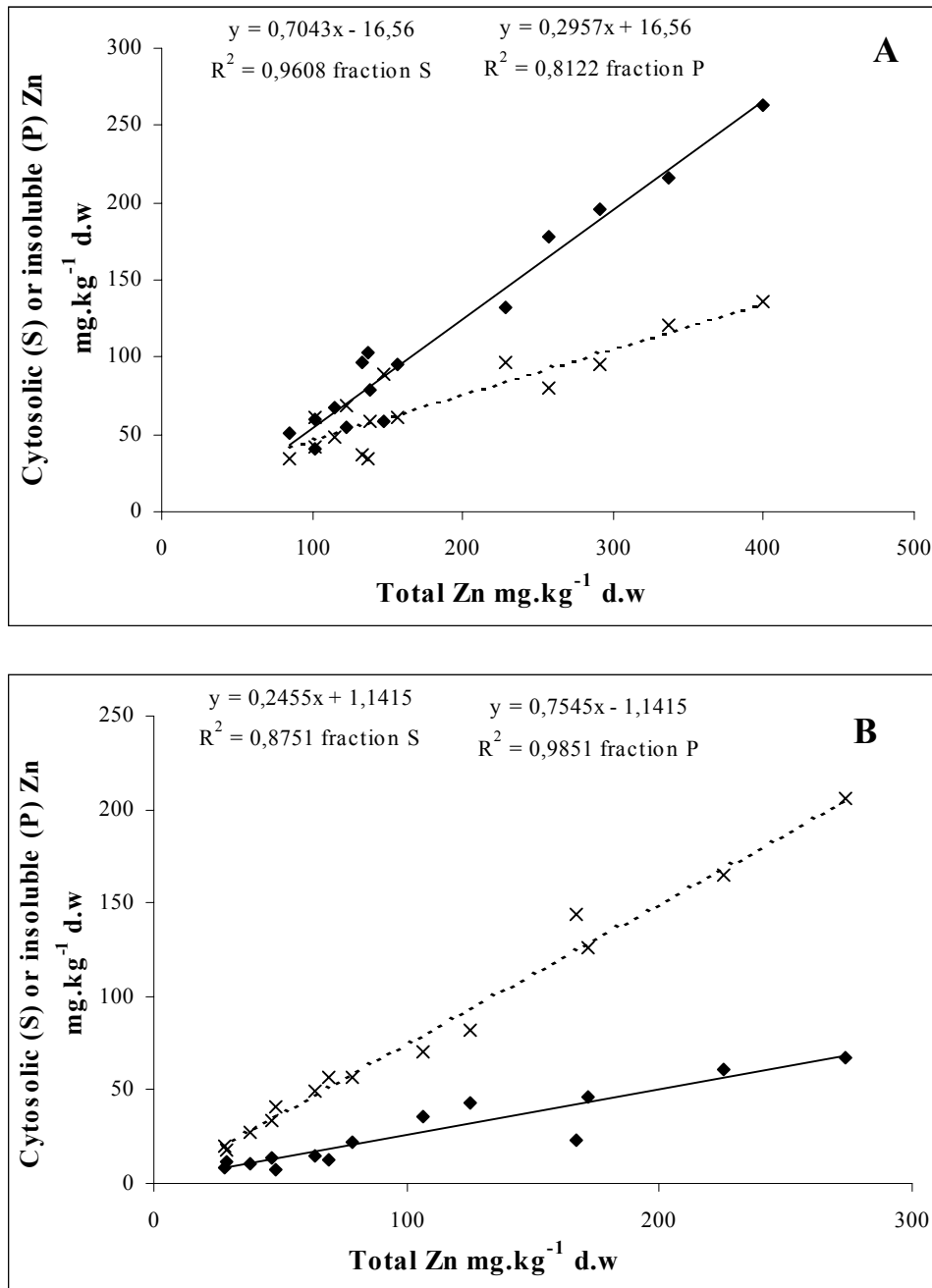


Figure 7 : Relationships between total and cytosolic (S1; dotted lines) or insoluble (P1; continuous lines) Zn in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 (A) or 96 h (B) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Equations and correlations coefficient were determined for each fraction. Each replicates containing about 120,000 and 20,000 larvae at 48 and 96 h respectively.

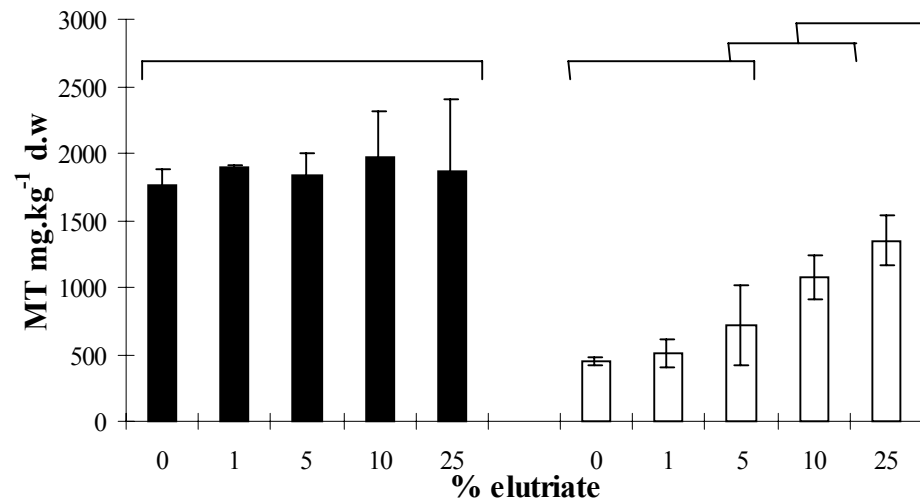


Figure 8 : Metallothionein concentrations (Means \pm SD) in *Mytilus galloprovincialis* larvae after 48 (black bars) or 96 h (white bars) of exposure to a range of sediment elutriate percentages. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line. (ANOVA, $p < 0.05$; Tukey's test). Each mean corresponding to three replicates, each of them containing about 120,000 and 20,000 larvae at 48 and 96 h respectively.

Table 1 : Results of internal quality control (mean concentrations and standard deviations in mg kg⁻¹ dry weight).

Mussel tissue BCR standard reference Materiel 278 R, Sample identification N°622			
	Cadmium (mg kg ⁻¹)	Copper (mg kg ⁻¹)	Zinc (mg kg ⁻¹)
Our values :	0.349 (± 0.013)	9.58 (± 0.12)	76.2 (± 0.5)
Certified values :	0.34 (± 0.002)	9.6 (± 0.16)	76 (± 2)

Standard Marine Sediment Homogenate SD-M-2/TM IAEA MONACO			
	Cadmium (mg kg ⁻¹)	Copper (mg kg ⁻¹)	Zinc (mg kg ⁻¹)
Our values :	0.127 (± 0.003)	28.7 (± 0.3)	71.8 (± 2.25)
Certified values :	0.113 (0.108-0.149)	32.7 (31.7-34.2)	74.8 (72.0-78.3)

Table 2 : Cadmium, copper and zinc concentrations in the sediment (µg g⁻¹ dry weight ± SD), filtered sea water (µg l⁻¹, control used in the present study), and concentrations at various estuarine and marine locations. References: 1: present study; 2: RNO 1984; 3: Cossa and Lassus, 1989; 4: Boutier *et al*, 1989.

	Cadmium	Copper	Zinc	References
Sediment (µg g ⁻¹ dry weight)	0.67 (0.04)	33 (3)	218 (31)	1
Filtered sea water (Arcachon) (µg l ⁻¹)	0.015	0.4	7	1
Raw elutriate (µg l ⁻¹)	0.485	lost	35	1
Loire estuary water (mouth) µg l ⁻¹	0.37 (0.05-1.43)	1.72 (0.6-2.3)	4.2 (0.7-10.6)	2
Loire estuary water (open sea) µg l ⁻¹	0.02 (0.02-0.02)	1.67 (0.6-2.7)	3.85 (1.9-5.8)	2
Gironde estuary water (mouth) µg l ⁻¹	0.67 (0.3-1.7)	5.92 (2-14)	12 (6-24)	2
Gironde estuary water (mouth) µg l ⁻¹	0.380			3
Gironde estuary water (open sea) µg l ⁻¹	0.25 (0.20-0.30)	3.6 (2.2-5)	10 (8-12)	2
Ocean atlantic water (surface) µg l ⁻¹	0.002-0.016			4

Table 3 : Equations of the relation between cytosolic Cd, Cu, Zn or Cd+Cu+Zn and MT in larvae after exposure of 96 h to a range of sediment elutriate concentrations. n : number of samples (three for each elutriate concentration tested). r^2 : correlation coefficient. ** shown that the relation is significantly correlated at 99%.

	Equation	n	r^2
Cd	$Y = 10166x + 205.5$	15	0.888**
Cu	$Y = 228.53x + 240,03$	15	0.8829**
Zn	$Y = 16.043x + 380.01$	15	0.7168**
Cd+Cu+Zn	$Y = 1015.9x + 341.36$	15	0.7458**

Publication n°10 :

Responses of *Crassostrea gigas* larvae exposed to elutriate from metal-rich sediment: growth, metal bioaccumulation and induction of metallothionein.

O. Geffard, A. Geffard, E. His, JC. Amiard

Des œufs fécondés et des larves de *Crassostrea gigas* ont été exposés à un éluviat, obtenu à l'aide d'un sédiment contaminé par les métaux, ceci afin de comparer différentes réponses biologiques : l'embryotoxicité, la croissance larvaire, la bioaccumulation métallique et l'induction de métallothionéines (MT).

Les concentrations d'éluviat testées sont inférieures à celles entraînant des anomalies larvaires. Seules les larves exposées pendant 10 jours à la concentration la plus élevée présentent une taille sensiblement plus faible. Après dix jours d'exposition, des accumulations métalliques ont été observées au niveau de la larve entière (fraction soluble et insoluble), en ce qui concerne le cuivre et au niveau de la fraction soluble pour le cuivre et le cadmium. Les concentrations de MT augmentent en fonction de la contamination du milieu. Cette induction de MT devient significative chez les larves exposées à une concentration de sédiment supérieure à 16.2 g l⁻¹. Les concentrations cytosoliques de Cd, Cu et Zn (considérés individuellement ou ensemble) sont toujours significativement corrélées aux teneurs de MT. Ces relations sont également significatives lorsque l'on considère les teneurs en métaux totaux, c'est à dire dans l'organisme entier (fraction soluble et insoluble).

La réponse sensible et précoce des métallothionéines, ainsi que les corrélations significatives observées avec les teneurs métalliques constituent de bons arguments pour proposer les larves de bivalves comme matrice biologique pour la détermination de la MT comme biomarqueur d'exposition métallique. Cette réponse moléculaire précoce peut servir de signal d'alarme, d'une contamination métallique, avant que des anomalies larvaires n'apparaissent. Ceci est d'autant plus important que c'est le succès de la reproduction (développement embryonnaire normal) qui conditionne le maintien de la population.

Mots clés : Croissance larvaire, *Crassostrea gigas*, éluviat, métaux, bioaccumulation, métallothionéine

Soumise à *Environmental Toxicology and Chemistry*

Responses of *Crassostrea gigas* larvae exposed to elutriate from metal-rich sediment: growth, metal bioaccumulation and induction of metallothionein.

O. Geffard^{*1}, A. Geffard², E. His¹ and J.C. Amiard²

¹ IFREMER, DEL/PC, quai du Commandant Silhouette, 33120 Arcachon, France

² Service d'Ecotoxicologie, ISOMer, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, BP 92208, 44322 Nantes, France

ABSTRACT

In the present study, fertilised eggs and larvae of *Crassostrea gigas* were exposed to an elutriate of metal-contaminated sediment in order to compare responses in embryos (embryotoxicity), larval growth, bioaccumulation of metals and metallothionein (MT) induction.

The elutriate tested were always lower than the threshold at which abnormal larval development appears, and only a slightly smaller size was recorded for ten-day-old larvae exposed to highest elutriate concentrations. After ten days of exposure, metal bioaccumulation was particularly observed for copper in the total larvae (soluble and insoluble fractions together) and for cadmium and copper in the soluble fraction. The concentration of MT increase linearly with the degree of contamination and the induction became significant in larvae exposed to sediment concentration above 16.2 g l⁻¹. Significantly positive relations were always observed between cytosolic concentrations of cadmium, copper and zinc alone or collectively and MT. These relations were equally significant when we considered total metal concentrations, that is to say metal concentrations in whole organisms (soluble and insoluble fractions together).

The sensitive and precocious response of MT and the significant relations with metal concentrations are good arguments to propose the use of bivalve larvae as biological matrix for the determination of MT as biomarker of exposure. In addition, an early molecular biomarker response can serve as an alarm signal indicative of metal contamination and the likelihood of abnormalities occurring at the population level. This is of particular importance, as successful breeding is necessary to maintain the population.

Key words: larval growth, *Crassostrea gigas*, elutriate, metals, bioaccumulation, metallothionein

* Corresponding author

Tel : (33) 5 56 83 85 60

Fax : (33) 5 56 83 89 80

Email : ogeffard@ifremer.fr

INTRODUCTION

As sediments can accumulate metals at concentrations 10,000 times higher than in the overlying water column [1]. They constitute an important source of environmental contamination and a risk for living organisms that needs to be assessed. A large number of endogenous and benthic species find their food in sediments [2] and are thus exposed to the toxic effects of heavy metals. Moreover, the remobilisation of contaminants of sedimentary origin can have harmful effects on pelagic organisms [3-9].

The remobilisation of metals during the resuspension of sediments is a complex phenomenon resulting from the release and reuptake of contaminants by fine particles, with only a small fraction of the metals remaining in the water column [10,11].

Chemical analyses allow measurement of the contamination level of a medium (water or sediment), but provide little indication of the incidence of contamination on living organisms, which requires the implementation of bioassays [3]. The embryo-larval test in marine bivalves is one of the most sensitive bioassays [12]. Since the work of Prytherch [13], gametes and embryos of the genus *Crassostrea*, particularly the Japanese oyster *C. gigas*, have been used quite often in marine ecotoxicology [12]. The larval growth test shows greater sensitivity than the embryo-larva test, but is more difficult to perform [12, 14, 15]. It has recently been used to determine the toxicity of elutriates of polluted sediments [16]. Yet bioassays, although capable of detecting disturbances related to the presence of micropollutants, provide no indications about the nature of the elements responsible for the biological effects observed.

The fraction of bioavailable metals can be determined by measuring their bioaccumulation and/or using a biomarker such as metallothionein (MT) [17]. Laboratory and *in situ* studies have shown that MT, a low-molecular-weight cytosolic protein, is induced by metal contamination in numerous taxa, including mammals, fish and marine invertebrates. It is generally admitted that the primary role of MT is the homeostasis of essential metals such as Cu and Zn, but this protein is also involved in the detoxification of non-essential metals such as Ag, Cd and Hg [18, 19]. The use of bivalve MT as a biomarker of metal exposure has recently been reviewed [19, 20], and MT has been proposed as a biomarker in adult oysters [21, 22].

MT-like protein has also been detected in bivalve larvae of *Mytilus galloprovincialis* [23] and *Crassostrea virginica* [24-26]. However, induction was observed after exposure to large experimental metal concentrations not comparable to those in the environment and to metallic salts that are more bioavailable than physicochemical forms in the natural environment. More recently, MT induction was detected in veligers of *M. galloprovincialis* exposed to natural contaminated sediment [27].

In the present study, fertilised eggs and larvae of *C. gigas* were exposed to an elutriate of metal-contaminated sediment from the Bidassoa estuary in order to compare responses in embryos (embryotoxicity), larval growth, bioaccumulation of metals, and MT induction.

MATERIALS AND METHODS

Sampling and conservation of sediment

Sediment samples from the top 2 cm of the surface were collected at Bidassoa estuary (French-Spanish border) in July 1999 and wet-sieved at 2 mm to eliminate debris. They were then homogenised and stored in glass bottles at 4°C in darkness for less than a week prior to bioassays.

Elutriate preparation

Elutriates were prepared for bioassay using a modification of the method of Melzian [4]. Sediments were shaken mechanically (multi-wirst shaker, 500 rpm) in filtered seawater (FSW) at a ratio of 1:4 (sediment:water) for 8 h and allowed to settle for another 8 h before recovery of the supernatant (elutriate). The elutriate concentrations of Bidassoa sediment corresponded to 324 g l⁻¹. A first portion of elutriate obtained by siphoning was recovered in an acid-washed polypropylene bottle and then acidified at 1:1000 by Suprapur hydrochloric acid (Carlo Erba). This portion was stored at 4°C in darkness for metal analysis. A second portion was diluted with FSW to concentrations of 0 (control), 5, 10, 25 and 50%, corresponding to sediment concentrations of 0, 16.2, 32.4, 81 and 162 g l⁻¹. These concentrations showed no embryotoxicity during preliminary tests [16].

Larval rearing

Mature oysters (*C. gigas*) were induced to spawn by thermal stimulation according to standard procedures [28]. Females for the spawning process were isolated in 1 litre of FSW, while males were placed in a small amount (around 100 ml) of FSW to obtain a sperm-dense solution. The oocytes and sperm of different bivalves were observed under an inverted microscope, and the best reproductive pair was selected (regular oocytes and very mobile spermatozoa) for the experiment. The oocytes were fertilised using 5 ml of the sperm-dense solution. Fifteen minutes after fertilisation, the embryos were counted and placed in 2-litre beakers (60,000 l⁻¹) filled with the different media to be tested (3 replications per treatment). After 24 h, veligers maintained in rearing status for ten days were placed in 2-litre beakers (10,000 larvae l⁻¹, 3 replications) and fed daily with culture of *Isochrysis galbana* (150 algae.µl⁻¹). All experimental solutions were renewed at 48-h

intervals. At each 48-h interval, the mean shell size of veligers was determined according to the technique of His et al. [29] by measuring valve length on photographs. Fifty individuals were measured from each culture. After 10 days, larvae were recovered using a sieve (32 μm), washed with 0.9% aqueous ammonium formiate, freeze-dried, and stored for analysis.

Pre-treatment of sediment and elutriate for chemical analysis

Aliquots (0.5 g) of fresh sediment were taken from the well-homogenised total sample and placed in acid-washed glass tubes. These samples were then dried and weighed to determine metal concentration as a function of dry weight. Hot mineralisation (95°C) was performed by addition of 5 ml of HNO_3 and 3 ml of HCl . This process was conducted until dryness, and the residues were then resuspended in 10 ml of 1 N HCl for metal analysis.

For elutriates, heavy metals (Cd, Cu and Zn) were pre-concentrated using the liquid-liquid extraction method described in detail by Danielson et al. [30]. Quality assurance testing relied on the control of blanks and on the accuracy and reproducibility of data relative to standard reference materials from the National Research Council of Canada (CASS-3).

Extraction of metals and metallothionein from larvae

Tissular compartmentalisation of metals and partial purification of MT were carried out according to the method of Mouneyrac et al. [21]. Each replication of lyophilised larvae was homogenised using a hand-held glass grinder in Tris- NaCl buffer 0.02 M, pH 8.6, at a ratio of 5 ml of buffer per g of larvae (wet weight). Proteolytic reactions and oxidation of MT molecules were avoided by working at 4°C in the presence of β -mercaptoethanol (10 mmol l^{-1}) added to the Tris buffer. Cytosolic (S1) and insoluble (P1) fractions were separated by initial centrifugation (25,000 g, 55 min at 4°C). MT was isolated from an aliquot of the S1 fraction by a second centrifugation (15,000 g, 10 min at 4°C) after being subjected to heat (75°C, 15 min). This second S2 supernatant containing MT was frozen at -80°C until MT analysis. Before metal analysis, an acid digestion step at 60°C was required for soluble (S1) and insoluble (P1) fractions. This step lasted 12 h and involved the addition of Suprapur nitric acid (Carlo Erba) at a ratio of 1:1 of S1 supernatant and 1 ml per 0.5 g of larvae (P1). The solutions obtained were supplemented to a known volume with deionised water.

Metal assays

Following the acid digestion phase, metals were analysed by flame atomic absorption spectrophotometry (AAS) for Cu and Zn, or electrothermal AAS with Zeeman effect (Hitachi

Z8200) for Cd. The analytical method was previously described by Amiard et al. [31]. Standard addition analysis was performed in an isomedium, and the concentrations for each element were +125, 250 and 500 ng ml⁻¹ for Cu and Zn and +0.25, 0.5 and 1 ng ml⁻¹ for Cd. The assays were validated using certified sediment (SD-M-2/TM IAEA) and mussel tissue (BCR, 278R) samples. The total bioaccumulation of metals (Cd, Cu and Zn) in larvae was calculated by summing up the amounts measured in the soluble (S1) and insoluble (P1) fractions.

Assay of larval metallothionein

The MT assay was performed in the S2 fraction by differential pulse polarography. The thiol groups (SH) were determined using Brdicka reagent [31] according to the method of Thompson & Cosson [33]. Measurements were performed at a constant temperature (4°C) on a polarograph using a PAR Model 174 analyser, a PAR/EG&G Model 303 electrode in SMDE mode, and an RE0089 type X-Y recorder. The MT amounts measured were determined by a standard addition method using MT rabbit liver metallothionein standard (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) (no MT standard exists for mussels). The validity of this method was confirmed by Olafson & Olsson [34].

Statistical analysis

For each series of results, the comparison of values was tested by one-way ANOVA (Statistica software). Significant differences (at the 95% level) were then determined by Scheffe's test. Linear regressions were performed and correlation coefficients (r) determined using Excel software.

RESULTS

Sediment characteristics

The organic matter in raw sediment decreased from 11.4% to 8.3% after preparation of the elutriate, indicating that a portion had been remobilised as soluble compounds. Cd, Cu and Zn concentrations were respectively 0.8, 70 and 268 mg kg⁻¹ for sediment and 0.09, 10.6 and 25.4 µg l⁻¹ for raw elutriate (Table 1). Thus, dilutions of raw elutriate led to concentrations of 0.013 to 0.05 µg l⁻¹ for Cd, 1.2 to 5.7 µg l⁻¹ for Cu, and 3.2 to 13.7 µg l⁻¹ for Zn.

Larval rearing

No larval deaths or abnormalities occurred in the different rearing conditions, and no growth differences were observed between larvae exposed to different elutriate concentrations (p>0.05) (Fig. 1). A slightly smaller size was recorded for ten-day-old larvae exposed to elutriate

concentrations of 32.4 g l^{-1} and above. However, this difference was not statistically significant ($p=0.07$; Fig.1).

Metallothionein concentrations

MT content differed significantly in larvae exposed to different doses of elutriates in their medium ($p=0.0001$), ranging from 864 mg kg^{-1} (dry weight) for controls to $1,430 \text{ mg kg}^{-1}$ for larvae exposed to 162 g l^{-1} (Fig. 2). The increase became significant ($p<0.05$) for concentrations above 16.2 g l^{-1} . The concentration ratio of exposed to control larvae ranged from 1.2 to 1.7 depending on the degree of contamination.

Metal bioaccumulation

Cd content in veligers did not increase significantly as a function of the percentage of elutriate used ($p=0.2301$; Fig. 3). The ratio between Cd concentrations in larvae exposed to elutriate and control specimens ranged from 0.8 to 1.6 depending on the degree of contamination.

The same pattern was observed for Zn ($p=0.108$; Fig. 3). The Zn content in larvae exposed to elutriate (16.2 to 162 g l^{-1}) was higher than in control larvae, but not significantly different. The Zn concentration ratio of exposed to control specimens ranged from 1.4 to 1.7 depending on the degree of contamination.

Cu levels in larvae increased as a function of the percentage of elutriate used (Fig. 3), becoming significant ($p=0.0001$) for elutriate concentrations above 32.4 g l^{-1} . The Cu concentration ratio of exposed to control larvae ranged from 1.1 to 1.8 depending on the degree of contamination.

The same pattern for Cd and Zn as in total organisms was found in the cytosolic fraction, except at the highest tested concentration (162 g l^{-1}), which showed a significantly greater Cd content than in control larvae (Fig. 4). As for total metal (S+C), cytosolic Cu levels increased as a function of the degree of exposure ($p=0.0001$) (Fig. 4), becoming significant for an elutriate concentration above 16.2 g l^{-1} . The metal concentration ratios of exposed to control larvae ranged from 0.6 to 1.7 for Cd, 0.9 to 2 for Cu, and 1.1 to 1.6 for Zn.

Relationships between metals and metallothionein

As MT is a cytosolic heat-stable protein, it is logical to consider the relationship between MT concentrations in an organism and metal concentrations in the supernatant obtained after heat-denaturation of the cytosol. However, during heating, the distribution of metals among cytosolic compounds may be modified, i.e. separation by gel chromatography showed Cd differences in fractions from S1 or S2 (Berthet, pers. comm.). Figure 5 depicts the relationships between MT concentrations and metal contents in the supernatant before heat treatment. All three of the metals

studied (Zn, Cu, Cd) bind to MT and could be involved in association with MT induction [34]. Therefore, total metal content was calculated as the sum of concentrations of soluble Cd, Cu and Zn expressed in mg atom kg^{-1} , and the relationship between MT and the sum of metals was also determined (Fig. 5).

Significantly positive correlations were found between concentrations of Cd, Cu and Zn alone or collectively and MT (Fig. 5). Using MT of oyster larvae as a biomarker, correlations between MT and metal concentrations were significantly positive in whole organisms (S+C) (Table 2).

DISCUSSION

The sediment obtained from the Bidassoa estuary consisted of fine mud with relatively high levels of organic matter. Part of this organic matter was released into seawater during the preparation of elutriates. Metal concentrations in sediment confirmed that the Bidassoa estuary is impacted by metal contamination. Long et al. [36] defined the “potential toxicity” of sediments (effects range-low, ER-L, and effects range-median, ER-M) and determined that toxicity to amphipods (such as *Rhepoxynius abrotinus*) is rare at concentrations below ER-L, occasional at concentrations between ER-L and ER-M, and frequent at concentrations above ER-M. In our study, Cu and Zn concentrations (respectively 34 and 150 mg kg^{-1} dry weight) exceeded ER-L levels, but were lower than ER-M (270 and 410 mg kg^{-1} for Cu and Zn). The sediment level for Cd was lower than ER-L (1.2 mg kg^{-1}).

Watzin et al. [37] tested the toxicity of estuarine sediments spiked with Zn under field conditions. Zn concentrations were found to be quite high (8,150 mg kg^{-1} dry weight) compared to environmental concentrations (268 mg kg^{-1} in the present study) and were responsible for decreased recruitment of different taxa as compared to control sediments. According to these authors, concentrations above 270 mg kg^{-1} caused lethal or sub-lethal effects on a variety of taxa. However, a low PAH level ($\approx 1,200 \text{ ng g}^{-1}$ dry weight) was reported for this sediment [38] as compared to the threshold value of 2,900 ng g^{-1} (dry weight) recently proposed by Swartz [39] or the ER-L level (4,022 ng g^{-1} dry weight) defined by Long et al. [36].

In our study, Cd levels in the different elutriate dilutions (0.013 to 0.05 $\mu\text{g l}^{-1}$) were very low compared to concentrations affecting the growth of *C. gigas* larvae ($>50 \mu\text{g l}^{-1}$) (in His et al. [12]). However, the Cu levels observed in elutriate (1.2 to 5.7 $\mu\text{g l}^{-1}$; after dilution of raw elutriate) were similar to those affecting *C. gigas* larval growth (6-13 $\mu\text{g l}^{-1}$; in His et al. [12]). In fact, Cu is able to form complexes in seawater that are much less bioavailable than the ionic form. For Zn, elutriate concentrations (3.2 to 13.7 $\mu\text{g l}^{-1}$) were one order of magnitude below the concentration affecting larval growth of *C. gigas* (150 $\mu\text{g l}^{-1}$) exposed for five days (in His et al. [12]).

Considering the different concentrations in sediment and elutriate, Cu would appear to be the element most likely to induce biological effects. This is consistent with the higher bioaccumulation of Cu than other metals (Cd and Zn) in larvae.

No deaths occurred during the experiments, and no abnormal larvae were observed at an elutriate concentration of 162 g l^{-1} [16]. A slight (non-significant) effect of the medium on larval growth was only observed after 10 days of rearing for larvae exposed to higher elutriate concentrations. However, His & Robert [14] for Cu, Beiras & His [15] for Hg, and Geffard et al. [16] for contaminated elutriates found that larval growth was a more sensitive physiological response than abnormal embryogenesis. These authors considered that larval growth is the most sensitive bioassay for physiological response, despite the need for longer trials, and that it is the most useful and realistic means of assessing the impact of a potential pollutant in the field.

The bioavailability of metals from sediment was demonstrated by determining the overall contamination of larvae as well as by measuring MT induction. However, metal contamination was only clearly established for Cu in whole organisms and for Cu and Cd in the cytosolic fraction. These results confirm those of Ringwood & Brouwer [24, 25] and Roesijadi [40] concerning MT induction in oyster larvae after exposure to metal. However, these previous studies found that the first MT induction occurred with a concentration of $0.6 \mu\text{g Cd l}^{-1}$, which is 10-fold higher than the maximum concentration measured by us. Our results indicate the high sensitivity of MT response during metal exposure. Similar results were obtained with oyster larvae (*C. gigas*) exposed to sediment elutriate for 24 h and with mussel larvae (*M. galloprovincialis*) exposed for 96 h [41, 27]. In these latter studies and ours, MT induction was observed for metal concentrations representative of environmental levels. Consequently, MT induction in larvae appears to be a very sensitive tool for early determination of metal exposure. Our results suggest that bivalve larvae could be used as a biological matrix for applications of MT as a biomarker of exposure to metals. In this respect, significant correlations were found between MT and metal concentrations.

Adult bivalves such as mussels [42] and oysters [21] appear to be the most promising candidates among aquatic invertebrates for applications of MT as a tool for biological monitoring of metal pollution. As it seems likely that MT concentrations are determined at least in part by concentrations of bioaccumulated metals, environmental (salinity, season) and biological (mainly sexual maturity) factors may be expected to have an influence on metal concentrations [43] and probably on MT levels as well. In *C. gigas*, size (weight) is an important factor accounting for variations of MT concentrations in whole soft tissues [21]. Seasonal changes in MT concentrations observed in the digestive gland of oysters (*C. gigas*) from a clean site as compared to those transplanted from the clean site to a metal-rich area were associated with weight variations during

the breeding period [44]. These variations would limit the use of feral oysters during biomonitoring for determination of MT as a biomarker of metal exposure. The rationale for active biomonitoring of bivalve molluscs between clean and contaminated sites, as compared to the collection of feral oysters, has been considered by De Kock & Kramer [45]. These authors emphasise the optimisation of resolution power 'by employing statistically similar groups of organisms, with regard to population size, age, pollution and environmental history, for comparing chemical stress at different locations'. However, field contamination of bivalves by active biomonitoring required several months to ensure that the animals were in equilibrium with the medium [45, 46]. Thus, initial inter-site variability is reduced by this procedure, but seasonal variability is obviously not affected.

The best metal accumulation rates for bivalve larvae as compared to adults [47] can shorten experimental time. The embryonic/larval development of oysters lasts for 2 or 3 weeks, so that a 24 to 48 h experiment can represent 5 to 10% of this life stage [48].

Moreover, MT amplification for larvae (the ratio of exposed to control larvae) is similar to metal bioaccumulation. In *M. galloprovincialis*, Geffard et al. [27] observed an amplification of MT synthesis of the same order as metal accumulation after exposure of larvae to sediment elutriate for 96 h. This representativeness is a further indication of the suitability of using larvae rather than adult bivalves as a biological matrix. In fact, during natural exposure of adult oysters to metal, MT amplification can be one order of magnitude lower than metal accumulation [20, 22]. This phenomenon is more marked during experimental contamination in the laboratory [49].

For the overall physiological and biochemical response of larvae during metal exposure, the sensitivity range was: MT > larval growth > abnormal embryogenesis. Beiras & His [15] considered that larval growth was a more realistic response to pollutant impact, but that the methodology involved requires a long experiment period (10 days). However, MT is more sensitive and can also provide data for a shorter exposure time (24 to 96 h), depending on the bivalve species used [27, 41].

The present study, using metal concentrations similar to those found in the natural environment, showed an early (low-dose) MT response as compared to the time that abnormalities appeared. Thus, an early molecular biomarker response can serve as an alarm signal indicative of metal contamination and the likelihood of abnormalities occurring at the population level. This is of particular importance, as successful breeding is necessary to maintain the population.

REFERENCES

1. Förstner U. 1979. Metal pollution assessment from sediment analysis. In Förstner U, Witmann GTW, eds, *Metal pollution in the aquatic environment*, Springer-Verlag, New York, pp 110-196.
2. Vale C, Sundby B. 1998. The interactions between living organisms and metals in intertidal and subtidal sediments. In Langston WJ, Bebianno MJ, eds, *Metal Metabolism in Aquatic Environments*, Chapman & Hall, London, pp 19-29.
3. Chapman PM, Long ER. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar Pollut Bull* 14:81-84.
4. Melzian BD. 1990. Toxicity assessment of dredged materials: acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In Alzieu C, Gallenne B, eds, *Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities*, Goubault Imprimeur, Nantes, pp 49-64.
5. Burgess RM, Scott KJ. 1992. The Significance of In-Place Contaminated Marine Sediments on the Water Column: Processes and Effects. In Burton, GAJ (Eds). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis; Chelsea, MI, USA. 129-165. Burton GAJr. 1992. Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, London.
6. Burgess RM, Schweitzer KA, McKinney RA, Phelps DK. 1993. Contaminated marine sediment: water column and interstitial toxic effect. *Environ Toxicol Chem* 12:127-138.
7. Chapman PM, Morgan JD. 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull Environ Contam Toxicol* 31:438-444.
8. Fichet D, Radenac G, Miramand P. 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediment resuspension on marine invertebrate larvae: Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Mar Pollut Bull* 36:509-518.
9. Miller BS, Pine DJ, Redshaw CJ. 2000. An assessment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. *Mar Pollut Bull* 40:22-34.
10. Saulnier I, Mucci A. 2000. Trace metal remobilization: the resuspension of estuarine sediments: Saguenay Fjord, Canada. *Applied Geochemistry*. 15: 203-222.
11. Van Den Berg GA, Meijers GGA, Van Der Heijdt LM, Zwolsman JG. 2001. Dredging-related mobilisation of trace metals: a case study in the Netherlands. *Wat Res* 35(8):1979-1986.
12. His E, Beiras R, Seaman MNL. 1999. The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve embryos and larvae. *Adv Mar Biol* 37:1-178.
13. Prytherch H.F., 1924. Experiments in the artificial propagation of oysters. *Rep. U. S. Com. Fish.*, 1923 (1924), XI, 14p.
14. His E. & R Robert, 1982. Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des oeufs et des jeunes larves de *C. gigas*. *Rev. Trav. Inst. Pêches marit.* 42 (2) : 117-125.
15. Beiras R, His E. 1994. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 113, 95-103.
16. Geffard O, Budzinski H, His E. 2001a. The effects of elutriates from PAH and heavy metal polluted sediments on *Crassostrea gigas* (Thunberg) embryogenesis, larval growth and bioaccumulation by the larvae (submitted).
17. Borgmann U. 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation–toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquat Ecosyst Health Manag* 3:277-289.
18. Roesijadi G. 1992. Metallothionein in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 22:81-114.

19. Cosson RP, Amiard JC. 2000. Use of metallothioneins as biomarkers of exposure to metals. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, eds, *Use of biomarkers for environmental quality assessment*, Science Publishers, Plymouth, pp 79-111.
20. Langston WJ, Bebianno MJ, Burt GR. 1998. Metal handling strategies in molluscs. In Langston WJ, Bebianno MJ, eds, *Metal metabolism in aquatic environments*, Chapman & Hall, London, pp 219-283.
21. Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C. 1998. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Mar Ecol Prog Ser* 162:125-135.
22. Geffard A, Amiard JC, Amiard-Triquet C. 2001b. Use of metallothionein in gills from oysters (*Crassostrea gigas*) as a biomarker of metal exposure: Seasonal and intersite fluctuations. *Biomarkers* (in press).
23. Pavicic J, Skreblin M, Kregar I, Tusek-Znidaric M, Stegnar P. 1994. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations-1. Toxic effects of Cd, Zn and Hg in relation to the metallothionein level. *Comp Biochem Physiol* 107:249-257.
24. Ringwood AH, Brouwer M. 1993. Expression of constitutive and metal-inducible metallothioneins in oyster embryos (*Crassostrea virginica*). *Comp Biochem Physiol* 106B:523-529.
25. Ringwood AH, Brouwer M. 1995. Patterns of metalloprotein expression in oyster embryos. *Mar Environ Res* 39:101-105.
26. Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1997a. Concentration-response relationships for Cd, Cu, and Zn and metallothionein mRNA induction in larvae of *Crassostrea virginica*. *Comp Biochem Physiol* 118C:267-270.
27. Geffard A, Geffard O, His E, Amiard JC. 2001c. Relationships between metal bioaccumulation and metallothionein levels in larvae of *Mytilus galloprovincialis* exposed to contaminated estuarine sediment elutriate. *Mar Ecol Prog Ser* (accepted).
28. His E., Seaman MNL & Beiras R. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Wat. Res.*31, 351-355.
29. His E, Maurer D, Robert R. 1983. Estimation de la teneur en acétate tributyle-étain dans l'eau de mer par une méthode biologique. *J Moll Stud* 12A:60-68.
30. Danielsson LG, Magnusson B, Westerlund S, Zhang K. 1982. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Anal Chim Acta* 144:183-188.
31. Amiard JC, Pineau A, Boiteau HL, Métayer C, Amiard-Triquet C. 1987. Application de la spectrométrie d'absorption atomique Zeeman aux dosages de huit éléments traces (Ag, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Se) dans les matrices biologiques solides. *Wat Res* 21:693-697.
32. Brdicka A. 1933. Polarographic studies with the dropping mercury method. A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solution of ammonium chloride. *Collect Czech Chem Commun* 5:112-128.
33. Thompson JAJ, Cosson RP. 1984. An improved electrochemical method for the quantification of metallothionein in marine organisms. *Mar Environ Res* 11:137-152.
34. Olafson RW, Olsson PE. 1991. Electrochemical detection of metallothionein. *Methods Enzymol* 205:205-213.
35. Amiard JC, Cosson RP. 1997. Les métallothionéines. In Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F, eds, *Biomarqueurs en écotoxicologie – Aspects fondamentaux*, Masson, Paris, pp 53-66.
36. Long ER, MacDonald DD, Smith SL, Calder FD. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ Monit Assess* 19: 81-97.

37. Watzin MC, Roscigno PF, Burke WD. 1994. Community-level field method for testing the toxicity of contaminated sediments in estuaries. *Environ Toxicol Chem* 13: 1187-1193.
38. Geffard O, Budzinski H, His E, Seaman MNL, Garrigues P. 2001d. Relationships between contaminant levels in marine sediments and their biological effects upon embryos of oysters, *Crassostrea gigas*. *Environ Toxicol Chem* (submitted).
39. Swartz RC. 1999. Consensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures. *Environ Toxicol Chem* 18: 780-787.
40. Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1996. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol Appl Pharmacol* 140:356-363.
41. Geffard O, Geffard A, His E, Budzinski H. 2001e. Bioavailability and toxicity of sediment-bound polycyclic aromatic hydrocarbons and metals to *Crassostrea gigas* embryos and larvae (submitted).
42. George SG, Olsson PE. 1994. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution. In Kramer KJM, ed, *Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 151-178.
43. NAS. 1980. *The International Mussel Watch*, National Academy of Science, Washington DC.
44. Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Mouneyrac C. 2001f. Temporal variations of metallothionein and metal concentration in the digestive gland of oysters *Crassostrea gigas* from a clean and metal-rich sites. *Biomarkers* 6: 91-107.
45. Kock WC de, Kramer KJM. 1994. Active biomonitoring (ABM) by translocation of bivalve molluscs. In Kramer KJM, ed, *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp 51-84.
46. Mouneyrac C, Berthet B, Amiard JC. 1999. Cd distribution in the tissues of oysters (*Crassostrea gigas*) exposed chronically *in situ*. *Wat Air Soil Pollut* 112: 187-196.
47. Ringwood AH. 1991. Short-term accumulation of cadmium by embryos, larvae and adults of an Hawaiian bivalve, *Isognomon californicum*. *J Exp Mar Biol Ecol* 22: 288-295.
48. Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1997b. Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aquat Toxicol* 39: 185-194.
49. Amiard-Triquet C, G ret F, Geffard A, Amiard JC, Cosson RP. 2000. Field and laboratory assessment of metallothionein as a biomarker of metal exposure in oysters. In *Global environmental issues in the 21st century: problems, causes and solutions*, 3rd SETAC World Congress, 21-25 May 2000, Brighton, U.K. 96.

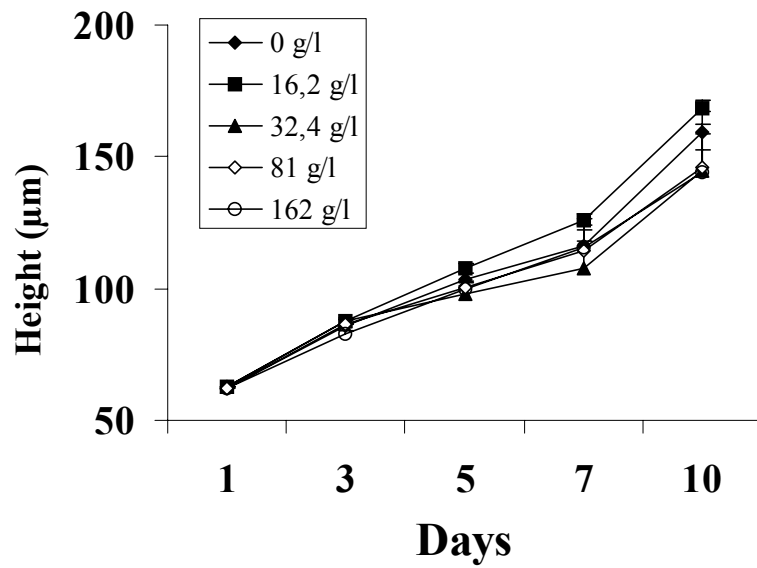


Figure 1: Height (mean \pm SD) of larvae exposed for ten days to different elutriate concentrations expressed according to the sediment concentration (see Materials and methods).

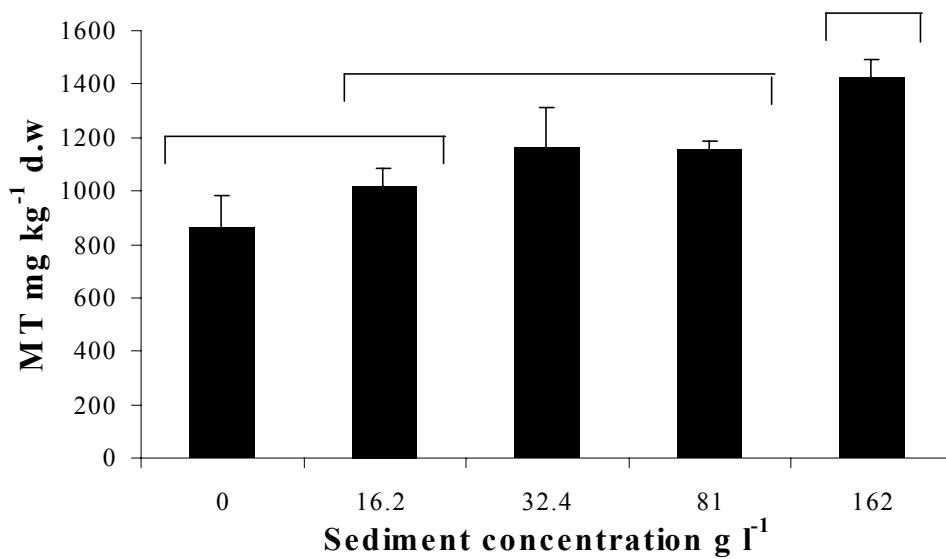


Figure 2: Metallothionein concentrations (mean \pm SD, three replications) in larvae after ten days of exposure to different elutriate concentrations. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Scheffé's test).

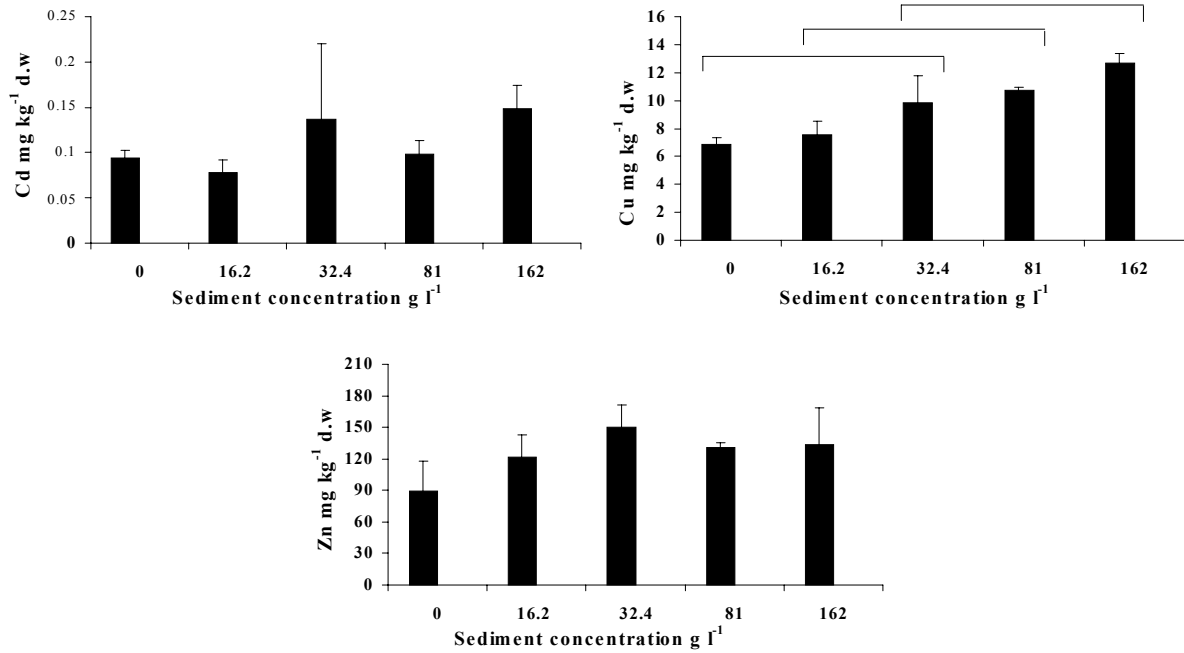


Figure 3. Total metal concentrations (mean \pm SD, three replications) in larvae after ten days of exposure to different elutriate concentrations. A, Cd; B, Cu and C, Zn. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Scheffé's test).

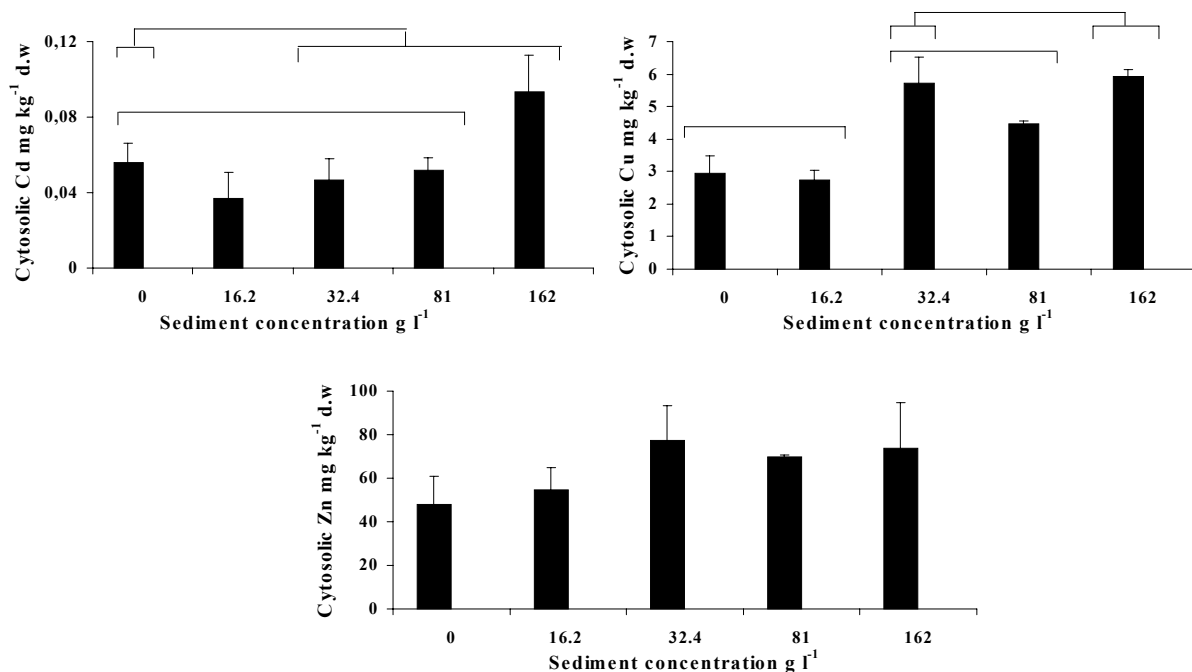


Figure 4. Cytosolic metal concentrations (mean \pm SD) in larvae after ten days of exposure to different elutriate concentrations. A, Cd; B, Cu and C, Zn. Values not significantly different from each other are grouped under a common overhead line (ANOVA, $p < 0.05$; Scheffé's test).

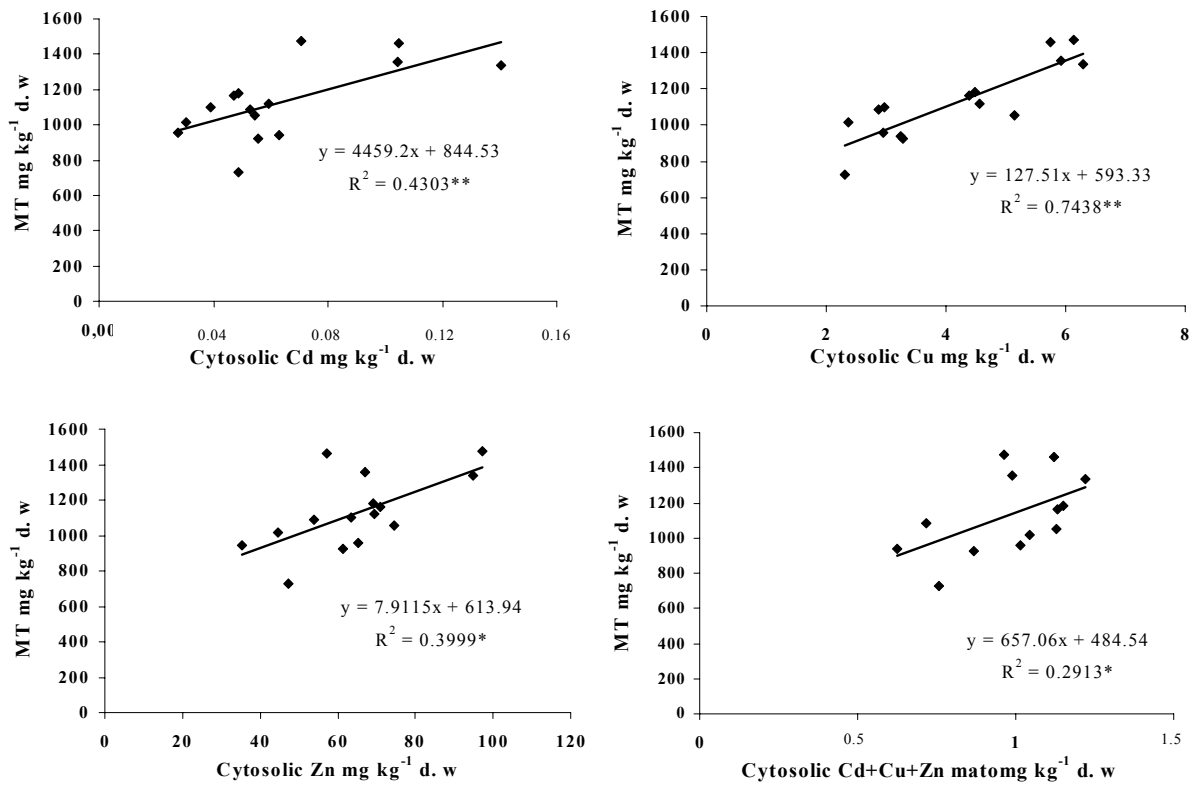


Figure 5. Relationships between cytosolic metal (individual or total) and MT concentrations in whole larva categories (n = 15). Significant correlations are indicated with an asterisk (* at 95% level and ** at 99% level). A : Cd ; B : Cu ; C : Zn and D : Cd+Cu+Zn.

Table 1: Cadmium, copper and zinc concentrations in sediment (mg kg^{-1} dry weight \pm SD), filtered sea water ($\mu\text{g l}^{-1}$, control used in the present study), and raw elutriate ($\mu\text{g l}^{-1}$, \pm SD).

	Cadmium	Copper	Zinc
Sediment	0.8 (0.1)	70 (11)	268 (31)
FSW (control)	0.009 (0.0005)	0.714 (0.21)	2.03 (0.6)
Raw elutriate	0.09 (0.035)	10.6 (3.3)	25.4 (5.3)

Table 2. Relationships between metal (individual or total) and MT concentrations in whole larva categories ($n = 15$). Significant correlations are indicated with an asterisk (* at 95% level and ** at 99% level).

Metal	a	b	r^2
Cd	3042.8	787.55	0.4024**
Cu	80.015	363.85	0.8172**
Zn	3.6784	666.03	0.2659*
Cd+Cu+Zn	224.08	644.95	0.2626*

Chapitre VIII : Test embryo-larvaire *in situ*

Ce chapitre concerne la mise en place d'un test *in situ* permettant de déterminer la qualité biologique d'un milieu de façon la juste possible. Cette étude a donné lieu à une publication.

1- Qualité biologique de l'eau de mer évaluée *in situ* par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus gallorprovincialis*. (Publication n°11).

Les bioessais réalisés en laboratoire ne peuvent pas donner une mesure exacte de la toxicité d'un sédiment ou d'une eau. En plus des modifications physico-chimiques des échantillons lors de leur prélèvement, stockage et manipulation, les tests en laboratoire ne reflètent pas les conditions du milieu naturel (température, salinité, lumière, turbidité, oxygène) qui modifient la spéciation, la biodisponibilité et la toxicité des contaminants.

Cette étude (Publication n°11) montre la possibilité de réaliser un test embryo-larvaire *in situ* pour étudier la qualité biologique des eaux naturelles et ceci pour toutes les périodes de l'année. Ce test a été utilisé pour évaluer les variations de la qualité des eaux du port d'Arcachon au cours de l'été 2000.

Publication n°11 :

**Qualité biologique de l'eau de mer évaluée *in situ* par le test embryo-larvaire de
Crassostrea gigas et *Mytilus galloprovincialis*.**

O. Geffard, E. His, H. Budzinski, MNL. Seaman, P. Garrigues

Les tests embryo-larvaires de bivalves sont fréquemment utilisés en écotoxicologie marine, compte tenu de leur grande sensibilité et de la rapidité des réponses. Toutefois, les résultats obtenus en laboratoire peuvent ne pas correspondre exactement aux effets réels qui se produisent dans le milieu naturel.

Des essais préliminaires de tests embryo-larvaires de bivalves «*in situ*» ont permis d'évaluer la «qualité biologique» des eaux du port de plaisance d'Arcachon. Une expérience réalisée en hiver 1999 (10°C) chez *Mytilus galloprovincialis* a montré que ces tests peuvent être pratiqués pendant cette période de l'année. Dans ce dernier cas, aucune modification de la «qualité biologique» de l'eau du port n'a été observée. Quatre séries d'observations, ont ensuite été conduites à l'aide d'embryons de *Crassostrea gigas* au cours de l'été 2000 (19 à 22°C). Une détérioration de la «qualité biologique» des eaux de surface a été mise en évidence lorsque l'on passe de l'entrée à la partie intérieure du port.

Il s'agit, à notre connaissance, des premiers tests réalisés «*in situ*» dans le milieu marin à l'aide d'embryons de bivalves, dont on sait qu'ils sont beaucoup plus sensibles aux effets des altéragènes que les stades adultes. Ces organismes présentent l'avantage d'être euryhalins, de se développer à des températures très variables dans le cas de la moule méditerranéenne. Enfin, des géniteurs mûrs sont souvent disponibles en toutes saisons. Par conséquent ils permettent les opérations de surveillance en zones estuariennes, côtières et marines et ceci toute l'année.

Mots clés : *In situ*, tests embryo-larvaires, qualité biologique de l'eau de mer, *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*

Sous presse dans *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences de Paris, Sciences de la vie*

Qualité biologique de l'eau de mer évaluée *in situ* par le test embryo-larvaire de *Crassostrea gigas* et *Mytilus galloprovincialis*.

In situ monitoring of sea water quality with the embryo-larval bioassay of *Crassostrea gigas* and *Mytilus galloprovincialis*.

Titre courant : Test embryo-larvaire de bivalves marins *in situ*.

Note de Olivier Geffard¹, Edouard His¹, Hélène Budzinski², Matthias Seaman³, Philippe Garrigues².

¹.IFREMER, Quai Silhouette, 33120 Arcachon, France. Téléphone 05 57 72 29 81.

Fax : 05 57 72 29 99. Email : ogeffard@ifremer.fr

².Laboratoire de Physico-Toxico-Chimie des Systèmes Naturels, UPRES A 5472, Université de Bordeaux 1, 33405 Talence, France

³.Institut für Meereskunde 24105 Kiel, Germany

RESUME

Les tests embryo-larvaires de bivalves sont fréquemment utilisés en écotoxicologie marine, compte tenu de leur grande sensibilité et de la rapidité des réponses. Toutefois, les résultats obtenus en laboratoire peuvent ne pas correspondre exactement aux effets réels qui se produisent dans le milieu naturel.

Des essais préliminaires de tests embryo-larvaires de bivalves «*in situ*» ont permis d'évaluer la «qualité biologique» des eaux du port de plaisance d'Arcachon. Une expérience réalisée en hiver 1999 (10° C) chez *Mytilus galloprovincialis* a montré que ces tests peuvent être pratiqués pendant cette période de l'année. Dans ce dernier cas, aucune modification de la «qualité biologique» de l'eau du port n'a été observée. Quatre séries d'observations, ont ensuite été conduites à l'aide d'embryons de *Crassostrea gigas* au cours de l'été 2000 (19 à 22°4 C). Une détérioration de la «qualité biologique» des eaux de surface a été mise en évidence lorsque l'on passe de l'entrée à la partie intérieure du port.

Il s'agit, à notre connaissance, des premiers tests réalisés «*in situ*» dans le milieu marin à l'aide d'embryons de bivalves, dont on sait qu'ils sont beaucoup plus sensibles aux effets des altéragènes que les stades adultes. Ces organismes présentent l'avantage d'être euryhalins, de se développer à des températures très variables dans le cas de la moule méditerranéenne. Enfin, des géniteurs mûrs sont souvent disponibles en toutes saisons. Par conséquent ils permettent les opérations de surveillance en zones estuariennes, côtières et marines et ceci toute l'année.

Mots clés : *In situ*, Tests embryo-larvaires, qualité biologique de l'eau de mer, *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*.

Keywords : *In situ*, embryo-larva bioassays, biological quality of sea water, *Crassostrea gigas*, *Mytilus galloprovincialis*.

ABSTRACT

Embryos and larvae of bivalves are frequently used in marine ecotoxicology for the purpose of assessing seawater quality, because they are very sensitive to pollutants and provide rapid responses. Laboratory studies, however, cannot accurately simulate natural conditions.

We conducted bivalve embryo-larval studies *in situ* at the marina of Arcachon (Southwest French Atlantic coast), in order to assess the “biological quality” of the water. One experiment conducted in winter 1999 (temperatures of 10° C) with embryos of the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*, has shown that such tests are practicable in winter at low temperatures. This study did not show any deterioration in “biological quality” of the water. Four series of experiments were subsequently performed during summer 2000 (ambient water temperatures of 19 to 22°4 C) with embryos of the Japanese oyster, *Crassostrea gigas*. The results show that the “sea water biological quality” deteriorates from the port entrance towards its inner part.

To our knowledge, this is the first investigation of the marine environment in which bivalve embryos have been used *in situ*. They are very suitable for this type of study, because bivalve embryos and larvae are more sensitive to pollutants than the adults, and also because they belong to euryhaline species and the embryos tolerate summer temperatures (both species) as well as winter temperatures (mussels), allowing biomonitoring to be conducted all year-round.

Introduction

Compte tenu du très important intérêt économique des huîtres et des moules, les essais de reproduction des bivalves marins en milieu contrôlé datent du début du 20^{ème} siècle. En particulier Prytherch [1], après avoir obtenu la métamorphose des larves de *Crassostrea virginica* en laboratoire de façon reproductible, proposait l'utilisation des véligères pour tester la toxicité des métaux lourds. Depuis cette époque, les effets de très nombreux micropolluants (polluants inorganiques ou organiques divers, effluents industriels) ont été évalués à l'aide des embryons et des larves de bivalves marins, huîtres du genre *Crassostrea* et moules du genre *Mytilus* en particulier. Ainsi, ces derniers se sont imposés très rapidement comme des «organismes tests» en écotoxicologie marine [2]. Ils répondent en effet aux critères définis par Stebbing *et al.* [3] pour être retenus comme tels. Avec les travaux de Woelke [4-6] chez *Crassostrea gigas* et de Dimick et Breese [7] chez *Mytilus edulis*, les embryons et les larves de bivalves ont été utilisés pour étudier la «qualité biologique» des eaux marines et estuariennes, notion qui avait été proposée par Wilson [8] et Bougis [9, 10], à la suite de travaux chez l'oursin, *Paracentrotus lividus*. A l'heure actuelle, les tests embryo-larvaires de bivalves marins sont parfaitement standardisés (11) ; différentes simplifications ont été proposées (utilisation de récipients de faible volume en matériel jetable, lecture directe sur microscope inversé) [12, 13], permettant d'envisager une éventuelle conduite de tests «*in situ*».

En effet, depuis quelques années, à la suite des travaux de Munawar et Munawar [14] sur le phytoplancton, de Sasson-Brickson et Burton [15] chez *Ceriodaphnia dubia* et de Norrgren et Degerman [16], des tests «*in situ*» ont été proposés en eau douce pour évaluer la qualité des eaux et des sédiments [17-20]. Les travaux sont par contre peu abondants en milieu marin ou saumâtre, si l'on excepte les expériences d'exposition en cages de moules adultes [21] ou de juvéniles [22] et concomitamment à nos propres travaux, ceux de Beiras *et al* [23], concernant *Paracentrotus lividus*.

Les stades embryonnaires et larvaires des invertébrés marins sont beaucoup plus sensibles aux effets des altéragènes [3] que les stades plus âgés ; pourtant ils n'ont jamais été utilisés jusqu'à ces dernières années dans le cadre de bioessais « *in situ* ». Ceci est vrai en particulier chez les bivalves qui présentent les plus grands avantages, compte tenu de la rapidité des réponses et de la sensibilité de ce matériel biologique [24]. Des essais préliminaires réalisés chez *Mytilus galloprovincialis* en hiver et chez *Crassostrea gigas* en période estivale nous ont montré que ceci était parfaitement réalisable.

Techniques

Le site

La qualité biologique de l'eau du port d'Arcachon a été étudiée (Fig. 1). Il s'agit d'un port en eau profonde dont l'échange à la marée est incomplet (compris entre 20 et 60% du volume total du port pour des coefficients de marée respectifs de 35 et 115). Ses 2400 places sont occupées par des navires de plaisance de taille moyenne, la majorité jaugeant moins de 57 tonneaux. Plus de 80 % d'entre eux ne quittent jamais leur amarrage même pendant la saison estivale. La navigation de plaisance, en augmentation constante, s'accompagne de pollutions, dues en particulier au grand nombre de navires habités en été. Il faut ajouter, dans la partie est, l'existence d'un port de pêche côtière, dont la flotte est composée à l'heure actuelle d'une trentaine de bateaux de plus de dix mètres.

Les observations ont été faites à 1 mètre de profondeur, à l'entrée (A), dans la partie médiane (B), et au fond (C) du port d'Arcachon ainsi qu'à l'extérieur de la digue (D), au niveau du port de travail, qui donne directement sur un chenal du bassin (Arams). Les dates suivantes ont été retenues compte tenu de la disponibilité de géniteurs mûrs pour effectuer les tests :

- période hivernale (*M. galloprovincialis*), du 10 au 14 janvier 1999.
- période estivale (*C. gigas*) les 15, 27 et 30 juin et 21 juillet 2000.

Matériel biologique

La technique utilisée pour la conduite des tests embryo-larvaires chez les bivalves a été décrite par ailleurs [12, 13]. Nous ne ferons qu'en rappeler les grandes lignes. Les gamètes sont obtenus par stimulation thermique de géniteurs prélevés dans le milieu naturel, dans le cas présent. Après comptage des ovocytes en eau de mer filtrée à 0,2 µm (EMF), on procède aux fécondations avec du sperme fraîchement émis. Au bout de dix minutes, les œufs fécondés sont répartis à raison de 60 par ml dans des récipients expérimentaux (de 3 à 5 répliquats par eau de mer à tester et pour les témoins). A l'issue d'une période d'incubation qui varie de 24 h chez les huîtres à un minimum de 48 h chez les moules, le contenu des récipients expérimentaux est formolé et les anomalies larvaires dénombrées sur 100 individus par pot. Le test est considéré comme valable si dans ces derniers, moins de 20 % des véligères sont anormales dans les récipients témoins (point D dans le présent cas sauf pour le 27 juin 2000).

Confection du matériel d'exposition « *in situ* » et mise en place des tests

Les chambres d'exposition sont construites à l'aide de bouteilles en polyéthylène (basse densité) de 1 litre (Fig. 2). Le fond de chacune des bouteilles est découpé et recouvert à l'aide de toile à bluter en polyamide (porosité de 30 µm). Cette toile est soudée à chaud, évitant ainsi toute utilisation de colle, dont les différents types essayés se sont révélés toxiques vis-à-vis des embryons de bivalves. Afin de permettre la circulation de l'eau à travers la bouteille, la partie supérieure est également ouverte et recouverte de toile à bluter (porosité 30 µm). Cette toile est maintenue à l'aide d'une capsule et d'un capuchon à vis ouverts. Le temps de rétention de l'eau, dans les chambres ainsi préparées, a été estimé par utilisation d'une solution de rouge neutre, à ¼ heure.

Les différentes chambres d'exposition sont remplies d'EMF au laboratoire, puisensemencées à l'aide de 60 000 œufs fécondés chacune ; elles sont acheminées dans un récipient contenant de l'EMF sur le site d'observation, immergées sous un mètre d'eau (3 par point) et lestées à l'aide d'un poids (pierre). La mise en place est effectuée dans l'heure qui suit les fécondations.

Lorsque les larves D sont formées, les pots sont ramenés au laboratoire, et les larves sont récupérées sur tamis inox de porosité 32 µm, puis formolées pour observation au microscope (détermination des pourcentages d'anomalies larvaires).

Traitement statistique

Les pourcentages d'anomalies larvaires sont déterminés sur chaque pot [13]. La moyenne des trois répliquats est calculée pour chaque point, avec intervalle de confiance au seuil de sécurité de 95 %.

Résultats

Période hivernale

Les œufs fécondés de *M. galloprovincialis* ont été exposés le 10 janvier 1999 en période de mortes eaux (coefficient 41) ; les larves D n'ont été formées qu'après 4 jours . En effet, la température de l'eau de mer a varié de 9°8 à 10°4 C, pour une salinité moyenne de 31. Les pourcentages d'anomalies larvaires dans les témoins (D, chenal d'Arams) se situent en dessous du seuil limite des 20 % d'anomalies larvaires, avec une valeur de 14,0 ± 4,2 % (Fig. 3-I). Aucune

action sur la qualité biologique des eaux du port n'a pu être observée, puisque le pourcentage le plus élevé n'est que de $19,0 \pm 6,2$ % (point C).

Période estivale

Quatre séries d'observations ont été réalisées à l'aide d'œufs fécondés de *C. gigas* pendant l'été 2000. En juin, la température de l'eau du port a varié de 19° à $22^{\circ}4$ C et la salinité est restée stable (31). En juillet, la température a varié de 21° C à $22^{\circ}4$ C, et la salinité était la même que précédemment. Les résultats sont présentés dans la figure 3-II.

Le 15 juin (coefficient de marée de 70), les pourcentages d'anomalies larvaires sont restés peu élevés à l'exception du point B, dans la partie moyenne du port ($27,3 \pm 9,7$ %).

Le 27 juin en période de mortes eaux (coefficient de 48), d'importantes perturbations ont été observées aux points B et C, avec respectivement $52,5 \pm 3,5$ % et $52,0 \pm 9,5$ % d'anomalies larvaires. On notait encore $27,0 \pm 4,2$ % d'anomalies au point D ; par contre celles-ci n'atteignaient que $14,7 \pm 2,0$ % à l'entrée du port (A), ce qui permettait de valider le test, puisque nous étions, sur ce dernier site, au-dessous de la limite des 20 % d'anomalies larvaires.

Le 30 juin (coefficient de marée 70), on observe encore une dégradation marquée de la qualité biologique de l'eau du port, de la zone moyenne (B) à la zone la plus confinée (C), avec les pourcentages respectifs de $41,3 \pm 7,6$ et $36,4 \pm 14,3$; à l'inverse, à l'entrée (A) et dans le chenal d'Arams (D), les valeurs obtenues sont très basses ($5,3 \pm 0,6$ et $6,0 \pm 2,5$ % d'anomalies larvaires seulement).

Enfin le 21 juillet, en période de vives eaux (coefficient de marée de 75), les différences précédemment notées se sont atténuées, avec des valeurs très proches aux points B ($25,3 \pm 7,8$) et C ($24,3 \pm 6,0$), toutefois supérieures aux pourcentages notés à l'entrée du port (A : $10,5 \pm 0,7$ % d'anomalies) et dans le chenal d'Arams (D : $11,0 \pm 4,2$ %).

Discussion et conclusions

Les pourcentages d'anomalies larvaires au point de référence (D) se situent, à une exception près (27 juin), nettement en dessous de la valeur seuil des 20 %, qui est retenue par les auteurs pour estimer la valeur des tests embryo-larvaires chez les Bivalves marins [11-13]. Ceci est valable pour les deux espèces utilisées, *C. gigas* et *M. galloprovincialis* ; ainsi aucune anomalie, liée soit aux matériaux soit au dispositif utilisés, n'a pu être mise en évidence. Une exception est toutefois à noter, le 27 juin 2000 : les eaux du point D sont de qualité biologique moyenne, le point A pouvant alors servir de référence. Les observations dans ce cas ont été effectuées par très faible coefficient de marée (valeur de 48), donc avec un renouvellement réduit de l'eau de mer dans le secteur. C'est

d'ailleurs à cette date que les plus mauvais résultats concernant la qualité biologique de l'eau ont été obtenus sur les différents sites étudiés. Il n'existe d'ailleurs que de faibles différences entre les données obtenues à l'entrée ou à l'extérieur du port. Cependant, ces situations favorables, présentant un point ayant moins de 20 % d'anomalies ne se produiront pas nécessairement en zone littorale fortement contaminée. L'adjonction d'élevages témoins, dans ce cas précis, est donc nécessaire. La solution que nous avons utilisée dans les études ultérieures, a été la mise en place *in situ* de 3 bouteilles en polyéthylène supplémentaires contenant l'EMF et les œufs fécondés, mais totalement hermétiques ; le matériel biologique de ces témoins a été ainsi soumis aux mêmes conditions thermiques que celui des chambres d'exposition.

Bien qu'aucune perturbation de la «qualité biologique» de l'eau de mer n'ait été observée en période hivernale sur le site étudié, et malgré le temps de réponse plus important, compte tenu des basses températures enregistrées, il est possible de réaliser des tests *in situ* en hiver ; or c'est à cette époque que dans le bassin d'Arcachon par exemple, comme dans la plupart des centres conchylicoles où les huîtres se reproduisent, on procède aux opérations de dragage dans les ports ; les tests embryo-larvaires de Bivalves peuvent donc être proposés pour étudier l'impact des ces opérations.

On sait par ailleurs que la moule méditerranéenne, *M. galloprovincialis*, outre une vaste aire de répartition géographique, est une espèce bradyctique, se caractérisant par la présence dans les populations naturelles de sujets mûrs toute l'année [2]. Les moules peuvent donc être utilisées à la place des huîtres, lorsque la température de l'eau de mer se situe nettement en dessous des 20°C qui sont nécessaires au bon développement larvaire de *C. gigas*. Enfin les deux espèces, qui colonisent à l'état naturel les zones côtières ainsi que les baies et les estuaires, sont euryhalines ; leur embryogenèse n'est pas perturbée jusqu'à la salinité de 20 [25]. Il est donc tout à fait envisageable d'effectuer des observations, dans les baies et estuaires où des perturbations anthropiques sont suspectées (développement récent des activités agricoles, en particulier). En ce qui concerne le milieu marin lui-même, qui sert encore trop souvent de réceptacle à de nombreuses activités humaines (rejets urbains ou industriels, boues de dragage), il devient possible par les tests d'embryotoxicité *in situ* de bivalves, d'étudier les nuisances engendrées de façon beaucoup plus réaliste que lors d'observations en laboratoire. Comme le rappellent les auteurs, les premiers rendent mieux compte des effets biologiques des polluants que les seconds [17, 22, 23, 26, 27]. Plusieurs raisons justifient cette position. Les épisodes toxiques peuvent être sous-estimés par des prélèvements ponctuels et certains toxiques volatiles ou labiles peuvent disparaître lors de

l'acheminement des échantillons au laboratoire. De plus, *in situ*, le matériel biologique se trouve soumis à des conditions environnementales naturelles, intégrant les effets de site sur plusieurs séquences temporelles (variations des conditions de milieu en fonction de la marée et conditions thermiques non constantes, par exemple). Pereira *et al.* [19] résumant parfaitement les raisons qui amènent les écotoxicologues à se tourner, dans la mesure du possible, vers l'utilisation de tests *in situ* : l'élimination des artéfacts liés au prélèvement et au stockage des échantillons ; de plus, les conditions qui régissent la toxicité et la bio-disponibilité des contaminants ne peuvent souvent pas être reproduites de façon précise en laboratoire.

Le test présenté ici, qui se fonde sur l'utilisation d'un organisme marin ou estuarien des plus utilisés en écotoxicologie, présente donc à notre sens un intérêt particulier. Il nous a permis de bien mettre en évidence une détérioration des conditions de milieu dans le port de plaisance d'Arcachon, en période estivale.

Enfin, en comparaison des tests *in situ* proposés par ailleurs pour le milieu marin [23], nous avons pu montrer [28] que les sensibilités des embryons de bivalves (*C. gigas* en particulier) et d'oursins (*P. lividus*) sont du même ordre vis-à-vis de nombreux altéragènes. Cependant, comme le soulignent les auteurs eux-mêmes [23], l'utilisation de l'oursin n'est guère possible toute l'année, ce qui limite fortement son utilisation en routine pour les opérations de surveillance. Il faut ajouter le caractère sténohalin de cette espèce, en opposition aux moules et aux huîtres qui colonisent à l'état naturel aussi bien les zones océaniques que les zones estuariennes. Les tests embryo-larvaires proposés ici présentent donc un avantage incontestable.

ABRIDGED VERSION

Larvae of oysters (*Crassostrea*) and mussels (*Mytilus*) have become standard organisms in ecotoxicological laboratory studies, because they are very sensitive to pollutants and yield rapid results. Mediterranean mussels, *M. galloprovincialis*, are useful for experiments throughout the year, because some ripe adults are to be found at almost any season; oysters (*C. gigas*), on the other hand, require about 20°C or more for spawning and embryonal development. Both species are euryhaline, and their embryogenesis is normal at salinities as low as 20 ; both of them are therefore appropriate for ecotoxicological studies in the coastal regions most strongly affected by pollution. The present study shows that bivalve larvae can be used perfectly well for *in situ* bioassays.

The biological quality of the water was studied at the port of Arcachon (Fig. 1), which has space for 2400 medium-size yachts, 80% of which never leave their berth, despite being inhabited during the summer. The boats are a source of increasing pollution. The eastern part of the port harbors some thirty fishing vessels more than 10 m in length. The studies were conducted at a depth of 1 m at the entrance (A), middle (B) and inner part (C) of the port, as well as outside the breakwater (D) at the commercial port situated on a channel of the Bay (Arams). The experiments were conducted in the following environmental conditions:

- Winter (*M. galloprovincialis*): during a period of neap tides from 10 to 14 January 1999 at a temperature of 9.8 to 10.4°C and salinity of 31.
- Summer (*C. gigas*): on 15, 27 and 30 June 2000 at temperatures of 19°C to 22.4 and salinity of 31 and on 21 July 2000 at 21.6 to 22.4°C and the same salinity.

The embryo-larva tests were carried out as follows : the gametes were obtained by thermal stimulation of ripe adults, and fertilized in 0.2 µm filtered seawater (FSW). After 10 minutes, fertilized eggs (60/ml) were transferred into bottles (3 per sea water to be treated). At the end of the incubation period (24 h in oysters, 48 h in mussels) the number of abnormal larvae was determined in subsamples of 100 larvae per treatment. The test is valid if the level of abnormality is less than 20% in controls.

The containers for the larvae were built from 1 l bottles of low-density polyethylene (Fig. 2). The bottom of each of the bottles was cut away and the opening covered with polyamide gauze of 30 µm mesh. The gauze was attached by heat-soldering, in order to avoid the use any glues, since all of the glues tested were found to be toxic to bivalve embryos. To permit the circulation of water through the bottle, the superior opening was equally covered with gauze fastened by a sealing ring and an open screw cap. The retention period of water in the containers was about 15 min, estimated with a solution of neutral red.

During winter experiments, the fertilized eggs of *M. galloprovincialis* required four days to complete embryogenesis. The controls (site D, channel of Arams) had abnormality levels of $14.0 \pm 4.2\%$ (mean percent value \pm 95 % confidence limits , Fig. 3-I). The highest level of abnormality was found at site C with $19.0 \pm 6.2\%$. The differences between sites were not significant. The long duration of embryogenesis during this experiment was due to low ambient temperatures. Even

though no toxic effects were found, the experiment demonstrates that *in situ* bioassays can be carried out in winter.

Four experimental series were carried out in summer 2000 (Fig. 3-II). In the experiment of 15 June, abnormality levels were similar to those in winter, except at site B with $27.3 \pm 9.7\%$. On 27 June, during a neap tide, abnormalities attained more than 50% at sites B and C. On 30 June, abnormalities were low at the port entrance and at Arams ($5.3 \pm 0.6\%$ and $6.0 \pm 2.5\%$, respectively), but high at sites B and C inside the port ($41.3 \pm 7.6\%$ and $36.3 \pm 14.3\%$, respectively). On 21 July, during a spring tide, the same tendency was found, but with smaller differences ($10.5 \pm 0.7\%$ and $11.0 \pm 4.2\%$ at sites A and D, respectively, as well as $25.3 \pm 7.8\%$ and $24.3 \pm 6.0\%$ at B and C, respectively).

In heavily polluted areas, controls are necessary to validate the data obtained. In further studies, we included, at each site, 3 tightly closed bottles containing FSW from an unpolluted site with the fertilized eggs as controls.

Embryotoxicity bioassays conducted *in situ* are more adequate for assessing the biological effects of pollutants than laboratory experiments, because toxic events may be underestimated due to incomplete sampling, and volatile or unstable toxicants may disappear on the way to the laboratory. The rationale for *in situ* testing are: elimination of artefacts resulting from sampling and storage, as well as from various other artificial laboratory conditions affecting the real toxicity and bioavailability of contaminants as well as a better simulation of the natural environment. In comparison to sea urchin bioassays, bivalve embryo-larval bioassays are particularly interesting for monitoring purposes, because they may be used year-round, since spawners are available in mussels during winter and in oysters during summer; in addition, both species are euryhaline and may be used to test seawater as well as brackish water.

Références

- [1] Prytherch H.F., 1924. Experiments in the artificial propagation of oysters. *Rep. U.S. Com. Fish.*, XI, 14p.
- [2] His E., Beiras R., Seaman M.N.L. 1999. The assessment of aquatic contamination: bioassays with bivalve larvae. *Adv. Mar. Biol.* 37, 1-178.
- [3] Stebbing A.R.D., Akesson B., Calabrese A., Gentile JH., Jensen A., Lloyd R. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapp. P.-v Réuni. Cons. Int. Explor. Mer* 179, 322-332.
- [4] Woelke C.E. 1961. Bioassay the bivalve larvae tool. *Proceedings of the Northwest Symposium on Water Pollution Research, US Dept. HEWPHS, Portland, Oregon*, 113-123.
- [5] Woelke C.E. 1967. Measurement of water quality with the Pacific oyster embryo bioassay. *Water Quality Criteria, ASTM STP 416, American Society for Testing and Materials*, 112-120.
- [6] Woelke C.E. 1972. Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48-hour Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. *Washington Department of Fisheries Technical Report 9*, 1-93.
- [7] Dimick R.E., Breese W.P. 1965. Bay mussel embryo bioassay. Proc. 12th Pacific Northwest Industrial Waste Conf., pp 165-175. Univ. Wash. College Engng Dpt. Civil Engng.
- [8] Wilson D.P. 1951. A biological difference between natural waters. *J. mar. biol. Ass. U. K.* 30, 1-21.
- [9] Bougis P. 1964. Sur le développement des plutéus *in vitro* et l'interprétation du test de Wilson. *C. R. Acad. Sc. Paris.* 259, 1250-1253.
- [10] Bougis P. 1981. Utilisation des larves d'oursins pour des tests biologiques. In Les Colloques de l'INS, les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique, *INSERM*, 106, 415-419.
- [11] American Society for Testing and Materials. 1989. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. *ASTM, E 724 -89, Philadelphia, PA*, 334-351.
- [12] His E., Beiras R. 1995. Monitoring fresh and brackish water quality around shellfish farming areas with a bivalve embryo and larva simplified bioassay method. *Oceanol. Acta.* 18, 591-595.
- [13] His E., Seaman M.N.L., Beiras R. 1997. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Wat. Res.* 31, 351-355.
- [14] Munawar M., Munawar I.F. 1987. Phytoplankton bioassays for evaluating toxicity of *in situ* sediment contaminants. *Hydrobiol.* 149, 87-105.
- [15] Sasson-Brickson G., Burton G.A. Jr. 1991. *In situ* and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 201-207.
- [16] Norrgren L., Degerman E. 1993. Effects of different water qualities on the early development of Atlantic salmon and brown trout exposed *in situ*. *Ambio.* 22, 213-215.
- [17] Crane M.P., Delaney P., Maidstone P.M., Clarke S. 1995. Measurement by *in situ* bioassay of water quality in an agricultural catchment. *Wat. Res.* 29, 2441-2448.
- [18] Crane M., Higman M., Olsen T., Simpson P., Callaghan A., Fisher T., Kheir R. 2000. An *in situ* system for exposing aquatic invertebrates to contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2715-2719.
- [19] Pereira A.M., Soares A.M.V.M., Gonçalves F., Ribeiro R. 1999. Test chambers and test procedures for *in situ* toxicity testing with zooplankton. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 1956-1964.
- [20] Sibley P.K., Benoit D.A., Balcer M.D., Phipps G.L., West C.W., Hoke R.A., Ankley G.T. 1999. *In situ* bioassay chamber for assessment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2325-2336.

- [21] Salazar M.H., Salazar S.M. 1995. *In situ* bioassays using transplanted mussels : I Estimating chemical exposure and bioeffects with bioaccumulation and growth. In Hughes J.S., Biddinger G.R., Mones E. Eds. *Environmental Toxicity and Risk Assessment*, vol. 3. American Society for Testing and Materials. Philadelphia. PA, pp 216-241.
- [22] Warrin L.W., Klaine S.J., Finley M.T. 1995. Development of a field bioassay with juvenile mussels. *J. North. Am. Benthol. Soc.* 14, 341-346.
- [23] Beiras R., Vasquez E., Bellas J., Lorenzo J.I., Fernandez N., Macho G., Mariño J.C., Casas L. 2001. Sea-urchin embryo bioassay for *in situ* evaluation of the biological quality of coastal seawater. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 52, 29-32.
- [24]. Widdows J. 1993. Marine and estuarine invertebrate toxicity tests. In “*Handbook of Ecotoxicology*”, (P. Calow, ed)., 1, 145-166. Blackwell, Oxford.
- [25] His E., Robert R., Dinet A. 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar. Biol.* 100, 455-463.
- [26] Meregalli G., Vermeulen A.C., Wakabayashi M. 2000. The use of chironomid deformation in an *in situ* test for sediment toxicity. *Ecotox. Environ. Saf.* 47(3), 231-239.
- [27] Pereira A.M.M., Soares A.M.V.M., Goncalves F., Ribeiro R. 2000. Water-column, sediment, and *in situ* chronic bioassays with cladocerans. *Ecotox. Environ. Saf.* 47(1), 27-39.
- [28] His E., Heyvang I., Geffard O., de Montaudouin X. 1999. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassay for toxicological studies. *Wat. Res.* 7, 1706-1718.

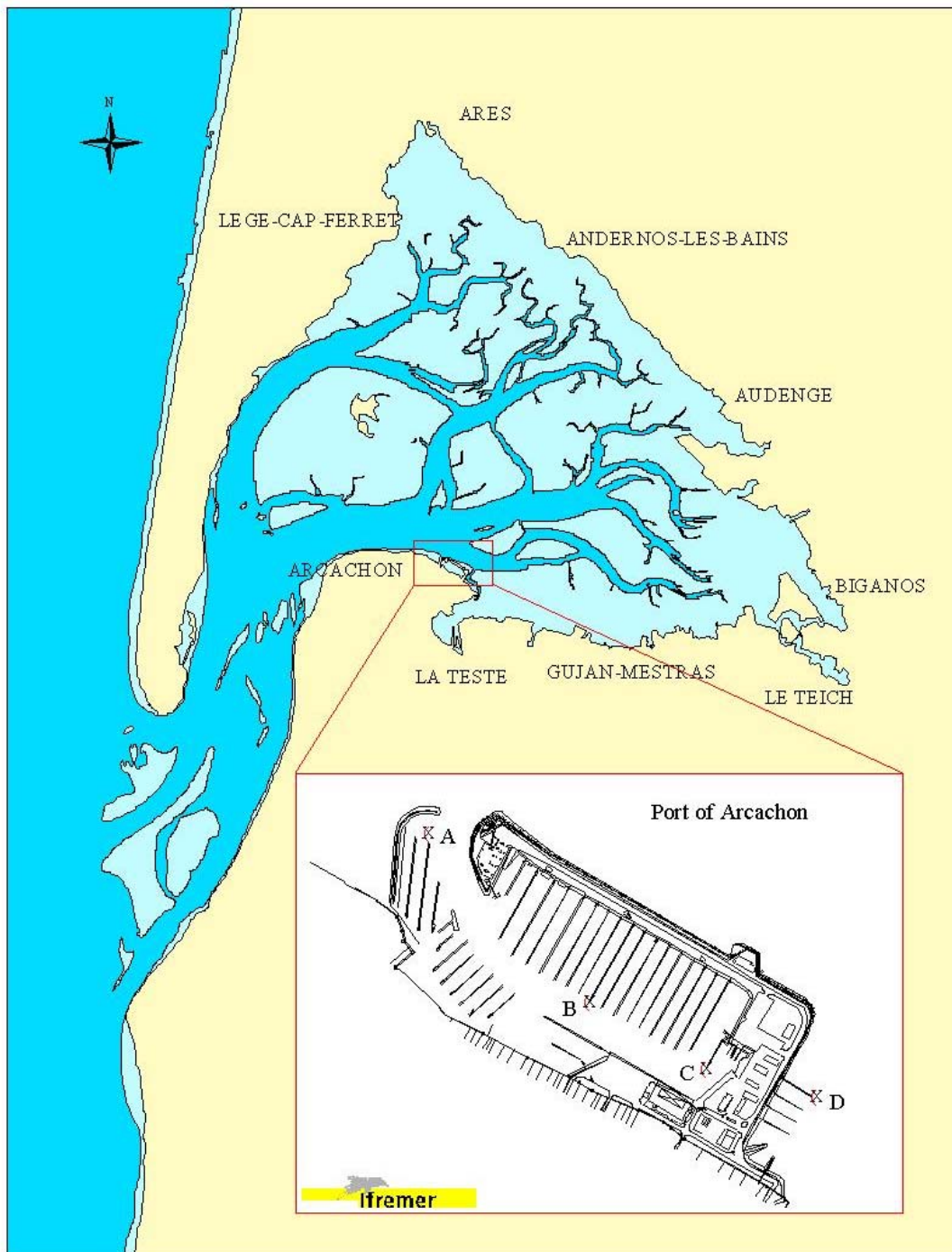


Figure 1: Le port de plaisance d’Arcachon, avec les points d’observation, dans le port lui même (A, B et C) et dans le chenal d’Arams (D).

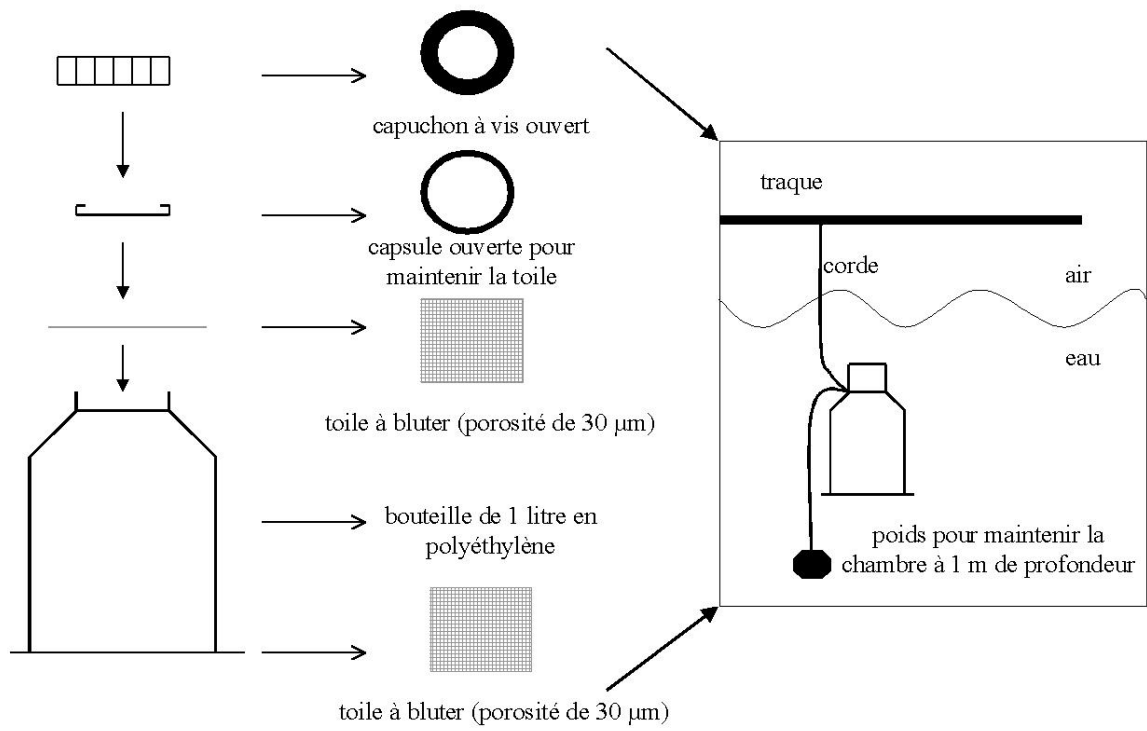


Figure 2 : Présentation des chambres d'exposition *in situ*.

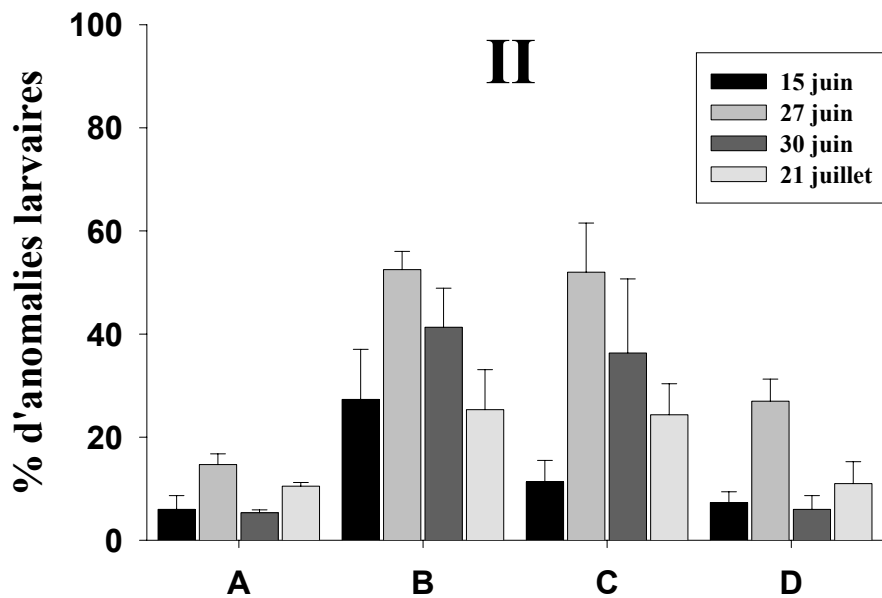
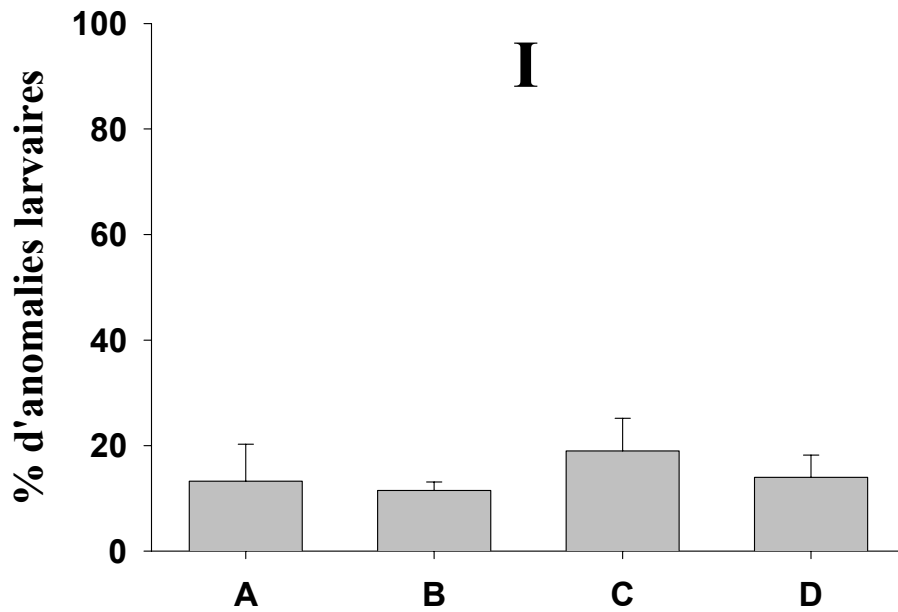


Figure 3 : Pourcentages d'anomalies larvaires obtenus chez *M. galloprovincialis* (I, 10/01/99) et *C. gigas* (II, été 2000) lors des tests d'embryotoxicité *in situ*. A, B, C et D correspondent aux différents points d'observation (voir figure 1).

Conclusion et perspectives

L'objectif de cette thèse était la mise en évidence de la toxicité des sédiments marins, côtiers et estuariens, ainsi que l'étude de la biodisponibilité des xénobiotiques d'origine sédimentaire. Les sédiments contaminés constituent un danger pour les organismes benthiques, vivant directement en contact du sédiment, mais également pour les espèces pélagiques à cause du relargage potentiel de contaminants dans la colonne d'eau. Pour évaluer la qualité d'un sédiment, les deux aspects doivent être étudiés.

Entre les différents stades de développement chez *C. gigas* et *P. lividus*, les embryons et les larves d'huître se sont révélés les plus sensibles et les mieux adaptés (espèce euryhaline et développement embryonnaire rapide) pour étudier la toxicité des sédiments. Ils peuvent être utilisés lors d'un test à court (embryotoxicité) et à long terme (croissance larvaire).

Afin que les bioessais aient une signification écologique maximale, les sédiments doivent être utilisés frais et conservés à 4°C et à l'obscurité pendant moins de 20 jours. En revanche, la lyophilisation qui exacerbe la toxicité des sédiments, permet néanmoins de stabiliser cette dernière au court du temps. Ce mode de stockage a été utilisé afin de mettre en évidence l'évolution simultanée de la mobilité des métaux et de la toxicité d'un sédiment de l'estuaire de la Gironde (le Cheyzin) au cours de l'année 1997. La lyophilisation peut donc être retenue, en dehors des opérations visant à évaluer la seule qualité des sédiments, pour des recherches à caractère plus fondamental.

Ce travail a pu montrer que le test d'embryotoxicité chez *C. gigas*, avec le sédiment contact, permet d'évaluer le danger que représente un sédiment vis à vis des organismes benthiques. Les anomalies larvaires observées sont corrélées au niveau de contamination des sédiments et à leur toxicité potentielle (définie selon Long *et al.*, 1995). De plus, avec l'espèce retenue, les caractéristiques physiques des sédiments n'ont aucune influence sur les effets biologiques, ce qui est un avantage en comparaison des autres modèles biologiques classiquement utilisés (Ex : certains tests amphipodes et le test Microtox[®]). Enfin, la contamination des embryons, responsable des effets biologiques, s'effectue lors de leur contact direct avec le sédiment, par l'accumulation des HAP et des métaux biodisponibles dans le cas présent, reflétant bien ainsi la qualité du sédiment.

L'utilisation des élutriats a montré ici que la remise en suspension des sédiments entraîne une contamination en HAP et en métaux de la colonne d'eau, à des niveaux généralement plus faibles que ceux qui sont utilisés en laboratoire lors d'études toxicologiques. Par contre, les teneurs en contaminants sont semblables à celles que l'on peut observer dans des zones côtières et estuariennes contaminées. L'utilisation d'élutriats réalisés à partir de sédiments frais permet donc

des expositions ayant une bonne signification écologique. Malgré la grande sensibilité reconnue des embryons de *C. gigas*, par rapport aux autres espèces marines, ces considérations expliquent que peu d'effets marqués aient été observés sur le développement embryonnaire de cette espèce (**effet à court terme**). Pour certains élutriats, des faux positifs ont été obtenus à cause de trop fortes teneurs en ammoniac qui est un composé très toxique pour les embryons de *C. gigas*. Toutefois, on a pu montrer que la remise en suspension des sédiments constitue un réel danger pour les organismes pélagiques. Ainsi, en présence de l'élutriat d'Arès et de Dunkerque, la croissance larvaire de *C. gigas* a été respectivement ralentie et stoppée (**effet à plus long terme**), pour des concentrations inférieures à celles entraînant des anomalies larvaires. De plus, avec l'élutriat d'Arès, pour une teneur en HAP dissous réaliste sur le plan environnemental, la contamination des larves par la voie trophique a été suffisante pour entraîner un ralentissement de la croissance (**effet sur une chaîne trophique courte**).

Les études de bioaccumulation ont montré que les HAP et les métaux sédimentaires sont biodisponibles pour les embryons et les larves de *Crassostrea gigas* et de *Mytilus galloprovincialis* et ceci pour les différents modes de contamination testés (directement au sédiment, à l'élutriat et par voie trophique). Avec les HAP, une concentration corporelle critique a pu être définie, au-dessus de laquelle les effets biologiques (anomalies larvaires et inhibition de croissance) apparaissent. Chez les larves D de 24 h, la concentration corporelle critique est de 300 ng/g (de poids sec), chez les larves de 9 jours, elle est de 120 ng/g (de poids sec), confirmant la plus grande sensibilité du test de croissance larvaire. Comme le préconisent plusieurs auteurs, la concentration interne en HAP chez les larves semble pouvoir être utilisée comme un indicateur de la qualité du milieu.

L'étude des concentrations relatives des composés tetra, penta et hexa-aromatiques a permis de mettre en évidence *i*) une différence de biodisponibilité des HAP en fonction du mode de contamination (sédiment contact, élutriat et voie trophique) et en fonction du stade de développement de l'organisme (embryons et larves); *ii*) la capacité des larves de *C. gigas* à transformer les HAP.

A partir du sédiment de la Bidassoa, de Dunkerque et du Cheyzin, utilisés comme sources de contamination métallique, des inductions de MT chez les larves de *C. gigas* et de *M. galloprovincialis* ont pu être mises en évidence. Ces inductions sont dans tous les cas très bien corrélées aux teneurs métalliques dans les larves. Elles apparaissent pour des niveaux de contamination dans le milieu bien plus faibles que ceux entraînant des effets sur le développement embryonnaire et sur la croissance larvaire (**effets précoces**). Les métallothionéines chez les larves

de bivalves constituent donc un biomarqueur d'exposition métallique très sensible et précoce. Ces résultats permettent de faire le lien entre une réponse moléculaire (MT) ou cellulaire (bioaccumulation) et les effets obtenus au niveau de l'organisme entier (à court ou à long terme) et donc au niveau de la population. En effet le développement embryonnaire et la croissance des larves conditionnent le maintien de la population.

A ce stade de développement, le test d'embryotoxicité chez *C. gigas* peut être recommandé pour les études de biomonitoring sur la qualité biologique des sédiments, ceci à l'aide de la démarche présentée sur la figure C-1. Le sédiment contact et l'élutriat permettent respectivement d'évaluer la qualité biologique des sédiments vis à vis des organismes benthiques et pélagiques. Toutefois, l'utilisation de ce type de test met en évidence une toxicité à court terme et irréversible, reflétant une contamination du milieu déjà bien marquée. Par conséquent et à partir de nos résultats, lorsqu'il n'y a pas d'effets sur le développement embryonnaire, ceci ne signifie pas que la qualité du sédiment est bonne et qu'une possible exposition et par suite une contamination des organismes par les contaminants sédimentaires est à exclure. Dans le cadre d'une contamination par les hydrocarbures et les métaux, la mesure des teneurs en HAP et en MT dans les larves permet de mettre en évidence une éventuelle exposition des organismes à ces composés, avant que des effets irréversibles n'apparaissent. Cette démarche permet donc de faire un diagnostic plus réaliste de la qualité des sédiments sur le plan environnemental, afin d'assurer une meilleure protection des milieux côtiers et estuariens. Comme le montre la figure C-1, la seconde partie de la démarche est dite en développement, car elle peut être améliorée, simplifiée et elle doit être validée de façon plus approfondie. L'analyse de MT répond tout à fait à l'objectif de biomonitoring, elle est rapide et peu onéreuse. Le point le plus délicat est la détermination des teneurs en HAP. Bien que la méthode analytique ait été améliorée et soit aujourd'hui plus rapide (Budzinski *et al.*, 1995), elle reste assez longue et onéreuse. Le développement d'un biomarqueur d'exposition aux HAP serait nettement souhaitable.

L'application de ce type de démarche en France, conjointement au Réseau National d'Observation, permettrait ; *i*) d'évaluer la qualité des sédiments du littoral français, *ii*) d'adapter et de valider pour nos zones côtières les seuils de toxicité développés aux Etats-Unis, ce qui permettrait une meilleure gestion des sédiments, en préservant les zones non impactées, en limitant les apports supplémentaires aux zones légèrement contaminées et réhabilitant les zones fortement polluées ; *iii*) de valider l'utilisation des études de bioaccumulations et de biomarqueurs pour prédire des effets aux niveaux d'intégrations biologiques plus élevés, comme l'individu entier et dans notre cas, la population larvaire.

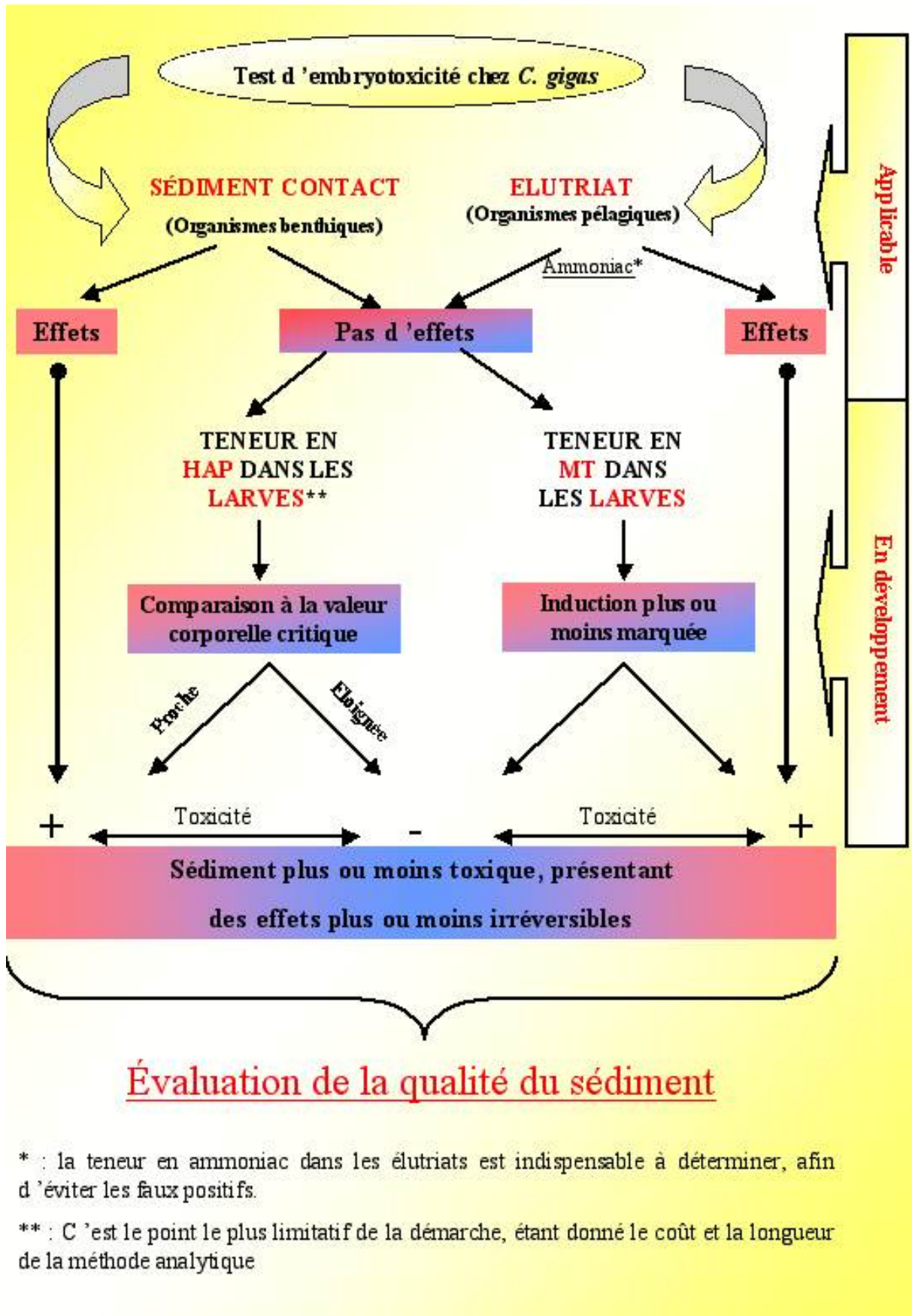


Figure 1 : Démarche pour l'évaluation de la qualité des sédiments marins, côtiers, estuariens lors d'études de biomonitoring.

Au delà d'une démarche sur l'évaluation de la qualité des sédiments marins lors d'études de biomonitoring, les résultats présentés ici confirment le rôle de l'embryon de *Crassostrea gigas* comme un outil des plus sensibles aux effets des altéragènes en écotoxicologie marine, domaine particulièrement déficitaire en comparaison à celui des eaux continentales. Cet organisme peut être utilisé lors d'un test à court (embryotoxicité) et à long terme (croissance larvaire), avec la prise en compte de la biodisponibilité des contaminants dissous, adsorbés sur les particules en suspension et transférés par la voie trophique. Le couplage de ces tests avec des études de bioaccumulation et l'utilisation de biomarqueurs d'exposition (MT dans le cas présent) permet non seulement d'augmenter leur sensibilité (réponses précoces), mais également de les rendre plus spécifiques. Il s'agit donc d'un outil de choix pour les études de risques chimiques par exemple, ou les PNEC (Probable No Effect Concentration) des composés doivent être déterminés de la façon la plus réaliste possible par rapport aux teneurs environnementales, si l'on veut que les comparaisons avec les PEC (Probable Environmental Concentration) assurent une bonne protection des milieux côtiers et estuariens. De la même façon, ce type d'outil est parfaitement utilisable pour évaluer l'impact environnemental (risque écotoxicologique) d'activités d'aménagement du littoral, telles que les opérations de dragages (portuaire et chenaux) et la réhabilitation de zones contaminées.

Les bioessais en laboratoire ne peuvent donner qu'une mesure approximative de la toxicité d'un milieu, car ils ne permettent pas de refléter parfaitement les conditions du milieu naturel. Le test d'embryotoxicité, développé au laboratoire, a été adapté au milieu naturel. Ce test *in situ* a été utilisé avec des embryons de *C. gigas* et de *M. galloprovincialis* et a permis de mettre en évidence une détérioration de la qualité biologique des eaux du port de plaisance d'Arcachon au cours de l'été 2000. Ces résultats ouvrent des perspectives à court terme, vers des études d'impact des opérations de dragage et de relargage de sédiments et boues portuaires, mais aussi à plus long terme, vers l'évaluation de la toxicité des sédiments *in situ*.

Les études sur la croissance larvaire, la bioaccumulation et l'utilisation de biomarqueurs sur le modèle biologique retenu, permettent de dégager des perspectives qu'il conviendra d'aborder dans des études ultérieures. En particulier en ce qui concerne les HAP auxquels nous nous sommes plus particulièrement intéressés, le développement d'un biomarqueur d'exposition à ces composés figure dans les perspectives de recherches affichées. En effet, la capacité des larves à transformer les HAP ; laisse envisager la possibilité de doser le 3-OH-BaP (produit de transformation du BaP) et de l'utiliser comme biomarqueur d'exposition ou de défense.

La dernière grande perspective de ces travaux de recherche est d'adapter l'utilisation des études de bioaccumulation et de biomarqueurs chez les larves de bivalves dans le cadre de travaux menés *in situ*, ainsi que d'élargir nos recherches à d'autres contaminants que nous avons pas pu étudier dans ce travail.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

- Allen HE, Fu G, Den B. 1993. Analysis of acid volatile sulfide (AVS) and simultaneous extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environ Toxicol Chem* 12:1441-1453.
- Amiard-Triquet C, Amiard JC. 1998. Influence of ecological factors on accumulation of metal mixtures. In : Langston WJ, Bebianno MJ (eds). Metal metabolism in aquatic environments. Chapman & Hall. London. 351-386.
- Amiard JC, Cosson R. 1997. Les métallothionéines. In Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Eds Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F. Masson, Paris p.53-66
- Amiard JC, Geffard A, Amiard-Triquet C. 1998. La métallothionéine chez la moule *Mytilus edulis* comme biomarqueur de pollution métallique: variabilité entre sites, saisons et organes. *J Rec Ocean* 23:25-30.
- Amiard JC, Pineau A, Boiteau HL, Métayer C, Amiard-Triquet C. 1987. Application de la spectrométrie d'adsorption atomique Zeeman aux dosages de huit éléments traces (Ag, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Se) dans des matrices biologiques solides. *Wat Res* 21:693-697.
- Aminot A, Chaussepied M. 1983. Manuel des analyses chimiques en milieu Marin. CNEXO, BNDO/Documentation Brest, 395 pp.
- Anderson BS, Hunt JW, Phillips BM, Fairey R, Puckett HM, Stephenson M, Taberski K, Newman J, Tjeerdema RS. 2001. Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface. *Mar Environ Res* 51:191-211.
- Anderson BS, Hunt JW, Phillips BM, Tudor S, Fairey R, Newman J, Puckett HM, Stephenson M, Long ER, Tjeerdema RS. 1998. Comparison of marine sediment toxicity test protocols for the amphipod *Rhepoxynius* and the polychaete worm nereis (*Neanthes*) *Arenaceodentata*. *Environ Toxicol Chem* 17(5):859-866.
- Ankley GT, Di Toro MD, Hansen DJ, Berry WJ. 1996a. Assessing the ecological risk of metals in sediments. *Environ Toxicol Chem* 15:2053-2055.
- Ankley GT, Di Toro MD, Hansen DJ, Berry WJ. 1996b. Technical basis and proposal for deriving sediment quality criteria for metals. *Environ Toxicol Chem* 15:2056-2066.
- Ankley GT, Erickson RJ, Phipps GL, Mattson VR, Kosian PA, Sheddy BR, Cox JR. 1995. Effects of light intensity on the Phototoxicity of Fluoranthene to a Benthic Macroinvertebrate. *Environ Sci Technol* 29:2828-2833.
- Ankley GT, Katko A, Arthur JW. 1990. Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the Lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environ Toxicol Chem* 9:313-322.
- Ankley GT, Schubauer-Berigan MK, Dierkes JR. 1991. Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fractions: pore water vs. Elutriate. *Environ Toxicol Chem* 10:1359-1366.
- Ankley GT, Thomas NA, Di Toro DM, Hansen DJ, Mahony JD, Berry WJ, Swartz RC, Hoke RA, Garrison AW, Allen HE, Zarba CS. 1994. Assessing potential bioavailability of metals in sediments: A proposed approach *Environ Management* 8:331-337
- ASTM. 1992. Standard guide for Conducting 10-Day Static Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Amphipods. E-1367-92. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- ASTM. 1994a. Standard guide for collection, storage, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing. E-1391-94. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- ASTM. 1994b. Standard guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Marine and Estuarine Polychaetous Annelids. E-1611-94. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.

- ASTM. 1994c. Standard guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Embryos of Four Species of Saltwater Bivalve Molluscs. E-724-94. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.
- ASTM. 1995. Standard guide for Conducting Static Acute Toxicity Tests Starting with Echinoid Embryos. E-1563-95. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, Pa.

B

- Batley GE. 1989. Physiochemical separation methods for trace element speciation in aquatic samples. In Batley GE (ed). Trace element speciation : analytical methods and problems. CRC Press. Boca Raton. 25-41. 43-76.
- Baudrimont M, Lemaine-Gony L, Ribeyre F, Métivaud J, Boudou A. 1997. Seasonal variations of metallothionein concentrations in asiatic clam (*Corbicula fluminea*) after experimental exposure to cadmium and inorganic mercury. *Environ Toxicol Chem* 16:2096-2106.
- Baumard P. 1997. Biogéochimie des composés aromatiques dans l'environnement marin. Thesis, University of Bordeaux I, Bordeaux, France. 290p.
- Bayne BL. 1976. The biology of mussel larvae. In Marine mussels, their ecology and physiology, BL Bayne (ed.), 81-119, Cambridge University Press, Cambridge.
- Becker DS, Bilyard GR, Ginn TC. 1990. Comparaison between sediment bioassays and alterations of benthic macroinvertebrate assemblage at a marine Superfund site : Commencement Bay, Washington. *Environ Toxicol Chem* 9:669-685.
- Becker DS, Ginn TC. 1995. Effects of storage time on toxicity of sediments from Puget Sound, Washington. *Environ Toxicol Chem* 14:829-835.
- Beiras R, His E. 1994. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Mar Ecol Prog Ser* 113:95-103.
- Beiras R, His E. 1995. Toxicity of fresh and freeze-dried hydrocarbon-polluted sediments to *Crassostrea gigas* embryos. *Mar Pollut Bull* 30:47-49.
- Beiras R, His E, Seaman MNL. 1998. Effects of storage temperature and duration on toxicity of sediments assessed by *Crassostrea gigas* oyster embryo bioassay. *Environ Toxicol Chem* 17(10):2100-2105.
- Beiras R, Vazquez E, Bellas J, Lorenzo JI, Fernandez N, Macho G, Marino JC, Casas L. 2001. Sea-urchin Embryo Bioassay for *in situ* evaluation of the Biological Quality of Coastal Seawater. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52:29-32.
- Beiras R, Widdows J. 1995. Induction of metamorphosis in *Crassostrea gigas* larvae using neuroactive compounds. *Mar Biol* 123:327-334.
- Bellair P., Pomerol C. 1977. Eléments de géologie. Armand Colin, Paris, 528p.
- Benson WH, Di Giulio RT. 1992. Biomarkers in hazard assessments of contaminated sediments. In Sediment toxicity assessment. Edited by GA Burton Jr. Lewis Publishers, Chelsea, Mitch. pp. 241-266.
- Benson WH, Waston CF, Baer KN, Stackhouse RA. 1988. Response of Hematological and Biochemical Parameters to Heavy Metal Exposure: Implications in Environmental Monitoring. *Mar Environ Res* 24:219-222
- Berry WJ, Hansen DJ, Mahony JD, Robson DL, Di Toro DM, Shipley BP, Rogers B, Corbin JM, Boothman WS. 1996. Predicting the toxicity of metal-spiked laboratory sediments using acid-volatile sulfide and interstitial water normalizations. *Environ Toxicol Chem* 15:2067-2079.
- Beyer JM, Sandvik K, Hylland E, Fjeld E, Egaas E, Aas E, Skare JU, Goksoyr A. 1994. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by cadging to polluted sediments in Sorflorden, Norway. *Aquat Toxicol* 36:75-98.
- Billard SM, Querbach K, Hodson PV. 1999. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species. *Environ Toxicol Chem* 18(9):2070-2077.

- Blasco J, Saenz V, Gomez-Parra A. 2000. Heavy metal fluxes at the sediment-water interface of three coastal ecosystems from south-west of the Iberian Peninsula. *The Science of the Total Environment* 247:189-199.
- Bona F, Cecconi G, Maffiotti A. 2000. An integrated approach to assess the benthic quality after sediment capping in Venice lagoon. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 3:379-386.
- Bonnet C. 2000. Développement de bioessais sur sédiments et applications à l'étude, en laboratoire, de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés. Thèse, Université de Metz, Metz, France, 309 pp.
- Boothman WS, Hansen DJ, Berry WJ, Robson DL, Helmstetter A, Corbin JM, Pratt SD. 2001. Biological response to variation of acid-volatile sulfide and metals in field-exposed spiked sediments. *Environ Toxicol Chem* 20(2):264-272.
- Borgmann U, Norwood WP. 1997. Identification of the toxic agent in metal-contaminated sediments from Manitowadge Lake, Ontario, using toxicity-accumulation relationship in *Hyalella azteca*. *Can J Fish Aquat Sci* 54:1055-1063.
- Borgmann U. 2000. Methods for assessing the toxicological significance of metals in aquatic ecosystems: bio-accumulation-toxicity relationships, water concentrations and sediment spiking approaches. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 3:277-289.
- Borgmann U, Néron R, Norwood WP. 2001. Quantification of bioavailable nickel in sediments and toxic thresholds to *Hyalella azteca*. *Environ Pollut* 111:189-198.
- Breton A. 1999. Evaluation de la sensibilité de lots d'huîtres creuses envers un toxique de référence, le sulfate de cuivre, lors de bioessais sur le développement embryonnaire. Rapport de Stage. 92p.
- Brereton A, Lord H, Thornton I, Webb JS. 1973. Effect of zinc on growth and development of larvae of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 19:96-101.
- Brownawell BJ, Farrington JW. 1986. Biogeochemistry of PCBs in interstitial waters of a coastal marine sediment. *Geochim Cosmochim Acta* 50:157-169.
- Broyelle I. 1997. Contribution à l'étude de la biochimie de la matière organique en milieu estuarien: cas des deltas du Rhône et de la Léna. Thèse de l'Université de Paris 6, Paris. 256pp.
- Budzinski H, Jones I, Bellocq J, Piérard C, Garrigues P. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. *Mar Chem* 58:85-97.
- Budzinski H, Papineau A, Baumard P, Garrigues P. 1995. Extraction assistée par chauffage microondes focalisées (MOF) à pression ambiante des composés organiques dans les matrices naturelles : application à l'analyse des composés aromatiques. *C R Acad Sci Paris, 321, série IIB*, 69-76.
- Burgeot T, Claisse D, Amiard-Triquet C. 2001. La surveillance de la qualité du milieu marin : L'expérience du Réseau National d'Observation (RNO) et la développement de biomarqueurs. *Océanis*. (sous presse).
- Burgess RM, McKinney RA. 1997. Effects of sediment homogenization on interstitial water PCB geochemistry. *Arch Environ Contam Toxicol* 33:125-129.
- Burgess R.M, Morrison GE. 1994. A short-term exposure, sublethal, sediment toxicity test using the marine bivalve *Mulinia lateralis* : statistical design and comparative sensitivity. *Environ Toxicol Chem* 13:571-580.
- Burgess RM, Scott KJ. 1992. The Significance of In-Place Contaminated Marine Sediments on the Water Column : Processes and Effects. In Burton, GAJ (Eds). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis, Chelsea, MI, USA. 129-165.
- Burgess RM, Schweitzer KA, McKinney RA, Phelps DK. 1993. Contaminated marine sediment : water column and interstitial toxic effect. *Environ Toxicol Chem* 12:127-138.
- Burton GA, 1992a. Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, London, 211p.
- Burton GA. 1992b. Sediment Collection and Processing: Factors Affecting. In Burton, GAJ (Eds). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis, Chelsea, MI, USA. 37-54.

- Burton GA. 1992c. Plankton, Macrophyte, Fish, and Amphibian Toxicity Testing of Freshwater Sediments. In Burton, GAJ (Eds). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis, Chelsea, MI, USA. 167-176.
- Butler PA, Lowe JI. 1978. Flowing sea water toxicity tests using oyster (*Crassostrea virginica*). In Bioassay Procedures for the Ocean Disposal Permit Program, EPA-600/9-78-010, 25-27.

C

- Campanella L, Conti ME, Cubadda F, Sucapane C. 2001. Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. *Environ Pollut* 111:117-126.
- Campbell PGC, Tessier A. 1994. Geochemistry and bioavailability of trace metals in sediments. In *Aquatic ecotoxicology: fundamental concepts and methodologies*. Vol. 1. Eds Boudou A. and Ribeyre F. CRC Press, Boca Raton, Fla. Pp. 125-148.
- Caquet T, Lagadic L. 1997. Conséquences d'atteintes individuelles précoces sur la dynamique des populations et la structure des communautés et des écosystèmes. In : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds). *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux*. Masson. Paris. 265-298.
- Cardwell RD, Woelke CE, Carr MI, Sanborn EW. 1976. Sediment and elutriate toxicity to oyster larvae. In *Proceedings of the Special Conference on Dredging and its environmental effects*. Eds Krenkel PA, Harrisson J, Burdick JC, New York : American Society of Civil Engineers.
- Carr R.S., 1998. Marine and Estuarine porewater toxicity testing. In *Microscale Testing and Aquatic Toxicology Advances, techniques and Praticce*. Edited by P. G. Wells, K. Lee and C. Blaise. CRC Press, Boca Raton, chap. 36:523-537.
- Carr RS, Chapman DC. 1992. Comparison of solid-phase and pore-water approaches for assessing the quality of marine environment. *Chem Ecol* 7:19-30.
- Carr RS, Chapman DC. 1995. Comparison of methods for conducting marine and estuarine sediment porewater toxicity tests-extraction, storage, and handling techniques. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:69-77.
- Carr RS, Chapman DC, Howard CL, Biedenbach J. 1996b Sediment Quality Triad assessment survey in Galvestone Bay, Texas system. *Ecotoxicology* 5:1-25.
- Carr RS, Chapman DC, Presley BJ, Biedenbach J, Roberston L, Boothe PN, Kilada R, Wade TL, Montagna P. 1996a. Sediment pore-water toxicity assessment studies in the vicinity of offshore oil and gas production platforms in the Gulf of Mexico. *Can J Fish Aquat Sci* 53:2618-2628.
- Carr RS, Long SE, Windom HL, Chapman DC, Thursby G, Sloane GN, Wolfe DA. 1996c. Sediment quality assessment studies of Tampa Bay, Florida. *Environ Toxicol Chem* 15:1218-1231.
- Carr RS, Montagna PA, Biedenbach JM, Kalke R, Kenneticutt MC, Hooten R, Cripe G. 2000. Impact of storm-water outfalls on sediment quality in corpus Christi bay, Texas, USA. *Environ Toxicol Chem* 19(3):561-574.
- Carr RS, Williams JW, Fragata CTB. 1989. Development and evaluation of a Novel Marine Sediment Pore Water Toxicity Test with the Polychaete *Dinophilus gyrocilatus*. *Environ Toxicol Chem* 8:533-543.
- Cauwet G. 1975. Optimisation d'une technique de dosage du carbone organique des sédiments. *Chem Geol* 16:56-63.
- Chandler GT, Scott GI. 1991. Effects of sediment bound endosulfan on survival, reproduction and larval settlement of meiobenthic polychaetes and copepods. *Environ Toxicol Chem* 10:375-382.
- Chapman PM. 1989. Current approaches to developing sediment quality criteria. *Environ Toxicol Chem* 8:589-599.

- Chapman PM. 1990. The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Sci total Environment* 97/98:815-825.
- Chapman PM, Fink R. 1984. Effects of Puget Sound Sediments and their elutriates on the life cycle of *Capitella capitata*. *Bull environ Contam Toxicol* 33:451-459.
- Chapman PM, Long ER. 1983. The use of bioassays as part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Mar Pollut Bull* 14:81-84.
- Chapman PM, Morgan JD. 1983. Sediment bioassays with oyster larvae. *Bull Environm Contam Toxicol* 31:438-444.
- Chapman PM, Dexter RN, Long ER. 1987. Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. *Mar Ecol Prog Ser* 37:75-96.
- Chapman PM, Paine MD, Arthur AD, Taylor LA. 1996. A triad study of sediment quality associated with a major, relatively untreated marine sewage discharge *Mar Pollut Bull* 32:47-64.
- Chapman PM, Power EA, Dexter RN, Andersen HB. 1991. Evaluation of effects associated with an oil platform using the sediment quality triad. *Environ Toxicol Chem* 10:407-424.
- Chapman PM, Swartz RC, Roddie B, Phelps HL, van den Hurk P, Butler R. 1992. An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. *Mar Ecol Prog Ser* 91:253-264.
- Chapman PM, Wang F. 2001. Assessing sediment contamination in estuaries. *Environ Toxicol Chem* 20(1):3-22.
- Chapman PM, Wang F, Janssen C, Persoone G, Allen HE. 1998. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Can J fish Aquat Sci* 55:2212-2243.
- Chappie DJ, Burton GA Jr. 1997. Optimization of *in situ* bioassays with *Hyaella azteca* and *Chironomus tentans*. *Environ Toxicol Chem* 16(3):559-564.
- Cherr GN, Shoffner-Mcgee J, Shenker JN. 1990. Methods for assessing fertilization and embryonic larval development in toxicity tests using the california mussel (*Mytilus californianus*). *Environ Toxicol Chem* 9:1137-1145.
- Chew KK. 1990. Global bivalve shellfish introductions: Implications for sustaining a fishery or strong potential for economic gains ? *World Aquaculture* 21:9-22.
- Choi J, Roche H, Caquet T. 2000. Effects of physical (hypoxia, hyperoxia) and chemical (potassium dichromate, fenitrothion) stress on antioxidant enzyme activities in *Chironomus riparius* Meigen (Diptera, Chironomidae) larvae: potential biomarkers. *Environ Toxicol Chem* 19:495-500.
- Ciarelli S, Kater BJ, van Straalen NM. 2000. Influence of bioturbation by the amphipod *Corophium volutator* on fluoranthene uptake in the marine polychaete *Nereis virens*. *Environ Toxicol Chem* 19(6):1575-1581.
- Ciarelli S, Van Straalen NM, Klap VA, Van Wezel AP. 1999. Effects of sediment bioturbation by estuarine amphipod *Corophium volutator* on fluoanthene resuspension and transfert into the mussel (*Mytilus edulis*). *Environ Toxicol Chem* 18(2):218-328.
- Ciarelli S, Vonck WAPMA, Van Straalen NM, Stronkhorst J. 1998. Ecotoxicity Assessment of contaminated dredged Material with the Marine Amphipod *Corophium volutator*. *Arch Environ Contam Toxicol* 34:350-356.
- Coglianesi MP. 1982. The effects of salinity on copper and silver toxicity to embryos of the Pacific oyster. *Arch Environ Contam Toxicol* 11:297-303
- Coglianesi MP, Martin M. 1981. Individual and interactive effects of environmental stress on the embryonic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. I. The toxicity of copper and silver. *Mar Environ Res* 5:13-27.
- Commendatore MG, Esteves JL, Colombo JC. 2000. Hydrocarbons in Coastal sediments of Patagonia, Argentina : Levels and Probable Sources. *Mar Pollut Bull* 40(11):989-998.

- Connell DW, Chaisuksant Y, Yu J. 1999. Importance of Internal Biotic Concentrations in Risk evaluations with Aquatic Systems. *Mar Pollut Bull* 39(1-12):54-61.
- Coon SL, Bonar DB. 1986. Norepinephrine and dopamine content of larvae and spat of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Biological Bulletin, Marine Biological Laboratory, Woods Hole* 171:632-639.
- Coon SL, Bonnar DB, Weiner RM. 1985. Induction of settlement and metamorphosis of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) by L-DOPA and catecholamines. *J exp mar Biol Ecol* 94:211-221.
- Crane M, Higman M, Olsen T, Simpson P, Callaghan A, Fisher T, Kheir R. 2000. An *in situ* system for exposing aquatic invertebrates to contaminated sediments. *Environ Toxicol Chem* 19:2715-2719.
- Cripe GM, Carr RS, Foss SS, Harris PS, Stanley RS. 2000. Effects of whole sediment from Corpus Christy Bay on survival, growth and reproduction of the mysid *Americamysis bahia* (formerly *Mysidopsis bahia*). *Bull Environ Contam Toxicol* 64(3):426-433.

D

- Dallinger R. 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger R, Rainbow PS (eds). *Ecotoxicology of metals in Invertebrates*. Lewis Publ. Boca Raton. 248-289.
- Danielsson LG, Magnusson B, Westerlund S, Zhang K. 1982. Trace metal determinations in estuarine waters by electrothermal atomic absorption spectrometry after extraction of dithiocarbamate complexes into freon. *Anal Chim Acta* 144:183-188.
- Dave G, Nilsson E. 1994. Sediment toxicity in the Kattegat and Skagerrak. *Journal of aquatic Ecosystem Health* 3:193-206.
- De Lafontaine Y, Gagné F, Blaise C, Costan G, Gagnon P, Chan HM. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat Toxicol* 50:51-71.
- DeFoe DL, Ankley GT. 1998. Influence of storage on toxicity of freshwater sediments to benthic macroinvertebrates. *Environ Pollut* 99:123-132.
- DeWitt TH, Ditsworth GR, Swartz RC. 1988. Effects of Natural Sediment Features on the Phoxocephalid Amphipod, *Rhepoxynius abronius*: Implication for Sediment Toxicity Bioassays. *Mar Environ Res* 25:99-124.
- DeWitt TH, Swartz RC, Hansen DJ, McGovern D, Berry WJ. 1996. Bioavailability and chronic toxicity of cadmium in sediment to the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environ Toxicol Chem* 15:2095-2101.
- DeWitt TH, Swartz RC, Lamberson JO. 1989. Measuring the acute toxicity of estuarine sediments. *Environ Toxicol Chem* 8:1035-1048.
- Dinnel P. 1995. Evolution and present status of sea urchin sperm test. *Sov J Mar Biol* 21:344-350.
- Dinnel PA, Pagano GG, Oshida PS. 1988. A sea urchin test system for marine environmental monitoring. *Echinoderm Biology*, Burke RD, Mladenov PV, Lambeet P, Parsley RL (eds), Balkema, Rotterdam, ISBN 90 6191 7557, 611-619.
- Di Toro DM, Mahony JD, Hansen DJ, Scott KJ, Hicks MB, Mayr SM, Redmond MS. 1990. Toxicity of cadmium in sediments : the role of acid volatile sulfide. *Environ Toxicol Chem* 9:1487-1502.
- Di Toro DM, Mahony JD, Hansen DJ, Scott KJ, Carlson AR, Ankley GT. 1992. Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environ Sci Technol* 26:96-101.
- Di Toro DM, Zarba CS, hansen DJ, Berry WJ, Swartz RC, Cowan CE, Pavlou SP, Allen HE, Thomas NA, Paquin PR. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for

nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ Toxicol Chem* 10:1541-1583.

E

- Eertman RHM, Groenink-van Emstede M, Sandde B. 1993. The effects of the polycyclic aromatic hydrocarbons fluoranthene and benzo(a)pyrene on the mussel *Mytilus edulis*, the amphipod *Bathyporeia sarsi* and larva of the oyster, *Crassostrea gigas*. BEON-Efecten, DGW-NIOO, 50p.
- EPA 1994. Methods for Assessing the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Estuarine and Marine Amphipods. 600/R-94/025
- Ettajani H. 1994. Transfert des éléments traces essentiels ou toxiques dans la chaîne trophique marine à mollusque. Thèse, Université de Tours, France, pp 199.
- Ettajani H, Amiard-Triquet C, Amiard JC. 1992. Etude expérimentale du transfert de deux éléments traces (Ag, Cu) dans une chaîne trophique marine : eau-particules (sédiments naturels, microalgue)-mollusques filtreurs (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Wat Air Soil Pollut* 65:215-236.

F

- Fernandes MB, Sicre MA, Boireau A, Tronczynski Y. 1997. Polyaromatic Hydrocarbon (PAH) Distributions in the Seine River and its Estuary. *Mar Pollut Bull* 34:857-867.
- Fichet D, Radenac G, Miramand P. 1998. Experimental studies of impacts of harbour sediments resuspension to marine invertebrates larvae : Bioavailability of Cd, Cu, Pb and Zn and toxicity. *Mar Pollut Bull* 36:509-518.
- Fischer JC, Ouddane B, Douez C, Wartel M. 1990. Sur la spéciation des métaux lourds dans les eaux naturelles. *Oceanis* 16(4):305-311.
- Fisher SW, Chordas SW, Landrum PF. 1999. Lethal and sublethal body residues for PCB intoxication in the oligochaete, *Lumbriculus variegatus*. *Aquat Toxicol* 45:115-126.
- Förstner U. 1987. Sediment-Associated Contaminants – An overview of Scientific Bases for Developing Remedial Options. *Hydrobiologia* 149:221-246.
- Förstner U, Wittmann GTW. 1979. Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag. New-York. pp 475.

G

- Galtsoff PS. 1964. The American oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *U S Fish and Wildlife Service, Fishery Bulletin* 64, 480p.
- Garrigues P, Budzinski H, Manitz MP, Wise SA. 1995. Pyrolytic and Petrogenic Inputs in recent Sediments: A definite signature through Phenanthrene and Chrysene Compound Distribution. *Pol Arom Comp* 7:275-284.
- Geffard A. 2001. Réponses du biota à la contamination polymétallique d'un milieu estuarien, la Gironde, Fr : Exposition, Imprégnation, Induction d'une protéine de détoxification, la métallothionéine, impact au niveau individuel et populationnel. Thèse. Université de Nantes, Faculté de Pharmacie, Nantes, France, 251 pp.
- Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard JC, Mouneyrac C. 2001. Temporal variations of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of oysters (*Crassostrea gigas*) from a clean and a metal-rich site. *Biomarkers* 6(2):91-107.

- Giere O. 1993. Meibenthologie (The microscopic fauna in aquatic sediment). Springer Verlag, Berlin, 238p.
- Giesy JP, Graney RL, Newsted JL, Rosiu CJ, Benda A. 1988. Comparison of three sediment bioassays methods using Detroit river Sediment. *Environ Toxicol Chem* 7:483-498.

H

- Hagopian-Schlekat T, Chandler GT, Shaw TJ. 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Mar Environ Res* 51:247-264.
- Hansen DJ, Berry WJ, Mahony JD, Boothman WS, DiToro DM, Robson DL, Ankley DGT, Ma D, Yan Q, Pesh CE. 1996. Predicting the toxicity of metal-contaminated field sediments using interstitial concentrations of metals and acid-volatile sulfide normalizations. *Environ Toxicol Chem* 15:2080-2094.
- Harvey EB. 1940. KCl method. *Biol Bull mar biol Lab Woods Hole* 79:363.
- Harkey GA, Hoof PL, Landrum PF. 1995. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons from a historically contaminated sediment core. *Environ Toxicol Chem* 14:1551-1560.
- Harries JE, Sheahan DA, Jobling S, Matthiessen P, Neall P, Routledge EJ, Rycroft R, Sumpter JP, Tylor T. 1996. A survey of oestrogenic activity in United Kingdom inland waters *Environ Toxicol Chem* 15:1993-2002.
- Hatch A, Burton GA Jr. 1998. Effects of photoinduced toxicity of fluoranthene on amphibian embryos and larvae. *Environ Toxicol Chem* 17(9):1777-1785.
- Haynes D, Johnson JE. 2000. Organochlorine, heavy Metal and Polyaromatic Hydrocarbon Pollutant Concentrations in the Great Barrier Reef (Australia) Environment: a Review. *Mar Pollut Bull* 41:267-278.
- Helm MM., Millican PF, 1977. Experiments in the hatchery rearing of Pacific oyster larvae (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Aquaculture* 11:1-12.
- His E, Robert R. 1982. Le danger des traitements par le sulfate de cuivre en zone conchylicole : toxicité vis-à-vis des œufs et des jeunes larves de *C. gigas*. *Rev Trav Inst Pêches Marit* 42 (2):117-125.
- His E, Seaman M. 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). *Cons int Explor Mer, Marine Environmental Quality Committee*, CM 1993 / E:22, 8p.
- His E, Beiras R, Seaman MNL. 1999a. The assessment of marine pollution – Bioassays with bivalve embryos and larvae. *Advances in marine Biology*. 37:1-178.
- His E, Budzinski H, Geffard O, Beiras R. 1997a. Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *C R Acad Sci Paris, Sciences de la vie* 320:797-803.
- His E, Heyvang I, Geffard O, de Montaudouin X. 1999b. A comparison between oyster (*Crassostrea gigas*) and sea urchin (*Paracentrotus lividus*) larval bioassays for toxicological studies. *Water Res* 33:1706-1718.
- His E, Maurer D, Robert R. 1983. Estimation de la teneur en acétate de tributyle-étain dans l'eau de mer par une méthode biologique. *J moll Stud* 12A:60-68.
- His E, Robert R, Dinet A. 1989. Combined effects of temperature and salinity on fed and starved larvae of the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* and the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *Mar Biol* 100:455-463.
- His E, Seaman MNL, Beiras R. 1997b. A simplification of the bivalve embryogenesis larval development bioassay method for water quality assessment. *Wat Res* 31:351-355.
- Holland DL, Hannant PJ. 1973. Addendum to a micro-analytical scheme for the biological analysis of marine invertebrate larvae. *J Mar Biol Ass U.K.* 53:833-838.

- Hwang H, Fisher SW, Landrum PF. Identifying body residues of HCBP associated with 10-d mortality and partial life cycle effects in the midge, *Chironomus riparius*. *Aquat Tox* 52:251-267.
- Hyne RV, Everett DA. 1998. application of a benthic euryhaline amphipod, *Corophium sp.*, as a sediment toxicity testing organism for both freshwater and estuarine systems. *Arch Environ Contam Toxicol* 34:26-33.

I

- Ingersoll CG, Macdonald DD, Wang N, Crane JL, Field LJ, Haverland PS, Kemble NE, Lindskoog RA, Severn C, Smorong DE. 2000. Prediction of sediment toxicity using consensus-based freshwater sediment quality guidelines. United States Geological Survey (USGS) final report for the U.S. Environmental Protection Agency (USEPA), Great lakes National Program Office (GLNPO).
- ISO. 1998. Qualité de l'eau – Essai d'inhibition de la croissance des algues marines avec *Skeletonema costatum* et *Phaedactylum tricorutum*. International Standards Organisation, Standard NF EN ISO10253: T90-311, 8p.

J

- Johnson BT, Long ER. 1998. Rapid toxicity assessment of sediments from estuarine ecosystems: a new tandem in vitro testing approach. *Environ Toxicol Chem* 17(6):1099-1106.

K

- Karickhoff SW. 1984. Organic pollutant sorption in aquatic systems. *Journal of Hydraulic Engineering* 10:255-264.
- Karickhoff SW, Brown DS, Scott TA. 1979. Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Wat Res* 13:241-248.
- Karouna-Renier NK, Zehr JP. 1999. Ecological implications of molecular biomarkers: assaying sub-lethal stress in the midge *Chironomus tentans* using heat shock protein 70 (HSP-70) expression. *Hydrobiologia* 401:255-264.
- Kemp PF, Swartz RC. 1986. Acute toxicity of interstitial and particle-bound cadmium to a marine infaunal amphipod. *Mar Environ Res* 26:135-153.
- Keith LH, Teillard WA. 1979. Priority pollutants. A perspective view. *Environ Sci Technol* 13:416-423.
- Kersten M, Förstner U. 1987. Cadmium association in freshwater and marine sediments. In *Cadmium in the Aquatic Environment*, JO Nriagu and JB Sprague, Eds., (New York: Wiley).
- Kersten M, Förstner U. 1989. Speciation of trace elements in sediments. In Batley GE (ed). *Trace Metal Speciation Analytical Methods and Problems*. CRC Press, Boca Raton. 246-309.
- Klößner K, Rosenthal H, Willführ J. 1985. Invertebrate bioassays with North Sea water samples. Structural effects on embryos and larvae of serpulids oysters and sea urchins. *Helgoländer Meeresunters* 39:1-19.
- Kohn NP, Word JQ, Niyogi DK, Ross LT, Dillon T, Moore DW. 1994. Acute toxicity of ammonia to four species of marine amphipods. *Mar Env Res* 38:1-15.
- Koroleff F. 1969. Direct determination of ammonia in natural waters as indophenol blue. ICES, C.M. 1969/C: 9 *Hydr Comm*.
- Kravitz MJ, Lamberson JO, Ferraro SP, Swartz RC, Boese BL, Specht DT. 1999. Avoidance response of the estuarine amphipod *Eohaustorius estuarius* to polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated field-collected sediments. *Environ Toxicol Chem* 18:1232-1235.

L

- Lacey R, Watzin MC, Mc Intosh AW. 1999. Sediment organic matter content as a confounding factor in toxicity tests with *Chironomus tentans*. *Environ Toxicol Chem* 18(2):231-236.
- Lagadic L, Caquet T, Amiard JC. 1997. Biomarqueurs en écotoxicologie : principes et définitions. Dans : Lagadic L, Caquet T, Amiard JC, Ramade F (eds). Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux. Masson. Paris. 1-9.
- Lamoureux E, Brownawell BJ. 1999. Chemical and biological availability of sediment-sorbed hydrophobic organic contaminants. *Environ Toxicol Chem* 18(8):1733-1741.
- Lamberson JO, DeWitt TH, Swartz RC. 1992. Assessment to Sediment Toxicity to Marine Benthos. In Burton, GAJ (Eds). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis, Chelsea, MI, USA. 183-210.
- Lamy Environnement. 1996. Eaux marines – Pollutions par immersion, Section II : Dispositions prises sur le plan national, Sous Section II : Normes de rejets.– 53062 – L'eau - © Lamy S.A. – Décembre 1996.
- Landrum PF. 1988. Toxicokinetics of organic xenobiotics in the amphipods *Pontoporeia hoyi*: role of physiological and environmental variables. *Aquat Toxicol* 12:245-271.
- Landrum PF, Nihart SR, Eadie BJ, Herche LR. 1987. Reduction in Bioavailability of Organic Contaminants to the Amphipod *Pontoporeia hoyi* by Dissolved Organic Matter of Sediment Interstitial waters. *Environ Toxicol Chem* 6:11-20.
- Landrum PF, Robbins JA. 1990. Bioavailability of sediment-associated contaminants to benthic invertebrates. In Sediments : chemistry and toxicity of in-place pollutants. Eds Baudo R, Giesy JP, Muntau H. Lewis publishers, Michigan. 8:237-263.
- Larrain A, Soto E, Bayschmith E. 1998. Assessment of sediment toxicity in San Vicente Bay, Central Chile, using the amphipod *Amplesima raucana*. *Bull Environ Toxicol Chem* 61:363-369.
- Lau SSS, Chu LM. 1999. Contamination release from sediment in a coastal wetland. *Wat Res* 33(4):909-918.
- Law RJ, Dawes VJ, Woohead RJ, Matthiessen P. 1997. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH) in Seawater around England and Wales. *Mar Pollut Bull* 34:306-322.
- Lawrence G. 1999. EC20 determinations for toxicity tests in aquatic risk assessment. *SETAC Europe News* 10:15-16.
- Lee GF, Jones RA. 1982. Discussion of article. Dredged material evaluations : correlations between chemical and biological evaluation procedures. *Journal Wat Contr Pollut Fed* 54:406-407.
- Lee Ferguson P, Chandler GT. 1998. A laboratory and field comparison of sediment polycyclic aromatic hydrocarbon bioaccumulation by the cosmopolita, estuarine polychaete *Streblospio benedicti* (Webster). *Mar Environ Res* 45(4-5):387-401.
- Leppänen MT, Kukkonen JVK. 2000. Effect of sediment-chemical contact time on availability of sediment-associated pyrene and benzo(a)pyrene to oligochaete worms and semi-permeable membrane devices. *Aquat Toxicol* 49:227-241.
- Lettelier M. 1998. Extraction assistée par micro-ondes de contaminants organiques dans les matrices environnementales. Thèse, Université de Bordeaux I, France, pp 296.
- Lillie FR. 1921. Studies on fertilization X. The effects of copper salts on the fertilization reaction in *Arbacia* and a comparison of mercury effects. *Biol Bull* 41:125-143.
- Long ER. 2000. Degraded sediment quality in US estuaries : A review of magnitude and ecological implications. *Ecol Appl* 10(2):338-350.
- Long ER, Morgan LG. 1990. Potential for biological effects of sediment-sorbed contaminants tested in the national status and trends program. NOAA/TM/NOS/OMA-52. National Oceanic and Atmospheric Administration, Springfield, USA, 232p.
- Long ER, Wilson CJ. 1997. On the identification of toxic hot spots using measures of the sediment quality triad. *Environ Toxicol Chem* 34(6):373-374.

- Long ER, Buchman MF, Bay SM, Bretler DJ, Chapman PM, Hose JE, Lissner AL, Scott J, Wolte DA. 1990. Comparative evaluation of five toxicity tests with sediment from San Francisco Bay and Tomales Bay, California. *Environ Toxicol Chem* 9:1193-1214.
- Long ER, Field LJ, MacDonald DD. 1998. Predicting toxicity in marine sediments with numerical sediment quality guidelines. *Environ Toxicol Chem* 17(4):714-727.
- Long ER, MacDonald DD, Severn CG, Hong CB. 2000. Classifying probabilities of acute toxicity in marine sediments with empirically derived sediment quality guidelines. *Environ Toxicol Chem* 19(10):2598-2601.
- Long ER, MacDonald DD, Smith SL, Calder FD. 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environ Management* 19:81-97.
- Long ER, Roberston A, Wolfe DA, Hameedi J, Sloane GM. 1996. Estimates of the spatial extent of sediment toxicity in major U. S. estuaries. *Environ Sci Technol* 30:3585-3592.
- Loosanoff VL, Davis HC. 1963. Rearing of bivalve molluscs. *Adv mar Biol* 1:1-136.
- Lourens JM, Vonck AP, Guchte CV, Hartnack J, Stronkhorst J. 1995. Sediment toxicity testing of lightly contaminated dredged material in The Netherlands. *J Aquat Ecosyst Health* 4:271-275.
- Luoma SN. 1983. Bioavailability of Trace Metals to Aquatic Organisms – A Review. *Sci Tot Environ* 28:1-22.
- Luoma SN. 1995. Prediction of metal toxicity in nature from bioassays : limitations and research needs. In : Tessier A, Turner DR (eds). *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, vol. 3. John Wiley & Sons, Chichester. 609-646.
- Luoma SN, Ho KT. 1993. Appropriate uses of marine and estuarine sediment bioassays. In *Handbook of Ecotoxicology* 1:193-226, P Calows (ed.), Blackwell, Oxford.

M

- MacDonald DD, Car RS, Calder FD, Long ER, Ingersoll CG. 1996. Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology* 5:253-278.
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berge TA. 2000. Development and Evaluation of Consensus-Based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Arch Environ Contam Toxicol* 39: 20-31.
- Magnusson K, Ekelund R, Dave G, Granmo A, Forlin L, Wennberg L, Samuelsson MO, Berggren M, Broström-Lunden E. 1996. Contamination and correlation with toxicity of sediment samples from the Skagerrak and Kattegat. *J Sea Res* 35:223-234.
- Mahony JD, Di Toro D, Gonzalez AM, Curto M, Dilg M, De Ross LD, Sparrow LA. 1996. Partitioning of metals to sediment organic carbon. *Environ Toxicol Chem* 15:2187-2197.
- Malueg KW, Schuytema GS, Krawczyk DF. 1986. Effects of sample storage on a copper-spiked freshwater sediment. *Environ Toxicol Chem* 5:245-253.
- Martin M, Osborn KE, Billig P, Glickstein N. 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar Pollut Bull* 12(9):305-308.
- Mason AZ, Jenkins KD. 1995. Metal detoxication in aquatic organisms. In *Metal speciation and bioavailability in aquatic systems*. Eds Tessier A, Turner DR, Vol 3. Wiley & Sons, Chichester, pp. 469-608.
- Matthiessen P, Bifield S, Jarrett F, Kirby MF, Law RJ, McMinn WR, Sheahan DA, Thain JE, Whale GF. 1998. An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, UK by means of bioassays. *Mar Environ Res* 45(1):1-15.
- May WE. 1980. The solubility behaviour of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous systems. *Advances in chemistry series* 285:143-192.
- McCauley DJ, DeGraeve GM, Linton TK. 2000. Sediment quality guidelines and assessment : overview and research needs. *Environmental Science & Policy* 3:133-144.

- McCarty LS, Mackay D. 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Environ Sci Technol* 27:1719-1729.
- McElroy AE, Farrington JW, Teal JM. 1989. Bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. In *Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment*. Varanasi U, ed. CRC, Boca Raton, FL, USA, pp 1-40.
- McGee BL, Fisher DJ, Yonkos LT, Ziegler GP, Turley S. 1999. Assessment of sediment contamination, acute toxicity, and population viability of the estuarine amphipod *Leptocheirus plumulosus* in Baltimore harbour, Maryland, USA. *Environ Toxicol Chem* 18(10):2151-2160.
- McGroddy SE, Farrington JW. 1995. Sediment porewater partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons in three cores from Boston harbor, Massachusetts. *Environ Sci Technol* 29:1542-1550.
- McPherson CA, Chapman PM. 2000. Copper effects on potential sediment test organisms: the importance of appropriate sensitivity. *Mar Pollut Bull* 40(8):656-665.
- Meador JP, Ross BD, Dinnel PA, Piquelle SJ. 1990. An analysis of the relationship between a sand-dollar embryo elutriate assay and sediment contaminants from stations in an urban embayment of Puget Sound, Washington. *Mar Environ Res* 30:251-272.
- Melzian BD. 1990. Toxicity assessment of dredged materials : acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. In : *Proceedings of the International Seminar on Environmental Aspects of Dredging Activities*. (C. Alzieu & B. Gallenne, eds.), 49-64, Goubault Imprimeur, s.a. , Nantes, France.
- Meregalli G, Vermeulen AC, Wakabayashi M. 2000. The use of chironomid deformation in an *in situ* test for sediment toxicity. *Ecotoxicol Environ Safety* 47(3):231-239.
- Michel P. 1993a. L'arsenic en milieu marin. Biogéochimie et écotoxicologie. Repères Océan, IFREMER, 4, 62p.
- Michel X. 1993b. Contribution à l'étude des interactions entre les contaminants chimiques organiques et les organismes marins : bases moléculaires et applications à la biosurveillance de l'environnement côtier. Thèse, Université de Bordeaux I, Bordeaux, France.
- Michel X, Beasse C, Narbonne JF. 1995. In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol* 28:215-222.
- Millemann RE, Birge WJ, Black JA, Cushman RM, Daniels KL, Franco PL, Giddings JM, McCarthy JF, Stewart A. 1984. Comparative acute toxicity to organisms of components of coal-derived synthetic fuels. *Transactions of the American Fisheries Society*. 113:74-85.
- Miller BS, Pine DJ, Redshaw CJ. 2000. An assessment of the contamination and toxicity of marine sediments in the Holy Loch, Scotland. *Mar Pollut Bull* 40:22-34.
- Moore DW, Dillon TM, Gamble EW. 1995. Long-term storage of sediments : implications for sediment toxicity testing. *Environ Pollut* 89(2):147-154.
- Morisson GMP, 1989. Trace element speciation and its relationship to bioavailability and toxicity in natural waters. In : Batley GE (ed). *Trace element speciation : analytical methods and problems*. CRC Press. Boca Raton. 25-41.
- Moriarty F. 1990. *Ecotoxicology. The study of pollutants in Ecosystems*. Academic Press, London, 289p.
- Mouneyrac C, Amiard JC, Amiard-Triquet C. 1998. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Mar Ecol Prog Ser* 162:125-135.
- Munoz MJ, Tarazona JV. 1993. Synergetic effect of two- and four-component combinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons: Phenanthrene, Anthracene, Naphtalene and Acenaphthene on *Daphnia magna*. *Bull Environ Contam Toxicol* 50:363-368.
- Murdoch MH, Chapman PM, Johns M, Norman MD, Quinto VM. 1997. Spiking sediment with organochlorine for toxicity testing. *Environ Toxicol Chem* 16 (7):1504-1509.

N

- Nacci DE, Jackim E, Walsh R. 1986. Comparative evaluation of three marine toxicity tests : sea urchin embryo growth test, sea urchin sperm cell toxicity test and Microtox. *Environ Toxicol Chem* 5:521-526.
- Neff JM. 1979. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment. Sources, fates and biological effects. Applied science publishers Ltd. Ripples road, Barking, Essex, England, 262pp.
- Newsted JL, Giesy JP. 1987. Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*, Strauss (Cladocera, Crustacea). *Environ Toxicol Chem* 6:445-461.
- Nipper MG, Greenstein DL, Bay SM. 1989. Short and long-term sediment toxicity test methods with the amphipod *Grandidierella japonica*. *Environ Toxicol Chem* 8:1191-1200.

O

- Okubo K, Okubo T. 1962. Study on the bio-assay method for the evaluation of water pollution. II Use of the fertilized eggs of sea urchin and bivalves. *Bull Tokai reg Fish Res Lab* 32:131-140.

P

- Pavicic J, Smodis Bskreblin BM, Kregar I, Stegnar P. 1994. Embryo-larval tolerance of *Mytilus galloprovincialis*, exposed to elevated seawater metal concentrations. II .Stage-specific fluctuations in sensitivity toward Zn and Cd and their bioaccumulation into veliger larvae. *Comp Biochem Physiol* 109(1):37-46.
- Pearlman RS, Yalkowsky SH, Banerjee S. 1984. Water solubility of polynuclear aromatic and heteroaromatic compounds. *J Phys Chem Ref Data* 13(2):555-562.
- Pedersen SN, Lumdebye AK, Depledge MH. 1997. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals. *Aquat Toxicol* 37:183-200.
- Pellegrini D, Ausili A, Onorati F, Ciuffa G, Gabellini M, Bigongiari N, De Ranieri S. 1999. Characterization of harbour and coastal sediments: specific destinations of dredged material. *Aquatic Ecosystem Health & Management* 2:455-464.
- Pelletier MC, Burgess RM, Cantwell MG, Serbst JR, Ho KT, Ryba SA. 2000. Importance of maternal transfer of the photoreactive polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene from benthic adult bivalves to their pelagic larvae. *Environ Toxicol Chem* 19(11):2691-2698.
- Pelletier MC, Burgess RM, Ho KT, Kuhn A, McKinney RA, Ryba A. 1997. Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environ Toxicol Chem* 16:2190-2199.
- Pereira AMM, Soares AMVM, Gonçalves F, Ribeiro R. 2000. Water-column, sediment, and *in situ* chronic bioassays with cladocerans. *Ecotoxicol Environ Safety* 47(1):27-39.
- Pereira AM, Soares AMVM, Gonçalves F, Ribeiro R. 1999. Test chambers and tests procedures for *in situ* toxicity testing with zooplankton. *Environ Toxicol Chem* 18:1956-1964.
- Peterson GS, Ankley GT, Leonard EN. 1996. Effects of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environ Toxicol Chem* 15:2147-2155.
- Phelps HL, Warner KA. 1990. Estuarine sediment bioassay with oyster pediveliger larvae (*Crassostrea gigas*). *Bull Environ Contam Toxicol* 44(2):197-204.
- Porte C, Albaigés J. 1993. Bioaccumulation patterns of hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in bivalves, crustaceans and fishes. *Arch Environ Contam Toxicol* 26:273-281.

- Power EA, Chapman PM. 1992. Assessing sediment quality. In Burton, GAJ (Eds). *Sediment Toxicity Assessment*, Lewis, Chelsea, MI, USA. 1-18.
- Prytherch HF. 1924. Experiments in the artificial propagation of oysters. *Rep. U. S. Com. Fish.*, 1923 (1924), XI, 14p.

Q

- Quiniou F, Judas A, Le Squer-Andre E. 1997. Toxicité potentielle des eaux et des sédiments des principaux estuaires de la rade de Brest évaluée par deux bio-essais. *Ann Inst Océanogr Paris*. 73 (1):35-48.

R

- Radenac G, Fichet D, Miramand P. 2001. Bioaccumulation and toxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo. *Mar Environ Res* 51:151-166.
- Ramade F. 1998. Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau. Ediscience Paris, FRA. 785p.
- Raoux CY. 1991. Modélisation du mécanisme de contamination par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) des sédiments marins côtiers de Méditerranée : conséquences sur la biodisponibilité des HAP dans le milieu marin. Thèse, Université de Bordeaux I, Bordeaux, France, 136pp.
- Raoux CY, Garrigues P. 1993. Mechanism model of polycyclic aromatic hydrocarbons contamination of marine coastal sediments from the Mediterranean sea. In Proceedings of the 13th international symposium on polynuclear aromatic hydrocarbons. Garrigues P, Lamotte M, eds. Gordon and Breach publishers. pp 443-450.
- Rasmussen AD, Andersen O. 1999. Cadmium transfer between water and sediments studied in laboratory experiments and with a computer model. *Bull Environ Contam Toxicol* 63:720-727.
- Ringwood AH. 1990. The relative sensitivities of different life stages of *Isognomon californicum* to cadmium toxicity. *Arch Contam Toxicol* 19:338-340.
- Ringwood AH. 1992. Comparative sensitivity of gametes and early development stages of a sea urchin (*Echinometra mathaei*) and a bivalve species (*Isognomon californicum*) during metal exposures. *Arch Environm Contam Toxicol* 22:288-295.
- Ringwood AH. 1993. Age-specific differences in cadmium sensitivity and bioaccumulation in bivalve molluscs. *Mar Environ Res* 35:35-39.
- Ringwood AH, Brouwer M. 1993. Expression of constitutive and metal-inducible metallothioneine in oyster embryos (*Crassostrea virginica*). *Comp Biochem Physiol* 106:523-529.
- Ringwood AH, Brouwer M. 1995. Patterns of metalloprotein expression in oyster embryos. *Mar Environ Res* 39:101-105.
- Ringwood AH, Connors DE, Keppler CJ. 1999. Cellular responses of oysters, *Crassostrea virginica*, to metal-contaminated sediments. *Mar Environ Res* 48:427-438.
- Ringwood AH, de Lorenzo ME, Ross PE, Holland AF. 1997. Interpretation of Microtox solid-phase toxicity tests : the effects of sediment composition. *Environ Toxicol Chem* 6:1135-1141.
- RNO. 1984. Bulletin du RNO N°20. IFREMER. 147p.
- Robert R, His E, Maurer D. 1986. Toxicité d'un désherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et sur deux algues fourrages, *Isochrysis aff-galbana* et *Chaetoceros calcitrans*. *Haliotis* 15:319-325.
- Roesijadi G, Hansen KM, Fuentes ME. 1995. Cadmium-induced expression of metallothionein and suppression of RNA to DNA ratios during molluscan development. *Toxicol Appl Pharmacol* 133:130-138

- Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1996. Cadmium-induced metallothionein expression during embryonic and early larval development of the mollusc *Crassostrea virginica*. *Toxicol Appl Pharmacol* 140:356-363.
- Roesijadi G, Hansen KM, Unger ME. 1997. Metallothionein mRNA accumulation in early developmental stages of *Crassostrea virginica* following pre-exposure and challenge with cadmium. *Aquat Toxicol* 39:185-194.
- Ross P, Munawar M. 1994. Development of regulations for managing contaminated sediments in Europe and North America. *Journal of Aquatic Health* 3:221-225.
- Rybicka EH, Calmano W, Breeger A. 1995. Heavy metals sorption/desorption on competing clay minerals ; an experimental study. *Applied Clay Science* 9:369-381.

S

- Sasson-Brickson G, Burton GA Jr. 1991. *In situ* and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem* 10:201-207.
- Saulnier I, Mucci A. 2000. Trace metal remobilization the resuspension of estuarine sediments : Saguenay Fjord, Canada. *Applied Geochemistry*. 15: 203-222.
- Schlekat CE, McGee BL, Reinhard E. 1992. Testing sediment toxicity in Chesapeake Bay with the amphipod *Leptocheirus plumulosus* : An evaluation. *Environ Toxicol Chem* 11:225-236.
- Schulz R, Liess M. 1999. Validity and ecological relevance of an active *in situ* bioassay using *Gammarus pulex* and *Limnephilus lunatus*.
- Schuytema GS, Nebeker AV, Griffis WL, Miller CE. 1989. Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin. *Environ Toxicol Chem* 8:883-891.
- Sibley PK, Ankley GT, Cotter AM, Leonard EN. 1996. Predicting chronic toxicity of sediments spiked with zinc : an evaluation of the acid-volatile sulfide model using life-cycle test with the midge, *Chironomus tentans*. *Environ Toxicol Chem* 15:2102-2112.
- Sicre MA, Marty JC, Saliot A, Aparicio X, Grimalt J, Albaiges J. 1987. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in different sized aerosols over the Mediterranean sea : occurrence and origin. *Atmos environ* 21:2247-2259.
- Slotten DG, Reuter JE. 1995. Heavy metals in intact and resuspended sediments of a California reservoir, with emphasis on potential bioavailability of copper and zinc. *Mar Freshwater Res* 46 :257-265.
- Soclo H. 1986. Etude de la distribution des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les sédiments marins récents, identification des sources. Thèse. Université de Bordeaux I, Bordeaux, France, 158 pp.
- Stebbing ARD. 1985. Bioassay. in *The effects of stress and pollution on marine animals*, BL Bayne, DA Brown, K Burns, DR Dixon, A Ivanovici, DR Livingstone, DM Lowe, MN Moore, ARD Stebbing and J Widdows eds, pp 133-140, Praeger Publishers, New York.
- Stebbing ARD, Akesson B, Calabrese A, Gentile JH, Jensen A, Lloyd R. 1980. The role of bioassays in marine pollution monitoring. *Rapp P-v Réuni Cons int Explor Mer*, 179:322-332.
- Stemmer BL, Burton GA Jr, Leibfritz-Frederick S. 1990. Effect of sediment test variables on selenium toxicity of *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 9:381-389.
- Swartz RC, Cole FA, Schults DW, DeBen WA. 1986. Ecological changes in the Southern California bight near a large sewage outfall benthic conditions in 1980 and 1983. *Mar Ecol Prog Ser* 31:1-13.
- Swartz RC, Deben WA, Cole EA. 1979. A bioassay for the toxicity of sediment to marine macrobenthos. *J Water Pollut Control Fed* 54:944-950.
- Swartz RC, DeBen WA, Sercu KA, Lamberson JO. 1982. Sediment toxicity and distribution of Amphipods in Commencement Bay, Washington, USA *Mar Pollut Bull* 13:359-364.

- Swartz RC, Ditsworth GR, Schults DW, Lamberson JO. 1985. Sediment toxicity to a marine infaunal amphipod: cadmium and its interaction with sewage sludge. *Mar Environ Res* 18:133-153.
- Swartz RC, Kemp PF, Schults DW, Lamberson JO. 1988. Effects of mixtures of sediment contaminants on the marine infaunal amphipod, *Rhepoxynius abronius*. *Environ Toxicol Chem* 7:1013-1020.
- Swartz RC, Kemp PF, Schults DW, Ditsworth GR, Ozretich RJ. 1989. Acute toxicity of sediment from Eagle Harbor, Washington, to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*. *Environ Toxicol Chem* 8:215-222.
- Swartz RC, Schults DW, DeWitt TH, Ditsworth GR, Lamberson JO. 1990. Toxicity of fluoranthene in sediment to marine amphipods: A test of the equilibrium partitioning approach to sediment quality criteria. *Environ Toxicol Chem* 9:1071-1080.
- Swartz RC, Schults DW, Ozretich RJ, Lamberson JO, Cole FA, DeWitt TH, Redmond MS, Ferraro SP. 1995. ΣPAH: A model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected. *Environ Toxicol Chem* 14:1977-1987.
- Swartz RC, Ferraro SP, Lamberson JO, Cole FA, Ozretich RJ, Boese BL, Schults DW, Behrenfeld M, Ankley GT. 1997. Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in marine sediment. *Environ Toxicol Chem* 16(10):2151-2157.

T

- Tagatz ME, Ivey JM. 1981. Effects of fenvalerate on field- and laboratory-developed estuarine benthic communities. *Bull Environ Contam Toxicol* 27(2):256-267.
- Taylor D, 1978. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 5. Copper. Imperial. Chem. Industries. Rapport BL/A/1900, 21p.
- Taylor D, 1981a. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 13. Zinc. Imperial. Chem. Industries. Rapport BL/A/2143, 25p.
- Taylor D, 1981b. A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 2. Cadmium. Imperial. Chem. Industries. Rapport BL/A/2073, 2^{ème} ed, 46p.
- Tessier A, Campbell PGC. 1987. Partitioning of trace metals in sediments: relationships with bioavailability. *Hydrobiologia* 149:43-52.
- Tessier A, Campbell PGC, Bisson M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal Chem* 51:844-851.
- Tessier A, Carignan R, Belzile N. 1994. Processes occurring at the sediment-water interface : emphasis on trace metals. In Chemical and biological regulation of aquatic systems. Edited by J. Buffle and R. De Vitre. Lewis Publishers, Boca Raton, Fla. Pp. 139-175.
- Tessier A, Couillard Y, Campbell PGC, Auclair JC. 1993. Modeling Cd partitioning in oxic lake sediments and Cd concentrations in the freshwater bivalve *Anodonta Grandis*. *Limnol Oceanogr* 38:1-17.
- Thain JE. 1992. Use of oyster *Crassostrea gigas* embryo bioassay on water and sediment elutriate samples from the German Bight. *Mar Ecol Prog Ser* 91:211-213.
- Thain JE, Matthiessen P, Bifield S. 1990. The toxicity of dichlorvos to some marine organisms. International Council for the Exploration of the Sea, Copenhagen (Denmark) Marine Environmental Quality Committee, CM-1990/E: 18, 15pp.
- Thompson S. 1999. Détermination des composés aromatiques et organochlorés dans l'environnement marin. Thèse. Université de Bordeaux I, Bordeaux, France, 255 pp.
- Thompson B, Anderson B, Hunt J, Taberski K, Philips B. 1999. Relationship between sediment contamination and toxicity in San Francisco Bay. *Mar Environ Res* 48:285-310.
- Thompson JAJ, Cosson RP. 1984. An improved electrochemical model for the quantification of metallothioneins in marine organisms. *Mar Environ Res* 11:137-152.

- Thompson EA, Luoma SN, Cain DJ, Johansson C. 1980. The effects of sample storage on the extraction of Cu, Zn, Fe, Mn and organic material from oxidized estuarine sediments. *Water, Air and Soil Pollution*. 14:215-233.
- Truhaut R. 1977. Ecotoxicology : objectives, principles, and perspectives. *Ecotox Envir Saf* 1:151-173.

V

- Van den Berg GA, Meijers GGA, Van Der Heijdt LM, Zwolsman JG. 2001. Dredging-related mobilisation of trace metals: a case study in the Netherlands. *Wat Res* 35(8):1979-1986.
- Van der Hurk P. 1994. Effect of natural sediment properties on test results in bioassays with oyster larvae (*Crassostrea gigas*) on sediment elutriates. *S Aquat Ecosys Health* 3:185-191.
- Van der Hurk P, Eertman RHM, Sronkhorst J. 1997. Toxicity of Harbour Canal sediments before dredging and after off-shore disposal. *Mar Pollut Bull* 34:244-249.
- Van Sprang PA, Janssen CR. 1997. Identification and confirmation of ammonia toxicity in contaminated sediments using a modified toxicity identification evaluation approach. *Environ Toxicol Chem* 16(12):2501-2507.
- Vaschenko MA, Zhadan PM. 1993. Ecological assessment of marine environment using two sea urchin tests : disturbance of reproduction and sediment embryotoxicity. *The Science of total Environment Supplement 1993*, Amsterdam Elsevier Science, 1235-1245.
- Verrhiest G, Clément B, Blake G. 2001. Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates. *Ecotoxicology* 10(6) (sous presse).
- Viarengo A, Burlando B, Dondero F, Marro A, Fabbri R. 1999. Metallothionein as a tool in biomonitoring programmes. *Biomarkers* 4(6):455-466.
- Viarengo A, Moore MN, Pertica M, Mancelli G, Zanicchi G, Pipe RK. 1985. Detoxication of copper in the cells of the digestive gland of mussel : the role of lysosomes and thioneins. *Sci Tot Environ* 44: 135-145.

W

- Walne PR. 1970. Present problems in the culture of the larvae of *Ostrea edulis*. *Helgoländer Wissenschaftliche Meeresuntersuchungen* 20:514-525.
- Warnau M, Iacarino M, de Biase A, Temara A, Jangoux M, Dubois P, Pagano G. 1996. spermioxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *Paracentrotus lividus*. *Environ Toxicol Chem* 15:1931-1936.
- Watling HR. 1981. Effects of metals on the development of oyster embryos. *South African Journal of Sciences* 77:134-135.
- Wen X, Allen HE. 1999. Mobilization of heavy metals from Le An River sediment. *Sci Total Environ* 227:101-108.
- Wiederholm T, Dave G. 1989. Toxicity of metal-polluted sediments to *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*. *Hydrobiologia* 176/177:411-417.
- Weiner R, Walch M, Labare MP, Bonar DB, Colwell RR. 1989. Effect of biofilms of the marine bacterium *Alteromonas colwelliana* (LST) on set of the oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973) and *C. virginica* (Gmelin, 1971). *J Shellfish Res* 8:117-123.
- Williams LG, Chapman PM, Ginn TC. 1986. A comparative evaluation of marine sediment toxicity using bacterial luminescence, oyster embryo and amphipod sediment bioassays. *Mar Environ Res* 19:225-249.
- Wirth EF, Fulton MH, Chandler GT, Key PB, Scott GI. 1998. Toxicity of sediment associated PAHs to estuarine crustaceans, *Palaemonetes pugio* and *Amphiascus tenuiremis*. *Bull Environm Contam Toxicol* 61:637-644.

- Wirth EF, Scott GI, Fulton MH, Van Dolah RF, Maier PP, Hadley N, Daugomah JW, Key PB. 1996. *In situ* monitoring of dredged material spoil sites using oyster *Crassostrea virginica*. *Arch Environ Contam Toxicol* 30:340-348.
- Wolfe DA, Long ER, Thursby GB. 1996. Sediment toxicity in the Hudson-Raritan estuary : Distribution and correlations with chemical contamination. *Estuaries* 19(4):901-912.
- Wollast R. 1989. Physico-chemical models of marine sediment. Proceeding of the international seminar on the environmental aspects of dredging activities, Nantes (France), 191-204.
- Wong CKC, Yeung HY, Cheung RYH, Yung KKL, Wong MH. 2000. Ecotoxicological assessment of persistent organic and heavy metal contamination in Hong Kong coastal sediments. *Arch Environ Contam Toxicol* 38(4):486-493.
- Woodhead RJ, Law R, Matthiessen J. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments around England and Wales, and their possible biological significance. *Mar Pollut Bull* 38(9):773-790.

Z

- Zhadan PM, Vashchenko MA, Medvedeva VV, Gareyeva RV. 1992. The effect of environmental pollution, hydrocarbons and heavy metals on reproduction of sea urchins and bivalves. In Oceanic and atmospheric controls of life in the Pacific Ocean. Eds Ilyichev VI, Anikiev VV. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 267-286.
- Zhuang Y, Allen HE, Fu G. 1994. Effect of aeration of sediment on cadmium binding. *Environ Toxicol Chem* 13:717-724.
- Ziehl TA, Schmitt A. 2000. Sediment quality assessment of flowing waters in South-West Germany using acute and chronic bioassays. *Aquatic Ecosystem Health and Management* 3:347-357.
- Zoumis T, Schmidt A, Grigorova L, Calmano W. 2001. Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. *The Science of the Total Environment* 266:195-202.

ANNEXE

ANNEXE 1

Conditions expérimentales des analyses par CG-SM.

Détecteur spectromètre de masse Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) (MSD) 5972

- Ionisation sous impact électronique : 70eV
- Tension : 2000 V

Chromatographe en phase gazeuse Hewlett Packard (Palo Alto, CA, USA) 5890 série II

Injecteur à mode sans partage :

- Temps de purge : 1 min
- Débit de purge : 60ml/min
- Gaz vecteur : helium

Colonne :

- PTE-5 (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
 - Epaisseur de la phase stationnaire : 0.25 μ m
 - Diamètre intérieur : 0.25 mm
 - Longueur : 60 m

Températures :

- Injecteur : 270°C
- Interface : 290°C
- Four : de 50°C (2 min) à 290°C (15 min) à 5°C/min

Débit gaz vecteur : 1 ml/min

Fréquence d'acquisition : 1.23 scan/s (mode sélectif)

Temps d'accumulation par ion : 40 ms (mode sélectif)

Résumé :

Les sédiments marins et estuariens sont un réservoir pour de nombreux polluants, constituant non seulement une source de contamination pour les organismes aquatiques, mais pouvant également poser un problème de santé publique. La toxicité potentielle de ces sédiments a été déterminée à l'aide de bioessais et d'études sur la biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et métaux contenus dans ces derniers.

En comparant les différents stades de développement testés chez l'huître *Crassostrea gigas* et l'oursin *Paracentrotus lividus*, les embryons et les larves d'huître sont apparus les plus sensibles et les mieux adaptés pour évaluer la qualité des sédiments vis à vis des organismes benthiques (sédiment contact ; test d'embryotoxicité) et pélagiques (élutriat ; tests d'embryotoxicité et de croissance larvaire). Il est apparu que d'un point de vue environnemental, les sédiments devaient être testés à l'état frais.

La biodisponibilité des HAP et des métaux sédimentaires a été abordée via des études de bioaccumulation et, dans le cas d'une contamination métallique aussi via l'induction de métallothionéines (MT) chez les larves de *C. gigas* et de la moule *Mytilus galloprovincialis*. Bioaccumulation et induction de MT se sont révélés plus sensibles, avec des réponses plus précoces, en comparaison des simples bioessais correspondants. Ils permettent, de plus, de faire le lien entre effets au niveau moléculaire (MT), cellulaire (bioaccumulation), individuel (anomalies larvaires et effets sur la croissance) et populationnel (puisque la survie des larves conditionne le recrutement et par suite le maintien de la population).

Une démarche pour l'évaluation de la qualité des sédiments lors d'études de biomonitoring est proposée, l'intérêt des embryons et des larves de bivalves comme outil en écotoxicologie marine est confirmé, notamment par leur utilisation lors d'un test embryo-larvaire *in situ*.

Mots-Clés : Sédiment contact, élutriat, HAP, métaux, bioessais en laboratoire et *in situ*, *Crassostrea gigas*, *Paracentrotus lividus*, *Mytilus galloprovincialis*, biodisponibilité, bioaccumulation, métallothionéine, chaîne trophique, biomonitoring

Summary :

Marine and estuarine sediments concentrate various pollutants. Thus, they can constitute a risk of contamination for aquatic organisms, and cause a public health problem. The potential toxicity of various sediments was studied by different bioassays and by assessing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and metals they contained.

Among the various stages of development investigated in oysters, *Crassostrea gigas*, and in sea urchins, *Paracentrotus lividus*, oyster embryos and larvae proved to be the most sensitive and useful tool for the evaluation of sediment effects on benthic organisms (whole sediment treatment ; embryotoxicity test) as well as on pelagic species (elutriate treatment; embryotoxicity and larval growth tests). Environmental assessments should be conducted with fresh sediments.

Bioavailability of PAHs and metals from sedimentary origin were assessed by studying contaminant bioaccumulation and metallothionein induction (in the case of sediments with metal contamination) in *C. gigas* and mussel, *Mytilus galloprovincialis* larvae. These tools were found to be more sensitive and giving precocious responses, than simple bioassays, to assess the biological responses towards contaminants. Furthermore they make possible to correlate pollution effects at molecular (metallothionein), cellular (bioaccumulation), individual (larval abnormalities and larval growth) and population levels (since contaminant effects on the reproductive stages impede the population dynamics of species).

These investigations have led us to the propose of a procedure for the evaluation of sediment quality in biomonitoring studies. The sensitivity and advantage of oyster embryos and larvae in marine ecotoxicology were confirmed, by their use *in situ* bioassays.

Keywords : Whole sediment, elutriate, PAHs, metals, laboratory and *in situ* bioassays, *Crassostrea gigas*, *Paracentrotus lividus*, *Mytilus galloprovincialis*, bioavailability, bioaccumulation, metallothioneine, food chain, biomonitoring.