

# Complément au SEQ-Eau : méthode de détermination des seuils de qualité pour les substances génotoxiques

Rapport final

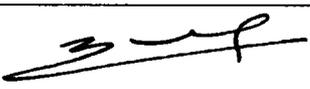
Agence de l'eau Rhin-Meuse

AVRIL 2000

*Michèle BISSON<sup>®</sup>, Roland DUJARDIN<sup>®</sup>, Patrick FLAMMARION<sup>®</sup>,  
Jeanne GARRIC<sup>®</sup>, Marc BABUT<sup>®</sup>, Marie-Hélène LAMY<sup>®</sup>, Jean-Marc  
PORCHER<sup>®</sup>, Éric THYBAUD<sup>®</sup> & Éric VINDIMIAN<sup>®</sup> (responsable  
d'affaire)*

- ❶ *Ineris / Direction des risques chroniques (DRC)*
- ❷ *Ineris / DRC / Unité évaluation des risques écotoxicologiques*
- ❸ *Ineris / DRC / Unité chimie de l'environnement*
- ❹ *Ineris / DRC / Unité toxicologie*
- ❺ *Cemagref / Unité biologie des écosystèmes aquatiques / laboratoire d'écotoxicologie*

Ce document comporte 152 pages

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Éric VINDIMIAN	Michel NOMINÉ	Éric VINDIMIAN
Qualité	Directeur des risques chroniques	Délégué scientifique DRC	Directeur des risques chroniques
Visa			

## **PERSONNES AYANT PARTICIPE A L'ETUDE**

--oOo--

**Patrick BAUDOIN, Michèle BISSON, Laurette CHAUVIRÉ, Roland DUJARDIN,  
Patrick FLAMMARION, Jeanne GARRIC, Marc BABUT, Jacques GIACALONE,  
Marie-Hélène LAMY, Maryse MARLIÈRE, Jean-Marc PORCHER, Agnès SCHORSCH,  
Eric THYBAUD et Eric VINDIMIAN**

# TABLE DES MATIERES

<b>1</b>	<b>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE ET ÉCO-ÉPIDÉMIOLOGIQUE.....</b>	<b>14</b>
1.1	ANALYSE DES TRAVAUX DU RIVM -----	14
1.2	PRISE EN COMPTE DE LA PHOTOTOXICITÉ -----	15
1.3	RECUEIL DES DONNÉES ÉCO-ÉPIDÉMIOLOGIQUES -----	16
1.3.1	<i>Méthodologie de l'interrogation bibliographique.....</i>	16
1.3.2	<i>Interrogation du serveur DIALOG.....</i>	16
1.3.3	<i>Interrogation des bases AQUALINE et CURRENT CONTENTS.....</i>	17
1.3.4	<i>Taux de pertinence des recherches.....</i>	17
1.3.5	<i>Synthèse des résultats.....</i>	17
1.3.6	<i>Définitions des paramètres à recueillir sur les fiches de lecture.....</i>	17
1.4	SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE -----	18
1.4.1	<i>Synthèse globale de l'information disponible par molécule.....</i>	19
1.4.2	<i>Génotoxicité et autres effets biologiques.....</i>	20
1.5	CONCLUSION SUR CETTE PARTIE-----	24
<b>2</b>	<b>PRODUCTION DE DONNÉES ÉCOTOXICOLOGIQUES ET GÉNOTOXICOLOGIQUES.....</b>	<b>26</b>
2.1	ESSAIS D'ÉCOTOXICOLOGIE -----	26
2.1.1	<i>Protocoles d'essais.....</i>	26
2.1.2	<i>Mesure des concentrations d'essai.....</i>	34
2.1.3	<i>Calcul des paramètres d'effet toxique.....</i>	40
2.1.4	<i>Résultats des essais.....</i>	45
2.1.5	<i>Comparaison des résultats des essais chroniques.....</i>	48
2.1.6	<i>Toxicité des mélanges de HAP.....</i>	50
2.2	ESSAIS DE GÉNOTOXICITÉ-----	55
2.2.1	<i>Principe de l'essai d'Ames fluctuations.....</i>	55
2.2.2	<i>Essais préliminaires.....</i>	57
2.2.3	<i>Interprétation des résultats.....</i>	58
2.2.4	<i>Résultats obtenus au laboratoire.....</i>	58
2.3	CONCLUSION SUR LES ESSAIS AU LABORATOIRE -----	59
<b>3</b>	<b>ÉLABORATION D'UNE DÉMARCHE.....</b>	<b>60</b>
3.1	LES PRATIQUES COURANTES-----	60
3.2	CALCUL DES SEUILS DE QUALITÉ DANS L'EAU -----	61
3.2.1	<i>Calcul basé sur la méthode des facteurs de sécurité.....</i>	61
3.2.2	<i>Examen des données disponibles pour les HAP.....</i>	62
3.2.3	<i>Calcul de seuils pour la toxicité chronique.....</i>	62
3.2.4	<i>Calcul des seuils basés sur la toxicité aiguë.....</i>	65
3.2.5	<i>Quels seuils adopter pour les mélanges ?.....</i>	65
3.3	CALCUL DES SEUILS DANS LE CAS DES SÉDIMENTS-----	67
3.3.1	<i>Calcul de seuil séparément pour chaque substance à partir des données bibliographiques.....</i>	68
3.3.2	<i>Calcul d'un seuil sédiment commun à tous les HAP à partir des données bibliographiques sur sédiments (hypothèse narcotique).....</i>	69
3.3.3	<i>Calcul d'un seuil sédiment par équilibre de partage.....</i>	73
3.3.4	<i>Discussion.....</i>	75
3.3.5	<i>Comparaison avec les données du milieu.....</i>	77
3.3.6	<i>Proposition de seuils pour les sédiments.....</i>	78
3.4	CALCUL DES SEUILS DE GÉNOTOXICITÉ -----	80
3.4.1	<i>Approche par comparaison des seuils de toxicité chronique avec les concentrations d'effet avérées.....</i>	80
3.4.2	<i>Approche par la dose génotoxique.....</i>	81
3.4.3	<i>Approche par les facteurs d'équivalents toxiques.....</i>	82
3.4.4	<i>Synthèse des données de génotoxicité.....</i>	83
<b>4</b>	<b>PROPOSITION DE SEUILS DE QUALITÉ POUR 16 HAP.....</b>	<b>85</b>

4.1	SEUILS DE QUALITÉ DANS L'EAU	85
4.2	SEUILS DE QUALITÉ POUR LES SÉDIMENTS	87
<b>CONCLUSION</b>		<b>89</b>
<b>RÉFÉRENCES</b>		<b>91</b>
DOCUMENTS DE SYNTHÈSE		91
4.3	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91
<b>5</b>	<b>ANNEXE : SYNTHÈSE DES DONNÉES PAR SUBSTANCE</b>	<b>118</b>
5.1	BENZO(K)FLUORANTHÈNE	118
5.1.1	Résultats obtenus au laboratoire	118
5.1.2	Données bibliographiques	118
5.1.3	Seuils de qualité existants	119
5.1.4	Seuils calculés par cette étude	119
5.2	BENZO(A)ANTHRACÈNE	120
5.2.1	Résultats obtenus au laboratoire	120
5.2.2	Données bibliographiques	120
5.2.3	Seuils de qualité existants	122
5.2.4	Seuils calculés par cette étude	122
5.3	BENZO(B)FLUORANTHÈNE	122
5.3.1	Résultats obtenus au laboratoire	122
5.3.2	Données bibliographiques	122
5.3.3	Seuils de qualité existants	123
5.3.4	Seuils calculés par cette étude	123
5.4	BENZO(GHI)PÉRYLÈNE	123
5.4.1	Résultats obtenus au laboratoire	123
5.4.2	Données bibliographiques	124
5.4.3	Seuils de qualité existants	125
5.4.4	Seuils calculés par cette étude	125
5.5	BENZO(A)PYRÈNE	125
5.5.1	Résultats obtenus au laboratoire	125
5.5.2	Données bibliographiques	125
5.5.3	Seuils de qualité existants	127
5.5.4	Seuils calculés par cette étude	128
5.6	DIBENZO(A,H)ANTHRACÈNE	128
5.6.1	Résultats obtenus au laboratoire	128
5.6.2	Données bibliographiques	128
5.6.3	Seuils de qualité existants	129
5.6.4	Seuils calculés par cette étude	129
5.7	ACÉNAPHTÈNE	129
5.7.1	Résultats obtenus au laboratoire	129
5.7.2	Données bibliographiques	130
5.7.3	Seuils de qualité existants	130
5.7.4	Seuils calculés par cette étude	130
5.8	ACÉNAPHTYLÈNE	131
5.8.1	Résultats obtenus au laboratoire	131
5.8.2	Données bibliographiques	131
5.8.3	Seuils de qualité existants	132
5.8.4	Seuils calculés par cette étude	132
5.9	ANTHRACÈNE	132
5.9.1	Résultats obtenus au laboratoire	132
5.9.2	Données bibliographiques	132
5.9.3	Seuils de qualité existants	134
5.9.4	Seuils calculés par cette étude	135
5.10	FLUORÈNE	135
5.10.1	Résultats obtenus au laboratoire	135
5.10.2	Données bibliographiques	135
5.10.3	Seuils de qualité existants	136

5.10.4	Seuils calculés par cette étude .....	136
5.11	CHRYSÈNE -----	136
5.11.1	Résultats obtenus au laboratoire .....	136
5.11.2	Données bibliographiques .....	137
5.11.3	Seuils de qualité existants .....	138
5.11.4	Seuils calculés par cette étude .....	138
5.12	FLUORANTHÈNE -----	138
5.12.1	Résultats obtenus au laboratoire .....	138
5.12.2	Données bibliographiques .....	138
5.12.3	Seuils de qualité existants .....	142
5.12.4	Seuils calculés par cette étude .....	142
5.13	INDÉNO(1,2,3,CD)PYRÈNE -----	142
5.13.1	Résultats obtenus au laboratoire .....	142
5.13.2	Données bibliographiques .....	142
5.13.3	Seuils de qualité existants .....	143
5.13.4	Seuils calculés par cette étude .....	143
5.14	NAPHTALÈNE -----	143
5.14.1	Résultats obtenus au laboratoire .....	143
5.14.2	Données bibliographiques .....	144
5.14.3	Seuils de qualité existants .....	146
5.14.4	Seuils calculés par cette étude .....	146
5.15	PHÉNANTHRÈNE -----	146
5.15.1	Résultats obtenus au laboratoire .....	146
5.15.2	Données bibliographiques .....	146
5.15.3	Seuils de qualité existants .....	149
5.15.4	Seuils calculés par cette étude .....	149
5.16	PYRÈNE 149	
5.16.1	Résultats obtenus au laboratoire .....	149
5.16.2	Données bibliographiques .....	149
5.16.3	Seuils de qualité existants .....	151
5.16.4	Seuils calculés par cette étude .....	151

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Méthode de détermination des facteurs de sécurité pour l'estimation de seuils de qualité. ....	14
Tableau 2 : Nombre de fiches de lecture dans les cas de mono ou de multi-contamination. ....	19
Tableau 3 : Plus faible concentration dans l'eau avec effet biologique significatif. ....	22
Tableau 4 : Tableau des seuils d'effet génotoxiques des HAP dans les sédiments. ....	22
Tableau 5 : Plus faible concentration dans le sédiment avec effet biologique significatif. ....	23
Tableau 6 : Essais de toxicité sur <i>Daphnia magna</i> sur substance de référence ( $K_2Cr_2O_7$ ). ....	28
Tableau 7 : Essais 72h <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> sur substance de référence ( $K_2Cr_2O_7$ ). ....	31
Tableau 8 : Limites de solubilité relevées dans la littérature pour les 16 HAP. ....	35
Tableau 9 : Caractéristiques du gradient d'élution utilisé pour le dosage des HAP. ....	36
Tableau 10 : Récapitulatif des $CL_{50}$ <i>Daphnia magna</i> (en $\mu g/L$ à 24 et 48h). ....	46
Tableau 11 : Récapitulatif des $CE_{10}$ (en $\mu g/L$ ) sur <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> à 72h. ....	47
Tableau 12 : Récapitulatif des $CE_{10}$ (en $\mu g/L$ ) reproduction sur <i>Ceriodaphnia dubia</i> à 7 jours. ....	48
Tableau 13 : Paramètres statistiques de la régression du log de $CE_{10}$ en fonction du log de $Kow$ . ....	49
Tableau 14 : Matrice expérimentale des essais sur mélanges de deux substances X et Y. ....	50
Tableau 15 : Concentrations utilisées pour les différents essais sur mélanges. ....	51
Tableau 16 : Toxicité aiguë du mélange B(k)F, fluoranthène. ....	53
Tableau 17 : Toxicité aiguë du mélange B(k)F, phénanthrène. ....	53
Tableau 18 Toxicité aiguë du mélange fluoranthène, phénanthrène. ....	53
Tableau 19 : Toxicité chronique sur algue du mélange B(k)F, fluoranthène. ....	54
Tableau 20 : Toxicité chronique sur algue du mélange B(k)F, phénanthrène. ....	54
Tableau 21 : Toxicité chronique sur algue du mélange fluoranthène, phénanthrène. ....	54
Tableau 22 : Toxicité chronique sur cériodaphnie du mélange B(k)F, fluoranthène. ....	54
Tableau 23 : Toxicité chronique sur cériodaphnie du mélange B(k)F, phénanthrène. ....	55
Tableau 24 : Toxicité chronique sur cériodaphnie du mélange fluoranthène, phénanthrène. ....	55
Tableau 25 : Résultats des essais d'Ames-fluctuations obtenus au laboratoire ( $mg/L$ ). ....	59
Tableau 26 : Récapitulatif des valeurs de toxicité obtenues au laboratoire et dans la bibliographie. ( $\mu g/L$ )	61
Tableau 27 : Calcul des seuils bruts à partir de la valeur seuil de concentration interne lipidique. ....	64
Tableau 28 : Récapitulatif des seuils calculés selon la méthode mise au point dans cette étude. ....	66
Tableau 29 : Coefficients de partage octanol eau utilisés pour cette étude. ....	66
Tableau 30 : Règle de calcul des seuils pour chaque substance. ....	68
Tableau 31 : Seuils sédiments (en $\mu g/kg$ ) calculés pour chaque HAP individuellement. ....	69
Tableau 32 : récapitulatif des données de la littérature sur la toxicité sédimentaire. ....	70
Tableau 33 : Comparaison des concentrations toxiques des HAP sur sédiments obtenues dans la littérature. ( $\mu g/Kg$ ) ....	71
Tableau 34 : Valeurs de $Koc$ et $Kd$ calculées à partir de $Kow$ . ....	74
Tableau 35 : seuils bruts sédiments pour tous les HAP à partir de l'hypothèse narcotique en $\mu g/Kg$ . ....	76
Tableau 36 : Percentiles correspondants aux seuils calculés selon TEL/PEL (LD : limite de dosage, considérée par excès comme égale à 500 $\mu g/kg$ ; nd : seuil hors de la distribution des concentrations) ...	78
Tableau 37- Seuils sédiments proposés. ....	79
Tableau 38 : Comparaison des valeurs seuils pour l'eau avec les valeurs les plus faibles de génotoxicité. ( $\mu g/L$ ) ....	80

Tableau 39 : Données de génotoxicité de l'INERIS et de la littérature sur les procaryotes, les doses sont en mg/L.....	81
Tableau 40 : Équivalents toxiques des HAP.....	83
Tableau 41 : Application de facteurs de sécurité sur le seuil brut de niveau 1 dans l'eau en µg/L.....	85
Tableau 42 Récapitulatif des seuils de qualité des HAP dans l'eau en (µg/L).....	86
Tableau 43 : Valeurs cibles des combinaisons linéaires des concentrations des différents HAP dans l'eau.....	86
Tableau 44 : Coefficients de la combinaison linéaire des concentrations de HAP en mélange.....	87
Tableau 45 : Seuil de qualité pour les HAP dans les sédiments tenant compte de la génotoxicité (en µg/Kg).....	88

## TABLE DES FIGURES

---

Figure 1 : Variation de la concentration au cours de la durée d'un essai sur Cériodaphnie.....	45
Figure 2 : Représentation graphique des résultats des essais algue et cériodaphnie en fonction du coefficient de partage octanol-eau. ....	49
Figure 3 : Exemple d'un effet additif (pas d'interaction) entre phénanthrène et B(k)F sur Daphnia magna.....	52
Figure 4 : Exemple d'antagonisme sur la reproduction des cériodaphnies.....	52
Figure 5 : Distribution des sensibilités chroniques des espèces à la concentration interne lipidique en HAP ( $\mu\text{g/L}$ ) quelle que soit la molécule considérée. ....	63
Figure 6 : Distribution des sensibilités aiguës des espèces à la concentration interne lipidique en HAP ( $\mu\text{g/L}$ ) quelle que soit la molécule considérée. L'abscisse est en logarithme népérien. ....	65
Figure 7 : Représentation graphique des seuils obtenus en $\mu\text{g/L}$ pour chaque HAP en regard des résultats des essais d'écotoxicologie.....	67
Figure 8 : Distribution des concentrations toxiques ( $\mu\text{g/Kg}$ ) des sédiments obtenus dans la littérature scientifique.....	72
Figure 9 Distribution des concentrations en HAP « totaux » dans les sédiments du bassin RMC en 1997	77
Figure 10 : Représentation des données de génotoxicité sur un seul graphe.....	84

## RESUME

---

Cette étude a permis de déterminer des seuils de qualité pour les 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques de la liste de l'US EPA dans les hydrosystèmes. Des essais de toxicité chronique et de génotoxicité ont été réalisés au laboratoire. Une analyse bibliographique exhaustive a été opérée afin de recueillir les données de toxicité et de génotoxicité produites dans le monde entier et de prendre en considération les données éco-épidémiologiques.

La démarche d'élaboration des seuils de qualité est basée sur la détermination la plus précise possible des concentrations d'effet protégeant 95% des communautés vivantes. La modélisation des effets toxiques à partir des données de laboratoire et la prise en compte de la disparition des HAP des milieux d'essais en cours d'expérience ont été mises à profit pour cette phase. Il s'est avéré qu'un mécanisme narcotique peut être envisagé pour tous les HAP ce qui permet d'améliorer la précision en intégrant tous les HAP dans un même mécanisme d'action toxique.

Les données de génotoxicité et d'éco-épidémiologie ont permis de donner des indications sur les facteurs de sécurité à adopter pour protéger les écosystèmes vis à vis des HAP génotoxiques.

Des expériences sur les effets conjoints de HAP ont permis de valider l'utilisation d'un modèle additif pour de tels mélanges.

Des seuils ont ainsi été élaborés qui pourront être mis en place dans le cadre de la surveillance des hydrosystèmes en tant qu'objectifs de qualité pour les hydrocarbures aromatiques polycycliques.

L'absence d'un jeu suffisant de données tant sur l'écotoxicologie sédimentaire que sur la génotoxicité sur eucaryotes nous a conduit cependant à proposer des facteurs de sécurité en application du principe de précaution et nous amène à recommander une étude complémentaire basée sur des essais sur sédiments.

## INTRODUCTION

---

Ce rapport présente les résultats de l'étude inter-agences intitulée : Complément au Seq-Eau : méthode de détermination des seuils de qualité pour les substances génotoxiques. Ce travail a pour but de fournir aux agences de l'eau les éléments quantitatifs et qualitatifs leur permettant de déterminer les seuils de concentrations dans le milieu pour les 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) de la liste prioritaire de l'agence de protection de l'environnement des États-Unis (US EPA).

La protection des hydrosystèmes contre les nuisances liées à la présence de substances toxiques implique la réduction des sources de pollution à partir des données de l'évaluation des risques écotoxicologiques et le contrôle des niveaux réels de pollution. Cette surveillance, intégrée au sein d'un système global de surveillance des milieux aquatiques incluant la biosurveillance de la santé des biocénoses, permet de cartographier la situation des hydrosystèmes, de percevoir les améliorations au fil des années en liaison avec les actions de réduction de pollution mises en œuvre et de décider des nouvelles mesures de protection nécessaires.

La surveillance du milieu est d'autant plus efficace qu'elle ne se contente pas d'appliquer les meilleures techniques analytiques disponibles mais qu'elle recueille des données pertinentes et est en mesure de les comparer à des objectifs de qualité. Ces objectifs se mettent en place dans les différents pays industrialisés, notamment dans l'union européenne. Ils sont complémentaires des listes de substances prioritaires qui contribuent également à la mise en place de politiques de surveillance cohérentes et harmonisées entre les pays inscrits dans une logique de partenariat économique.

Ces objectifs de qualité sont décidés par les pouvoirs publics en se basant sur des données scientifiques précises qui doivent tenir compte des conditions couramment admises en matière de protection de l'environnement. Or ces conditions sont également celles sur lesquelles sont basées les évaluations des risques liés aux substances toxiques qui visent à contrôler la mise sur le marché de produits et préparations chimiques en fonction des risques écotoxicologiques. Plus exactement, la détermination d'objectifs de qualité correspond à l'analyse des dangers du processus d'évaluation des risques lequel consiste à confronter le devenir des substances dans l'environnement avec le danger que représente leurs effets dans le milieu.

Dans ce contexte, les seuils de qualité peuvent être assimilés aux seuils de danger que les experts établissent pour les substances chimiques. On remarque que cette approche est plus conservatoire puisqu'elle ne se contente pas de substances mises sur le marché, mais peut concerner toute substance toxique émise intentionnellement ou non dans l'environnement. Cette étude sur les seuils de qualité des HAP se situe dans ce contexte, les HAP étant des substances émises par de nombreux processus industriels notamment tous ceux qui font intervenir la combustion des hydrocarbures.

La notion de seuil de danger toxique nécessite cependant d'être qualifiée. Certaines interprétations des effets toxiques basent la notion de seuil sur le fait que les organismes vivants possèdent des dispositifs de lutte contre les agressions et d'adaptation à leur environnement et qu'en dessous d'une certaine concentration ils sont capables d'éliminer les substances afin de maintenir leur niveau de concentration interne à l'organisme en dessous du seuil d'effet. On sait par exemple que les HAP sont métabolisés et excrétés ce

qui limite leur bioaccumulation. D'autres scientifiques n'admettent pas forcément l'existence d'un seuil mais considèrent que l'effet tend vers 0 quand la concentration tend également vers 0 ce qui est parfaitement observable sur une courbe concentration réponse.

Cependant, admettre l'existence d'un seuil implique d'envisager sa variabilité statistique au sein des communautés et des populations ce qui fait qu'en pratique il faut passer par une interprétation de type probabiliste et admettre un niveau d'effet acceptable. Dans le domaine de l'étude des dangers des substances sur les écosystèmes le niveau couramment admis en Europe et aux États-Unis est celui qui protège 95% des espèces d'un écosystème, nous le retiendrons pour cette étude.

Certains HAP présentent, en plus de leur toxicité pour les organismes des milieux aquatiques, la propriété de se fixer sur le matériel génétique et de provoquer par ce mécanisme des altérations de l'ADN pouvant entraîner une altération des performances individuelles ou évoluer vers des cancers. Ces effets sont encore peu étudiés au sein des populations naturelles et on ignore encore l'importance écologique des cancers en milieu naturel. On envisage cependant que la toxicité génétique sur les cellules germinales est susceptible d'interagir négativement avec la reproduction. Ces phénomènes, liés à des expositions à très long terme, sont susceptibles de ne pas être détectés par les essais de toxicité chroniques classiques. Enfin les espèces à cycle de vie long comme les poissons ou les batraciens seraient potentiellement les plus affectés, or il s'agit des espèces sur lesquelles nous manquons généralement de données du fait du coût et des difficultés de mise en œuvre des essais au laboratoire.

Il faut enfin tenir compte du fait que l'homme est en contact avec les hydrosystèmes par la voie alimentaire, on peut donc considérer que la définition d'objectifs de qualité pour les substances toxiques au sein du milieu naturel contribue aux objectifs de protection de la santé humaine vis à vis des atteintes environnementales, toujours difficiles à évaluer. Dans cette optique nous intégrerons, dans l'évaluation de la génotoxicité des HAP des éléments de génotoxicité utilisées pour la protection de la santé humaine, c'est à dire en fait des données obtenues sur mammifères.

La principale difficulté à laquelle nous sommes confrontés en matière de risque génotoxique est celle de la difficulté de trouver des données bien établies notamment sur des espèces eucaryotes. La plupart des essais de génotoxicité concernent en effet les bactéries, avec cependant l'utilisation de systèmes d'activation métabolique des substances chimiques issus des mammifères. Par ailleurs la génotoxicité fournit peu de données quantifiées en termes de concentration génotoxique. Il est souvent admis que les substances n'ont pas de seuil concernant la génotoxicité<sup>1</sup> ce qui fait qu'une substance peut être considérée comme génotoxique ou non sans notion quantitative. Enfin, les essais de génotoxicité utilisent des gammes de concentrations proches de celles qui sont toxiques pour les êtres vivants utilisés, la courbe concentration réponse n'est plus alors monotone ce qui en complique l'interprétation statistique et peut masquer certains effets génotoxiques.

L'utilisation de données épidémiologiques, dans notre cas nous pouvons employer le terme d'éco-épidémiologiques, est un palliatif de l'absence de données précises dans le domaine de l'évaluation des risques. On en connaît les avantages dans l'étude des risques pour la santé humaine où, bien souvent, l'épidémiologie a permis de révéler des risques que les

---

<sup>1</sup> Ce qui n'est pas le moindre des paradoxes quand on sait que de nombreux essais de génotoxicité utilisent des systèmes connus de réparation de l'ADN.

gestionnaires et les pouvoirs publics n'avaient pas pu prédire. Nous avons tenté dans cette étude d'utiliser des données éco-épidémiologiques pour améliorer notre approche de la génotoxicité des HAP. Cependant il faut avoir à l'esprit que ces études sont encore rares en matière de connaissance des impacts toxiques sur les écosystèmes. Par ailleurs elles ne permettent que l'établissement de corrélations, jamais de relations de causalité, et enfin elles ne sont performantes que dans les situations de contamination bien caractérisée ce qui n'est pas le cas de la pollution par les HAP, polluants ubiquistes.

Notre démarche sera basée sur quelques principes couramment admis en matière d'évaluation des risques liés aux substances chimiques. D'une part nous chercherons à établir des résultats les plus conservatifs possibles en utilisant les essais les plus performants et en contrôlant systématiquement les concentrations des substances étudiées. La modélisation sera mise en œuvre afin de déterminer avec une grande précision les effets toxiques à partir des essais de laboratoire. Enfin le principe de précaution nous guidera à chaque étape notamment lorsque l'absence de données, ou les faits mal établis sur le plan scientifique, ne permettent pas l'utilisation de modèles précis et objectifs.

Cette étude était organisée en différentes phases en fonction des différents types de données à recueillir. Elle a été réalisée en collaboration par deux établissements publics, l'INERIS, établissement spécialisé dans l'évaluation des risques des substances chimiques et le CEMAGREF, qui a développé des compétences fortes en éco-épidémiologie.

La première phase de cette étude avait pour but de recueillir des données d'écotoxicité, au laboratoire et dans la bibliographie, sur chacun des HAP de la liste de référence de l'agence de protection de l'environnement des Etats-Unis (US EPA). Les données expérimentales ont été complétées par des données éco-épidémiologiques issues de la littérature scientifique permettant notamment de caler les coefficients de sécurité utilisés pour la protection des écosystèmes.

Dans une deuxième phase nous avons recueilli des données de génotoxicité dans le but de tenir compte de ces effets dans la détermination de seuils de qualité.

Nous avons également produit, pendant la troisième phase des données sur les 16 HAP à l'aide de l'essai de Ames de type fluctuations. Des essais d'interaction de HAP ont été utilisés pour déterminer, à partir d'essais de toxicité chronique, le comportement des substances en mélange.

Les essais de toxicité chronique ont été interprétés de façon à calculer des concentrations effectrices 10% (CE<sub>10</sub>). Par ailleurs une analyse bibliographique poussée a été réalisée, les résultats ont fait l'objet de la mise en place d'une base de donnée. Ce document présente des monographies succinctes par substance. Un chapitre regroupe les références bibliographiques. Les résultats complets par substance sont annexé dans un document séparé.

Les résultats des essais permettent d'établir une démarche pour l'élaboration des seuils et de vérifier que l'effet principal des HAP est de type narcotique.

En matière de données éco-épidémiologiques on constate que très peu de données de la littérature font référence à des situations de pollution bien caractérisées. On note de façon générale des situations de multipollution sans analyse détaillée de la composition du mélange des HAP présents. Nous aurons donc à critiquer ces valeurs en tenant compte des imprécisions de ces études.

Enfin l'étude bibliographique sur la génotoxicité montre une pléthore de données sur certains composés comme le benzo(a)pyrène alors que d'autres sont très peu, voire pas du tout, étudiés. Nous avons utilisé au maximum les synthèses pour les HAP très connus et les résultats des nos essais dans des conditions identiques pour les 16 HAP de la liste prioritaire.

Conformément à nos prédictions l'analyse des données de toxicité chronique a été largement plus fructueuse que celle des données de génotoxicité et des données éco-épidémiologiques. Nous avons donc utilisé une méthode d'évaluation des risques avec une forte composante de modélisation pour la détermination de seuils de qualité en matière de toxicité chronique. Pour ce qui est de la partie génotoxicité nous avons plus largement appliqué le principe de précaution en définissant des facteurs de sécurité à appliquer aux seuils précédemment modélisés.

Nous pouvons recommander qu'un effort plus important soit fait au niveau de la communauté scientifique pour la mise au point de méthodes d'évaluation des risques génotoxiques, d'essais d'écotoxicité des sédiments et pour le développement des investigations éco-épidémiologiques. Des telles méthodes si elles fournissaient des données sur les HAP pourraient permettre de revoir les seuils de qualité que nous avons définis dans cette étude.

# 1 ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE ET ECO-EPIDEMIOLOGIQUE

## 1.1 ANALYSE DES TRAVAUX DU RIVM

Le RIVM a produit une étude récente (Kalf et al. 1995) qui propose des objectifs de qualité environnementaux intégrés pour 10 HAP. La démarche consiste à évaluer des concentrations maximales admissibles (CMA) à partir de données d'essai d'écotoxicité unispécifiques. Ces concentrations sont harmonisées entre les divers compartiments à partir des équations de partage à l'équilibre. Cette opération permet d'éviter qu'une concentration maximale admissible dans un compartiment ne soit en équilibre avec une concentration au-dessus du seuil pour un autre compartiment.

Les données de partage à l'équilibre sont également utilisées lorsque aucune donnée n'est disponible pour un compartiment afin de reconstituer la toxicité prévisible, en supposant la sensibilité des espèces identique. Ceci est très utile dès lors que les organismes des sédiments sont peu étudiés par rapport aux organismes de pleine eau.

Une fois les CMA établies, des concentrations négligeables sont calculées égales à 1% des CMA. Il s'agit d'un facteur de sécurité arbitraire utilisé pour tenir compte des incertitudes et des autres facteurs de stress éventuels du milieu. Ces deux valeurs sont estimées pour chaque HAP, la fixation des seuils de qualité réglementaires est faite par le ministère chargé de l'environnement des Pays-Bas à partir de ces résultats.

L'étude n'utilise aucune donnée éco-épidémiologique et ne se base que sur des données de laboratoire. Elle actualise en fait des seuils de qualité existants en utilisant les données les plus récentes de la littérature. Par ailleurs les auteurs considèrent que les données de génotoxicité et de cancérogénicité sont trop peu nombreuses pour être prises en considération.

L'estimation des seuils se fait par application de facteurs de sécurité conformes à ceux utilisés pour l'analyse des risques liés aux substances chimiques. Ces facteurs sont eux-mêmes préconisés par l'agence de protection de l'environnement aux États-Unis. Le Tableau 1 page 14 récapitule ces facteurs.

*Tableau 1 : Méthode de détermination des facteurs de sécurité pour l'estimation de seuils de qualité.*

Information connue	Facteur de sécurité
Plus faible valeur de CL50 aiguë	1000
Plus faible valeur de CL50 aiguë, à condition que trois essais sur poisson, invertébré et algue aient été réalisés	100
Plus faible NOEC chronique	100
Plus faible NOEC chronique, à condition que trois essais sur poisson, invertébré et algue aient été réalisés	10

*Ces facteurs sont valables que les données proviennent d'expérimentations ou de calculs par relations structure activité.*

Il faut noter cependant que ces facteurs ne correspondant pas strictement à ceux préconisés par le guide technique de l'union européenne pour l'évaluation des risques des substances chimiques (TGD).

Au bilan cette étude est intéressante car elle propose une méthodologie correcte même si elle est incomplète. Il sera intéressant de comparer nos résultats avec ceux de ce travail pour 10 HAP. Cependant du fait de l'absence de prise en compte de l'éco-épidémiologie et de la génotoxicité ces résultats apparaissent insuffisants par rapport aux besoins de notre étude.

## 1.2 PRISE EN COMPTE DE LA PHOTOTOXICITE

De nombreux auteurs ont constaté l'induction de phénomènes de toxicité sous l'effet de la lumière avec la plupart des HAP. Tous les HAP ne présentent pas cet effet au même degré. Par ailleurs la photoinduction de la toxicité dépend du spectre de la lumière incidente qui peut être différent d'un laboratoire à l'autre et dans le milieu récepteur.

En présence d'UV solaires de nombreux HAP deviennent toxiques en dessous de leur limite de solubilité en raison de phénomènes de photosensibilisation et de photomodification des orbitales moléculaires de ces composés (Krylov et al., 1997). Cette augmentation de toxicité peut aller jusqu'à un facteur 100 (Pelletier et al., 1997). On peut citer plus d'une vingtaine de références observant la phototoxicité des fluoranthène, anthracène et, phénanthrène chez les poissons (Kagan et al., 1987 ; Oris et Giesy, 1987), les invertébrés (Newsted et Giesy, 1987) et les algues (Gala et Giesy, 1992).

Mekenyan et al. (1994) ont proposé une approche intéressante qui prédit correctement la phototoxicité de nombreux HAP vis à vis *Daphnia magna*. Les HAP phototoxiques sont ceux dont l'énergie de transition HOMO-LUMO<sup>2</sup> est située autour de 7.2eV. Pour ces composés on assiste à un renforcement de la toxicité dans les conditions naturelles d'éclairement. Lorsque cette énergie de transition est trop faible les molécules sont photodégradables, au-delà d'une certaine valeur l'absorption des photons ne se fait plus en lumière visible ou dans le proche ultraviolet. La courbe en cloche qui en résulte permet d'isoler les composés photoactivés sans dégradation par la lumière solaire. Les valeurs d'énergie de transition HOMO-LUMO sont indiquées sur les monographies des substances.

La phototoxicité devrait être prise en compte pour la détermination des seuils de qualité des HAP. Nous pourrions imaginer d'appliquer un facteur de sécurité supplémentaire sur la toxicité des HAP photodégradables. Ce facteur de sécurité pourrait être de 10 pour l'essai aigu sur *Daphnia magna* qui est réalisé dans l'obscurité. Le cas de l'essai chronique sur *Ceriodaphnia dubia* est plus délicat, cet essai est conduit à la lumière du jour, cependant l'éclairement n'est pas extrêmement intense et rien ne permet d'écarter des effets de photoactivation légèrement plus importants en milieu naturel. En revanche, il ne nous semble pas nécessaire de l'appliquer à l'essai sur algue du fait de l'éclairement intense de ce test. La phototoxicité devrait se traduire pour certain HAP par un renforcement de la toxicité sur algues comparée à la toxicité sur cériodaphnie. Nous verrons plus loin dans ce rapport qu'aucun des HAP ne présente un tel profil de toxicité sur algues il n'y aura donc pas lieu de tenir compte de ce phénomène pour le calcul des seuils de qualité.

---

<sup>2</sup> HOMO : highest occupied molecular orbital, LUMO : lowest unoccupied molecular orbital

## 1.3 RECUEIL DES DONNEES ECO-EPIDEMIOLOGIQUES

### 1.3.1 Méthodologie de l'interrogation bibliographique

L'interrogation de bases de données bibliographiques a été effectuée afin de compléter de manière la plus exhaustive possible le fond documentaire dont nous disposons sur les HAP. Les documents recherchés sur les serveurs AQUALINE et DIALOG correspondent à la période 1986-1998 sachant que les articles et rapports de synthèse permettront de couvrir la période antérieure. Une recherche sur CURRENT CONTENTS pour les années 1997 et 1998 a permis de compléter l'interrogation pour les références particulièrement récentes.

### 1.3.2 Interrogation du serveur DIALOG

Sur ce serveur américain couvrant 520 bases de données, nous avons sélectionné les bases suivantes :

- Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts
- BIOSIS
- Current Contents Search
- Embase
- Enviroline
- Pascal
- Sci search
- Toxline
- Uncover
- Water Resources Abstracts

L'équation de recherche est la suivante :

- S1 321383 HAP\* OR HPA\* OR PAH\*
- S2 116731 ANTHRACEN\* OR PHENANTHREN\* OR FENANTHREN\* OR PYREN\*
- S3 8366 BENZO(W)ANTHRACEN\* OR CHRYSEN\* OR DIBENZO(W)ANTHRACEN\* OR FLUORANTHEN\*
- S4 2414 BENZO(W)FLUORANTHEN\* OR BENZO(W)PYREN\* OR BENZO(W)PERYLEN\* OR INDENO(W)PYREN\*
- S5 39914 NAPHTALEN\* OR ACENAPHTYLEN\* OR ACENAPHTEN\* OR FLUOREN\* OR BAP
- S6 448456 S1 OR S2 OR S3 OR S4 OR S5 OR S5
- S7 117116 HYALELLA OR AMPHIPOD\* OR CHIRONOM\* OR MIDGE OR OLIGOCH\* OR LUMBRICUL\* OR GAMMAR\* OR BENTH\*
- S8 1609034 INVERT\* OR FISH\* OR ALGA\* OR CERODAPH\* OR DAPH\*
- S9 1679590 S7 OR S8
- S10 1550473 S9 NOT (MAMMAL\* OR HUMAN OR RAT OR BIRD\* OR AVIAN)
- S11 2877 S6 AND S10
- S12 1973 S11 AND PY=1986:1998
- S13 463 S12 AND (CARCINO\* OR MUTAGEN\* OR ECOTOXIC\* OR IMMUNOTOX\*)
- S14 797 S12 AND (TOXIC\* OR CHRONIC\* OR NOEC OR LOEC)
- S15 136 S12 AND (GENOTOX\* OR CANCER\* OR REPRODUCTION)
- S16 1035 S13 OR S14 OR S15
- S17 567 RD S16 (unique items)
- S18 567 S17 AND PY=1986:1998

### 1.3.3 Interrogation des bases AQUALINE et CURRENT CONTENTS

L'équation de recherche sur la base AQUALINE du WRC en Grande Bretagne sur CDROM est identique à celle présentée ci-dessus. Au total 341 articles répondent à la question posée dont un certain nombre de doublons avec le résultat de DIALOG.

La recherche sur la base CURRENT CONTENTS cherchait à compléter l'interrogation pour la période 01/01/1997-19/01/1998. Au total 42 articles répondent à la question posée.

### 1.3.4 Taux de pertinence des recherches

- DIALOG :  $176/567 = 31\%$
- AQUALINE :  $99/341 = 30\%$
- CURRENT CONTENTS :  $30/42 = 71\%$

Le ratio de références pertinentes<sup>3</sup> est supérieur à 30% par interrogation, ce qui est un assez bon résultat pour une interrogation de bases de données.

Concrètement, la liste de références que nous avons au départ (122 références) s'est allongée grâce à ces interrogations et contient désormais près de 400 références sous le logiciel de base de données bibliographique TEXTO. Cette liste sera complétée au fur et à mesure des lectures<sup>4</sup>.

### 1.3.5 Synthèse des résultats

Les thèmes qui ressortent majoritairement sont les suivants :

- métabolisme, bioaccumulation (22 %)
- génotoxicité, adduits ADN, cancérogenèse in vivo (20 %)
- toxicité dans l'eau (26 %)
- toxicité organismes du sédiment (13 %)
- Le BaP représente à lui seul 47 % des articles ! (Ensuite vient le fluoranthène avec 14 % des articles).

### 1.3.6 Définitions des paramètres à recueillir sur les fiches de lecture

Ces paramètres sont listés ci-dessous :

- Coordonnées de l'article (références, numéro dans la base de donnée TEXTO).
- Expérience de laboratoire, de terrain ou de mésocosme.
- Milieu marin ou continental.
- Toxiques(s) :
  - nature + concentration (nominale ou mesurée),
  - multi-contamination ?

---

<sup>3</sup> C'est à dire avec un effet biologique quantifié et une concentration disponible pour au moins l'une des 16 molécules.

<sup>4</sup> Afin de disposer du plus grand nombre d'informations possibles et en particulier d'atteindre en particulier des informations "grises" (rapports), nous aurions pu rassembler les adresses de différentes personnes, contacts personnels, auteurs, et leur envoyer un questionnaire ce qui n'a pas été fait dans le cadre de cette étude.

- - Compartiment (eau ou sédiment) :
  - Caractéristiques physico-chimiques, fractionnement, traitement éventuel (spiking ...),
- - Autres facteurs:
  - température, pH ...
- - Coefficient de partage
- - Organismes:
  - nom, type d'essais (bioessais labo, in situ, ),
- - Effets observés:
  - CE50, NOEC, autres effets (à préciser)

Concernant les paramètres biologiques, en plus des paramètres de toxicité “ classiques ” tels que la CEx ou CL<sub>50</sub>, la NOEC, des informations d'effet toxique sur les populations benthiques in situ seront récoltées, telles que des modifications de structure de population (indices divers), de biomasse ou de métabolisme. Par ailleurs, ne seront pas ou peu considérées les informations concernant la bioaccumulation.

Cette liste de paramètres comprend plusieurs paramètres physico-chimiques spécifiquement identifiés et connus pour intervenir dans la modification de la biodisponibilité des contaminants vis à vis des organismes aquatiques et en particulier affecter les valeurs des coefficients de partage eau-particules.

L'ensemble de ces paramètres constitue la trame de la grille de lecture utilisée pour dépouiller les informations bibliographiques disponibles et associer :

- un type d'effet toxique, aigu, chronique uni ou pluri spécifique,
- une concentration en contaminant,
- un compartiment : eau (douce ou salée), sédiment.

Les données obtenues ont été structurées dans une base de données par composé en fonction des espèces en tenant compte au maximum des informations physico-chimiques disponibles sur l'eau ou les sédiments. Un exemple de fiche de lecture (formulaire) est donné en annexe.

#### 1.4 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

231 fiches de lecture ont été exploitées (correspondant à 61 articles ‘exploitables’ sur les 359 articles composant la base bibliographique). Il s'agit essentiellement de mesures de laboratoire ou alors d'échantillons de terrain (sédiment) ramenés au laboratoire en vue d'un test biologique. Il manque cruellement des données de type bioindication *in situ* ainsi que de résultats de génotoxicité de terrain. Une recherche supplémentaire s'avère nécessaire.

La base de données regroupant les fiches de lecture a été reproduite en annexe (mais partiellement car seules les variables principales, i.e. concentration et effet biologique, ont été reportées dans le tableau tiré de la base de données).

### 1.4.1 Synthèse globale de l'information disponible par molécule

Dans un premier temps, on peut s'attacher aux effets obtenus lorsque l'organisme vivant est exposé à une seule molécule (en général tests de laboratoire sur eau ou sédiment enrichis avec la molécule dont on veut étudier la toxicité). Ce genre d'information donne rapidement une idée quantifiée sur la toxicité du composé. Les informations obtenues dans les cas de multi-contamination (données de terrain) sont quant à elles plus délicates à interpréter sans traitement statistique adéquat (multivarié) et sans hypothèse sur le mécanisme d'interaction entre la toxicité des constituants du mélange. Toutefois, dans le cas de multi-contamination il est possible de considérer que les observations de 'non-effet' (NOEC) sont valables individuellement pour tous les constituants du mélange.

Le Tableau 2 page 19 propose une première synthèse de nombre de fiches de lecture par molécule en considérant les cas de mono-contamination (eau ou sédiment enrichi en laboratoire) ou de multi-contamination (sédiment naturel ramené en laboratoire ou résultats de terrain). Pour ces derniers cas nous avons comptabilisé les études de multi-contamination où un non-effet était observé ; en effet ces concentrations sont comparables à des NOEC pour chacune des molécules constituant le cocktail de multi-contamination.

Tableau 2 : Nombre de fiches de lecture dans les cas de mono ou de multi-contamination.

Molécule	Mono-contamination	Multi-contamination	
		NOEC	Effet significatif
acénaphthène	5	1	1
acénaphthylène	3	0	1
anthracène	26	0	5
benzo(a)anthracène	4	1	6
benzo(a)pyrène	34	1	6
benzo(b)fluoranthène	4	1	6
benzo(ghi)pérylène	1	1	5
benzo(k)fluoranthène	0	1	6
chrysène	2	1	6
dibenzo(a,h)anthracène	0	1	1
fluoranthène	74	3	10
fluorène	2	0	5
indéno(1,2,3-cd)pyrène	0	1	5
naphtalène	7	0	5
phénanthrène	44	1	5
pyrène	12	2	6

Les données de ce tableau s'entendent avec ou sans effet biologique significatif.

On constate (Tableau 2) que selon la molécule les informations sont soit nombreuses (BaP, fluoranthène, anthracène et phénanthrène) soit quasi inexistantes (chrysène, benzo(ghi)pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène...). Ces observations confirment celles de Kalf et al. (1995). Ces auteurs pallient ce manque en privilégiant les approches QSAR pour ces substances. Globalement les articles concernant le compartiment eau représentent 60% des articles. Pour certaines molécules (benzo(k)fluoranthène et indéno(123-cd)pyrène) seules des données pour le compartiment sédiment étaient disponibles. Notons enfin que les informations disponibles sont de plus déclinées par espèce et par variable biologique mesurée.

Dans l'immense majorité des cas les résultats de terrain sont des résultats de multi-contamination et il est difficile d'en déduire un effet relié à un seul des 16 HAP. Par ailleurs, de nombreux articles (anciens notamment) ne donnent que la concentration en HAP totaux comme information de contamination.

#### **1.4.2 Génotoxicité et autres effets biologiques**

Les fiches de lecture concernant la génotoxicité sont peu nombreuses. En effet, en laboratoire les études sont généralement effectuées avec une dose injectée à l'organisme (et de ce fait aucune concentration n'est disponible) et sur le terrain il s'agit de cas de multi-contamination où, bien souvent, seule la concentration en HAP totaux est disponible.

Les études de génotoxicité en laboratoire ont concerné essentiellement le benzo(a)pyrène en mesurant des adénomes (Guobaitis et al., 1986 ; Hawkins et al., 1988), des aberrations chromosomiques (Al Sabti, 1986), des micronoyaux (Al Sabti, 1985 ; Burgeot et al., 1995 ; Bolognesi et al., 1996 ; Venier et al., 1997) ou des adduits à l'ADN (Shugart et al., 1987 ; Kurelec et al., 1988 ; Maccubin et al., 1990 ; Sikka et al., 1990 ; Mac Elroy et al., 1991 ; James et al., 1992 ; Masfarau et al., 1992 ; Stein et al., 1993 ; French et al., 1996 ; Peters et al., 1997). Parallèlement aux adduits ont souvent été mesurées sur des poissons prélevés in situ des activités mono-oxygénases à cytochrome P450 (Garrigues et al., 1990 ; Masfarau et al., 1992 ; Collier et al., 1995 ; Peters et al., 1997). Les HAP sont activés par les réactions de biotransformation en intermédiaires réactifs (diols époxydes) capables d'interagir avec l'ADN en formant des adduits stables.

Il a été observé, au cours d'études de zones côtières, que la contamination des sédiments en HAP pouvait être un facteur explicatif déterminant dans l'induction du cytochrome P450 1A des poissons (Narbonne *et al.*, 1991 ; Lafaurie *et al.*, 1992). Notons que des anguilles mises en cage dans un site où les sédiments contenaient 1,2 mg HAP/kg ne présentaient pas de différence d'induction par rapport à des anguilles maintenues en laboratoire (Fenet, 1997). Mc Donald *et al.* (1996) concluent de quatre études qu'une quantité de 3 mg/kg en HAP est "nécessaire" pour observer une induction significative de l'EROD tandis que les sites témoins ont des concentrations comprises entre 10 et 1000 µg/kg. Pour une contamination en HAP de 1 mg/kg, la fréquence de néoplasmes chez les poissons de la région de Puget Sound (États Unis) est de l'ordre de 1% (Malins *et al.*, 1988). La présence de néoplasmes chez les poissons peut cependant être beaucoup plus élevée selon la concentration en HAP des sédiments.

La formation d'adduits serait une étape nécessaire dans le mécanisme de nombreux cancérigènes. De plus les adduits auraient une durée de vie dans l'organisme plus longue que celle de la molécule mère et de ce fait seraient un bon indicateur de risque cancérigène (Dunn, 1991). Chez les poissons on observe concomitamment un fort métabolisme des cancérigènes, de faibles concentrations bioaccumulées, des adduits et des tumeurs. Tandis que chez les invertébrés, il y a peu de métabolisme cancérigène, des hautes concentrations en cancérigènes et peu d'adduits ou de tumeurs (Dunn, 1991). Le meilleur exemple de tumeurs chez les poissons induites par la pollution est celui des poissons plats de l'état de Washington où l'occurrence des tumeurs est corrélée à la contamination des sédiments en HAP (Malins et al., 1987 ; Malins et al., 1988 ; Varanasi et al., 1989 ; Stein et al., 1990). Consommer des poissons avec des néoplasmes n'entraîne pas forcément un risque sauf si les polluants à l'origine de ces néoplasmes sont encore dans le poisson (Black et Baumann, 1991).

Hormis les résultats d'écotoxicité classique (bioessais de toxicité aiguë ou chronique) et de génotoxicité, on peut relever d'autres effets des HAP : immunotoxicité (Walczak et al., 1987 ; Dunier et Siwicki, 1993 ; Coles et al., 1994 ; Lowe et al., 1995 ; Grundy et al., 1996) et effets sur la reproduction des poissons (Thomas, 1988 ; Mac Master et al., 1996).

#### **1.4.2.1 Comparaison avec des documents de synthèse**

Une première synthèse simpliste de nos données, avant un traitement statistique ultérieur, consiste à considérer pour chaque substance la plus faible concentration où un effet biologique significatif (écotoxicité ou génotoxicité) a été observé. On peut en parallèle comparer ces valeurs avec des données existantes de seuils de qualité. Les valeurs correspondantes ont été rassemblées dans le Tableau 3 page 22 et le Tableau 5 page 23 pour l'eau et les sédiments respectivement.

L'approche de Kalf et al. (1995) pour 10 HAP consiste, en se basant sur des données d'écotoxicité (NOEC) pour différentes espèces (éventuellement complétées avec des valeurs de QSAR), à préserver 95% des espèces par la technique d'Aldenberg et Slob (1993).

Nous avons par ailleurs considéré les seuils pour les micropolluants déterminés dans le cadre d'une étude interagences (WRc, 1996). Pour cette étude interagence, le seuil 3 correspond à la plus basse valeur de toxicité sans facteur de sécurité ce qui correspond à l'estimation faite avec nos données (nous avons estimé la plus basse LOEC ce qui explique que nos valeurs seraient bien plus élevées que les seuils de Kalf et al., 1995).

Suter et Tsao (1996) quant à eux synthétisent les approches Nord américaines (dont celle de l'US EPA, 1993) et fournissent des seuils chroniques et aigus pour les substances organiques et inorganiques<sup>5</sup>.

---

<sup>5</sup> Les seuils aigus sont calculés comme  $\frac{1}{2}$  fois le percentile 5% des données de toxicité aiguë. Les seuils chroniques sont tirés du seuil aigu par la moyenne géométrique d'au moins 3 valeurs aigu/chronique où la valeur chronique est elle-même la moyenne géométrique de NOEC et LOEC. Dans les cas où moins de trois coefficients aigu/chronique sont disponibles, un coefficient de 17.9 est utilisé par défaut.

Tableau 3 : Plus faible concentration dans l'eau avec effet biologique significatif.

Molécule	Eco-toxicité	Géno-toxicité	RIVM Kalf et al. (1995) MPC <sup>a</sup>	Suter et Tsao (1996)		WRc (1996) Seuils 1-2-3-4
				Chronic value	Acute value	
acénaphthène	740	-	-	23	80	-
acénaphthylène	22308	310	-	-	-	-
anthracène	2.1	2919	0.07	0.73	13	-
benzo(a)anthracène	3000	260	0.01	0.027	0.49	-
benzo(a)pyrène	10	0.5	0.05	0.014	0.24	0.005-0.05-5-5
benzo(b)fluoranthène	1000	-	-	-	-	0.004-0.04-4-28
benzo(ghi)pérylène	-	5250	0.03	-	-	0.004-0.04-4-28
benzo(k)fluoranthène	-	-	0.04	-	-	0.004-0.04-4-28
chrysène	-	1490	0.34	-	-	-
dibenzo(a,h)anthracène	-	-	-	-	-	-
fluoranthène	14	3270	0.30	6.16	33.6	0.004-0.04-4-28
fluorène	-	3230	-	3.9	70	-
indéno(1,2,3-cd)pyrène	-	-	0.04	-	-	0.004-0.04-4-28
naphtalène	2000	680	1.2	12	190	-
phénanthrène	41	530	0.30	6.3	30	-
pyrène	1200	2152	-	-	-	-

Extrait de notre base de données ACCESS, cas de mono-contamination en µg/L et comparaison avec les seuils de Kalf et al. (1995), de Suter et Tsao (1996) et du WRc (1996). MPC= Maximum Permissible Concentration.

Ces seuils sont tirés essentiellement d'études de toxicité sur invertébrés (amphipodes). Cependant des résultats concernant des lésions (hépatiques) observées chez les poissons plats benthiques (sole anglaise) sont disponibles de 1984 à 1994 (e.g. Myers et al., 1990, 1994 et 1998). Une synthèse récente met en relation les effets observés chez les poissons (néoplasmes, altérations cellulaires, nécroses, lésions dégénératives, lésions prolifératives) avec les concentrations en HAP totaux dans les sédiments (Horness et al., 1998). Ils proposent des seuils avec intervalles de confiance (tableau ci dessous).

Tableau 4 : Tableau des seuils d'effet génotoxiques des HAP dans les sédiments.

Effet observé	Seuil d'effet (µg/kg)	Intervalle de confiance (µg/kg)
Néoplasmes	2800	(11 ; 5500)
Altérations cellulaires (foci prénéoplasiques)	54	non calculable
Nécroses, lésions dégénératives	940	(680 ; 1200)
Lésions prolifératives non néoplasiques	230	(1.4 ; 830)
Tous effets	600	(300 ; 1000)

Les bornes de l'intervalle de confiance donnent deux seuils : 300 et 1000µg/kg pour tous effets. On peut en tirer des équivalents aux TEL et PEL (Cf. définition TEL, PEL, ERL en note infrapaginale page 24). Notons que pour les poissons ERL=4mg/kg et TEL=1.7mg/kg, les concentrations du Tableau 4 sont donc inférieures d'un **facteur 10** par rapport aux seuils déterminés précédemment à partir essentiellement de données de toxicité aiguë.

Tableau 5 : Plus faible concentration dans le *sédiment* avec effet biologique significatif.

Molécule	Ecoto x	Génot ox	RIVM	EqP	WRc	SLC Ontario		NOAA		FDEP Floride		Saint Laurent			Canadien	
			Kalf et al. (1995)	Jones et al. (1997) +EPA 1993	(1996)	tiré de Persaud et al. (1993)	tiré de Long et al. (1995)	tiré de Mac Donald (1996)	Provisoire (1992)			tiré de Smith et al. (1996)				
			MPC <sup>a</sup>	eau douce Chronic Value	Seuils 1-2	eau douce		marin-estuarien		marin-estuarien		SSE	eau douce		eau douce	
						LOEL	SEL	ERL	ERM	TEL	PEL		SEM	SEN	TEL	PEL
						(% 5 SLC)	(% 95 SLC)						(% 15 SLC)	(% 80 SLC)		
													mg/kg CO			
acénaphthène	69300	-	-	1300 (620-2800)	-	-	-	16	500	6.71	88.9	10	-	-	-	-
acénaphthylène	-	-	-	-	-	-	-	44	640	5.87	128	10	-	-	-	-
anthracène	-	-	120	220	-	220	3700	85.3	1100	46.9	245	20	-	-	-	-
benzo(a)anthracène	-	-	360	110	-	320	14800	261	1600	74.8	693	50	400	50	31.7	385
benzo(a)pyrène	-	-	2700	140	9-90	370	14400	430	1600	88.8	763	10	500	70	31.9	782
benzo(b)fluoranthène	-	-	-	-	113-1500	-	-	-	-	-	-	300	-	-	-	-
benzo(ghi)pérylène	-	-	7500	-	113-1500	170	3200	-	-	-	-	100	-	-	-	-
benzo(k)fluoranthène	-	-	2400	-	113-1500	240	13400	-	-	-	-	-	-	-	-	-
chrysène	-	-	10700	-	-	340	4600	384	2800	108	846	100	600	80	57.1	862
dibenzo(a,h)anthracène	-	-	-	-	-	60	1300	63.4	260	6.22	135	5	-	-	-	-
fluoranthène	23.6	580	2600	6200 (2900-13000)	113-1500	750	10200	600	5100	113	1494	20	600	200	111	2355
fluorène	-	-	-	540	-	190	1600	19	540	21.2	144	10	-	-	-	-
indéno(1,2,3-cd)pyrène	-	-	5900	-	113-1500	200	3200	-	-	-	-	70	-	-	-	-
naphtalène	-	-	140	240	-	-	-	160	2100	34.6	391	20	400	60	-	-
phénanthrène	3680	-	510	1800 (850-3900)	-	560	9500	240	1500	86.7	544	30	400	80	41.9	515
pyrène	59100	-	-	-	-	490	8500	665	2600	153	1398	20	700	100	53	875
HAP légers						-	-	552	3160	312	1442	100	-	-	-	-
HAP lourds						-	-	1700	9600	655	6676	1000	-	-	-	-
Total HAP						4000	100000	4022	44792	1684	16772	-	-	-	-	-

Extrait de notre base de données ACCESS, cas de mono-contamination en µg/kg et comparaison avec les seuils de Kalf et al. (1995), de Jones et al. (1997) et du WRc. (%x = percentile x)

Pour les sédiments les données sont moins nombreuses que pour l'eau. En revanche, on dispose de nombreux seuils publiés. Une synthèse française récente présente les démarches d'élaboration de seuils ainsi que les valeurs de seuils pour 8 substances (4 métaux et 4 pesticides) (Garric et al., 1998) tandis qu'une synthèse nord américaine sera trouvée chez Batts et Cabbage (1995). Ces démarches sont résumées ci-dessous. Elles aboutissent pour la plupart à la définition de deux seuils délimitant trois zones : pas d'effet/peu d'effet ou espèces sensibles/effet probable sur la plupart des espèces.

Les seuils 1 et 2 de l'approche du WRC concernent les concentrations correspondantes aux NOEC et NOEC avec facteurs de sécurité. Les approches de Kalf et al. (1995) et de Jones et al. (1997) utilisent les équilibre de partage eau-sédiment. Pour acénaphthène, fluoranthène et phénanthrène, il s'agit des résultats des rapports de l'US-EPA (1993).

L'approche ERL/ERM<sup>6</sup> de Long et collègues depuis le début des années 1990 s'est avérée intéressante car précise et prédictive : on observe dans une phase de validation des seuils pour les HAP par exemple, quelle que soit la molécule, qu'une concentration inférieure au seuil ERL entraîne systématiquement moins de 25% d'effet, tandis qu'une concentration supérieure au seuil ERM entraîne plus de 75% d'effet (Long et al., 1995). Après l'utilisation des ERL et ERM, une approche a intégré la matrice des non-effets afin de préciser plus justement les seuils : il s'agit des TEL et PEL<sup>7</sup> : Smith et al. (1996) pour les eaux douces et Mac Donald et al. (1996) pour le milieu marin et estuarien. Notons que sur 23 substances la corrélation est excellente entre seuils pour eau douce et seuil pour eau salée (Smith et al., 1996). En particulier pour les HAP il apparaît que les TEL eau douce sont légèrement inférieures aux TEL d'eau salée (se reporter au Tableau 5). La prédictibilité des TEL/PEL est élevée (>80% pour 34 substances et 128 sédiments) mais il reste à tester la validité de ces seuils sur un nombre très grand d'échantillons (Mac Donald et al., 1996)

Ces études ont été complétées par Long et al. (1998). Ces auteurs ont comparé les seuils ERL/ERM et TEL/PEL sur 1068 données de bioessais sur sédiments estuariens. Ils confirment l'intérêt des ERL ou TEL comme prédiction de la non-toxicité (nombre de faux négatifs inférieur pour les TEL), que la toxicité augmente avec le nombre de substances dont les concentrations dépassent les ERM/PEL et que le nombre de faux positifs est globalement plus élevé pour les PEL que pour les ERM.

## 1.5 CONCLUSION SUR CETTE PARTIE

Sont disponibles à la fois des données bibliographiques "brutes" (base ACCESS) et des données "intégrées" (rapports de synthèse). Quelques substances sont bien décrites (benzo(a)pyrène, fluoranthène...) tandis que d'autres nécessiteraient des calculs de type QSAR. Les données écotoxicologiques obtenues dans le cadre de cette étude par l'INERIS en laboratoire seront de ce fait particulièrement utiles pour ces substances. La confrontation

---

<sup>6</sup> ERL (Effects Range Low correspondant au 10<sup>ième</sup> percentile d'effet) et ERM (Effects Range Median correspondant à la médiane des effets).

<sup>7</sup> TEL (Threshold Effect Level correspondant à une moyenne géométrique entre le percentile 15 des effets et le percentile 50 des non effets) et PEL (Probable Effect Level correspondant à une moyenne géométrique entre le percentile 50 des effets et le percentile 85 des non effets).

des données brutes ou intégrées de bibliographie avec les résultats de tests obtenus dans le cadre de cette étude permettra de tirer des seuils d'écotoxicité en laboratoire des HAP.

Cependant, les données de terrain sont indispensables car ce sont elles qui donnent une information sur " l'effet réel " *in situ*. Malheureusement elles sont généralement obtenues dans des cas de multi-contamination. Or la problématique de l'interaction entre substances a été peu traitée jusqu'à présent. Ces données de terrain permettront au moins de déduire des concentrations sans effet (NOEC) ou de tester la validité des facteurs de sécurité obtenus pour les 16 HAP grâce aux données de laboratoire.

Un travail de collecte de données sur la génotoxicité a également été réalisé. Dans la quasi-totalité des cas les HAP ne sont pas les seuls contaminants dans les sédiments et le détail de la composition en HAP est rarement donné. Ainsi les interprétations de ces données sont délicates et ne permettent pas de conclure. Des effets individuels sont connus en laboratoire mais en déduire des effets populationnels *in situ* est moins évident ainsi que prévoir les effets des métabolites des HAP via la biotransformation (Kalf et al., 1995).

## 2 PRODUCTION DE DONNEES ECOTOXICOLOGIQUES ET GENOTOXICOLOGIQUES

---

### 2.1 ESSAIS D'ECOTOXICOLOGIE

#### 2.1.1 Protocoles d'essais

Nous avons utilisé les protocoles standards pour les essais sur algues et daphnies. Le protocole d'essai sur céridaphnies est celui qui fait l'objet d'un protocole de normalisation actuellement à l'AFNOR, il est issu d'un travail interagences et lui-même inspiré du protocole de l'US EPA.

##### 2.1.1.1 Toxicité aiguë vis-à-vis de *Daphnia magna*

###### 2.1.1.1.1 Principe

L'essai consiste à déterminer dans des conditions définies, la toxicité de la substance testée vis-à-vis d'un microcrustacé d'eau douce, *Daphnia magna*. L'effet mesuré est une immobilisation des organismes. L'essai dure 48 heures en conditions statiques. Après 24h et en fin d'essai, le pourcentage d'immobilisation est calculé pour chaque lot d'organismes.

###### 2.1.1.1.2 Protocole expérimental

Les essais ont été réalisés conformément au protocole expérimental décrit dans la norme internationale NF EN ISO 6341 de mai 1996, intitulée : " Qualité de l'eau : Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Strauss (*Cladocera crustacea*). Essai de toxicité aiguë ".

Les résultats des essais sont exprimés sous forme de CL50-24h et 48h, concentrations de la substance qui entraînent une inhibition de la mobilité de 50% des organismes mis en expérimentation pendant 24 puis 48 heures. Les intervalles de confiance à 95% des CL50 sont également déterminés lorsque cela est possible<sup>8</sup>.

###### 2.1.1.1.3 Système d'essai

Daphnies : *Daphnia magna* Strauss, 1820 (*Cladocera crustacea*) âgées de moins de 24 heures et sélectionnées à partir d'un élevage maintenu au laboratoire d'écotoxicologie de l'INERIS.

###### 2.1.1.1.4 Milieu d'essai

Le milieu d'essai utilisé est un milieu synthétique préparé à partir de réactifs de pureté analytique reconnue avec de l'eau déionisée ayant une conductivité n'excédant pas 10  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ .

Chlorure de calcium dihydraté	$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	294 mg
-------------------------------	--	--------

---

<sup>8</sup> Les CL<sub>50</sub> ont été choisies pour cet essai et non les CE<sub>10</sub> pour des raisons de cohérence avec l'usage pour ce type d'essai.

Sulfate de magnésium heptahydraté	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	123,25 mg
Hydrogénocarbonate de sodium	NaHCO <sub>3</sub>	64,75 mg
Chlorure de potassium	KCl	5,75 mg
Eau déionisée	q.s.p	1000 ml

Le milieu est aéré jusqu'à saturation en oxygène dissous.

Ses caractéristiques physico-chimiques après aération sont :

- un pH de  $7,8 \pm 0,2$
- une teneur en oxygène dissous  $\geq 7,0 \text{ mg.l}^{-1}$
- une conductivité de  $680 \mu\text{S.cm}^{-1} \pm 60 \mu\text{S.cm}^{-1}$
- une dureté totale de  $250 \text{ mg CaCO}_3.\text{l}^{-1} \pm 30 \text{ mg.l}^{-1}$
- un rapport  $\frac{\text{Ca}}{\text{Mg}} \cong 4$ .
- un rapport  $\frac{\text{Na}}{\text{K}} \cong 10$

#### 2.1.1.1.5 Conditions d'essai

Réipients : tubes de verre d'une capacité d'au moins 20 ml

Charge : 5 daphnies par tube. Chaque tube contient 10 ml de solution d'essai.

Dispositif : 4 tubes par concentration testée :

4 tubes témoins et 4 tubes témoins solvant à une concentration identique à la plus forte concentration testée dans la gamme d'essai.

Alimentation : aucune

Température : pièce régulée à  $20^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$

Aération : aucune

Durée : 48 heures à l'obscurité

Observations : à 24 et 48 heures

Effet toxique : immobilisation. Les daphnies qui ne sont pas capables de nager dans les 15 secondes qui suivent une légère agitation du tube à essai, sont considérées comme immobiles. Un pourcentage d'immobilisation inférieur à 10% n'est pas considéré comme un " effet significatif ".

#### 2.1.1.1.6 Appareillage

Oxymètre, pH mètre, conductimètre, enceintes climatisées, balance de précision, thermo-enregistreurs, kit HACH pour la mesure de la dureté calcique totale et sonificateur.

#### 2.1.1.1.7 Mesures

pH et oxygène dissous sont mesurés sur un tube des lots témoins et de la plus faible concentration testée affichant le plus fort effet.

Un thermo-enregistreur placé dans le local d'essai permet d'enregistrer la température pendant la durée de l'essai.

#### 2.1.1.1.8 Substance de référence

Afin de vérifier la sensibilité du réactif biologique, un essai de toxicité aiguë sur 24h est effectué chaque semaine avec une substance de référence, le bichromate de potassium. Les résultats obtenus sur cette référence sont indiqués dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Essais de toxicité sur *Daphnia magna* sur substance de référence ( $K_2Cr_2O_7$ ).

Date de réalisation de l'essai	CE <sub>50</sub> -24h	Intervalle de confiance à 95%	HAP concernés
24 février 1998	1,08 mg.l <sup>-1</sup>	0,99-1,18 mg.l <sup>-1</sup>	Benzo(ghi)Pérylène Dibenzo(a,h)Anthracène
17 mars	0,83 mg.l <sup>-1</sup>	0,75-0,92 mg.l <sup>-1</sup>	Acénaphène Fluoranthène Benzo(a)Pyrène Anthracène Chrysène
5 mai 1998	0,93 mg.l <sup>-1</sup>	0,83-1,05 mg.l <sup>-1</sup>	Benzo(k)Fluoranthène Benzo(b)Fluoranthène
12 mai 1998	1,40 mg.l <sup>-1</sup>	1,29-1,53 mg.l <sup>-1</sup>	Benzo(a)Anthracène Fluorène
19 mai 1998	1,10 mg.l <sup>-1</sup>	1,00-1,24 mg.l <sup>-1</sup>	Acénaphylène
3 juin 1998	0,68 mg.l <sup>-1</sup>	0,62-0,74 mg.l <sup>-1</sup>	Naphtalène
9 juin 1998	0,65 mg.l <sup>-1</sup>	0,54-0,74 mg.l <sup>-1</sup>	Indéno (1,2,3-cd)Pyrène
17 juin 1998	0,68 mg.l <sup>-1</sup>	0,61-0,74 mg.l <sup>-1</sup>	Pyrène
25 novembre 1998	0,83 mg.l <sup>-1</sup>	0,58-1,19 mg.l <sup>-1</sup>	Phénanthrène
5 janvier 1999	0,84 mg.l <sup>-1</sup>	0,76-0,93 mg.l <sup>-1</sup>	Mélange " M2 " Benzo(k)Fluoranthène et Fluoranthène
12 janvier 1999	0,88 mg.l <sup>-1</sup>	0,81-0,95 mg.l <sup>-1</sup>	Mélange " M3 " Benzo(k)Fluoranthène et Phénanthrène
19 janvier 1999	1,09 mg.l <sup>-1</sup>	1,00-1,19 mg.l <sup>-1</sup>	Mélange " M4 " Fluoranthène et Phénanthrène

Ces essais ont été réalisés parallèlement aux essais sur HAP.

#### 2.1.1.1.9 Validité des résultats

Un essai est considéré comme valide lorsque le pourcentage d'inhibition de la mobilité des daphnies du témoin solvant est inférieur ou égal à 20% et lorsque les trois critères suivants sont simultanément satisfaits :

1. Le pourcentage de daphnies immobilisées en 48 heures dans les tubes témoins est inférieur à 10%.
2. La CL<sub>50</sub>-24h du bichromate de potassium est comprise dans l'intervalle préconisé par la norme (0,6-1,7 mg.l<sup>-1</sup>).
3. La teneur en oxygène dissous mesurée à la fin de l'essai après 48 heures est supérieur à 2 mg.l<sup>-1</sup> pour la substance testée.

#### 2.1.1.2 Inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*

##### 2.1.1.2.1 Principe

L'essai consiste à déterminer, dans des conditions définies, la toxicité de la substance testée vis-à-vis d'une algue planctonique d'eau douce : *Pseudokirchneriella subcapitata* (anciennement dénommée *Selenastrum capricornutum*). L'effet mesuré est une inhibition de la croissance des algues. L'essai dure 72 heures en conditions statiques. En fin d'essai,

le taux de croissance et la biomasse sont calculés pour chaque concentration. La concentration cellulaire de chaque lot est comparée à la concentration cellulaire du lot témoin.

#### 2.1.1.2.2 Protocole expérimental

Les essais sont réalisés conformément au protocole expérimental décrit dans la norme NF EN 28692 : “ Qualité de l’eau- Essai d’inhibition de la croissance des algues d’eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum* ”.

Les résultats des essais sont exprimés sous forme de  $CE_{10}(0-72h)$  : concentration de la substance testée qui inhibe en 72 heures 10 % de la croissance de la biomasse algale par rapport à des cultures témoins.

Des comptages des cellules algales sont effectués après 24, 48 et 72 heures d’exposition et la  $CE_{10}(0-72h)$  et son intervalle de confiance à 95% sont déterminés quand cela est possible.

#### 2.1.1.2.3 Système d’essai

Algue : *Pseudokirchneriella subcapitata* appartenant à l’ordre des chlorococcales (chlorophytes chlorophycées), anciennement dénommée *Selenastrum capricornutum* puis *Raphidocelis subcapitata* en classification systématique.

Origine : The Culture Centre of Algae and Protozoa (Cambridge, Royaume Uni) sous la référence 278/4. La souche est entretenue au laboratoire par simple repiquage hebdomadaire dans les conditions de milieu, de température, d’agitation et d’éclairement qui assurent sa bonne conservation.

#### 2.1.1.2.4 Milieu d’essai

Le milieu d’essai utilisé est un milieu synthétique préparé à partir de réactifs de pureté analytique reconnue avec de l’eau déionisée stérile de conductivité inférieure à  $10 \mu S.cm^{-1}$ .

##### Solutions de base :

Solution mère n°1 :

- NH <sub>4</sub> Cl	1,5 g.l <sup>-1</sup>
- MgCl <sub>2</sub> - 6H <sub>2</sub> O	1,2 g.l <sup>-1</sup>
- CaCl <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O	1,8 g.l <sup>-1</sup>
- MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O	1,5 g.l <sup>-1</sup>
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,16 g.l <sup>-1</sup>

Solution mère n°2 :

- FeCl <sub>3</sub> - 6H <sub>2</sub> O	80 mg.l <sup>-1</sup>
- Na <sub>2</sub> EDTA - 2H <sub>2</sub> O	100 mg.l <sup>-1</sup>

Solution mère n°3 :

- H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185 mg.l <sup>-1</sup>
- MnCl <sub>2</sub> - 4H <sub>2</sub> O	415 mg.l <sup>-1</sup>
- ZnCl <sub>2</sub>	3 mg.l <sup>-1</sup>
- CoCl <sub>2</sub> - 6H <sub>2</sub> O	1,5 mg.l <sup>-1</sup>
- CuCl <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O	0,01 mg.l <sup>-1</sup>
- Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O	7 mg.l <sup>-1</sup>

Solution mère n°4 :  
- NaHCO<sub>3</sub> 50 g.l<sup>-1</sup>

Les solutions mères 1, 2 et 3 sont stérilisées par autoclavage à 120°C pendant 20 minutes.

La solution mère n° 4 est stérilisée uniquement par filtration sur membrane.

Le concentré nutritif est préparé comme suit :

solution mère n°1	100 ml
solution mère n°2	10 ml
solution mère n°3	10 ml
solution mère n°4	10 ml
eau déionisée stérile q.s.p.	1000 ml

Ce concentré nutritif constituera 10 % du volume final des solutions d'essai de façon à apporter aux algues les nutriments nécessaires à leur croissance.

#### 2.1.1.2.5 Conditions d'essai

Récipients : erlenmeyers de 250 ml pour un volume de solution d'essai de 100 ml,

Densité cellulaire initiale : de l'ordre de 10<sup>4</sup> cellules.ml<sup>-1</sup>

Témoins blancs : 6 erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 100 ml de milieu d'essai y compris l'inoculum algal et 10 ml de concentré nutritif.

Témoins solvant : 3 erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 100 ml de milieu d'essai, y compris l'inoculum algal, 10 ml de concentré nutritif et le solvant utilisé pour la dissolution de la substance d'essai à la même concentration que dans l'essai.

Solutions d'essai : 3 erlenmeyers de 250 ml contenant chacun 100 ml de milieu d'essai, y compris l'inoculum algal, 10 ml de concentré nutritif et la substance à la concentration souhaitée.

L'intensité lumineuse au niveau des solutions d'essai est comprise entre 6000 et 8000 lux. Le dégagement de chaleur provoqué par le dispositif d'éclairage est compensé par la température de la pièce (19 ± 2°C).

Température dans les récipients d'essai : 23°C ± 2°C.

Agitation rotative à 150 tr.min<sup>-1</sup>.

Durée d'exposition : 72 heures

Comptage des cellules algales à 24, 48 et 72 heures.

#### 2.1.1.2.6 Appareillage

Balance de précision, tables d'agitation orbitale réglées à 150 tours/min, hotte à flux laminaire, autoclave, luxmètre, pH mètre, sonificateur, compteur de particules (COULTER COUNTER) et thermo-enregistreur.

#### 2.1.1.2.7 Mesures

Comptage des cellules algales à l'aide d'un compteur de particules (COULTER COUNTER) après 24, 48 et 72 heures d'incubation.

Température : un thermo-enregistreur placé dans le local pendant l'essai permet d'enregistrer la température pendant la durée de l'essai. La température de l'eau dans un récipient placé dans les conditions de l'essai est mesurée au moins une fois au cours de l'essai.

pH : mesuré à T0 et T72h dans un récipient par concentration et dans tous les récipients témoins.

#### 2.1.1.2.8 Substance de référence

Un essai est réalisé périodiquement avec une substance de référence (bichromate de potassium) afin de vérifier la sensibilité du réactif biologique. Les valeurs de CE<sub>50</sub> précisées dans les textes de référence pour cette substance sont les suivantes :

CE<sub>b50</sub>(0-72h)<sup>9</sup> comprise entre 0,20 et 0,75 mg.l<sup>-1</sup>,

CE<sub>t50</sub>(0-72h)<sup>10</sup> comprise entre 0,60 et 1,03 mg.l<sup>-1</sup>.

Ces valeurs sont des valeurs moyennes d'un essai interlaboratoire.

Les résultats obtenus pendant la durée des essais réalisés sur les HAP sont indiqués dans le Tableau 7

Tableau 7 : Essais 72h *Pseudokirchneriella subcapitata* sur substance de référence (K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>).

Date	CE <sub>b50</sub> (0-72h)	CE <sub>t50</sub> (0-72h)
16 au 19 février 1998	0,32 mg.l <sup>-1</sup> (0,45-0,55 mg.l <sup>-1</sup> )	0,85 mg.l <sup>-1</sup> (0,74-0,95 mg.l <sup>-1</sup> )
30 mars au 2 avril 1998	0,42 mg.l <sup>-1</sup> (0,34-0,51 mg.l <sup>-1</sup> )	0,86 mg.l <sup>-1</sup> (0,77-0,96 mg.l <sup>-1</sup> )
25 au 28 mai 1998	0,40 mg.l <sup>-1</sup> (0,32-0,51 mg.l <sup>-1</sup> )	1,05 mg.l <sup>-1</sup> (0,92-1,23 mg.l <sup>-1</sup> )
6 au 9 juillet 1998	0,37 mg.l <sup>-1</sup> (0,29-0,48 mg.l <sup>-1</sup> )	0,84 mg.l <sup>-1</sup> (0,66-1,08 mg.l <sup>-1</sup> )
8 au 11 septembre 1998	0,45 mg.l <sup>-1</sup> (0,41-0,49 mg.l <sup>-1</sup> )	1,03 mg.l <sup>-1</sup> (0,93-1,17 mg.l <sup>-1</sup> )
13 au 16 octobre 1998	0,42 mg.l <sup>-1</sup> (0,28-0,61 mg.l <sup>-1</sup> )	0,84 mg.l <sup>-1</sup> (0,58-1,20 mg.l <sup>-1</sup> )
23 au 26 février 1999	0,22 mg.l <sup>-1</sup> (0,18-0,26 mg.l <sup>-1</sup> )	0,67 mg.l <sup>-1</sup> (0,59-0,77 mg.l <sup>-1</sup> )

Ces essais ont été réalisés parallèlement aux essais sur HAP.

#### 2.1.1.2.9 Validité des résultats

Un essai est considéré comme valide lorsque le pourcentage d'inhibition de la croissance algale du lot témoin solvant par rapport au lot témoin est inférieur ou égal à 10% et lorsque les deux critères suivants sont simultanément satisfaits :

La concentration cellulaire dans les cultures témoins doit avoir été multipliée par un facteur supérieur à 16 sur la période d'essai de 3 jours.

<sup>9</sup> CE<sub>b50</sub> : effet sur la biomasse algale

<sup>10</sup> CE<sub>t50</sub> : effet sur le taux de croissance algale

Le pH des solutions témoins ne doit pas varier de plus de 1,5 unités pendant la durée de l'essai.

### **2.1.1.3 Toxicité chronique vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia***

#### **2.1.1.3.1 Principe**

L'essai consiste à déterminer dans des conditions définies, la toxicité de la substance testée vis-à-vis d'un microcrustacé d'eau douce, *Ceriodaphnia dubia*. Les effets mesurés sont la survie et la reproduction des organismes. L'essai dure 7 jours et se déroule en conditions semi-statiques. En fin d'essai, le pourcentage de mortalité est calculé pour chaque lot d'organismes. Le nombre de jeunes produits en 7 jours par chaque lot de cériodaphnies est comparé au nombre de jeunes produits par le lot de cériodaphnies témoin.

#### **2.1.1.3.2 Protocole expérimental**

Les essais sont réalisés selon le protocole expérimental décrit dans le projet de norme en cours d'élaboration à l'AFNOR.

Les résultats obtenus sont exprimés sous forme de  $CE_{10-7j}$ , concentration de la substance testée qui entraîne une inhibition de 10% de la reproduction des cériodaphnies par rapport aux cériodaphnies du lot témoin.

Tous les jours ouvrés de la semaine, à l'occasion du renouvellement du milieu d'essai, la survie des cériodaphnies mères est enregistrée ainsi que le nombre de jeunes qu'elles ont produits.

La  $CE_{10-7j}$  et son intervalle de confiance à 95% sont déterminés lorsque cela est possible.

#### **2.1.1.3.3 Système d'essai**

*Ceriodaphnia dubia* âgées de moins de 24 h, issues de portées d'au moins huit jeunes, de génitrices âgées de 6 à 14 jours sélectionnées à partir d'un élevage maintenu au laboratoire d'écotoxicologie de l'INERIS.

#### **2.1.1.3.4 Milieu d'essai**

Le milieu d'essai utilisé est une eau minérale naturelle commercialisée : l'eau d'Evian.

Ses caractéristiques minérales sont les suivantes:

- Calcium :	78 mg.l <sup>-1</sup>
- Magnésium :	24 mg.l <sup>-1</sup>
- Sodium :	5 mg.l <sup>-1</sup>
- Potassium :	1 mg.l <sup>-1</sup>
- Bicarbonates :	357 mg.l <sup>-1</sup>
- Sulfates :	10 mg.l <sup>-1</sup>
- Chlorures :	4,5 mg.l <sup>-1</sup>
- Nitrates :	3,8 mg.l <sup>-1</sup>

L'eau minérale est aérée jusqu'à saturation en oxygène dissous.

Ses caractéristiques physico-chimiques après aération sont :

- pH :	8,1 ± 0,4
- O <sub>2</sub> :	> 7,0 mg.l <sup>-1</sup>
- Conductivité :	460 ± 100 μs.cm <sup>-1</sup>
- Dureté :	240 mg CaCO <sub>3</sub> .l <sup>-1</sup> ± 40 mg

#### 2.1.1.3.5 Conditions d'essai

Récipients : Flacons en verre d'une capacité de 90 ml, fermés par des bouchons à vis.

Charge : 1 cériodaphnie par flacon. Chaque flacon contient 50 ml de solution d'essai.

Témoins : 10 flacons contenant chacun 50 ml de milieu d'essai, y compris la nourriture nécessaire à la croissance et à la survie des organismes.

Témoins solvant : 10 flacons contenant chacun 50 ml de milieu d'essai, y compris la nourriture et le solvant utilisé pour solubiliser la substance, à une concentration identique à celle de tous les lots de substance à tester.

Solutions d'essai : 10 flacons contenant chacun 50 ml de milieu d'essai, y compris la nourriture, la substance à la concentration souhaitée et le solvant à une concentration identique à celle de la plus forte concentration testée.

Alimentation: Suspensions d'algues :

- *Chlorella vulgaris* : 12.10<sup>7</sup> cellules/l

- *Pseudokirchneriella subcapitata* : 6.10<sup>7</sup> cellules/l

- Nourriture pour poissons (Séra micron broyé) : 500 μl.l<sup>-1</sup> d'une solution à 5 g.l<sup>-1</sup>

Température : 25°C ± 2°C

Aération : néant

Éclairage : cycle lumière / obscurité = 16 h/8 h. Intensité lumineuse inférieure à 500 lux.

Durée d'exposition : 7 jours

Renouvellement : les solutions d'essai, témoins y compris, sont renouvelées 5 fois dans la semaine (tous les jours du lundi au vendredi).

Effet toxique: survie et reproduction

Observations : Les cériodaphnies mères mortes sont éliminées ; les vivantes sont transférées dans des solutions d'essai fraîchement préparées. Les cériodaphnies adultes qui se révèlent être des mâles au cours de l'essai sont comptées et éliminées. Les jeunes cériodaphnies vivantes sont comptées et éliminées. La présence de jeunes morts ou d'œufs avortés est notée. Toutes les observations sont effectuées à la loupe binoculaire.

#### 2.1.1.3.6 Appareillage

Oxymètre, pH mètre, conductimètre, loupe binoculaire, balance de précision, thermo-enregistreurs, luxmètre, kit HACH pour la mesure de la dureté calcique totale, sonificateur, enceinte thermostatée illuminée.

#### 2.1.1.3.7 Mesures

pH, oxygène dissous, conductivité et dureté totale calcique sont mesurés sur un récipient des lots témoins et de la plus forte concentration testée, avant renouvellement du milieu d'essai.

Un thermo-enregistreur placé dans le local pendant l'essai permet d'enregistrer la température pendant la durée de l'essai.

#### **2.1.1.3.8 Substance de référence**

Aucune substance de référence n'étant préconisée pour l'essai de toxicité chronique vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia*, la sensibilité des organismes est vérifiée par le respect des critères de validité de l'essai.

#### **2.1.1.3.9 Validité des résultats**

Un essai est considéré comme valide lorsque le pourcentage d'inhibition de la reproduction du lot de cériodaphnies témoins solvant par rapport au lot de cériodaphnies témoins est inférieur ou égal à 20% et lorsque les quatre critères suivants sont simultanément satisfaits :

1. Le pourcentage de mortalité des cériodaphnies dans l'ensemble des récipients témoins est  $\leq 20\%$ .
2. Le pourcentage de cériodaphnies mâles dans l'ensemble des récipients témoins est  $\leq 20\%$ .
3. Au moins 60% des mères vivantes en fin d'essai ont produit un minimum de 3 portées.
4. 60% des mères vivantes en fin d'essai ont produit au moins 15 jeunes.

#### **2.1.2 Mesure des concentrations d'essai**

Les HAP sont peu à très peu solubles dans l'eau, les valeurs de solubilité constatées dans la littérature sont très variables et obtenues dans des conditions très particulières (en général en eau pure) (Cf. Tableau 8). Nous avons donc essayé d'obtenir des concentrations en HAP les plus proches possibles de leur limite théorique de solubilité dans l'eau.

L'analyse des HAP a été effectuée dans certains cas pour vérifier les concentrations réelles mises en œuvre au début des essais écotoxicologiques, mais également au cours d'essais "virtuels" sur des mélanges des 16 HAP pour étudier l'évolution des concentrations au cours du temps.

Les limites de détection dans ce rapport correspondent à une concentration égale à 3 fois le bruit de fond du plus faible étalon de référence utilisé. Ce ne sont pas des limites de quantification.

Tableau 8 : Limites de solubilité relevées dans la littérature pour les 16 HAP.

Nom	n° CAS	identification laboratoire	Solubilité <sup>1</sup> ( $\mu\text{g.l}^{-1}$ à 25 °C)	référence bibliographique
Benzo(k)fluoranthène	207-08-9	98/Ba649/1	1,5	Swartz R.C. <i>et al.</i> , 1995, cités par Pelletier M.C. <i>et al.</i> , 1997
			1,1	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
Benzo(a)anthracène	56-55-3	98/Ba649/2	9,4	May W.E., 1980
			13	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
Benzo(b)fluoranthène	205-99-2	98/Ba649/3	1,5	Swartz R.C. <i>et al.</i> , 1995, cités par Pelletier M.C. <i>et al.</i> , 1997
Benzo(ghi)pérylène	191-24-2	98/Ba649/4	0,26	U.S. EPA 440/4-81-014, 1982 cités par Pelletier M.C. <i>et al.</i> , 1997
			0,137	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
Benzo(a)pyrène	50-32-8	98/Ba649/5	3,8	Callahan M.A., <i>et al.</i> , 1979 cités par Pelletier M.C. <i>et al.</i> , 1997
			1,82	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
Dibenzo(ah)anthracène	53-70-3	98/Ba649/6	0,5	U.S. EPA 440/4-81-014, 1982 cité par Pelletier M.C. <i>et al.</i> , 1997
Acénaphène	83-32-9	98/Ba649/7	3940	Miller <i>et al.</i> , cité par U.S. EPA/822/R-93/013
Acénaphthylène	208-96-8	98/Ba649/8	16100	fiche HSDB
Anthracène	120-12-7	98/Ba649/9	44,6	May W.E., 1980
			93	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
Fluorène	86-73-7	98/Ba649/10	1685	May W.E., 1980
Chrysène	218-01-9	98/Ba649/11	1,8	May W.E., 1980
			1,5	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
Fluoranthène	206-44-0	98/Ba649/12	206	May W.E., 1980
			207	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
Indéno(1,2,3-cd) pyrène	193-39-5	98/Ba649/13	530	U.S. EPA 440/4-81-014, 1982 cité par Pelletier M.C. <i>et al.</i> , 1997
Naphtalène	91-20-3	98/Ba649/14	34800	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
			31700	May W.E., 1980
Phénanthrène	85-01-8	98/Ba649/15	823	P. Gert-Jan de Maagd <i>et al.</i> , 1998
			1002	May W.E., 1980
Pyrène	129-00-0	98/Ba649/16	132	May W.E., 1980
			164	M. Bouchez <i>et al.</i> , 1996
			130	U.S. EPA 440/4-81-014, 1982 cité par Pelletier M.C. <i>et al.</i> , 1997

### 2.1.2.1 Protocoles d'analyse

#### 2.1.2.1.1 Dosages directs

Lorsque les concentrations sont suffisamment élevées, les HAP peuvent être directement dosés par Chromatographie Liquide Haute Performance (HPLC) en phase inverse à 30°C avec une double détection fluorimétrique et UV. Cette méthode évite de passer par une phase d'extraction avec un solvant.

##### 2.1.2.1.1.1 Matériels utilisés:

- Ensemble HPLC comprenant:
  - Passeur d'échantillon,
  - Pompe à gradient,
  - Détecteur fluorimétrique,
  - Détecteur UV,
  - Four pour colonne (permet d'obtenir des temps de rétention répétables),
  - Colonne Supelcosil LC-PAH Ref. 5-8229 Supelco,
  - Ensemble d'acquisition.
- Fioles jaugées et pipettes étalons de classe A (verrerie nettoyée avec un tensioactif puis rincée à l'eau et séchée à l'acétone)
- Matériel de filtration sous vide et filtre millipore 0.45µm pour eau et solvant.

##### 2.1.2.1.1.2 Réactifs:

- Acétonitrile de qualité HPLC
- Eau milliQ
- Solution étalon contenant les 16 HAP de la liste EPA à 2000µg/ml SUPELCO avec certificat d'analyse et date de péremption.

##### 2.1.2.1.1.3 Conditions chromatographiques:

- Volume injecté : 20µl
- Débit d'éluant : 1.5ml/minute
- Eluants : eau  
Acétonitrile (filtré sous vide)
- Gradient d'élution:

Tableau 9 : Caractéristiques du gradient d'élution utilisé pour le dosage des HAP

Temps	eau en %	Acétonitrile en %
0	45	55
15	45	55
60	0	100
65	45	55

##### 2.1.2.1.1.4 Paramètres de détection:

- Fluorimètre: programme avec 8 changements de longueur d'onde

- UV: longueur d'onde fixée à 228nm (spécifique de l'acénaphthylène qui n'est pas fluorescent)

#### 2.1.2.1.1.5 Analyse:

Après injection de la gamme d'étalonnage et vérification de la linéarité (4 points minimum), on injecte les solutions à analyser.

La concentration de chaque HAP dans la solution à analyser est déterminée par étalonnage externe à partir d'une courbe d'étalonnage.

#### 2.1.2.1.2 Dosages après extraction

Lorsque les concentrations sont trop faibles, les HAP sont quantifiés après une extraction liquide-liquide par du cyclohexane.

##### 2.1.2.1.2.1 Références normatives:

NF T90-115

##### 2.1.2.1.2.2 Matériels utilisés:

- Verrerie courante de laboratoire calcinée à 450°C
- Évaporateur ZYMARK

##### 2.1.2.1.2.3 Réactifs:

- Acétonitrile de qualité HPLC
- Sulfate de sodium anhydre de qualité normapur
- Cyclohexane de qualité HPLC

##### 2.1.2.1.2.4 Mode opératoire de l'extraction liquide-liquide

L'échantillon d'eau de l'essai biologique, mesuré précisément, est introduit dans une ampoule à décanter. Le flacon d'échantillonnage est rincé avec 10 ml de cyclohexane de qualité HPLC que l'on transvase dans l'ampoule. On agite pendant 3 minutes, on laisse décanter et on récupère la phase organique. On répète cette opération une deuxième fois.

La totalité de la phase organique est séchée par du sulfate de sodium anhydre. L'extrait cyclohexanique, concentré à l'aide du TURBOVAP (ZYMARK) jusqu'à 100µl est amené à 1 ml d'Acétonitrile puis analysé par HPLC.

#### 2.1.2.2 Détermination des concentrations initiales d'essai

Compte tenu des difficultés rencontrées pour la mise en solution des HAP, un certain nombre de solutions mères ont été dosées en début d'essai. Les concentrations des solutions d'essai obtenues par dilution de solutions mères ont ensuite été extrapolées à partir des résultats de l'analyse de la solution mère. Dans de nombreux cas l'analyse chimique nous a permis de constater que les valeurs obtenues étaient assez loin des valeurs théoriques et que le comportement de la substance dépendait du milieu d'essai.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer ces différences :

- Les milieux d'essai utilisés pour les essais écotoxicologiques sont des milieux complétés en sels minéraux et parfois en matière organique pour permettre la survie

et le développement des organismes d'essai. Tous ces composés ajoutés contribuent à limiter la solubilisation des HAP.

- Les milieux d'essais sont également saturés en oxygène dissous avant d'être utilisés. Or, la fluorescence des hydrocarbures aromatiques polycycliques peut être inhibée par des composés tels que l'oxygène présent en solution (Garrigues et Raoux, 1997)

#### 2.1.2.2.1 Stabilité des HAP au cours du temps

Certains HAP sont volatils et ne subsistent pas dans les milieux d'essai. Parfois ils sont dégradables, notamment sous l'action de la lumière. Afin de connaître avec précision les concentrations dans les milieux d'essais nous avons réalisé des analyses des concentrations des HAP dans les milieux au cours du temps. Le coût unitaire de ces analyses étant élevé nous avons dosé simultanément les 16 HAP dans les milieux d'essais. Ces milieux ont été préparés dans les conditions des essais et contiennent le mélange des 16 HAP aux concentrations utilisées pour les essais biologiques.

Pour chaque type d'essai daphnies, algues et cériodaphnies, des solutions des 16 HAP à 4 concentrations différentes ont été suivies dans le temps. Les concentrations initiales ont été si possible choisies de manière à encadrer les concentrations pour lesquelles une toxicité était observée.

Dans les blancs (témoins et témoins solvants), aucun HAP n'a jamais été détecté, quelle que soit la méthode de dosage employée. Par conséquent, les résultats du tableau présenté en annexe peuvent être considérés comme les limites de détection des méthodes d'analyse.

Le dosage après extraction ne donne pas les mêmes limites de détection pour les essais daphnies, algues et cériodaphnies en raison de la différence de milieu d'essai utilisé. Certains résultats présentés sont inférieurs à la limite de détection déterminée par rapport aux " blancs ". Ces résultats correspondent à des HAP détectés et quantifiés par l'appareil malgré une intégration délicate car proche de la limite de détection. Les résultats ont été considérés comme " inférieurs à la limite de détection " (< LD).

L'influence des produits de dégradation des HAP sur les méthodes de dosages n'a pas été étudiée.

Certains HAP sont considérés comme " légers " et donc susceptibles de disparaître plus rapidement que les autres. Il s'agit des 5 HAP suivants : naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène. Pour ces composés, les résultats d'analyses peuvent donc une fois encore sous estimer les concentrations réelles d'essai.

D'une manière générale, les concentrations dans les solutions des essais *Daphnia magna* semblent se maintenir sur 24 heures mais chuter après. Au contraire, les concentrations dans les solutions des essais sur *Pseudokirchneriella subcapitata* chutent significativement lors des premières 24 heures d'essai et se maintiennent un peu mieux ensuite. Les concentrations des essais cériodaphnies sont dans une situation intermédiaire avec une diminution progressive sur 48 heures. La diminution plus rapide des concentrations lors de l'essai *Pseudokirchneriella subcapitata* peut s'expliquer par l'environnement de l'essai, soumis à des intensités lumineuses importantes (6000 à 10000 lux) comparé à l'essai *Daphnia magna* qui lui se fait à l'obscurité.

Les concentrations nominales des 16 HAP de la solution 3 de l'essai *Daphnia magna* étaient suffisamment élevées pour pouvoir prévoir un dosage direct (sans extraction) des solutions d'essai. Les résultats à T0 ont cependant montré qu'un certain nombre de HAP étaient déjà en limite de détection de la méthode analytique. Il a donc été décidé de réaliser également une extraction liquide/liquide sur ces solutions pour affiner certains résultats analytiques. Le planning des dosages étant déjà très chargé, ces analyses supplémentaires n'ont pu être réalisées que 24 heures après le prélèvement. En attendant, les échantillons ont été conservés au réfrigérateur à l'obscurité. Le délai de 24 heures entre le prélèvement et l'extraction a été conservé pour les trois temps de prélèvement : T0, T24 et T 48 heures.

Pour les HAP les plus lourds (Anthracène, Fluoranthène, Pyrène, Benzo(a)Anthracène, Chrysène, Benzo(b)Fluoranthène, Benzo(k)Fluoranthène, Benzo(a)Pyrène, Dibenz(a,h)Anthracène, Benzo(g,h,i)Pérylène et Indéno(1,2,3,cd)Pyrène), on peut considérer que les concentrations ont été maintenues stables au cours de ces 24 heures de stockage. D'ailleurs, la comparaison des résultats des tableaux du rapport d'analyse en annexe montre que les concentrations obtenues après extraction sont égales voire supérieures aux concentrations obtenues par dosage direct. En particulier, les résultats ont pu être affinés pour l'Anthracène, le Fluoranthène, le Pyrène, le Benzo(b)Fluoranthène et l'Indéno(1,2,3,cd)Pyrène.

En revanche, pour les HAP les plus légers, (Naphtalène, Acénaphtylène, Acénaphtène, Fluorène et Phénanthrène), les 24 heures de stockage ont entraîné une perte significative de chaque substance : les concentrations obtenues après extraction sont largement inférieures aux concentrations obtenues par dosage direct. Pour ces 5 HAP, les résultats des dosages directs ont donc de préférence été utilisés tandis que pour les 11 autres HAP, le résultat du dosage après extraction a été préférentiellement considéré.

Il est difficile de déterminer la contribution du phénomène d'adsorption sur les algues dans la différence de concentrations observée sur les solutions avec et sans algues. En effet, les solutions avec algues ont été soumises à une centrifugation pour séparer les algues du milieu d'essai. Lors de cette centrifugation, des pertes de substances par volatilisation ou par adsorption sur les parois peuvent avoir eu lieu, biaisant ainsi les résultats de l'analyse.

### **2.1.2.3 Stabilité de chacun des 16 HAP au cours des essais daphnies, algues et cériodaphnies : " arbre de décision "**

Un des objectifs des analyses réalisées sur le mélange des 16 HAP soumis à des conditions identiques à celles des essais d'écotoxicité est d'évaluer la stabilité des solutions dans le temps afin d'extrapoler les " concentrations réelles d'essai ". En effet, l'utilisation de la concentration nominale ou bien de la concentration en début d'essai conduit, lorsque le produit disparaît du milieu à surestimer les concentrations toxiques. Cela pourrait conduire, si l'on n'y prenait garde à définir des seuils de qualités trop peu protecteurs. Le problème revient donc de trouver des concentrations toxiques équivalentes de produits stables qui auraient présenté la même toxicité.

Pour chaque HAP et pour chaque type d'essai, une courbe de stabilité est sélectionnée en fonction des critères listés ci-dessous. C'est à partir de cette courbe de stabilité que les concentrations réelles d'essai seront recalculées pour tenir compte de la décroissance de la dose d'exposition. Sur les tableaux du rapport d'analyse figurant en annexe nous avons indiqué en caractères gras, pour chaque HAP, la série d'analyse retenue pour le calcul de la variation de la concentration en fonction du temps

Les critères de sélection des séries analytiques sont les suivants :

1. Concentration de la solution d'analyse proche des concentrations de l'essai d'écotoxicité
2. Pertinence et fiabilité de la méthode d'analyse : elle dépend pour chaque HAP de la méthode d'analyse et de la gamme de concentrations testée :
3. Pour les HAP " légers ", seuls les résultats de l'analyse en direct sont considérés. Pour les HAP " lourds ", le choix des résultats analytiques à prendre en compte est fait en fonction de l'adéquation de la concentration dosée avec celle de l'essai écotoxicologique considéré, du rapport concentration mesurée / concentration théorique ( $> 0.3$  ) et de la situation des concentrations dosées par rapport à la limite de détection analytique ( $> 2$  fois la limite de détection).

### **2.1.3 Calcul des paramètres d'effet toxique**

#### **2.1.3.1 Calcul ne tenant pas compte de la variation temporelle de concentration**

Nous avons utilisé une méthode de régression non linéaire à partir de l'équation de Hill sur les jeux de données brutes des expérimentations. L'équation de Hill est la suivante :

$$Y = \frac{C^n}{CE_{50}^n + C^n} \quad (1)$$

où C représente la concentration d'exposition,  $CE_{50}$  la concentration effectrice 50 et n le nombre de Hill, paramètre qui décrit la pente de la courbe au voisinage de la  $CE_{50}$ .

La valeur de Y représente la probabilité d'inhibition du paramètre biologique mesuré, on retrouve la valeur mesurée en multipliant  $1-Y$  par la valeur mesurée du témoin. Connaissant l'équation de Hill on peut facilement retrouver les  $CE_X$  pour tout X en calculant C pour  $Y=X$ .

Les paramètres de l'équation de Hill sont ajustés par régression non linéaire avec l'algorithme de Marquardt. Une simulation " Bootstrap " sur les données répliquées de départ permet d'estimer de façon totalement non paramétrique les intervalles de confiance sur les paramètres ainsi que sur les différentes  $CE_X$  calculées. Les intervalles de confiance à 95% et 99% ont été systématiquement estimés et figurent dans les tableaux en annexe, nous utiliserons pour la suite de cette étude les valeurs à 95%.

Ces calculs ont été réalisés à partir d'un programme que nous avons développé en langage " Visual basic for applications " pour le tableur Microsoft® Excel™. Les résultats bruts de ces calculs sont montrés en annexe ainsi que les graphes permettant de juger de la qualité de l'ajustement. Ces résultats sont à prendre avec précautions dans les cas où la toxicité n'apparaît pas de façon significative aux plus hautes concentrations. Nous avons préféré dans ces cas indiquer que la toxicité n'était pas atteinte en dessous de la limite de solubilité de la substance. Nous verrons au chapitre 2.1.5 page 48 comment dans ces cas, l'utilisation d'une relation structure activité simple permet néanmoins de conclure.

#### **2.1.3.2 Prise en compte de concentrations instables dans le temps**

Ce cas se rencontre essentiellement pour les essais sur algue du fait de la photodégradation des HAP et du non-renouvellement des milieux pendant toute la durée de l'essai soit 72

heures. Ce phénomène est important et conduit si l'on n'en tient pas compte à une sous estimation de la toxicité des HAP.

Nous avons développé un modèle spécifique à l'essai algue en tenant compte de la dégradation de la concentration de la substance.

### 2.1.3.2.1 Description du modèle de croissance algale en présence d'un toxique en concentration décroissante

Celle ci est considérée comme une réaction d'ordre 1 de constante cinétique k dont l'équation différentielle est la suivante :

$$\frac{dC}{dt} = -kC$$

l'intégration de cette équation différentielle conduit au résultat suivant :

$$C = C^0 e^{-kt} \quad (2)$$

où C est la concentration et C<sup>0</sup> la concentration à t=0.

On peut calculer la constante de dégradation k pour chaque substance dans le milieu d'essais algues en ajustant cette fonction aux données d'analyse de la substance obtenues à 0, 24, 48 et 72 heures. Cette méthode permet de connaître la concentration à chaque instant et de prendre en outre en considération plusieurs valeurs de dosages, donc d'augmenter la précision.

La croissance algale est supposée suivre une loi logistique classique, c'est à dire une croissance initialement exponentielle limitée ensuite par la capacité d'accueil du milieu. Cette loi d'accroissement de population est classiquement utilisée pour décrire la dynamique des populations en écologie. Elle s'applique également aux essais sur algue, nous avons d'ailleurs constaté que, contrairement à notre attente, la capacité d'accueil du système d'essai était loin d'être assimilable à l'infini et qu'on ne pouvait pas considérer la croissance comme une simple exponentielle.

L'équation de ce phénomène est la suivante :

$$\frac{dN}{dt} = rN \left( 1 - \frac{N}{K} \right) \quad \text{où } N \text{ représente l'effectif (ici un nombre de cellules algales), } r \text{ est le taux d'accroissement de la population et } K \text{ la capacité d'accueil du système.}$$

L'intégration est la suivante :

$$\frac{dN}{N \left( 1 - \frac{N}{K} \right)} = r dt$$

$$\text{or } \int \frac{dx}{(a + bx)(c + dx)} = \frac{1}{ad - bc} \ln \left| \frac{c + dx}{a + bx} \right|$$

$$\text{d'où : } \ln \frac{1 - \frac{N}{K}}{N} = -rt + \text{cte}$$

et

$$N = \frac{1}{\frac{e^{-rt}}{N^0} + \frac{(1 - e^{-rt})}{K}} \quad (3)$$

L'équation 3 sera utilisée pour décrire la croissance des témoins durant l'essai, on peut initialement ajuster ses paramètres sur les valeurs de population algale des témoins.

L'effet toxique est alors considéré comme perturbant le taux de croissance de la population algale ( $r$ ) via l'équation de Hill. Ici la  $CE_{50}$  est relative à ce taux d'accroissement de population, il ne s'agit pas de la concentration inhibant 50% de la biomasse algale, la relation entre le taux d'accroissement et la biomasse n'étant pas linéaire. Par ailleurs cette  $CE_{50}$  est une  $CE_{50}$  instantanée correspondant à la constante d'équilibre du mécanisme de toxicité mis en jeu. L'équation de l'inhibition s'écrit dans ce cas comme suit (Nous avons simplement écrit  $r = r^0(1 - H(C))$  où  $H$  est l'équation de Hill décrite précédemment, puis divisé le numérateur et le dénominateur par  $C^n$  afin de faciliter l'intégration de cette équation) :

$$r = r^0 \frac{\left(\frac{C_{50}}{C}\right)^n}{1 + \left(\frac{C_{50}}{C}\right)^n}$$

En remplaçant  $C$  par sa valeur dans l'équation 1 on obtient :

$$r = r^0 \frac{\left(\frac{C_{50}}{C^0 e^{-kt}}\right)^n}{1 + \left(\frac{C_{50}}{C^0 e^{-kt}}\right)^n} \text{ qui s'écrit également : } r = r^0 \frac{\left(\frac{C_{50}}{C^0}\right)^n e^{knt}}{1 + \left(\frac{C_{50}}{C^0}\right)^n e^{knt}}$$

En remplaçant  $r$  par sa valeur dans l'équation différentielle ci-dessus on obtient l'équation différentielle du système complet :

$$\frac{dN}{N\left(1 - \frac{N}{K}\right)} = r^0 \frac{\left(\frac{C_{50}}{C^0}\right)^n e^{knt}}{1 + \left(\frac{C_{50}}{C^0}\right)^n e^{knt}} dt$$

On remarque que le deuxième terme s'écrit  $\frac{u'}{u}$  au facteur  $kn$  près ce qui autorise à intégrer cette équation différentielle en :

$$\ln\left(\frac{1 - \frac{N}{K}}{N}\right) = -\frac{r^0}{kn} \ln\left(1 + \left(\frac{C_{50}}{C^0}\right)^n e^{knt}\right) + cte$$

Après exponentiation et identification de la constante telle que l'effectif est  $N^0$  pour  $t=0$  il vient :

$$N = \left\{ \frac{1}{K} + \frac{\left[1 + \left(\frac{C_{50}}{C^0}\right)^n e^{knt}\right]^{-\frac{r^0}{kn}}}{1 + \left(\frac{C_{50}}{C^0}\right)^n} \left(\frac{1}{N^0} - \frac{1}{K}\right) \right\}^{-1} \quad (4)$$

qui est l'équation du phénomène d'inhibition de la croissance algale par un toxique disparaissant au cours du temps.

Cette équation peut être ajustée en plusieurs étapes en utilisant la fonction "solveur" d'Excel™. On ajuste en premier lieu l'équation 2 aux concentrations mesurées du toxique provenant du rapport d'analyses, on en déduit la valeur du paramètre  $k$ . On calcule ensuite le taux de croissance algale  $r$  et la capacité d'accueil du système  $K$  en ajustant l'équation 3 aux valeurs obtenues dans les lots témoins sans toxique. Il reste alors à calculer les deux paramètres de l'équation de Hill en ajustant l'équation 4 aux résultats de l'essai complet avec les valeurs de  $k$ ,  $r^0$  et  $K$  déjà calculées. On peut affiner le calcul en réalisant alors un ajustement complet de l'équation 4 avec les quatre paramètres ( $k$  est exclu car il est calculé de façon plus précise avec les données analytiques).

#### 2.1.3.2.2 Calcul de la $CE_{10}$ sur la croissance de la biomasse

La  $CE_{10}$  est la concentration qui inhibe de 10% la biomasse algale produite. Il s'agit de calculer la concentration stable qui produirait une inhibition de la biomasse de 10%. Le calcul de la  $CE_{10}$  peut donc se faire à partir de la  $CE_{50}$  instantanée en considérant cette fois une concentration stable dans le temps. L'équation est alors la suivante :

$$N(C, t) = \left[ \left(\frac{1}{N^0} - \frac{1}{K}\right) e^{-\frac{r^0 t}{1 + \left(\frac{C}{C_{50}}\right)^n}} + \frac{1}{K} \right]^{-1} \quad \text{d'où il vient :}$$

$$C = C_{50} \left( \frac{\frac{r^0 t}{\ln\left(\frac{\frac{1}{N^0} - \frac{1}{K}}{\frac{1}{N} - \frac{1}{K}}\right)} - 1}{1} \right)^{\frac{1}{n}}$$

La CEx est la valeur de C telle que N est égal à  $N(0,t) \cdot (1-x)$ . On peut calculer ainsi une CE<sub>10</sub> 72 heures par exemple, ce qui correspond à l'effet qu'aurait la substance sur la biomasse algale dans le cas où elle ne disparaîtrait pas du milieu. C'est cette valeur de CE<sub>10</sub> 72 heures sur la biomasse que nous avons calculée pour chacun des essais sur *Pseudokirchneriella subcapitata*. Il est également intéressant de calculer la CE<sub>10</sub> 72h que l'on obtiendrait si la capacité d'accueil du système était infinie, cela revient à remplacer 1/K par 0 dans l'équation précédente.

En effet au sein des hydrosystèmes naturels la population algale correspond à la production primaire d'hydrocarbures à partir de dioxyde de carbone et de la lumière solaire. La limitation des populations algales, sauf cas particulier des systèmes dystrophes, est limitée non par la capacité d'accueil du système mais par la pression de prédation des herbivores. Il nous apparaît donc plus judicieux de baser nos calculs de concentration inhibitrice sur la croissance non limitée par la capacité d'accueil du système. Cette CE<sub>10</sub> correspond au potentiel de croissance de la culture sans limitation, c'est celle que nous avons utilisée pour la suite de cette étude.

Le " solveur " d'Excel™ se prêtant assez mal à un re-échantillonnage de type " Bootstrap " sans l'écriture d'un programme spécifique nous n'avons pas pu calculer les intervalles de confiance sur les CE<sub>10</sub> ainsi calculées. On peut cependant estimer ces intervalles de confiance en utilisant les intervalles de confiance relatifs calculés par régression non linéaire et re-échantillonnage " Bootstrap " décrite au chapitre 2.1.3.1 page 40.

Ce modèle sera utilisé pour les essais sur algue dans le cas où les HAP disparaîtraient de façon significative du milieu d'essai.

### 2.1.3.2.3 Cas des essais sur invertébrés

Dans le cas des essais sur *Ceriodaphnia dubia*, le renouvellement du milieu tous les jours ouvrés de la semaine modifie le problème, l'intoxication est ainsi plus constante. De plus cette espèce est de taille plus importante que les cellules algales ce qui permet d'imaginer un mécanisme de pénétration des substances toxiques non immédiat. Enfin, la croissance des cériodaphnies durant l'essai modifie leur sensibilité au toxique tout au long de l'essai.

Il paraît illusoire de modéliser l'ensemble du processus avec un modèle simple susceptible de s'ajuster aux données expérimentales, de plus l'intérêt d'un tel modèle paraît bien moins net que pour les essais sur algues. Dans ce cas les normes en vigueur recommandent l'utilisation de la moyenne géométrique des concentrations selon le calcul suivant tiré du projet de document guide OCDE de Mars 1999 sur les essais de toxicité aquatique sur substances difficiles : " Pour les essais statiques et semi-statiques pour lesquels la concentration n'est pas maintenue dans l'intervalle des 20% de la concentration nominale, il est recommandé d'utiliser la moyenne géométrique des concentrations mesurées :

$$\text{moyenne géométrique} = \text{anti log} \left( \frac{1}{2(t_n - t_1)} \sum_{i=1}^{n-1} [(\log(\text{conc}_i) + \log(\text{conc}_{i+1})) \cdot (t_{i+1} - t_i)] \right) "$$

où n est le nombre de renouvellements de la solution d'essai.

Nous avons utilisé ce calcul pour tous les renouvellements des solutions des essais sur cériodaphnie. Le rapport de la concentration corrigée à la concentration nominale est utilisé pour corriger les CE<sub>10</sub> et leurs intervalles de confiance.

Le graphe Figure 1 illustre le type de concentration obtenue dans un essai sur cériodaphnie et la valeur retenue pour le calcul des paramètres de toxicité, celle ci est comparée à la valeur que l'on aurait obtenue par la même opération sur des valeurs de concentrations non transformées en logarithmes.

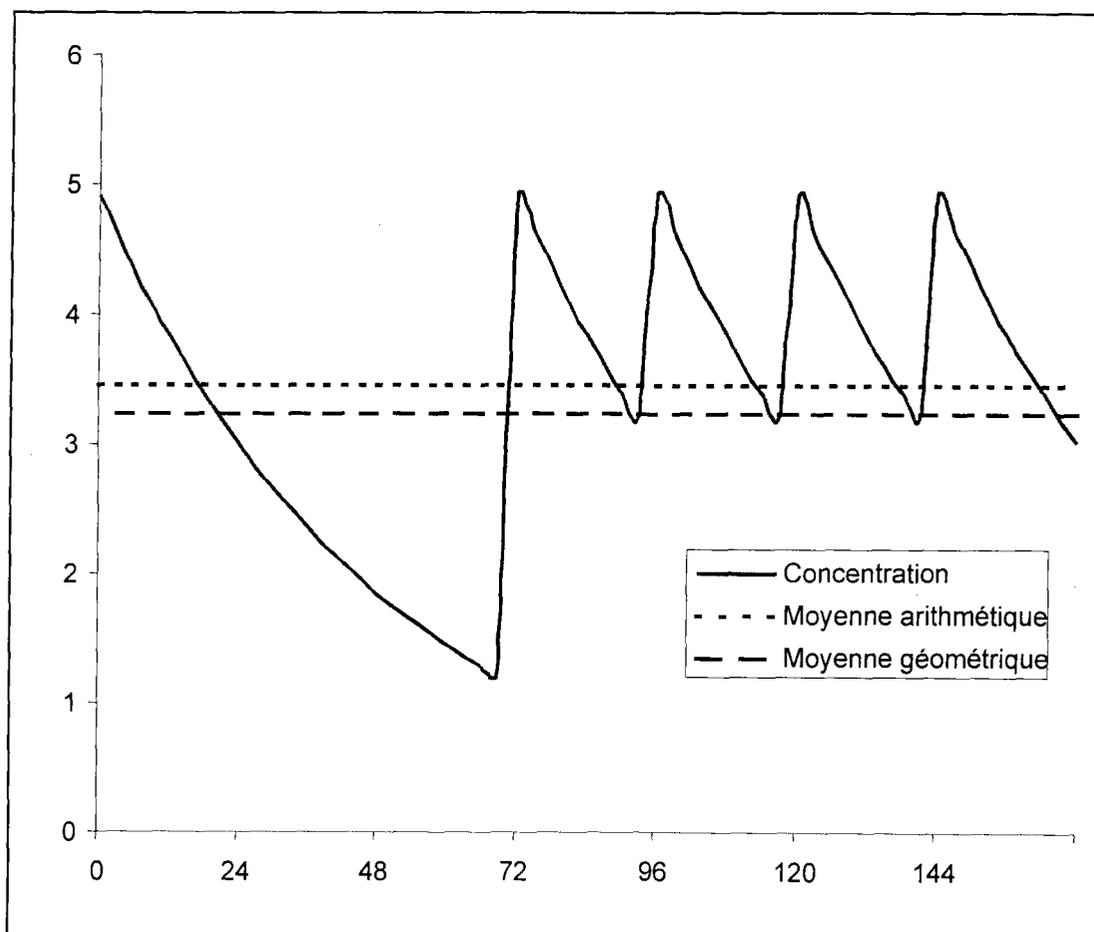


Figure 1 : Variation de la concentration au cours de la durée d'un essai sur Cériodaphnie.

Dans le cas des essais sur *Daphnia magna* nous avons utilisé la moyenne géométrique des concentrations à  $t=0$ , 24 et 48h ce qui revient à modifier les  $CL_{50}$  et leurs intervalles de

confiance en multipliant les concentrations nominales par le rapport :  $\frac{\left(\prod_{t=0}^{48} C_t^m\right)^{\frac{1}{3}}}{C^0}$  où  $C_t^m$  représente la concentration mesurée au temps  $t$  et  $C^0$  la concentration nominale.

## 2.1.4 Résultats des essais

### 2.1.4.1 Résultat des essais sur *Daphnia magna*

Le Tableau 10 rassemble l'ensemble des résultats obtenus à 24 et 48h sur l'immobilisation de *Daphnia magna*. Seuls 5 HAP de la liste EPA se sont révélés toxiques au-dessous de leur limite de solubilité dans l'eau. Les essais sont exprimés en  $CL_{50}$  afin de rendre ce tableau homogène aux pratiques courantes dans la littérature concernant l'écotoxicologie des substances.

On note une toxicité importante du pyrène avec une  $CL_{50}$  48h de 24,6  $\mu\text{g/L}$ . Cet essai étant conduit à l'obscurité aucune photoinduction de toxicité n'est à suspecter sur cette série d'essais.

Tableau 10 : Récapitulatif des  $CL_{50}$  *Daphnia magna* (en  $\mu\text{g/L}$  à 24 et 48h).

Toxicité daphnies Nom	24h			48h		
	$CL_{50}$	IC95-	IC95+	$CL_{50}$	IC95-	IC95+
Benzo(k)fluoranthène	>1.1			>1.1		
Benzo(a)anthracène	>9.1			>9.1		
Benzo(b)fluoranthène	>1.1			>1.1		
Benzo(ghi)pérylène	>0.2			>0.2		
Benzo(a)pyrène	>2.7			>2.7		
Dibenzo(a,h)anthracène	>0.35			>0.35		
Acénaphtène	1204	1106	1305	958	916	994
Acénaphthylène	21506	4454	11918638	1800	1731	1956
Anthracène	>25			>25		
Fluorène	407	389	427	408	368	449
Chrysène	>1.3			>1.3		
Fluoranthène	>112			>112		
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	>357			>357		
Naphtalène	1541.7	1403	1765	1664	1441	1902
Phénanthrène	>400			>400		
Pyrène	165	103	2126	24.6	21.6	28.4

Les colonnes IC95- et IC95+ représentent les intervalles de confiance à 95% sur les  $CL_{50}$ . Ces valeurs tiennent compte des résultats de l'analyse des substances dans les milieux d'essai. Lorsque aucune toxicité n'a été constatée à la limite de solubilité celle-ci a été précisée.

Les rapports d'analyse utilisés sont indiqués en annexe. Les tableaux de données brutes et les modèles d'effet montrés en annexe sont en concentrations nominales.

#### 2.1.4.2 Résultats des essais sur *Pseudokirchneriella subcapitata*

Les valeurs de toxicité constatées sur les essais réalisées sont nettement plus élevées que celles obtenues sur *Daphnia magna*. Outre la sensibilité accrue de *Pseudokirchneriella subcapitata* il faut noter le fait que l'essai sur algues est réalisé en présence d'un éclairage intense alors que l'essai aigu sur *Daphnia magna* se fait à l'obscurité. Ce résultat est en accord avec la littérature scientifique, Mekenyan et al. (1994) ont constaté également une absence de toxicité de la majorité des HAP lors des essais à l'obscurité sur *Daphnia magna* et obtenu un renforcement considérable de cette même toxicité en présence de lumière. Une relation entre une propriété physique de la molécule et la toxicité a été mise en évidence, cette toxicité serait liée à l'énergie de transition électronique entre l'orbitale la plus haute occupée (HOMO) et la plus basse vide (LUMO) comme nous l'avons indiqué au chapitre 1.2 page 15.

Nous avons également constaté, suite aux analyses des substances d'essai, une disparition assez rapide des HAP des solutions d'essai. Le modèle décrit au paragraphe 2.1.3.2.2 page 43 a été utilisé pour calculer les  $CE_{10}$  corrigées de ce phénomène. Il s'agit de valeurs de  $CE_{10}$  correspondant à l'inhibition de 10% de la biomasse produite telles qu'on aurait pu les obtenir avec les mêmes essais conduits sur des substances stables.

Tableau 11 : Récapitulatif des  $CE_{10}$  (en  $\mu\text{g/L}$ ) sur *Pseudokirchneriella subcapitata* à 72h.

Toxicité Algues Nom	$CE_{10}$ à 72 heures en $\mu\text{g/L}$			
	C variable	nominale	IC95-	IC95+
Benzo(k)fluoranthène	>1	>1.5	-	-
Benzo(a)anthracène	1,2	4.1	3.8	4.6
Benzo(b)fluoranthène	>1	>1.5	-	-
Benzo(ghi)pérylène	>0,16	>0.26	-	-
Benzo(a)pyrène	0,78	1.54	1.52	1.57
Dibenzo(a,h)anthracène	0,14	0.73	0.52	1.31
Acénaphène	38	308	266	371
Acénaphtylène	82	595	505	703
Anthracène	7,8	23.3	18.6	27.8
Fluorène	820	485	411	540
Chrysène	>1	>3.9	-	-
Fluoranthène	8,6	33.1	27.8	37.5
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	1,5	5.7	3.6	9.8
Naphtalène	>4270	>8024	-	-
Phénanthrène	26	123.5	80.1	170.4
Pyrène	1,2	12.4	6.7	17.9

La première colonne représente la  $CE_{10}$  modifiée en tenant compte de la perte de substance au cours du temps. Les colonnes IC95- et IC95+ représentent les intervalles de confiance à 95% sur les  $CE_{10}$  calculées à partir de concentrations nominales. Lorsque aucune toxicité n'a été détectée à la limite de solubilité nous avons indiqué cette limite dans la colonne des valeurs nominales, la limite correspondant à une concentration mesurée est alors la moyenne géométrique des concentrations mesurées en fonction du temps dans le lot le plus concentré.

#### 2.1.4.3 Résultats des essais sur *Ceriodaphnia dubia*

Les essais sur *Ceriodaphnia dubia* se sont montrés en général plus sensibles que les essais sur *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Tableau 12 : Récapitulatif des  $CE_{10}$  (en  $\mu\text{g/L}$ ) reproduction sur *Ceriodaphnia dubia* à 7 jours.

Toxicité Cériodaphnie	$CE_{10}$ à 7 jours en $\mu\text{g/L}$			
	Nom	C variable	nominale	IC95- IC95+
Benzo(k)fluoranthène	>1,08	>1.5	-	-
Benzo(a)anthracène	>8,7	>13	-	-
Benzo(b)fluoranthène	>1,083	>1.5	-	-
Benzo(ghi)pérylène	0,082	0.124	0	0.17
Benzo(a)pyrène	0,503	0.77	0.03	2.2
Dibenzo(a,h)anthracène	>0,032	>0.046	-	-
Acénaphène	42	64	50	100
Acénaphthylène	64	95	47	231
Anthracène	>3,4	>4.9	-	-
Fluorène	25	33	28	45
Chrysène	>0,09	>0.13	-	-
Fluoranthène	1,17	1.2	0.2	4.9
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	0,27	0.38	0.0	9.49
Naphtalène	514	999	761	1331
Phénanthrène	13	15	4.7	19
Pyrène	2,1	2.1	1.3	3.1

Les colonnes IC95- et IC95+ représentent les intervalles de confiance à 95% sur les  $CE_{10}$ . Lorsque aucune toxicité n'a été détectée à la limite de solubilité celle-ci est indiquée tant en concentration nominale qu'en concentration variable.

### 2.1.5 Comparaison des résultats des essais chroniques

L'ensemble des résultats obtenus nous offre la possibilité de comparer la toxicité des 16 HAP sur *Ceriodaphnia dubia* et sur *Pseudokirchneriella subcapitata* (Cf. Figure 2 page 49). On note que les crustacés ont toujours été plus sensibles que les algues à ces composés, cependant la différence est très faible. Notre calcul de  $CE_{10}$  corrigée avec le modèle que nous avons décrit précédemment renforce la sensibilité de l'essai sur algues.

Nous avons réalisé la régression des logarithme des  $CE_{10}$  en fonction du logarithme du coefficient de partage octanol eau (Kow). Cette analyse est couramment pratiquée dans l'étude des relations structure activité. Le coefficient de partage octanol eau est un indicateur de l'affinité des substances chimiques pour les lipides. Le mécanisme de l'effet narcotique suppose que la toxicité est liée à la charge des lipides structuraux par les substances toxiques sans qu'intervienne un mécanisme spécifique.

On remarque alors le fait que la toxicité est une fonction linéaire du coefficient de partage octanol-eau, ce qui traduit un effet narcotique lié à l'affinité des composés pour les lipides sans intervention d'un récepteur spécifique.

Les droites de régression ont une pente identique pour les deux essais dans notre modèle car nous avons réalisé la régression sur l'ensemble des données avec une variable qualitative qui différencie algues et cériodaphnies. Les coefficients de partage octanol eau utilisés sont indiqués Tableau 29 page 66.

L'équation de la régression est la suivante :  $\log(CE_{10}) = \beta_0 + \beta_1 sp + \beta_2 \log(K_{ow})$ , où  $sp$  est une variable qualitative représentant l'espèce, les paramètres statistiques de cette régression sont indiqués dans le Tableau 13 page 49.

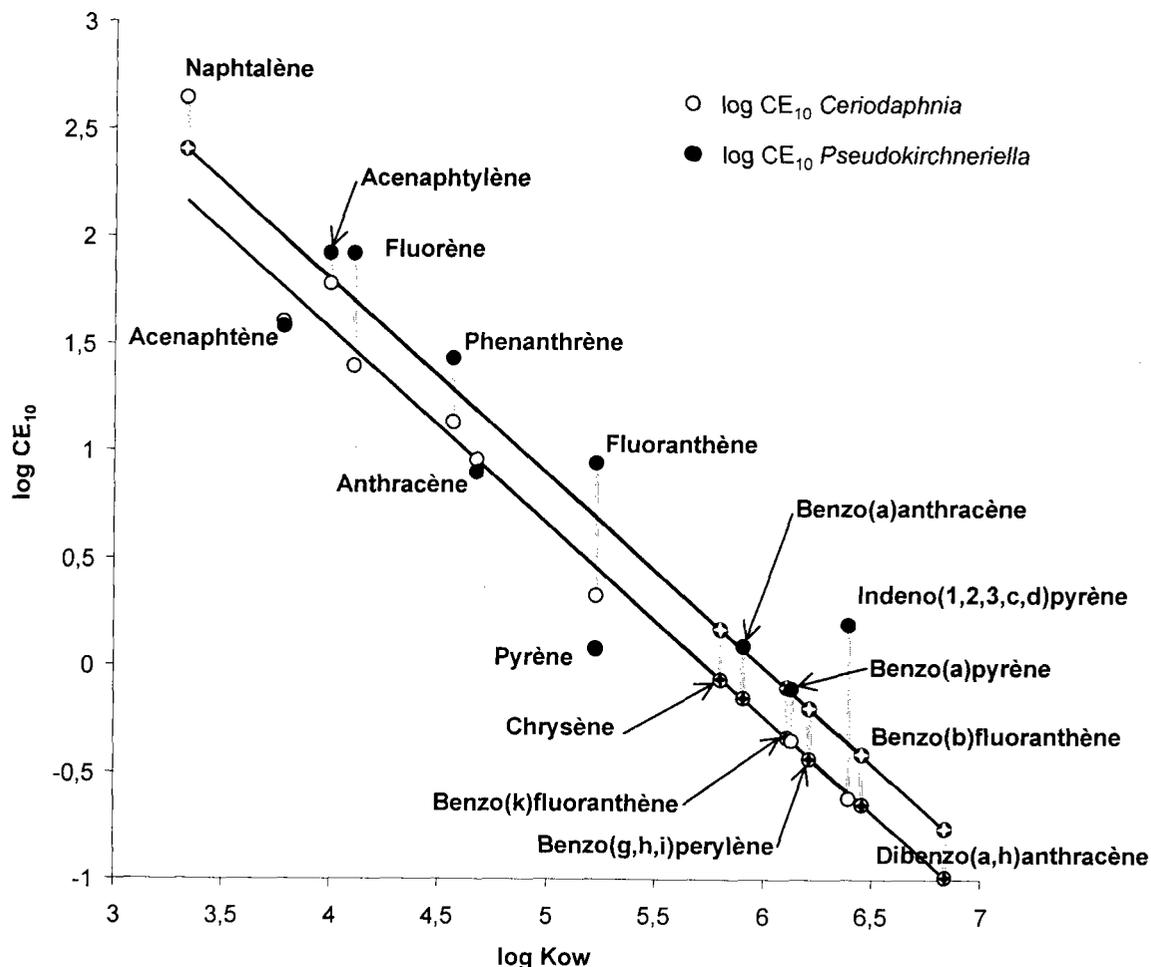


Figure 2 : Représentation graphique des résultats des essais algue et cériodaphnie en fonction du coefficient de partage octanol-eau.

Les valeurs représentées par une croix sont modélisées et n'ont pas participé à la régression, aucune toxicité n'ayant pu être détectée sur ces produits du fait de la faible solubilité.

Tableau 13 : Paramètres statistiques de la régression du log de  $CE_{10}$  en fonction du log de  $K_{ow}$ .

Coefficient	Valeur	Probabilité	Intervalle de confiance 95%	
$\beta_0$	5,27	$2,3 \times 10^{-10}$	4,5	6,1
$\beta_1$	0,12	0,12	-0,04	0,3
$\beta_2$	-0,90	$2,6 \times 10^{-09}$	-1,1	-0,7
$R^2$	0,89			

La probabilité est celle d'obtenir le coefficient considéré par hasard.

Les droites de régression ont été calculées à partir des seules valeurs obtenues au laboratoire lors des essais pour lesquels une toxicité a été constatée en dessous de la limite de solubilité. Pour chacune des substances ne présentant pas de toxicité en dessous de la limite de solubilité on a simplement reporté le point modélisé sur la droite de régression Figure 2.

Nous proposons d'utiliser ces valeurs pour la suite de notre étude, elles ne sont pas forcément réalistes, par exemple si elles sont supérieures à la limite de solubilité, elles ne pourront être retrouvées dans les eaux de surface. Ces valeurs peuvent être considérées comme valeurs seuil protectrices qui n'ont un sens que lorsqu'elles ne sont pas présentes seules. En effet ces substances contribuent à la toxicité d'un mélange de substances même si prises isolément elles ne peuvent atteindre leur concentration seuil. On verra également dans la suite de cette étude que des valeurs de référence dans l'eau peuvent être utilisées pour la détermination des seuils dans les sédiments à partir de l'équilibre de partage.

Ces résultats conduisent à utiliser largement ce mécanisme non spécifique de toxicité pour la détermination des seuils de qualité. En particulier, dans les cas d'absence d'effet en dessous de la limite de solubilité ce modèle permet d'obtenir une valeur de référence plus réaliste que le centième de la limite de solubilité utilisée classiquement pour l'évaluation des risques des substances chimiques en Europe. Il faudra utiliser la valeur modélisée comme valeur de référence afin de s'assurer du caractère protecteur des seuils proposés. Ceci est particulièrement important dans le contexte des seuils liés à des mélanges de HAP, en effet chaque HAP contribue à la toxicité du mélange même si sa concentration dans l'eau est inférieure à sa concentration toxique. Il est donc important de mettre en place des seuils de qualité de tous les HAP y compris ceux qui sont trop peu solubles pour exercer une action toxique isolément.

Dans ce contexte d'effet narcotique, la toxicité d'un mélange pourra être prédite par un modèle additif. Les essais de toxicité des mélanges devront être réalisés avec des composés de coefficient de partage variés pour vérifier cette assertion.

## 2.1.6 Toxicité des mélanges de HAP

Les HAP se présentent dans les hydrosystèmes sous la forme de mélanges complexes. Il est donc nécessaire de connaître les interactions éventuelles entre ces composés afin de tenir compte de ce fait dans l'élaboration de seuils de qualité. Nous avons donc, conformément au cahier des charges de l'étude, réalisé les essais de toxicité chronique et aiguë sur trois mélanges sur trois HAP choisis en fonction de log Kow divers : benzo(k)fluoranthène, fluoranthène et phénanthrène.

### 2.1.6.1 Méthode d'essai utilisée et interprétation statistique

Les essais ont été réalisés à partir des protocoles identiques aux essais sur produits seuls selon des matrices expérimentales complètes présentées sur le Tableau 14

*Tableau 14 : Matrice expérimentale des essais sur mélanges de deux substances X et Y*

Concentrations	0	Y1	Y2
0	Témoin	0×Y1	0×Y2
X1	X1×0	X1×Y1	X1×Y2
X2	X2×0	X2×Y1	X2×Y2

Les concentrations choisies en fonction des résultats des essais sur substances seules sont montrées sur le Tableau 15.

Tableau 15 : Concentrations utilisées pour les différents essais sur mélanges

Essai	Substance	C1	C2
<i>Daphnia magna</i>	Benzo(k)fluoranthène	0,75	1,5
	Fluoranthène	103,5	207
	Phénanthrène	377	681
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Benzo(k)fluoranthène	0,75	1,5
	Fluoranthène	33,1	72,8
	Phénanthrène	123,5	265,7
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Benzo(k)fluoranthène	0,75	1,5
	Fluoranthène	1,19	5,97
	Phénanthrène	14,7	18,4

L'interprétation des données vise à déterminer la présence d'une éventuelle interaction entre les deux substances. Nous avons donc utilisé la régression linéaire multiple sur les variables X, Y et le produit X×Y associée à une analyse de variance. Cette analyse de variance permet via un test F de vérifier la signification de chacune de ces variables dans le modèle linéaire de régression. Si la probabilité de la variable X×Y est inférieure à 0,05 nous en déduisons que nous avons moins de 5% de probabilité d'observer une interaction par hasard. Le type d'interaction est déterminé par le signe du coefficient de la variable X×Y. S'il est positif, c'est à dire opposé aux signes des coefficients des variables X et Y qui eux sont négatifs, il s'agit d'un antagonisme, dans le cas contraire il s'agit d'une synergie. Lorsque la probabilité associée à la variable X×Y est supérieure à 5% nous considérerons qu'il n'y a pas d'interaction significative et que le modèle à retenir est donc additif.

La visualisation des interactions entre substances est assez délicate nous présentons quelques exemples tirés des régressions calculées avec les mélanges utilisés dans cette étude pour montrer les différents cas de figure (Cf. : Figure 3 et Figure 4).

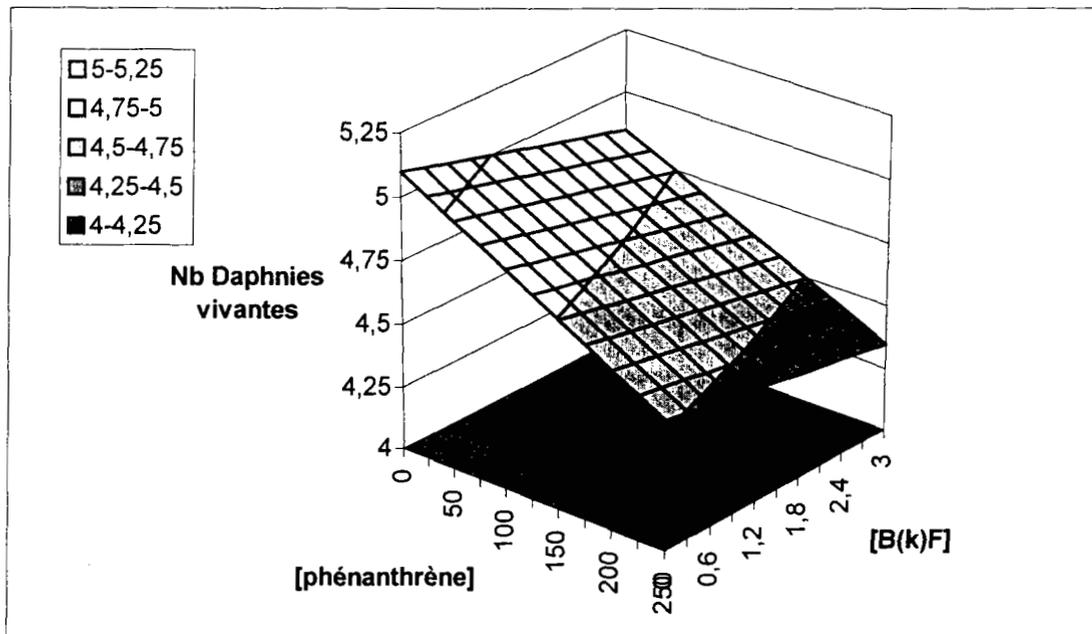


Figure 3 : Exemple d'un effet additif (pas d'interaction) entre phénanthrène et B(k)F sur *Daphnia magna*.

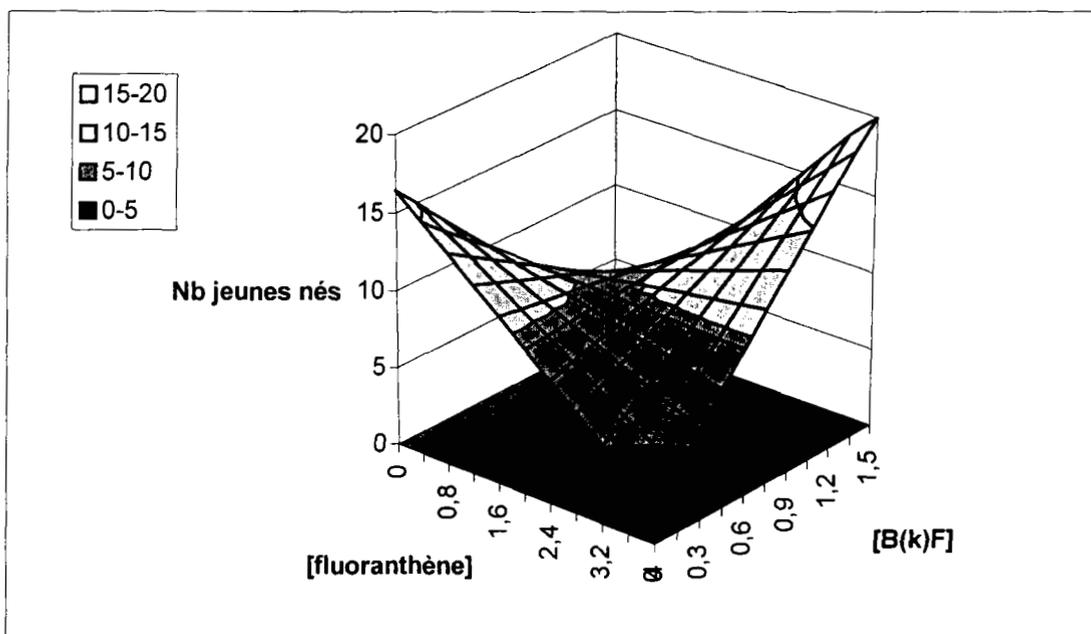


Figure 4 : Exemple d'antagonisme sur la reproduction des cériodaphnies.

Dans ce cas, mélange fluoranthène, B(k)F ; on a obtenu, lorsque les deux produits étaient présents ensemble, un taux de reproduction meilleur que le témoin.

On notera sur ces exemples que la forme de la surface est plane en cas d'absence d'interaction et qu'elle est gauchie lorsqu'une interaction est présente.

Les tableaux suivants (Tableau 16 page 50 à Tableau 24 page 55) rendent compte des résultats obtenus par cette analyse de variance pour les différents essais sur les trois mélanges. Ces tableaux ont tous la même structure, la première colonne indique les variables considérées dans l'analyse de variance, la colonne suivante leurs coefficients

obtenus par régression linéaire multiple, la troisième colonne l'écart type sur ces coefficients, puis la valeur du paramètre statistique t de Student, enfin la probabilité, c'est à dire la probabilité que le coefficient de la ligne considérée soit différent de zéro par hasard.

L'interaction (synergie ou antagonisme) n'est significative que lorsque la probabilité associée au coefficient de X×Y est inférieure à 5%.

### 2.1.6.2 Toxicité aiguë de trois mélanges sur *Daphnia magna* en 48heures

#### 2.1.6.2.1 Benzo(k)fluoranthène et fluoranthène

Tableau 16 : Toxicité aiguë du mélange B(k)F, fluoranthène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	4,926	0,364	13,548	0,000
B(k)F	-0,072	0,318	-0,227	0,821
Fluoranthène	-0,739	0,318	-2,321	0,026
X×Y	-0,107	0,262	-0,406	0,687

Nous ne notons pas dans ce cas d'interaction significative, nous pouvons retenir le modèle additif.

#### 2.1.6.2.2 Benzo(k)fluoranthène et phénanthrène

Tableau 17 : Toxicité aiguë du mélange B(k)F, phénanthrène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	5,0	0,26	19,7	0,00
B(k)F	0,023	0,22	0,1	0,92
Phénanthrène	-0,1	0,22	-0,46	0,65
X×Y	-0,31	0,18	-1,71	0,1

Nous ne notons pas dans ce cas d'interaction significative, nous pouvons retenir le modèle additif.

#### 2.1.6.2.3 Phénanthrène et fluoranthène

Tableau 18 Toxicité aiguë du mélange fluoranthène, phénanthrène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	5,2	0,33	15,6	0,00
Phénanthrène	-0,68	0,29	-2,3	0,03
Fluoranthène	-0,47	0,29	-1,6	0,12
X×Y	0,08	0,24	0,3	0,74

Nous ne notons pas dans ce cas d'interaction significative, nous pouvons retenir le modèle additif.

### 2.1.6.3 Toxicité chronique de trois mélanges sur *Pseudokirchneriella subcapitata* en 72 heures

#### 2.1.6.3.1 Benzo(k)fluoranthène et fluoranthène

Tableau 19 : Toxicité chronique sur algue du mélange B(k)F, fluoranthène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	136	5,7	24	0,00
B(k)F	-15,8	7,3	-2,2	0,04
Fluoranthène	-1,7	0,15	-11,1	0,00
X×Y	0,09	0,17	0,5	0,61

Nous ne notons pas dans ce cas d'interaction significative, nous pouvons retenir le modèle additif.

#### 2.1.6.3.2 Benzo(k)fluoranthène et phénanthrène

Tableau 20 : Toxicité chronique sur algue du mélange B(k)F, phénanthrène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	112	4,4	25,5	0,00
B(k)F	-18,2	5,6	-3,2	0,00
Phénanthrène	-0,24	0,03	-7,6	0,00
X×Y	0,06	0,04	1,6	0,11

Nous ne notons pas dans ce cas d'interaction significative, nous pouvons retenir le modèle additif.

#### 2.1.6.3.3 Phénanthrène et fluoranthène

Tableau 21 : Toxicité chronique sur algue du mélange fluoranthène, phénanthrène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	208	6,6	31,5	0,00
Fluoranthène	-2,6	0,18	-14,8	0,00
Phénanthrène	-0,28	0,046	-6,09	0,00
X×Y	0,003	0,001	2,9	0,01

On note dans ce cas un léger antagonisme significatif

### 2.1.6.4 Toxicité chronique de trois mélanges sur *Ceriodaphnia dubia* en 7 jours

#### 2.1.6.4.1 Benzo(k)fluoranthène et fluoranthène

Tableau 22 : Toxicité chronique sur céridaphnie du mélange B(k)F, fluoranthène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	14,6	1,07	13,7	0,00
B(k)F	-5,5	1,21	-4,54	0,00
Fluoranthène	-1,36	0,34	-4	0,00
X×Y	2,06	0,36	5,67	0,00

On note dans ce cas une interaction significative, il s'agit d'un antagonisme.

#### 2.1.6.4.2 Benzo(k)fluoranthène et phénanthrène

Tableau 23 : Toxicité chronique sur cériodaphnie du mélange B(k)F, phénanthrène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	18,8	1,62	11,6	0,00
B(k)F	-7,29	1,93	-3,8	0,00
Phénanthrène	-0,44	0,14	-3,3	0,001
X×Y	0,41	0,15	2,7	0,008

On note dans ce cas une interaction significative, il s'agit d'un antagonisme.

#### 2.1.6.4.3 Phénanthrène et fluoranthène

Tableau 24 : Toxicité chronique sur cériodaphnie du mélange fluoranthène, phénanthrène

	Coefficients	Erreur-type	Statistique t	Probabilité
Constante	16	1,14	14	0,00
Fluoranthène	-0,003	0,37	-0,007	0,99
Phénanthrène	-0,27	0,09	-3	0,003
X×Y	0,02	0,03	0,6	0,5

Nous ne notons pas dans ce cas d'interaction significative, nous pouvons retenir le modèle additif.

#### 2.1.6.5 Conclusion des essais sur les mélanges

Dans quelques cas particuliers il a été noté un léger antagonisme entre les substances, le cas général étant celui de l'additivité. Cet antagonisme est surtout présent lors des essais sur *Ceriodaphnia*. L'absence de synergie nous permet d'utiliser un modèle additif sans prendre de risque, au pire nous négligerions un antagonisme qui réduirait la toxicité des mélanges.

Le modèle additif sera donc utilisé dans la suite de cette étude pour déterminer les seuils de qualité des HAP.

## 2.2 ESSAIS DE GENOTOXICITE

### 2.2.1 Principe de l'essai d'Ames fluctuations

Ce test permet de rechercher un effet mutagène potentiel sur un modèle bactérien dérivé de celui proposé par B.N. AMES et al. (1975), MARON et AMES (1983).

Les produits sont étudiés à la fois en absence et en présence d'activation métabolique provoquée par une fraction microsomale de foie.

Les produits mutagènes sont mis en évidence par les mutations réverses qu'ils induisent au niveau du locus His des souches de *Salmonella typhimurium* auxotrophes pour l'histidine.

L'augmentation, par rapport au taux spontané, du nombre de révertants non dépendants en histidine (prototrophes) se développant dans un milieu pauvre en histidine en présence du produit à étudier est une indication de l'activité mutagène de ce dernier. Les différentes souches utilisées permettent de mettre en évidence divers mécanismes de mutations

géniques. L'essai en l'absence d'activation métabolique met en évidence des mutagènes directs, l'essai en présence d'activation métabolique, les agents promutagènes.

### **2.2.1.1 Propriétés des souches bactériennes**

Les deux souches bactériennes utilisées ont été obtenues auprès de l'Institut Pasteur (Paris); elles sont entretenues au laboratoire et conservées dans l'azote liquide. L'utilisation de deux souches au lieu des cinq prévues dans l'essai fluctuation est une simplification acceptée par le comité de pilotage de l'étude. Il s'agissait d'obtenir une série de données homogène dans les mêmes conditions et non pas de réaliser des essais fluctuations complets sur tous les HAP.

Les souches TA 98 (His D3052, rfa, uvrB, R<sup>+</sup>) et TA 100 (His G46, rfa, uvrB, R<sup>+</sup>) contiennent le facteur R du plasmide pKM101 (résistance à l'ampicilline) qui augmente leur sensibilité à certains mutagènes chimiques, probablement par une augmentation du système de réparation fautive de l'ADN.

Ces deux souches portent :

- une mutation rfa provoquant une altération de la paroi lipopolysaccharidique conférant à la bactérie une plus grande perméabilité aux produits à analyser,
- une mutation uvrB correspondant à une délétion du système de réparation par excision de l'ADN.

### **2.2.1.2 Contrôle des souches bactériennes**

Les différents caractères des souches sont vérifiés régulièrement :

- exigence en histidine,
- perte des lipopolysaccharides de la paroi liée à la mutation rfa (sensibilité au cristal violet),
- mutation uvrB (sensibilité aux UV),
- présence du plasmide pKM101 (résistance à l'ampicilline),
- présence du plasmide pAQ1 (résistance à la tétracycline).

### **2.2.1.3 Système d'activation métabolique**

L'activation métabolique est réalisée par ajout d'un système S<sub>9</sub> mix qui provient d'un extrait d'homogénat de foie de rat préalablement induit par l'Aroclor 1254 (IFFA CREDO).

Le système S<sub>9</sub> mix nécessite une préparation extemporanée et doit être conservé à 4°C jusqu'à utilisation. Sa composition est la suivante :

	Concentration finale
MgCl <sub>2</sub>	: 8 mM
KCl	: 33 mM
Glucose 6Phosphate	: 5 mM
NADP	: 4 mM
Tampon phosphate pH = 7,4	: 100 mM
Fraction S <sub>9</sub>	: 0,1 ml/ml de S <sub>9</sub> mix

Eau ppi : 0,335 ml pour 1 ml

#### **2.2.1.4 Contrôles**

Un ensemble de contrôles a été réalisé afin de vérifier les capacités de réversion des différentes souches de *Salmonella typhimurium* utilisées. Ces substances sont solubilisées dans du diméthyl sulfoxyde (DMSO). Pour chaque souche, nous utilisons un témoin négatif, le DMSO. Le témoin positif retenu est la 2-anthramine en solution dans le DMSO à la concentration de 2,5 µg/ml.

#### **2.2.1.5 Suspension bactérienne**

La suspension bactérienne utilisée pour chaque test est obtenue à partir d'un inoculum bactérien (1 ml suspension bactérienne à 9 % de DMSO conservé à -170°C) mis en culture dans du milieu nutritif, bouillon n°2 (OXOïD), sous agitation et à 37°C pendant 10 à 12 heures.

### **2.2.2 Essais préliminaires**

#### **2.2.2.1 Essai préliminaire de solubilité**

Compte tenu de la faible solubilité des HAP et en l'absence de données spécifiques concernant la solubilité dans le DMSO, nous avons procédé à une solubilisation progressive de chacune des 16 substances utilisant si nécessaire une sonication légère (< à 10 minutes). Une fois la solubilité dans le DMSO établie, nous avons procédé à la mise en solution à 5 % de la solution de DMSO directement dans le tampon constituant majoritaire de notre milieu de culture bactérien. Une gamme de dilution au ½ dans le DMSO a été réalisée afin de ne retenir que les concentrations les plus élevées ne présentant que peu ou pas de précipité. Les concentrations ainsi obtenues ont été vérifiées par mesure HPLC à la fois dans le DMSO et dans le milieu d'essai dans les conditions de l'expérimentation aux temps initiaux (t = 0) et finaux (t = f). Les dosages de 16 HAP sont pratiqués selon la norme NF X43-329 par chromatographie liquide haute performance en phase inverse avec une double détection fluorimétrique et UV.

Nous avons utilisé la moyenne géométrique des mesures à t=0 et à la fin de l'expérience pour calculer, comme pour les essais d'écotoxicologie des concentrations moyennes d'essai.

#### **2.2.2.2 Essai préliminaire de toxicité**

Cette étude permet une première identification de la gamme de dilution la plus appropriée pour la recherche des effets mutagènes en l'absence d'effet toxique.

Cet essai consiste en la mise en culture de la souche bactérienne en présence de la substance à tester et d'un excès en histidine permettant la croissance à la fois de colonies His<sup>-</sup> et de colonies révertantes His<sup>+</sup>. Le protocole retenu est directement dérivé de Hubbard et al., 1984.

#### **2.2.2.3 Essai de mutagénicité**

Le protocole retenu est directement dérivé de Hubbard et al. (1984).

Après régénération des souches une nuit à 37°C sous agitation, la culture est diluée au 1/10 dans du tampon pH 7,4 et incubée 3 heures à 37°C sous agitation pour obtenir approximativement 4 x 10<sup>6</sup> bactéries /ml. Un aliquote de cette culture est ajouté au milieu de culture comprenant du tampon pH 7,4, du glucose à 20 %, de la biotine à 0,1 %, de

l'histidine à 0,1 % et du S9 mix à 10 %. Enfin, la substance à tester ou les solutions témoins sont ajoutées. La solution finale est distribuée dans des microplaques 96 puits. Les microplaques 96 puits sont ensuite incubées à 37 °C pendant 16 heures. Est alors ajouté du milieu de Davis-Mingoli contenant 4 % de glucose à 20 % dans chacun des puits. Les plaques sont ensuite incubées à 37 °C pendant 72 heures afin de permettre la croissance des mutants. La lecture des résultats s'effectue par ajout d'un indicateur coloré, le pourpre de Bromocrésol à 500 µg/ml dans de l'éthanol.

L'indicateur coloré permet de visualiser la croissance bactérienne donc la présence de révertants. En absence de croissance bactérienne, les puits demeurent bleu/violet, la modification du pH du milieu induite par la croissance bactérienne colore le milieu en jaune. Pour chacune des plaques, le nombre de puits bleus et jaunes est comptabilisé.

Le test de génotoxicité est réalisé sur *Salmonella typhimurium* souches TA 98, TA 100, en présence de S<sub>9</sub> mix. Les concentrations utilisées sont directement liées aux résultats de l'étude préliminaire de toxicité.

Pour chaque essai, nous avons travaillé en présence de témoins positifs et négatifs. Les valeurs de ces contrôles permettent de valider ou de rejeter un essai si les valeurs S'avèrent trop éloignées des valeurs habituelles.

### 2.2.3 Interprétation des résultats

Les critères retenus pour identifier une toxicité bactérienne sont une diminution ou un retard de la croissance bactérienne visualisé grâce à l'utilisation de l'indicateur coloré le bleu de Bromocrésol. Les résultats de la génotoxicité sont exprimés en nombre de puits de couleur jaune correspondant au nombre de puits où une colonie bactérienne s'est développée. Pour chaque concentration, nous pratiquons le test du chi<sup>2</sup> ainsi que le calcul du taux de mutation qui correspond à la moyenne du nombre de puits contenant des colonies révertantes pour le lot traité rapporté à la moyenne du nombre de puits contenant des colonies révertantes pour le blanc correspondant.

	Négatif (bleu/violet)	Positif (jaune)	Total
Témoin	a	b	a+b = N
Traité	c	d	c+d = N
Total	a + c	b+d	a+b+c+d = n

$$\chi^2 = 2N(d-b)^2 / (d+b)(2N-d-b) \text{ avec } i \text{ degrés de liberté (d'après Green et al. 1976)}$$

Un produit est considéré comme génotoxique si les critères suivants sont vérifiés :

- augmentation statistiquement significative du chi<sup>2</sup> pour un degré de liberté,
- augmentation du rapport traité sur témoin supérieure à 2.

### 2.2.4 Résultats obtenus au laboratoire

Les résultats que nous avons obtenus avec les essais de fluctuations sur souches TA98 et TA100 ne sont pas positifs pour tous les HAP (Cf. Tableau 25). Seuls le benzo(k)fluoranthène, le benzo(a)anthracène et le benzo(a)pyrène, se révèlent positifs en dessous de la limite de solubilité dans le milieu d'essai sur la souche TA98. La souche TA100 se révèle un peu plus sensible puisqu'il faut ajouter le benzo(b)fluoranthène, le

benzo(ghi)pérylène, le dibenzo(a,h)anthracène, l'acénaphylène, et le chrysène à la liste des composés génotoxiques.

Tableau 25 : Résultats des essais d'Ames-fluctuations obtenus au laboratoire (mg/L).

Substance	Souche TA98		Souche TA100	
	Effet	Concentration	Effet	Concentration
Benzo(k)fluoranthène	+	0,74	+	0,74
Benzo(a)anthracène	+	0,07	+	0,13
Benzo(b)fluoranthène	-	2,69	+	0,35
Benzo(ghi)pérylène	-	2,80	+	0,35
Benzo(a)pyrène	+	1,08	+	0,14
Dibenzo(a,h)anthracène	-	3,81	+	0,24
Acénaphène	-	2,53	-	2,53
Acénaphylène	-	2,82	+	1,41
Anthracène	-	1,42	-	2,84
Fluorène	-	3,68	-	3,68
Chrysène	-	2,91	+	2,91
Fluoranthène	-	2,97	-	2,97
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	-	1,98	-	1,07
Naphtalène	-	1,24	-	1,24
Phénanthrène	-	4,72	-	4,72
Pyrène	-	2,89	-	2,89

Souches *Salmonella typhimurium* TA98 et TA100. Les limites de solubilités sont différentes de celles des essais de toxicité du fait de la présence de DMSO dans les milieux d'essai.

### 2.3 CONCLUSION SUR LES ESSAIS AU LABORATOIRE

A l'occasion de cette étude, nous avons réalisé les essais des 16 HAP de la liste EPA sur *Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Ceriodaphnia dubia* et en matière de génotoxicité sur *Salmonella typhimurium* souches TA98 et TA100.

Les difficultés principales concernent la solubilité et la rémanence des composés dans les milieux d'essai. Cela nous a conduit à multiplier les analyses des substances dans les milieux d'essai et à utiliser des modèles de calcul, parfois spécifiques, comme celui des algues, pour déterminer des concentrations toxiques.

Néanmoins nous avons pu ainsi dégager un ensemble de données important et comparatif. Cet ensemble de données permettra en le complétant avec les données bibliographiques présentées au chapitre 3 de déterminer des seuils de qualité pour chacun de ces HAP.

### **3 ELABORATION D'UNE DEMARCHE**

---

#### **3.1 LES PRATIQUES COURANTES**

L'élaboration des seuils d'écotoxicité est basée sur la distribution de la sensibilité des différentes espèces susceptibles d'être atteintes par les composés toxiques. Sur le plan méthodologique, la méthode d'Aldenberg et Slob (1993) peut être considérée comme la plus pertinente. Cette méthode permet d'estimer la fonction de répartition de la probabilité des effets sur les différentes espèces utilisées lors des essais en fonction de la concentration. La loi log-logistique est utilisée par commodité du fait de sa proximité avec la loi log-normale.

Dans le cas où le nombre de données est trop faible on utilise la méthode des facteurs de sécurité que nous avons évoquée au chapitre 1.1, le Tableau 1 page 14 récapitule les différents facteurs de sécurité appliqués. C'est l'application de ces méthodes qui explique la grande variabilité des seuils notés dans la bibliographie. En effet il suffit que plusieurs auteurs disposent d'une donnée commune à forte toxicité pour qu'en fonction du nombre des autres données disponibles au moment de leur étude leurs valeurs diffèrent de facteurs multiples de 10 correspondant à l'application de facteurs de sécurité différents.

Ces facteurs peuvent conduire à la détermination de seuils de qualité différenciés selon le niveau de protection désiré. Les seuils établis par le WRC sont ainsi calés sur les limites d'incertitude du tableau des facteurs de sécurité. Il faut cependant considérer que cette méthode conduit à confondre des facteurs de sécurité basés sur le niveau de connaissance de la toxicité des composés avec des niveaux de perturbation des écosystèmes correspondant par exemple à des fractiles de la distribution de sensibilité des espèces.

Il faut noter que ces méthodes acceptent l'utilisation de méthodes de détermination des concentrations toxiques à partir du calcul sous la forme de relations structure activité.

L'utilisation des données de la littérature peut donner lieu à des coefficients de pondération en fonction de leur pertinence. La méthode préconisée par le WRC reprise par Paule VASSEUR dans le document joint au cahier des charges de cette étude, distingue deux classes de données de toxicité : la classe 1 correspond aux données obtenues à partir de protocoles normalisés pour lesquelles des mesures de concentration ainsi que des différents paramètres de qualité de l'eau ont été réalisés, la classe 2 regroupe toutes les autres données prises dans la littérature.

Enfin des facteurs de sécurité supplémentaires peuvent être ajoutés pour adopter une attitude plus sûre en matière de protection du milieu. L'étude du RIVM utilise un facteur 100 pour tenir compte à la fois d'un effet milieu non pris en compte au laboratoire et de l'impact des éventuels mélanges de composés chimiques. Nous appellerons seuils bruts les seuils obtenus avant application de tels facteurs de sécurité.

Il faut noter que ces facteurs de sécurité proviennent d'une application du principe de précaution, en effet ils majorent l'incertitude liée au faible nombre de données, à l'extrapolation au terrain des valeurs obtenues au laboratoire, aux erreurs de mesure diverses et à l'utilisation d'essais à court terme, voire à très court terme. Toute amélioration de la connaissance sur la toxicité des substances chimiques devrait conduire à une

diminution de ces facteurs de sécurité. Cependant nous utiliserons strictement les facteurs de sécurité couramment admis dans le domaine de l'évaluation des risques écotoxicologiques et il appartiendra aux gestionnaires de ces risques de modifier, le cas échéant, les valeurs obtenues en fonction de l'évolution des pratiques dans ce domaine.

## 3.2 CALCUL DES SEUILS DE QUALITE DANS L'EAU

### 3.2.1 Calcul basé sur la méthode des facteurs de sécurité

Le tableau ci-dessous récapitule les résultats obtenus par cette étude et recueillis dans la littérature concernant la toxicité de chacun des HAP. Le seuil est calculé en appliquant un facteur de sécurité selon le Tableau 1 page 14 lui même annexé au cahier des charges de l'étude. Seuls les essais de toxicité chronique sur organismes portant sur les paramètres physiologiques d'êtres vivants entiers (survie, croissance, reproduction...) ont été pris en compte, à l'exclusion notamment des effets biochimiques ou cellulaires.

Dans la plupart des cas aucun résultat de toxicité chronique n'a été relevé dans la littérature ce qui nous a amené à utiliser un facteur de sécurité de 100. Lorsque les expérimentations ne permettaient pas de conclure à la présence de toxicité en dessous de la limite de solubilité nous avons pris la solubilité comme valeur de référence.

Tableau 26 : Récapitulatif des valeurs de toxicité obtenues au laboratoire et dans la bibliographie. ( $\mu\text{g/L}$ )

Molécule	Seuil 1	Plus faible concentration toxique mesurée	Plus faible concentration toxique extraite de la bibliographie
benzo(k)fluoranthène	0.01	>1	-
benzo(a)anthracène	0.01	1.2	260*
benzo(b)fluoranthène	0.01	>1	-
benzo(ghi)pérylène	0.0008	0.082	-
benzo(a)pyrène	0.05	0.503	25
dibenzo(a,h)anthracène	0.001	0.141	-
acénaphthène	0.4	37	740*
acénaphthylène	0.6	64	310*
anthracène	0.2	7.7	2.1
fluorène	0.3	25	3230*
chrysène	0.0009	>0.09	1490*
fluoranthène	0.1	1.17	8.6
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0.003	0.27	-
naphtalène	5	514	680*
phénanthrène	1.5	15	19
pyrène	0.01	1.18	500*

Les valeurs marquées d'un astérisque indiquent qu'aucune donnée de toxicité chronique sur poisson n'est disponible. Le seuil 1 correspond à l'application d'un facteur de sécurité dépendant du nombre de données disponibles tant dans cette étude que dans la littérature.

Ces seuils de qualité sont obtenus avec la méthode des facteurs de sécurité, qui est bien souvent la seule utilisable du fait du faible de nombre de données disponibles sur la toxicité

des substances chimiques sur les espèces aquatiques. Ces facteurs de sécurité sont d'autant plus fiables que l'on dispose de données sur un plus grand nombre d'espèces de niveaux trophiques distincts. Ainsi deux substances de toxicité comparable sur des invertébrés peuvent voir leur seuil différer d'un facteur 10 si l'une d'entre elles a fait l'objet d'un essai sur poisson, même si aucune toxicité particulière n'a été observée dans ce cas.

D'autres méthodes peuvent être utilisées lorsque des données sur de nombreuses espèces sont disponibles, nous verrons comment le cas particulier des HAP et certaines de leurs propriétés permettent d'améliorer le calcul des seuils de qualité pour l'ensemble de la série.

### **3.2.2 Examen des données disponibles pour les HAP**

Les données disponibles sur les HAP sont assez disparates en fonction des molécules considérées (tous des HAP) Cependant nous avons réalisé sur chacun des 16 HAP concernés par cette étude deux essais de toxicité chronique et un essai de toxicité aiguë. Nous nous situons donc, avant toute prise en compte de la bibliographie dans une zone de précision intermédiaire entre celle qui nécessite un facteur de sécurité de 10 et celle qui utilise la valeur 100. Dès lors, par exemple, que nous aurions une donnée bibliographique de toxicité chronique sur poisson nous serions fondés à n'utiliser qu'un facteur de sécurité de 10. Dans certains cas nous disposons de nombreuses données qui nous permettent d'ajuster une distribution avec la méthode d'Aldenberg et Slob et un facteur de sécurité de 10.

La situation qui se présente à nous est donc la suivante : pour certains HAP nous avons suffisamment de données pour établir la distribution des sensibilités, pour d'autres nous avons à appliquer un facteur de sécurité de 100, enfin, pour quelques rares produits, pour lesquels un résultat de toxicité sur poisson est disponible ce facteur est de 10.

Si nous examinons les données de toxicité obtenues au laboratoire nous constatons qu'il est possible de prédire les valeurs de toxicité avec une assez bonne précision en fonction de la valeur de coefficient de partage octanol-eau de chaque composé (Tableau 29 page 66). La première conséquence pratique que nous pouvons tirer consiste à prédire les concentrations toxiques de chacun des composés pour lesquels nous n'avons pu obtenir de valeur de toxicité en dessous de la solubilité de la molécule. Ceci est particulièrement important car ces mêmes molécules sont celles qui ont le coefficient de partage le plus élevé, donc potentiellement les plus toxiques dans la mesure où elles seraient biodisponibles.

### **3.2.3 Calcul de seuils pour la toxicité chronique**

La relation linéaire que nous avons établie entre la toxicité et le coefficient de partage est le signe d'un effet narcotique des HAP, c'est à dire d'un effet toxique ne faisant pas intervenir de mécanisme spécifique, seul le chargement des structures lipidiques par les molécules bioaccumulables provoque l'intoxication. Dans ces conditions la seule variable qui explique la toxicité est la concentration interne du toxique quelle que soit la molécule considérée. Il devient alors possible de considérer la distribution des sensibilités des espèces à cette concentration interne recalculée de façon arbitraire avec le coefficient de partage octanol-eau. La Figure 5 page 63 illustre cette distribution obtenue en tenant compte de l'ensemble des données mesurées et bibliographiques présentées dans les monographies par substance. Cette distribution correspond à une distribution de sensibilité des espèces à l'ensemble des HAP.

Nous pouvons déterminer sur une telle figure que le percentile 5% correspond à une concentration interne en  $\mu\text{g/L}$  dont le logarithme décimal est 4,6. Cette concentration interne peut s'exprimer en  $\mu\text{g/L}$  d'équivalent octanol, cette valeur est proche d'une concentration lipidique. Le but de cette étude n'est pas d'expliquer la différence entre les espèces, on peut cependant penser qu'elle est liée en grande partie au taux de lipides.

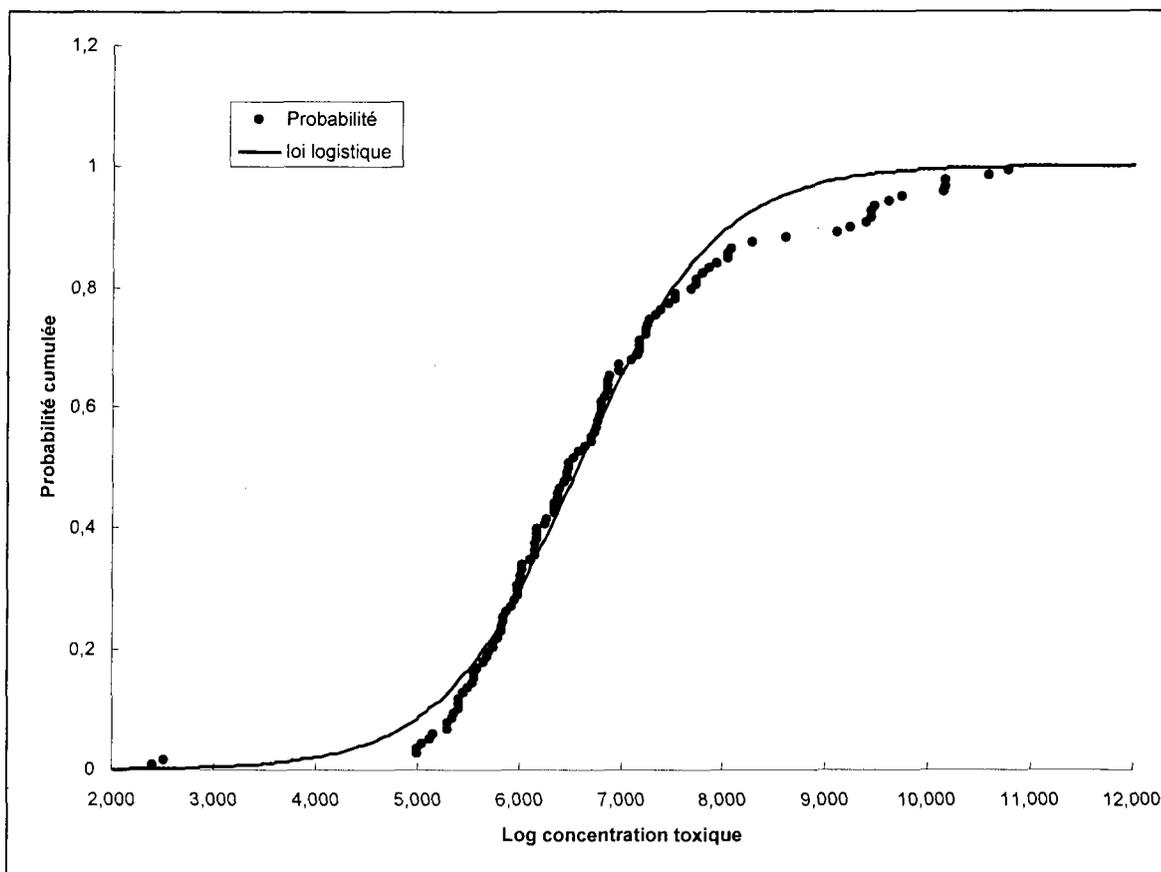


Figure 5 : Distribution des sensibilités chroniques des espèces à la concentration interne lipidique en HAP ( $\mu\text{g/L}$ ) quelle que soit la molécule considérée.

Chaque point représente une donnée de toxicité et non une espèce distincte. Lorsque la même espèce est présente plusieurs fois la régression sur l'ensemble des données moyenne la dispersion du résultat sur cette espèce, dispersion dont on ne sait si elle est liée à une variabilité expérimentale ou bien à un écart par rapport à l'effet narcotique.

A partir de cette valeur nous pouvons retrouver les valeurs de concentration seuil pour chaque HAP en divisant les concentrations internes par le Kow correspondant. Le Tableau 27 montre le résultat obtenu ainsi que les seuils proposés par Suter et Kalf, et les seuils de niveau 1 du WRC. Les seuils bruts proposés sont comparables globalement aux seuils de Kalf et Suter, avec cependant des disparités importantes.

Il faut cependant noter que le seuil brut obtenu devra être attaché d'un facteur de sécurité de 10 lié à l'extrapolation au milieu, le Tableau 27 ayant un objectif comparatif nous avons appliqué ce facteur de sécurité aux seuils bruts que nous avons calculés. Ce facteur sera modulé en fonction de la génotoxicité lorsque nous proposerons des seuils définitifs.

Le graphe Figure 7 page 67 illustre ces seuils en liaison avec les essais que nous avons réalisés. Les seuils obtenus sont systématiquement inférieurs à la plus faible  $\text{CE}_{10}$  obtenue.

Nous proposons de retenir cette méthodologie pour le calcul des seuils bruts d'écotoxicité. En effet elle évite l'utilisation de facteurs de sécurité arbitraires<sup>11</sup> et tient compte d'un ensemble de données solide. Toutes les données jouent un rôle dans l'établissement de la distribution, il ne nous semble pas nécessaire de classer les résultats en fonction de la qualité supposée des données, notre valeur n'est pas en effet inféodée à un petit nombre de valeurs de toxicité pour lesquelles il y a lieu d'être sûr de la qualité des essais. Bien que déjà protecteurs, ces seuils doivent être affectés d'un facteur de sécurité pour prendre en compte les éventuelles contaminations multiples, les phénomènes de phototoxicité ainsi que les éventuels autres facteurs aggravants de l'environnement. Ces facteurs de sécurité seront appliqués après prise en compte de la génotoxicité.

Cette méthodologie peut également être appliquée aux essais de toxicité aiguë et conduire au calcul d'un seuil de type 3 protecteur pour la survie à court terme des espèces du milieu. Nous proposons de choisir ensuite de façon arbitraire le seuil 2 comme la moyenne géométrique des seuils 1 et 3 et de calculer le seuil 4 de telle façon que le seuil 3 soit la moyenne géométrique de seuils 2 et 4. Ceci ne correspond pas à une réalité toxicologique mais permet une classification des cours d'eau selon une échelle logarithmique qui correspond à ce que l'on sait de l'intensité d'un effet toxique en fonction de la concentration.

Tableau 27 : Calcul des seuils bruts à partir de la valeur seuil de concentration interne lipidique.

HAP	CE <sub>10</sub> algue	CE <sub>10</sub> Cério	Seuil brut/10	Seuil classique	Seuil Kalf	Seuil Suter	Seuil 1 WRC
Benzo(k)fluoranthène	0,69	0,37	0,003	0.01	0.04		0.004
Benzo(a)anthracène	1,21	0,57	0,005	0.01	0.01	0.027	
Benzo(b)fluoranthène	0,32	0,17	0,0014	0.01			0.004
Benzo(ghi)pérylène	0,55	0,08	0,0025	0.0008	0.03		0.004
Benzo(a)pyrène	0,78	0,5	0,003	0.05	0.05	0.014	0.005
Dibenzo(a,h)anthracène	0,14	0,08	0,0006	0.001			
Acénaphène	37,6	42,3	0,7	0.4		23	
Acénaphylène	82	63,5	0,4	0.6			
Anthracène	7,77	8,3	0,09	0.2	0.07	0.73	
Fluorène	82	25,2	0,3	0.3		3.9	
Chrysène	1,33	0,7	0,006	0.0009	0.34		
Fluoranthène	8,65	1,18	0,024	0.1	0.3	6.16	0.004
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	1,54	0,27	0,002	0.003	0.04		0.004
Naphtalène	298	514	1,91	5	1.2	12	
Phénanthrène	26,4	13,4	0,1	1.5	0.3	6.3	
Pyrène	1,18	2,1	0,024	0.01			

Les valeurs de CE<sub>10</sub> ont été soit mesurées au laboratoire soit calculées à partir du coefficient de partage octanol-eau et de la droite de régression page 49 – Le seuil « brut » est calculé à partir de la distribution des sensibilités, le seuil « classique » par application du facteur de sécurité sur les données disponibles. Un facteur de sécurité de 10 a été appliqué sur les seuils bruts pour comparaison avec les autres valeurs.

<sup>11</sup> Sauf bien entendu le facteur 10 lié à l'extrapolation au milieu, les données dont nous disposons étant des données de laboratoire.

### 3.2.4 Calcul des seuils basés sur la toxicité aiguë

Nous pouvons opérer les mêmes calculs sur les données de toxicité aiguë en nous basant sur les 62 données pour lesquelles des résultats étaient disponibles tant dans la littérature qu'à travers cette étude.

La courbe Figure 6 montre la distribution des données de toxicité aiguë en concentration interne  $\mu\text{g/L}$ . La concentration interne correspondant à la protection de 95% des espèces (percentile 5%) à court terme est environ 10g/L.

Les seuils de type 3 peuvent alors être calculés de la même manière que le seuil 1 ainsi que les seuils de type 2 et 4. Le Tableau 28 récapitule les quatre types de seuil brut ainsi obtenus. On note que le passage d'un seuil à l'autre correspond environ à un facteur 10.

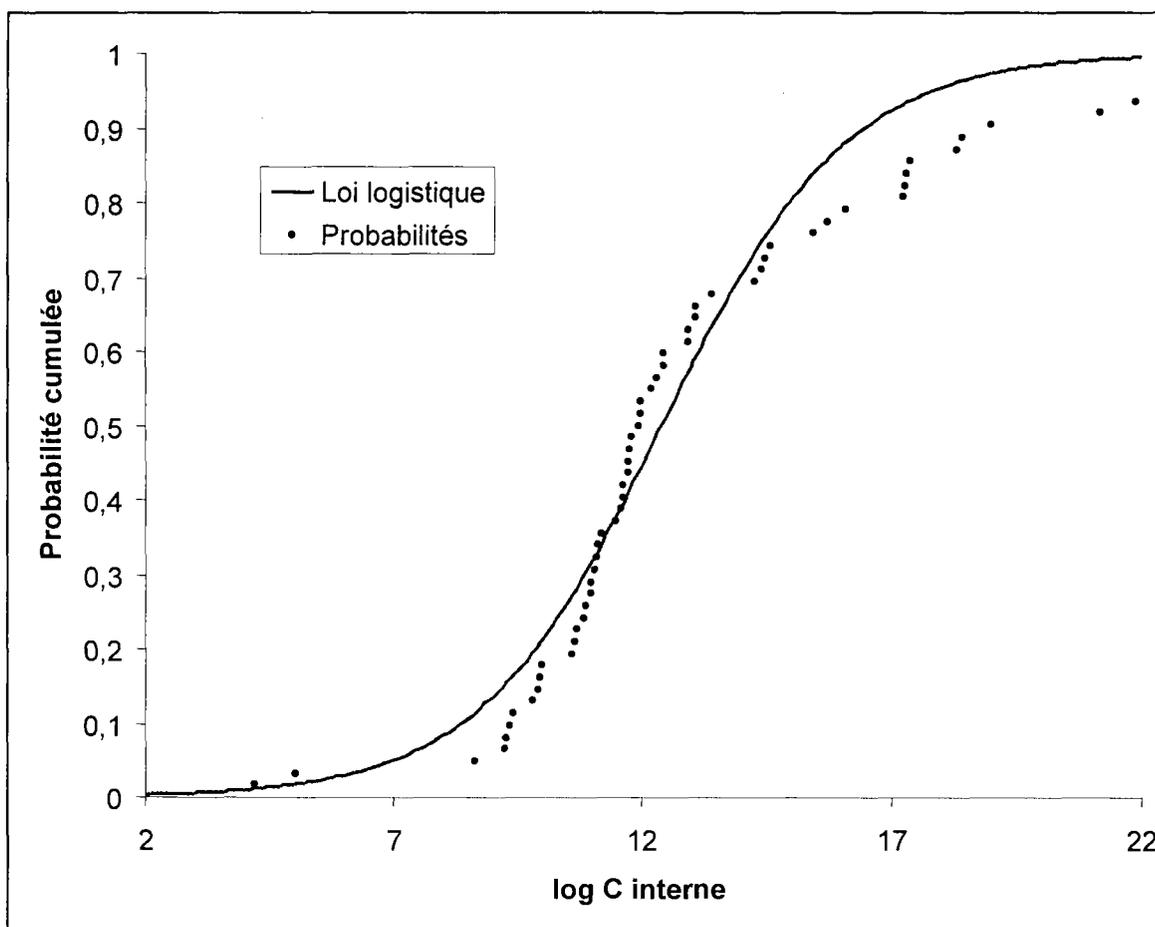


Figure 6 : Distribution des sensibilités aiguës des espèces à la concentration interne lipidique en HAP ( $\mu\text{g/L}$ ) quelle que soit la molécule considérée. L'abscisse est en logarithme népérien.

### 3.2.5 Quels seuils adopter pour les mélanges ?

Nous avons vu que la toxicité des mélanges de HAP procédait d'un mécanisme additif, c'est à dire que la toxicité du mélange de plusieurs produits est expliquée par la somme des produits présents. Ceci est en parfaite cohérence avec l'effet narcotique trouvé pour ces substances. Nous pouvons alors baser notre démarche sur ce mécanisme et proposer que lorsque plusieurs substances sont présentes la concentration interne des HAP ne doit pas dépasser la valeur seuil de concentration interne du niveau indiqué.

Il suffit alors d'écrire la valeur seuil d'une combinaison linéaire des concentrations des 16 HAP dont les coefficients sont les coefficients de partage octanol eau donnés page 66. Cette valeur seuil est la concentration interne seuil que nous avons déterminée à partir des distributions de sensibilités chronique et aiguë respectivement pour les seuils 1 et 3 ainsi que les valeurs extrapolées des seuils 2 et 4 que nous avons choisis en progression géométrique. Ces valeurs sont indiquées dans le Tableau 28.

Tableau 28 : Récapitulatif des seuils calculés selon la méthode mise au point dans cette étude.

Nom	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Benzo(k)fluoranthène	0,03	0,5	8	119
Benzo(a)anthracène	0,05	0,8	12	189
Benzo(b)fluoranthène	0,014	0,2	3,4	53
Benzo(ghi)pérylène	0,025	0,4	6	93
Benzo(a)pyrène	0,03	0,5	7	114
Dibenzo(a,h)anthracène	0,006	0,09	1,4	22
Acénaphène	6,8	105	1640	25524
Acénaphthylène	4,1	63	988	15380
Anthracène	0,9	13,3	206	3213
Fluorène	3,2	49	767	11939
Chrysène	0,06	1	15	238
Fluoranthène	0,24	3,7	58	906
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	0,02	0,25	3,9	61
Naphtalène	19,1	297	4622	71937
Phénanthrène	1,1	17	266	4140
Pyrène	0,24	3,7	58	906
<b>Seuil interne</b>	<b>40 797</b>	<b>634 942</b>	<b>9 881 970</b>	<b>153 798 848</b>

Les valeurs sont exprimées en µg/L. Le seuil interne correspond à une concentration interne en µg/L quel que soit le HAP considéré.

Tableau 29 : Coefficients de partage octanol eau utilisés pour cette étude.

Nom	log Kow	Référence
Benzo(k)fluoranthène	6,11	De Maagd et al. 1998
Benzo(a)anthracène	5,91	De Maagd et al. 1998
Benzo(b)fluoranthène	6,46	Schwartz et AL. 1995
Benzo(ghi)pérylène	6,22	De Maagd et al. 1998
Benzo(a)pyrène	6,13	De Maagd et al. 1998
Dibenzo(a,h)anthracène	6,84	
Acénaphène	3,78	Schwartz et AL. 1995
Acénaphthylène	4	Schwartz et AL. 1995
Anthracène	4,68	De Maagd et al. 1998
Fluorène	4,11	Schwartz et AL. 1995
Chrysène	5,81	De Maagd et al. 1998
Fluoranthène	5,23	De Maagd et al. 1998
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	6,4	MEDCHEM
Naphtalène	3,33	De Maagd et al. 1998
Phénanthrène	4,57	De Maagd et al. 1998
Pyrène	5,23	Schwartz et AL. 1995

Nous avons utilisé les dernières références disponibles en supposant la précision accrue avec les nouveaux outils d'analyse.

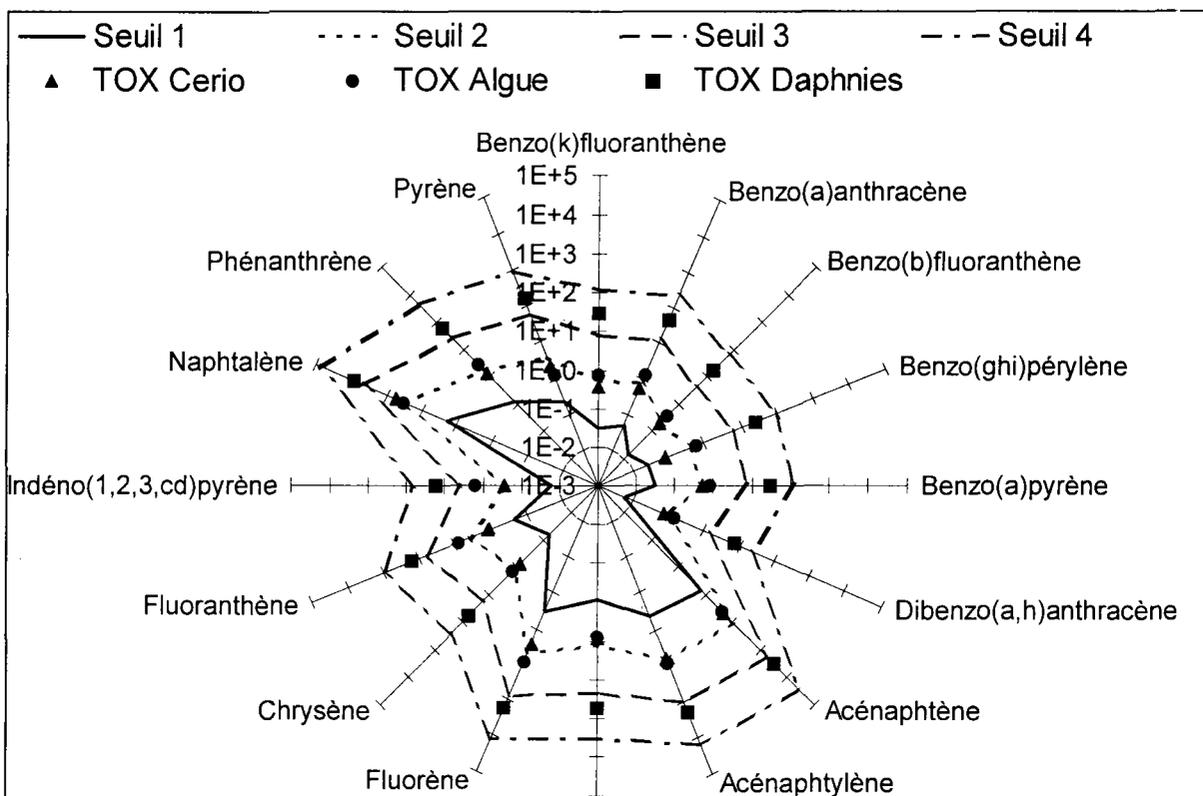


Figure 7 : Représentation graphique des seuils obtenus en  $\mu\text{g/L}$  pour chaque HAP en regard des résultats des essais d'écotoxicologie.

Les valeurs sont en logarithme décimal.

### 3.3 CALCUL DES SEUILS DANS LE CAS DES SEDIMENTS

Aucun essai sur sédiment n'était prévu dans le cadre de cette étude. Nous ne pourrions établir des seuils de toxicité sur sédiments que par le calcul à partir des valeurs obtenues pour l'eau ou bien en utilisant les données de la littérature, en utilisant par conséquent l'une des trois approches suivantes :

1. Calcul de seuil séparément pour chaque substance à partir des données bibliographiques
2. Calcul d'un seuil sédiment commun à tous les HAP à partir des données bibliographiques sur sédiments (hypothèse narcotique)
3. Calcul d'un seuil commun pour toutes les substances à partir du coefficient de partage et des valeurs de seuil obtenues dans l'eau.

Nous avons écarté d'emblée une quatrième approche qui consisterait à calculer un seuil eau séparément pour chaque substance et à appliquer ensuite la théorie du coefficient de partage. Cela reviendrait à ne pas valider l'hypothèse narcotique pour les sédiments, tout en l'acceptant pour l'eau, ce qui manque de logique.

Ces trois approches sont présentées successivement ci-dessous.

### 3.3.1 Calcul de seuil séparément pour chaque substance à partir des données bibliographiques

#### 3.3.1.1 Règles de base

Plusieurs méthodologies ont été proposées pour déterminer des seuils de qualité pour les sédiments ; elles ont fait par ailleurs l'objet d'une analyse critique, complétée d'une proposition d'approche (Garric & al. 1998). C'est cette proposition, résumée ci-dessous (Cf. Tableau 30), qui a servi de base à ce paragraphe.

Tableau 30 : Règle de calcul des seuils pour chaque substance.

Seuil	Calcul du seuil
1	{TEL/10} ou {plus basse NOEC/10} sur toutes les espèces disponibles ou {plus basse NOEC/100} si effets létaux seulement
2	{TEL} ou {plus basse NOEC} ou {plus basse NOEC/10} si effets létaux seulement
3	{PEL} ou {plus basse CEx} <sup>12</sup>
4	{moyenne géométrique des CEx}

Si le jeu de données comprend au moins deux espèces d'invertébrés appartenant à des embranchements différents, " ou " signifie ici " à défaut ". NB : Ces données proviennent du cahier des charges de l'étude et non du document guide technique de l'union Européenne.

#### 3.3.1.2 Données disponibles

Les données disponibles sont de deux types : d'une part des valeurs de toxicité récentes (sédiments enrichis ou échantillons naturels) issues de la bibliographie, d'autre part les valeurs TEL et PEL publiées. Les valeurs plus anciennes sont probablement toutes ou presque incluses dans la base de données ayant servi à calculer les TEL et PEL.

Les données du premier type portent sur le fluoranthène (25 valeurs pour des sédiments d'eau douce, dont 13 CE<sub>50</sub> survie ou immobilité, sur un insecte et un crustacé, provenant de 5 références ; si l'on ne conserve que les données relatives aux invertébrés benthiques, il reste 10 valeurs, dont 6 CE<sub>50</sub>), le phénanthrène (5 valeurs provenant de 3 références) et le pyrène (2 valeurs, provenant d'une seule référence). Les données du deuxième type figurent dans le Tableau 5 page 23. Les TEL et PEL proprement dits sont disponibles pour 6 substances (benzo(a)anthracène, benzo(a)pyrène, chrysène, fluoranthène, phénanthrène et pyrène). Des critères établis selon des approches similaires, mais pouvant différer au niveau de la formule de calcul et de la base de données utilisée, sont aussi disponibles pour la plupart des autres HAP de la série. En première analyse, on ne les retiendra pas ici par souci de cohérence de la démarche.

Par conséquent, la démarche proposée par Garric & al. (1998) ne paraît actuellement pas applicable à l'ensemble des HAP de la série EPA, ni ne permet de déterminer tous les seuils pour quelques substances au moins.

#### 3.3.1.3 Détermination de seuils & discussion

##### 3.3.1.3.1 Seuils par substance

Sur la base des données disponibles et de la démarche proposée par Garric & al., on obtient le Tableau 31 ci-après. Les valeurs TEL et PEL proviennent de Smith & al. (1996), citées dans le Tableau 5 page 23 et arrondies. Le seuil 4 pour le fluoranthène est la moyenne

---

<sup>12</sup> X ≥ 50%

géométrique des CE50 sur *C. tentans* et *H. azteca*, calculée à l'aide des données mentionnées ci-dessus. Le seuil 4 du phénanthrène est la moyenne géométrique de CE50 survie sur *Limnodrilus hoffmeisteri*, *Schizopera knabeni* et *Nitocra lacustris*. Le seuil 4 du pyrène n'a pas été calculé, en raison du trop petit nombre de données disponibles.

Tableau 31 : Seuils sédiments (en µg/kg) calculés pour chaque HAP individuellement

Molécule	Seuil 1 (TEL/10)	Seuil 2 (TEL)	Seuil 3 (PEL)	Seuil 4
Benzo(k)fluoranthène				
Benzo(a)anthracène	3	32	385	
Benzo(b)fluoranthène				
Benzo(ghi)pérylène				
Benzo(a)pyrène	3	32	780	
Dibenzo(a,h)anthracène				
Acénaphthène				
Acénaphthylène				
Anthracène				
Fluorène				
Chrysène	6	57	860	
Fluoranthène	11	110	2355	8000
Indéno(1,2,3-cd)pyrène				
Naphtalène				
Phénanthrène	4	42	515	224000
Pyrène	5	53	875	

Les seuils 1 et 2 obtenus pour le benzo(a)pyrène et le fluoranthène diffèrent de ceux adoptés jusqu'à présent (seuils dits " WRC " dans le Tableau 5 page 23), mais cela tient à ce que la définition des seuils a changé entre-temps, et à ce que le WRC a probablement utilisé un jeu de données différent. Cela ne devrait pas porter à conséquence pour le benzo(a)pyrène, dans la mesure où les ordres de grandeur des nouveaux seuils 1 et 2 sont les mêmes que précédemment ; en revanche, cela pourrait amener à des appréciations différentes de la qualité des sédiments pour le fluoranthène, puisque le seuil 1 passerait de 113 à 11 µg/kg, et le seuil 2 de 1500 à 110 µg/kg.

### 3.3.2 Calcul d'un seuil sédiment commun à tous les HAP à partir des données bibliographiques sur sédiments (hypothèse narcotique)

Une première approche consiste à examiner les valeurs de toxicité obtenues avec les HAP au laboratoire sur des organismes des sédiments. A partir de la base de données que nous avons établie, il est possible d'extraire 58 valeurs de toxicité sur 4 HAP<sup>13</sup> ; ces valeurs sont détaillées sur le Tableau 32. Le Tableau 33 page 71 montre que les substances concernées présentent des concentrations toxiques très comparables et non significativement différentes.

La simple application de la méthodologie " classique ", avec application de coefficients de sécurité modulés en fonction du jeu de données, conduirait à ne calculer des seuils que pour 4 substances avec des facteurs de sécurité très élevés. Par exemple l'acénaphthène aurait un seuil de 0.15µg/Kg car une seule espèce a été étudiée, par un même auteur. De même les trois valeurs de toxicité les plus faibles sont obtenues par un seul auteur qui avait lui-même publié des valeurs bien plus élevées quatre ans plus tôt.

<sup>13</sup> dans ce cas, les organismes marins sont inclus, contrairement au § précédent

Tableau 32 : récapitulatif des données de la littérature sur la toxicité sédimentaire.

Substance	Toxicité	Espèce	Mesure	Effet	Référence
Fluoranthène	23,6	<i>Chironomus tentans</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et Rodgers (1996)
Fluoranthène	60,6	<i>Hyallela azteca</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et Rodgers (1996)
Fluoranthène	110,5	<i>Daphnia magna</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et Rodgers (1996)
Fluoranthène	1500	<i>Hyallela azteca</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Fluoranthène	1700	<i>Chironomus tentans</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Fluoranthène	2300	<i>Hyallela azteca</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Fluoranthène	2400	<i>Daphnia magna</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Fluoranthène	3000	<i>Chironomus tentans</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Phénanthrène	3680	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie sur 10 jours	50%	Swartz et al. (1989)
Fluoranthène	4200	<i>Daphnia magna</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Fluoranthène	4200	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1989)
Fluoranthène	5500	<i>Hyallela azteca</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Fluoranthène	7300	<i>Chironomus tentans</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Fluoranthène	10100	<i>Capitella sp</i>	croissance 14 j	50%	Foss et Forbes (1997)
Fluoranthène	10247	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	50%	De Witt et al. (1992)
Phénanthrène	11000	<i>Schizopera knabeni</i>	reproduction 10 j	NOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
Phénanthrène	11000	<i>Nitocra lacustris</i>	survie 10 jours	NOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
Fluoranthène	11400	<i>Hyallela azteca</i>	survie 16 jours	NOEC	Driscoll et Landrum (1997)
Fluoranthène	13100	<i>Daphnia magna</i>	survie sur 10 jours	NOEC	Suedel et Rodgers (1996)
Fluoranthène	13900	<i>Chironomus tentans</i>	survie sur 10 jours	NOEC	Suedel et Rodgers (1996)
Fluoranthène	15000	<i>Daphnia magna</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1993)
Fluoranthène	21000	<i>Hyallela azteca</i>	survie 16 jours	LOEC	Driscoll et Landrum (1997)
Phénanthrène	22000	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 10 jours	NOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
Phénanthrène	22000	<i>Schizopera knabeni</i>	reproduction 10 j	LOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
Phénanthrène	22000	<i>Nitocra lacustris</i>	survie 10 jours	LOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
Phénanthrène	22000	<i>Nitocra lacustris</i>	reproduction 10 j	NOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
Fluoranthène	31000	<i>Chironomus riparius</i>	développement 28 j	NOEC	Stewart et Thompson (1995)
Fluoranthène	31000	<i>Chironomus riparius</i>	émergence 28 jrs	NOEC	Stewart et Thompson (1995)
Fluoranthène	38000	<i>Schizopera knabeni</i>	reproduction 14 j	50%	Lotufo (1997)
Phénanthrène	40500	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Prod. jeunes 28j	25%	Lotufo et Fleeger (1996)
Phénanthrène	45000	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 10 jours	LOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
Phénanthrène	45000	<i>Nitocra lacustris</i>	reproduction 10 j	LOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
Phénanthrène	51000	<i>Schizopera knabeni</i>	alimentation 30 h	LOEC	Lotufo (1997)
Phénanthrène	52000	<i>Schizopera knabeni</i>	reproduction 14 j	LOEC	Lotufo (1997)
Pyrène	59100	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Prod. jeunes 28j	25%	Lotufo et Fleeger (1996)
Phénanthrène	66600	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1997)
Phénanthrène	67194	<i>Nitocra lacustris</i>	survie 10 jours	50%	Lotufo et Fleeger (1997)
Acénaphène	69300	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1997)
Fluoranthène	80000	<i>Hyallela azteca</i>	survie 16 jours	50%	Driscoll et Landrum (1997)
Fluoranthène	80000	<i>Chironomus riparius</i>	émergence 28 jrs	67%	Stewart et Thompson (1995)
Pyrène	84300	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1997)
Fluoranthène	94000	<i>Schizopera knabeni</i>	alimentation 30 h	50%	Lotufo (1997)
Fluoranthène	99300	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1997)
Acénaphène	106200	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)
Phénanthrène	109500	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)
Pyrène	121000	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)
Fluoranthène	170000	<i>Chironomus riparius</i>	émergence 28 j	2%	Stewart et Thompson (1995)

Substance	Toxicité	Espèce	Mesure	Effet	Référence
Phénanthrène	171219	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 10 jours	50%	Lotufo et Fleeger (1997)
Fluoranthène	181000	<i>Hyallolela azteca</i>	croissance 30 j	NOEC	Harkey et al. (1997)
Pyrène	226000	<i>Lumbriculus variegatus</i>	évitement séd. 7j	50%	Kukkonen et Landrum (1994)
Fluoranthène	249000	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 4 jours	NOEC	Lotufo (1997)
Phénanthrène	261000	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 4 jours	NOEC	Lotufo (1997)
Pyrène	269000	<i>Lumbriculus variegatus</i>	survie 7 jrs	83%	Kukkonen et Landrum (1994)
Phénanthrène	297500	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Survie sur 10 jours	50%	Lotufo et Fleeger (1996)
Fluoranthène	451000	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 4 jours	LOEC	Lotufo (1997)
Phénanthrène	514000	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 4 jours	LOEC	Lotufo (1997)
Phénanthrène	524000	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 4 jours	50%	Lotufo (1997)
Pyrène	841000	<i>Limnodrilus hoffmeisteri</i>	Survie sur 10 jours	NOEC	Lotufo et Fleeger (1996)

Tableau 33 : Comparaison des concentrations toxiques des HAP sur sédiments obtenues dans la littérature. ( $\mu\text{g/Kg}$ )

	acénaphthène	Fluoranthène	Phénanthrène	Pyrène
Moyenne	4,9	4,0	4,7	5,2
Écart type	0,1	1,0	0,6	0,4
Nombre	2	30	20	6

Les concentrations sont en logarithmes décimaux. Aucun lot n'est significativement différent des autres au sens du test de Student.

Nous pouvons cependant nous inspirer de la méthodologie liée à l'hypothèse narcotique, proposée pour l'eau, pour tenter également de calculer des seuils de qualité pour les sédiments. Ceux ci seront alors basés sur des données publiées de toxicité dans les sédiments correspondant à des impacts réellement mesurés.

On considère que la concentration dans les sédiments, dans la mesure où elle dépend du coefficient de partage eau-carbone organique, est proportionnelle à la concentration interne au sein des organismes vivant dans les sédiments (cf. §3.3.3.1). Si l'hypothèse narcotique est vérifiée, la toxicité de tous les HAP doit donc se produire à une concentration constante dans les sédiments<sup>14</sup>. La variabilité de cette concentration-limite ne dépendra que de la distribution de sensibilité des espèces et de la distribution des taux de matière organique. Nous pouvons émettre l'hypothèse d'une distribution log-logistique de ces variations et calculer les paramètres de cette distribution.

Une fois la distribution logistique établie, le percentile 5% peut être choisi comme seuil susceptible de protéger les organismes benthiques dans 95% des cas, que cette variabilité soit dépendante de la diversité des espèces ou bien de la diversité des taux de matière organique sédimentaire dans les hydrosystèmes.

La courbe Figure 8 montre la diversité des réponses toxiques des organismes des sédiments obtenues au laboratoire, seules les données de toxicité chronique ayant été retenues.

<sup>14</sup> On peut cependant s'interroger sur l'expression de la concentration, en toute rigueur il faudrait tenir compte de molarités mais l'effet narcotique étant lié à une charge dans les lipides il ne faut pas exclure qu'une molécule aura un effet narcotique proportionnel à sa masse molaire à concentration molaire égale. Sans trancher sur cette hypothèse nous utiliserons les valeurs en masse dont nous disposons.

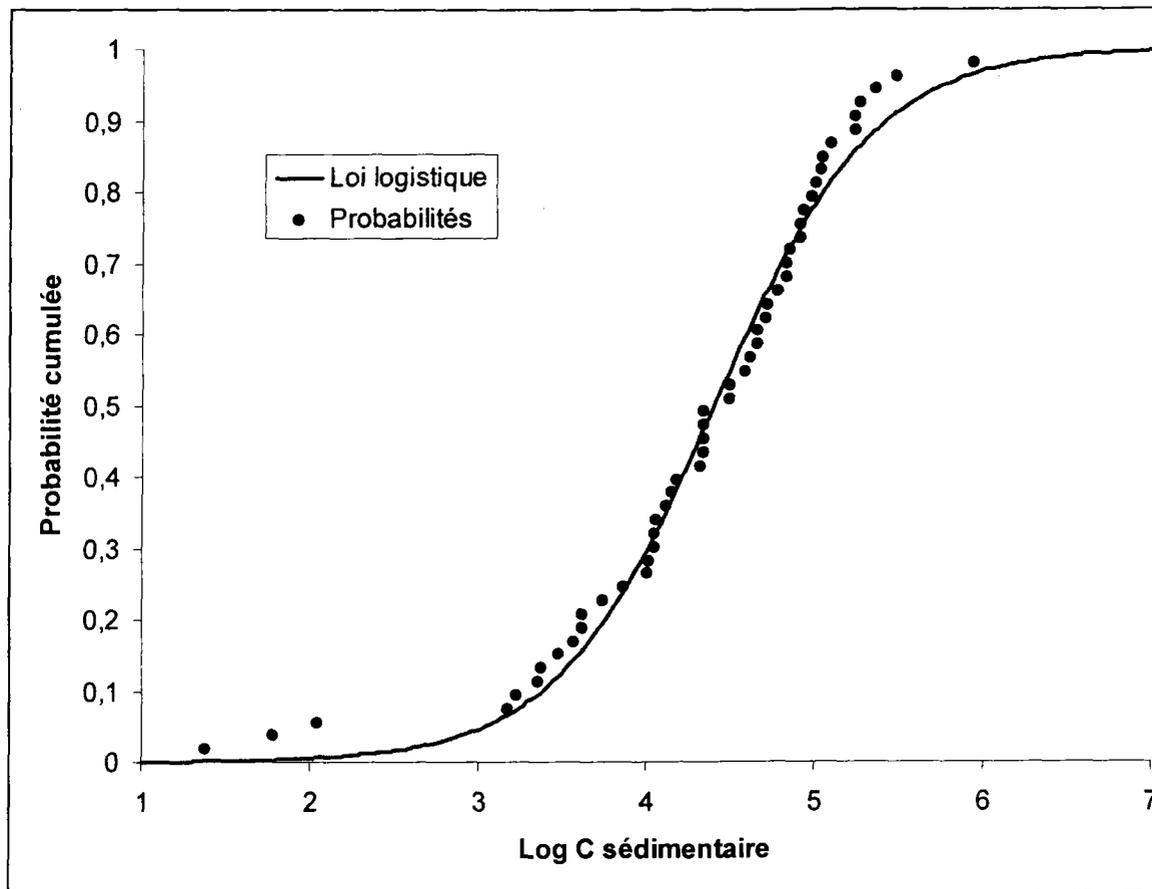


Figure 8 : Distribution des concentrations toxiques ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) des sédiments obtenus dans la littérature scientifique.

On note la faible diversité de cette distribution en comparaison avec les distributions de toxicité aiguë et chronique obtenues au laboratoire dans l'eau. Les données sont essentiellement des données de toxicité chronique avec cependant une majorité de mesures en  $\text{CL}_{50}$  chronique, paramètre moins sensible que la  $\text{CE}_{10}$ , ce dont il faudra tenir compte au moment d'appliquer des facteurs de sécurité aux seuils bruts.

Il faut noter également la faiblesse relative des données extraites de la littérature, par exemple les trois valeurs de concentrations toxiques les plus faibles proviennent de la même publication ce qui rend dangereux le fait de leur faire une confiance aveugle.

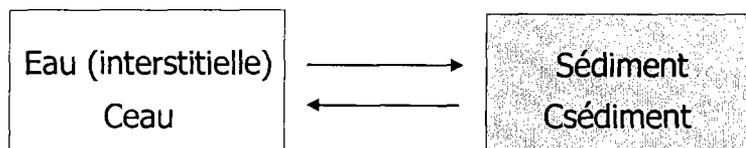
Cette distribution admet un percentile 5% correspondant à une concentration-seuil dans les sédiments de  $1\,105\ \mu\text{g}/\text{Kg}$ . Cette valeur constitue le *seuil 1 brut* obtenu par cette approche. Toutefois les données utilisées sont hétérogènes et incluent majoritairement des  $\text{CL}_{50}$ . Outre le fait qu'il conviendrait alors d'appliquer un coefficient de sécurité majoré, il faut aussi admettre que ce seuil n'est pas strictement cohérent avec la méthode d'Aldenberg et Slob (cf. § 3.1).

Enfin cette méthode pose le problème des seuils 2, 3, 4 pour lesquels nous n'avons pas d'autre alternative que de calquer arbitrairement les rapports entre seuils consécutifs sur ceux obtenus en milieu aquatique où nous avons une indication supplémentaire basée sur la toxicité aiguë.

### 3.3.3 Calcul d'un seuil sédiment par équilibre de partage

#### 3.3.3.1 Base théorique :

Un produit chimique placé dans un système diphasique tend à s'adsorber sur la phase solide en fonction de ses propriétés physiques. L'équilibre thermodynamique entre la phase adsorbée et la phase aqueuse obéit à la loi d'action de masse.



L'équilibre d'adsorption s'écrit selon l'équation suivante :

$$\frac{Csédiment}{Ceau} = Kd \text{ (Équation 1)}$$

où  $C_{eau}$  et  $C_{sédiment}$  représentent respectivement la concentration dans l'eau interstitielle et les sédiments,  $Kd$  est le coefficient de partage eau-sédiments.

Ce coefficient est dépendant du type de sédiment et notamment de sa teneur en carbone organique. On peut donc exprimer le coefficient de partage en fonction de  $Koc$  qui est le coefficient de partage carbone organique-eau et du taux de carbone organique des sédiments ( $f_{oc}$ ). L'équation suivante montre cette relation :

$$Kd = \frac{Csédiments}{Ceau} = Koc \times f_{oc} \text{ (Équation 2)}$$

Les données de la littérature étudiées par J. Garric et al. en 1998 conduisent à utiliser un taux de carbone organique de 5% et une valeur de  $Koc$  telle que :

$$\log Koc = \log Kow - 0,21 \text{ (Équation 3)}$$

Les valeurs qui en résultent apparaissent dans le Tableau 34.

Il faut noter que le taux de carbone organique retenu par l'Union Européenne dans le cadre des évaluations des concentrations prédites dans l'environnement (PEC) est de 10% ce qui est conservatif du point de vue des PEC mais ne le serait pas du tout dans le cadre de la détermination des concentrations d'effet dans les sédiments à partir de concentrations aqueuses.

La relation entre le coefficient de partage eau-sédiments et le coefficient de partage octanol-eau déduite de l'équation 3 est donc la suivante :

$$Kd = f_{oc} \times Kow \times 10^{-0,21} \text{ (Équation 4)}$$

Rappelons que  $Kow$  est également un descripteur rudimentaire du coefficient de bioconcentration et que nous l'avons utilisé pour déterminer la concentration interne toxique des HAP. Il en résulte que si nous nous plaçons dans l'hypothèse de l'équilibre entre les phases eau, sédiment et organismes biologiques, la concentration-seuil de toxicité dans les sédiments sera proportionnelle à la concentration interne biologique de chaque HAP.

Si l'on combine cette assertion avec l'hypothèse d'un mécanisme d'effet de type narcotique, selon laquelle la concentration toxique interne aux organismes est identique pour tous les HAP, le niveau de concentration correspondant dans les sédiments sera

également identique pour tous les HAP, et simplement proportionnel à la concentration interne. En effet, en combinant l'équation 4 ci-dessus avec l'équation du partage à l'équilibre entre organismes et eau, il vient :

$$C_{sed} = \frac{C_{org}}{K_{ow}} \times K_{ow} \times 10^{-0.21} \times f_{oc} = C_{org} \times 10^{-0.21} \times f_{oc}$$

(Équation 5)

### 3.3.3.2 Calcul du seuil :

Le Tableau 34 récapitule les valeurs des paramètres thermodynamiques du partage eau-sédiments calculés selon les équations développées au chapitre 3.3.3.1.

Tableau 34 : Valeurs de Koc et Kd calculées à partir de Kow.

Nom	log Kow	log Koc	log Kd (5% Corg.)
Benzo(k)fluoranthène	6,11	5,9	4,60
Benzo(a)anthracène	5,91	5,7	4,40
Benzo(b)fluoranthène	6,46	6,25	4,95
Benzo(ghi)pérylène	6,22	6,01	4,71
Benzo(a)pyrène	6,13	5,92	4,62
Dibenzo(a,h)anthracène	6,84	6,63	5,33
Acénaphène	3,78	3,57	2,27
Acénaphylène	4	3,79	2,49
Anthracène	4,68	4,47	3,17
Fluorène	4,11	3,9	2,60
Chrysène	5,81	5,6	4,30
Fluoranthène	5,23	5,02	3,72
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	6,4	6,19	4,89
Naphtalène	3,33	3,12	1,82
Phénanthrène	4,57	4,36	3,06
Pyrène	5,23	5,02	3,72

Le seuil 1 calculé (cf. Tableau 28) pour l'eau permet alors le calcul du seuil sédiments à partir des seuils dans l'eau et du Kd. La valeur obtenue est 1 258 µg/kg pour le seuil 1-sédiment.

On note que l'utilisation de la méthode des facteurs de sécurité en milieu aqueux préalablement à l'application de la méthode de l'équilibre de partage conduirait à des valeurs de seuils sédiments très disparates et éloignées de la toxicité mesurée au laboratoire pour les quelques substances qui ont été étudiées par des essais sur sédiments. Dans un tel cas de figure l'utilisation du coefficient de partage devrait être maniée avec précaution car elle peut conduire à des incohérences liées à l'imprécision des valeurs de seuil aqueux.

Il faut noter aussi que le seuil 1-sédiment obtenu *in fine* repose sur plusieurs hypothèses emboîtées (système à l'équilibre, partage "simple" entre compartiments, relation entre Kow et Koc), et qu'aucune de ces hypothèses n'a reçu de validation expérimentale complète. Par exemple, la relation entre Koc et Kow (équation 4) est obtenue par régression à partir d'un jeu de données particulier, mais d'autres équations ont été

proposées à partir de jeux de données différents. Si l'on appliquait celle proposée par Di Toro & al. (1991)<sup>15</sup> (Équation 6), on obtiendrait un seuil 1 à 2000 µg/kg.

$$\log K_{oc} = 0.000928 + 0.983 \times \log K_{ow}$$

(Équation 6)

### 3.3.4 Discussion

Des trois méthodes utilisées, les deux qui utilisent l'effet narcotique donnent des résultats très semblables bien que provenant de jeux de données de toxicité totalement différents ; toutefois, l'une des deux est entachée d'incertitudes, dues au fait qu'on a inclus dans la distribution des données hétérogènes. Les deux valeurs de seuil 1 " brut " ainsi obtenues, c'est à dire avant utilisation d'un facteur de sécurité, sont supérieures d'un facteur cent à trois cents- à celles obtenues à partir des TEL de la littérature. Les valeurs de TEL sont basées sur des données bibliographiques et de la " littérature grise " à laquelle nous n'avons pas accès. Plusieurs publications récentes présentent des résultats encourageants quant à la pertinence des concepts TEL/PEL et ERL/ERM lorsqu'on les confronte aux résultats d'essais de toxicité de sédiments collectés dans le cadre de programmes de monitoring en milieu estuarien ou cotier (Long & al. (1998), O'Connor & al. (1998)).

Long & al. (1998) notent par exemple 11% et 9% de " faux négatifs " (c'est à dire des sédiments toxiques pour l'essai de survie sur amphipode, tous les contaminants étant à des concentrations inférieures soit à l'ERL, soit au TEL) sur plus de 1000 échantillons. De même les pourcentages de faux négatifs pour les ERM et PEL (sédiments fortement toxiques à des concentrations inférieures à ces critères) restent faibles ( $\leq 16\%$ ). Cependant, lorsqu'on ajoute les résultats d'autres essais, les pourcentages de faux négatifs augmentent fortement – sans doute parce que la base de données utilisée pour établir les critères est dominée par les résultats d'essais amphipode -, et d'autre part les fréquences de faux positifs ne sont pas discutées. O'Connor & al. (1998), dans l'examen statistique sommaire d'environ 1500 échantillons, retrouvent plus de faux négatifs, mais en prenant en compte trois essais de toxicité simultanément.

D'autre part la théorie du partage eau-sédiment, ainsi que l'évidence d'un effet narcotique pour tous les HAP quel que soit leur  $K_{ow}$  est controversée dans la littérature scientifique. L'approche de partage à l'équilibre repose implicitement sur l'hypothèse d'une relation linéaire entre les  $K_{ow}$  et les facteurs de bioconcentration. Celle-ci paraît discutable sur l'ensemble de la distribution des  $K_{ow}$  des HAP, les écarts à la linéarité étant rencontrés pour des valeurs élevées de  $K_{ow}$ . Dans une publication récente montrant l'échec à valider le modèle  $\Sigma$ -PAH proposé par Swartz & al. (1995), Boese & al. (1999) en viennent à mettre en cause d'une part la linéarité de la relation entre  $K_{ow}$  et toxicité (exprimée en  $CL_{50}$ ), d'autre part la linéarité de la relation entre facteur de bioconcentration et  $K_{ow}$  (élément déjà souligné par Vasseur & al. dans l'un des rapports SEQ).

Du fait de l'hypothèse narcotique, et par voie de conséquence de l'additivité des effets toxiques, le seuil unique est applicable à la somme des HAP présents sur un site. Les valeurs obtenues pour les 4 seuils (arrondies, calculées à partir des seuils " eau " du Tableau 28) apparaissent dans le Tableau 35. Les seuils étant dérivés des seuils en milieu

---

<sup>15</sup> cité par Swartz & al. (1995)

aquatique les seuils 1,2,3,4 sont calculés avec la même équation à partir de leurs homologues aqueux. On peut bien entendu leur donner la même signification sous réserve de validité de l'hypothèse narcotique.

*Tableau 35 : seuils bruts sédiments pour tous les HAP à partir de l'hypothèse narcotique en µg/Kg*

Type de seuil	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Seuil brut (partage)	1 000	15 000	240 000	3 800 000
Seuil brut (littérature)	(1258)	19000	300 000	4 743 000

*La première ligne correspond à des seuils calculés par hypothèse narcotique et équilibre de partage, la deuxième correspond à l'application de l'hypothèse narcotique aux données de la littérature.*

Récemment, Swartz (1999) a proposé pour le milieu marin une approche “consensuelle”, valable pour les HAPs “totaux”<sup>16</sup>. Les valeurs sont normalisées à 1% de carbone organique. Selon lui, des seuils individuels basés sur des essais en laboratoire risquent de conduire à sous-estimer les effets écologiques sur le terrain, du fait que les HAPs sont présents systématiquement en mélange. Inversement, des seuils dérivés d'observation de terrain corrélées avec des concentrations individuelles vont surestimer les effets dus à un HAP particulier.

Il constate par ailleurs une bonne convergence des seuils déterminés selon différentes méthodes (pour le seuil le plus bas : équilibre de partage, modèle ΣPAH, ERL, SLC), dès lors que l'on s'intéresse aux mélanges de HAPs. Les TEL-PEL font cependant exception ; alors que les autres seuils diffèrent au maximum d'un facteur 2 pour le niveau le plus bas, le TEL-T<sub>PAH</sub> (totalité des HAP) représente moins de la moitié du plus bas de cette gamme.

Swartz propose donc de retenir des critères de consensus qui sont simplement la moyenne des seuils existants dans chaque série (TEC<sup>17</sup> : TEL-ERL-SLC ... ; MEC<sup>17</sup> : PEL-ERM-LAET ...). Comparant ces seuils moyens à des résultats d'essais de toxicité sur sédiments estuariens et marins, et à quelques relevés de faune benthique, il observe de 5 à 13% de sédiments toxiques pour des concentrations de HAPs totaux inférieures ou égales au TEC, et une relation inverse entre richesse et abondance de la faune benthique d'une part, HAPs totaux d'autre part. Dans ce dernier cas, les données sont cependant peu nombreuses.

Compte tenu de ces différents éléments, quel jeu de seuils choisir ? Il est proposé de choisir un seuil global “HAP-totaux”, soit sur la base des propositions de Garric & al. adaptées, soit sur la base de l'équilibre de partage, soit encore une synthèse des deux (comme proposé par Swartz). La confrontation aux résultats du RNB devrait permettre d'éclairer ce choix.

<sup>16</sup> en fait 13 substances : naphthalène, acenaphtylène, acenaphtène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)- et benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène

<sup>17</sup>TEC : threshold effect concentration ; MEC : median effect concentration ...

### 3.3.5 Comparaison avec les données du milieu

Les données utilisées proviennent du bassin Rhône-Méditerranée-Corse (année 1997 ; 128 points de prélèvement, 16 HAP mesurés). La distribution des HAP totaux est donnée Figure 9.

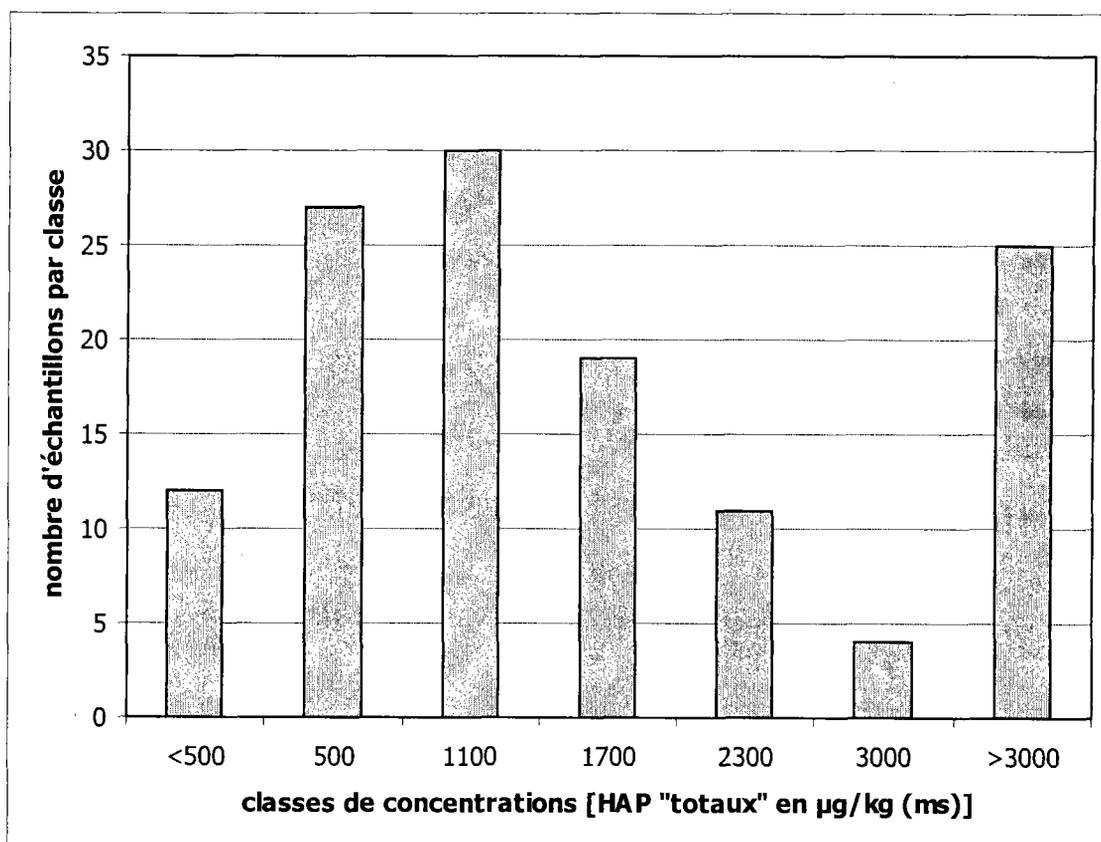


Figure 9 Distribution des concentrations en HAP « totaux » dans les sédiments du bassin RMC en 1997

Les bornes des classes ont été déterminées à partir de la deuxième classe, qui correspond au 25<sup>ème</sup> percentile et à peu de chose près à la limite de dosage fictive (somme des limites de dosage) ; de ce fait, la borne supérieure de la troisième classe correspond à la médiane, celle de la cinquième au 75<sup>ème</sup> percentile.

Si l'on confronte les seuils bruts du Tableau 35 à cette distribution, on constate que le seuil 1 correspond au 54<sup>ème</sup> percentile, et le seuil 2 au 96<sup>ème</sup>.

Dans le cas de l'approche préconisée par Garric & al., la somme des seuils 2 disponibles vaut environ 330 µg/kg, pour 6 HAP. On peut donc penser que la somme des 16 serait du même ordre de grandeur que le seuil 1 brut calculé par la méthode de partage à l'équilibre. Il paraît préférable de comparer le seuil 2 (TEL) avec le seuil 1 (EP), dans la mesure où ce dernier a été calculé sans application de facteur d'extrapolation sur les seuils eau et sur des données de toxicité létale.

Le même raisonnement amènerait à calculer une somme des seuils 3 sur les 6 HAPs pour lesquels on a des valeurs de PEL ( $\Sigma = 5800 \mu\text{g/Kg}$  ce qui amènerait à 17000 pour 16).

Les valeurs de seuil calculées pour des HAPs individuels selon la démarche TEL/PEL adaptée (Garric & al, 1998) permettraient en l'état une classification des sédiments du RNB sur 2 classes de qualité, sur 3 au maximum si le seuil 4 était calculable. Cela dit, le nombre d'échantillons en classe 5 serait en tout état de cause extrêmement réduit.

Tableau 36 : Percentiles correspondants aux seuils calculés selon TEL/PEL (LD : limite de dosage, considérée par excès comme égale à 500 µg/kg ; nd : seuil hors de la distribution des concentrations)

	seuil 1	seuil 2	seuil 3	seuil 4
benzo(a)anthracène	< LD	9	72	pas de seuil
benzo(a)pyrène	< LD	18	94	pas de seuil
chrysène	< LD	6	89	pas de seuil
fluoranthène	< LD	20	95	98
phénanthrène	< LD	< LD	87	n.d.
pyrène	< LD	7	94	pas de seuil

### 3.3.6 Proposition de seuils pour les sédiments

Dans le contexte actuel, une approche “ consensuelle ” et portant sur des seuils exprimés en HAP totaux telle que celle proposée par Swartz (1999) semble inévitable. Cependant, ce consensus ne doit être pris que pour ce qu’il est, c’est à dire l’impossibilité actuelle à valider une démarche plutôt qu’une autre. Le calcul d’une moyenne des différents critères, tel que le propose Swartz, a l’inconvénient de faire l’impasse sur les approches théoriques qui sous-tendent chacun d’entre eux, et de les considérer comme tous également erronés. Or, s’il y a consensus, c’est essentiellement sur le fait que les résultats obtenus avec les données disponibles sont relativement proches les uns des autres : on a vu que l’hypothèse narcotique et le partage à l’équilibre donnaient des résultats très proches (1105 et 1258 µg/kg pour le seuil 1 brut), et qu’il paraissait plausible que les seuils 2 et 3 issus de l’approche TEL/PEL étaient du même ordre de grandeur. Mais chacun de ces calculs dépend étroitement de jeux de données particuliers, voire hétérogènes (cas du jeu utilisé dans l’hypothèse narcotique), et d’hypothèses de travail ou de modèles perfectibles.

Il nous semble préférable de retenir cette démarche de consensus “ faute de mieux ” et temporairement. Les données théoriques et de terrain à venir permettront certainement à terme de réviser les seuils et de les consolider.

Le recours à des seuils globaux, exprimés en HAP totaux, est par ailleurs justifié, en suivant Swartz (1999), par le fait que les HAPs sont systématiquement présents dans l’environnement sous forme de mélanges, et que ce problème n’est pas résolu de manière satisfaisante par les approches usuelles, dès lors qu’elles cherchent à déterminer des critères individualisés. Les critères dérivés à partir de données de terrain en tiennent compte, puisqu’on ramène à des concentrations de substances individuelles une toxicité qui est due à un mélange. C’est d’ailleurs probablement ce qui explique que les critères dérivés du terrain (i.e. TEL/PEL) soient systématiquement plus bas que les autres, et notamment ceux calculés par la méthode EP (Swartz, 1999, Long & al., 1998). L’hypothèse narcotique constitue un argument allant dans le même sens : la concentration interne unique qui détermine un effet donné vaut aussi bien pour un HAP individuel que pour la somme des HAPs.

Le jeu de seuils issu de l’approche du partage à l’équilibre étant le seul complet actuellement sera utilisé comme base de départ. Cependant, ces seuils ont été déterminés à partir de seuils bruts dans l’eau, c’est à dire avant application de facteurs de sécurité. La question se pose donc de savoir quel facteur appliquer.

L’usage de facteurs de sécurité (terminologie générique, qui englobe plusieurs appellations) est très répandu, et plus ou moins codifié, notamment par des institutions telles que l’Union

Européenne, dans le cadre de la procédure d'évaluation des risques préalable à la notification des substances chimiques. On peut considérer cet usage comme une application du principe de précaution. Après application d'un facteur de sécurité le seuil est inférieur à la borne inférieure de l'intervalle de confiance du seuil calculé.

Dans le cas présent, il s'agit de rendre compte d'incertitudes relatives à la gamme de sensibilité des espèces à protéger (en d'autres termes les résultats d'essais rendent-ils compte de l'ensemble de cette gamme ?), de l'adéquation des données disponibles au but poursuivi, et de l'incertitude sur la voie d'exposition. D'après les éléments rassemblés par Chapman & al. (1998) sur les pratiques de diverses institutions, la première source d'incertitudes peut conduire à un facteur de 1 à 10, la deuxième de 1 à 100, et la troisième de 10. Cependant, ces auteurs critiquent l'usage abusif (cumulatif) de facteurs de sécurité ou d'extrapolation, et recommandent de limiter ceux-ci autant que faire se peut.

Un facteur de sécurité de 10 semble toutefois insuffisant dans le contexte de cette étude ; il est habituellement utilisé pour des jeux de données assez complets, avec donc une incertitude minimale. Un facteur de sécurité de 100 paraît en revanche un maximum, dans la mesure notamment où il signifierait qu'aucun échantillon (sur la base des données RMC 1997) n'est en classe de qualité excellente (< seuil 1), et seulement 10% des échantillons auraient des concentrations inférieures au seuil 2. En d'autres termes, 90% des sites seraient susceptibles d'effets toxiques dus aux HAP.

Dans ces conditions, un facteur de sécurité de 40 paraît un compromis acceptable ; compte tenu des nécessaires arrondis, et des limites de dosage, on arriverait aux seuils exposés Tableau 37.

Seuil	Valeur du seuil ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ms))
1	50
2	500
3	7 500
4	110 000

*Tableau 37- Seuils sédiments proposés*

Il paraît en tout état de cause indispensable de prévoir de collecter des données biologiques (essais de toxicité, communautés, etc.) sur des sites contaminés à ces niveaux de concentrations, de façon à consolider ou améliorer ces valeurs.

On aurait aussi pu envisager de garder l'approche Garric et al., dans la mesure où nous avons constaté une concordance satisfaisante entre les différentes approches TEL/PEL (effet narcotique et somme des 16 HAPS) et les seuils calculés par équilibre de partage en appliquant un facteur sécurité de 10 sur le TEL ou seuil 1 (1000/10), conserver le TEL = seuil 1 (1000) en seuil 2, conserver un TEL en seuil 3 (18000), mais dans ce cas il aurait été difficile de déterminer un seuil 4 satisfaisant.

### 3.4 CALCUL DES SEUILS DE GENOTOXICITE

#### 3.4.1 Approche par comparaison des seuils de toxicité chronique avec les concentrations d'effet avérées.

La recherche bibliographique effectuée à l'occasion de cette étude a couvert un grand nombre d'études de génotoxicité sur les HAP. Nous avons décrit page 22 les valeurs les plus faibles rencontrées conduisant à un effet génotoxique, il s'avère que ces valeurs sont largement plus élevées que les seuils bruts que nous avons calculés. Seul le benzo(a)pyrène serait génotoxique à une concentration d'un ordre de grandeur approchant la valeur du seuil dans l'eau.

Ces données semblent indiquer qu'il n'est pas nécessaire de renforcer la sévérité des seuils que nous avons calculés en raison de considérations sur la génotoxicité. Cependant le fait que la littérature ne comporte que peu de données de génotoxicité en milieu aquatique doit nous inciter à la prudence.

Par ailleurs ces données concernent essentiellement les cas de multi-contamination, ce qui rend difficile l'affectation à une molécule particulière de la responsabilité de l'effet génotoxique. Cependant on peut penser que l'effet observé est toujours supérieur à celui que l'on noterait si la molécule étudiée était présente seule, ceci dans l'hypothèse où aucun antagonisme massif n'est suspecté.

Enfin les concentrations globales des HAP dans les sédiments provoquant des effets génotoxiques et relevées dans la littérature (Tableau 4 page 22) sont proches ou bien se révèlent supérieures au seuil 1 que nous venons de proposer pour les sédiments.

Tableau 38 : Comparaison des valeurs seuils pour l'eau avec les valeurs les plus faibles de génotoxicité. ( $\mu\text{g/L}$ )

Molécule	Seuil 1 (eau)	Plus faible concentration génotoxique constatée
benzo(k)fluoranthène	0,03	740
benzo(a)anthracène	0,05	70
benzo(b)fluoranthène	0,014	350
benzo(ghi)pérylène	0,025	350
benzo(a)pyrène	0,03	0,5
dibenzo(a,h)anthracène	0,006	240
acénaphthène	6,8	
acénaphtylène	4,1	310
anthracène	0,9	2919
fluorène	3,2	3230
chrysène	0,06	1490
fluoranthène	0,24	3270
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0,016	-
naphthalène	19	680
phénanthrène	1,1	530
pyrène	0,24	2152

### 3.4.2 Approche par la dose génotoxique

Nous avons vu que les seuils que nous avons calculés correspondent à une concentration interne maximale identique pour tous les HAP. Nous pouvons alors comparer cette concentration interne à la concentration d'essai susceptible de provoquer l'apparition de phénomènes génotoxiques dans les essais classiques de génotoxicité. Les essais sur boîte de pétri sont en effet réalisés au-delà de la limite de solubilité sur un milieu solide ce qui devrait permettre, en première hypothèse, de comparer les concentrations toxiques à des concentrations internes.

En revanche l'essai des fluctuations est un essai en phase aqueuse, les concentrations d'effet doivent être plutôt comparées aux seuils en solution dans l'eau. On se rend compte dans ce cas que les essais fluctuations ne permettent en aucun cas de diminuer les valeurs des seuils établis à partir de données d'écotoxicité.

Ces considérations doivent être prises avec la plus grande prudence, en effet les assertions sur les concentrations en phase solide des boîtes de pétri sont sujettes à caution ainsi que le calcul des concentrations mêmes reconstituées à partir de valeurs données par boîte.

Tableau 39 : Données de génotoxicité de l'INERIS et de la littérature sur les procaryotes, les doses sont en mg/L.

Substance	INERIS		Pahlman et al.		Kaden et al.		Mersch et al.		
	Rép.	Dose	Rép.	Dose	Rép.	Dose	Rép.	IF	IP
Benzo(k)fluoranthène	+	0,74	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
<b>Benzo(a)anthracène</b>	+	0,07	+	<b>5,02</b>	+	<b>14,84</b>	+	3,78	0,100
Benzo(b)fluoranthène	+	0,35	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+	3,21	0,045
<b>Benzo(ghi)Pérylène</b>	+	0,35	N.D.	N.D.	+	<b>19,89</b>	+	2,14	0,033
<b>Benzo(a)pyrène</b>	+	0,14	+	<b>0,50</b>	+	<b>1,01</b>	+	6,94	0,600
<b>Dibenzo(a,h)anthracène</b>	+	0,24	+	<b>5,01</b>	+	<b>20,88</b>	+	2,62	0,039
Acénaphène	-		-	24,98	N.D.	N.D.	-	1,10	0,000
Acénaphthylène	+	1,41	N.D.	N.D.	+	152,14	N.D.	N.D.	N.D.
Anthracène	-		-	499,85	-	40,10	-	1,36	0,000
fluorène	-		-	124,98	-	49,86	-	1,02	0,000
<b>Chrysène</b>	+	2,91	+	<b>2,51</b>	+	<b>10,27</b>	+	7,43	0,220
<b>Fluoranthène</b>	-		N.D.	N.D.	+	<b>1,01</b>	+	8,71	0,410
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	-		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	+	2,59	0,036
Naphtalène	-		-	49,99	-	256,36	-	1,09	0,000
Phénanthrène	-		-	50,00	-	53,47	+	2,94	0,053
<b>Pyrène</b>	-		-	<b>49,97</b>	+	<b>28,32</b>	-	1,21	0,000

Les valeurs de concentrations de la littérature ont été calculées en supposant le volume des boîtes de culture bactérienne égal à 2 ml. Certaines données sont en facteur d'induction (IF) ou potentiel d'induction (IP) maximal. ND indique une absence de donnée. Les essais rapportés dans la littérature sont donnés en µg par boîte, nous les avons reconstitués en mg/L.

La valeur à comparer aux données du Tableau 39 se trouve dans le Tableau 28 page 66 soit 40,7 mg/L pour le seuil 1. On remarque que huit substances sur les seize, marquées en gras sur le tableau, sont génotoxiques à des concentrations inférieures aux concentrations seuils interne.

Les substances dont les réponses sont les plus souvent positives sont le benzo(a)pyrène, le dibenzo(a,h)anthracène et le chrysène. Le benzo(a)anthracène présente également une génotoxicité fréquemment citée et ceci à des concentrations relativement faibles.

Il reste que ces données sont assez peu homogènes selon les auteurs y compris par rapport aux données obtenues à l'occasion de cette étude. Les valeurs de concentrations de la littérature ont été recalculées à partir de concentrations par boîte ceci peut expliquer certaines différences importantes entre les laboratoires. Nous serons donc très prudents dans notre interprétation à partir de la dose génotoxique.

### **3.4.3 Approche par les facteurs d'équivalents toxiques**

Les équivalents toxiques sont utilisés depuis quelques années notamment dans la série des polychloro-dibenzo-dioxines afin de pondérer la concentration de chacun des constituants d'un mélange par sa toxicité. On donne le poids 1 au composé de référence dans la série (souvent le plus toxique connu au moment d'établir la liste) et on pondère les autres composés en fonction de leur toxicité relative. Nisbet et al. ont proposé en 1992 des équivalents toxiques pour les HAP en fonction des données de génotoxicité en leur possession (Tableau 40).

Cette démarche est intéressante car elle permet de calculer un équivalent benzo(a)pyrène pour tout mélange de HAP présent dans le milieu. Elle serait donc utile à la protection du milieu naturel en proposant de la même manière que nous le faisons pour la toxicité des mélanges d'aborder un seuil de génotoxicité des mélanges de HAP.

On remarque cependant des contradictions entre le Tableau 39 et le Tableau 40 qui rendront difficile la détermination des seuils de génotoxicité pour les HAP. Le plus notable est le cas du fluoranthène qui est affecté d'un équivalent toxique faible alors que dans la littérature sa génotoxicité semble avérée.

Ces équivalents toxiques sont cependant en accord avec les résultats du Tableau 39 et confirment que le benzo(a) pyrène et le dibenzo(a,h)anthracène sont les plus génotoxiques. En revanche le chrysène n'apparaît pas particulièrement génotoxique tandis que le benzo(a)anthracène, le benzo(k)fluoranthène et le benzo(b)fluoranthène ainsi que l'Indéno(1,2,3,c,d)pyrène ont un rang inquiétant.

Tableau 40 : Équivalents toxiques des HAP

Substance	Équivalent toxique
Benzo(k)fluoranthène	0.1
Benzo(a)anthracène	0.1
Benzo(b)fluoranthène	0.1
Benzo(ghi)Pérylène	0.01
Benzo(a)pyrène	1
Dibenzo(a,h)anthracène	5
Acénaphène	0.001
Acénaphthylène	0.001
Anthracène	0.01
fluorène	0.001
Chrysène	0.01
Fluoranthène	0.001
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0.1
Naphtalène	0.001
Phénanthrène	0.001
Pyrène	0.001

#### 3.4.4 Synthèse des données de génotoxicité

Il apparaît évident, au vu des données de la littérature aussi bien que des données obtenues à l'occasion de cette étude qu'il ne sera pas possible d'utiliser pour déterminer les seuils de génotoxicité une démarche de modélisation, comme celle que nous avons utilisée pour les seuils de toxicité. La Figure 10 représente les résultats obtenus dans la littérature et à l'INERIS sous une forme synoptique sous la forme d'équivalents benzo(a)pyrène. On peut identifier les substances qui sont les plus génotoxiques sur les cercles de plus grand rayon.

A partir de cette représentation en équivalents toxiques nous choisirons de pénaliser les composés les plus génotoxiques que sont le benzo(a)pyrène et le dibenzo(a,h)anthracène par un facteur de sécurité de 100. Concernant les autres substances dont la génotoxicité est moins forte, nous proposons un facteur de sécurité de 10 pour Benzo(k)fluoranthène, Benzo(a)anthracène, Benzo(b)fluoranthène, Chrysène, Fluoranthène et Indéno(1,2,3,c,d)pyrène. Les HAP restant ne sont pas pénalisés par rapport au seuil basé sur la toxicité chronique. Ces facteurs de sécurité de 100 et 10 pour la génotoxicité ne seront pas ajoutés au facteur d'extrapolation au milieu suite à une décision du comité de pilotage de l'étude<sup>18</sup>.

Il reste que le manque de données de génotoxicité sur eucaryotes vivant dans les sédiments obère sérieusement la prise de décision dans ce domaine. Nous recommandons fortement le développement de tels essais dans un proche avenir.

<sup>18</sup> Il s'agit d'une décision de gestion des risques prise par le comité de pilotage

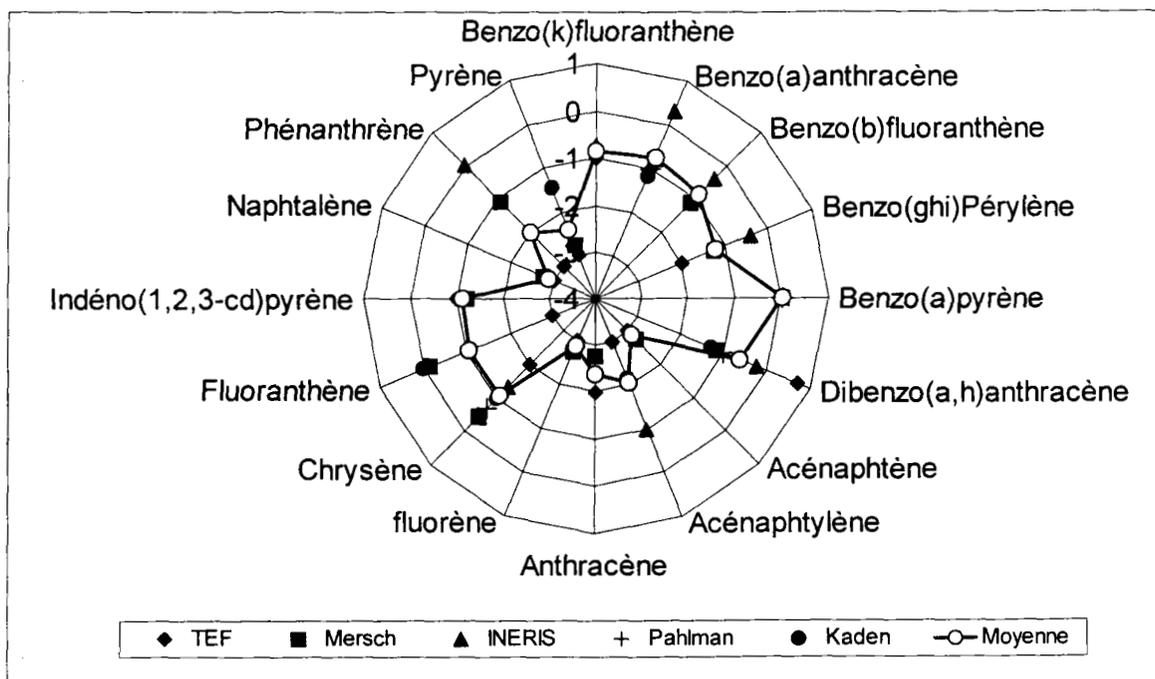


Figure 10 : Représentation des données de génotoxicité sur un seul graphe.

Les données sont les logarithmes décimaux des équivalents génotoxiques normés par le benzo(a)pyrène, c'est à dire que pour chaque auteur la concentration génotoxique du benzo(a)pyrène a été divisée par les valeurs qu'il a obtenues pour chaque produit.

## 4 PROPOSITION DE SEUILS DE QUALITE POUR 16 HAP

Nous avons, tout au long de ce chapitre, élaboré des seuils de qualité pour l'eau puis les sédiments basés sur des résultats d'essais de toxicité chronique, puis nous avons analysé les résultats de génotoxicité pour proposer de pénaliser certains HAP génotoxiques par des facteurs de sécurité supplémentaires.

S'agissant de seuils basés sur des données de laboratoire nous devons pour être cohérents avec les pratiques de l'évaluation des risques pour les substances chimiques appliquer les mêmes facteurs de sécurité que ceux appliqués aux données de danger dans le guide de documentation technique de l'union européenne (TGD). Dans le cas de données de toxicité chronique sur plus de trois espèces, ce qui est le cas ici, ce facteur est de 10. Le Tableau 41 récapitule les différentes pénalisations des substances par les facteurs de sécurité.

Tableau 41 : Application de facteurs de sécurité sur le seuil brut de niveau 1 dans l'eau en  $\mu\text{g/L}$ .

Nom	Seuil brut	Seuil tenant compte de la génotoxicité	Seuil tenant compte de l'extrapolation au milieu	Facteur de sécurité
Benzo(k)fluoranthène	0,03	0,003	0,003	10
Benzo(a)anthracène	0,05	0,005	0,005	10
Benzo(b)fluoranthène	0,014	0,0014	0,0014	10
Benzo(ghi)pérylène	0,025	0,025	0,0025	10
Benzo(a)pyrène	0,03	0,0003	0,0003	100
Dibenzo(a,h)anthracène	0,006	0,00006	0,00006	100
Acénaphène	6,8	6,8	0,7	10
Acénaphylène	4,1	4,1	0,4	10
Anthracène	0,9	0,9	0,09	10
Fluorène	3,2	3,2	0,3	10
Chrysène	0,06	0,006	0,006	10
Fluoranthène	0,24	0,024	0,024	10
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	0,016	0,0016	0,0016	10
Naphtalène	19	19	1,9	10
Phénanthrène	1,1	1,1	0,11	10
Pyrène	0,24	0,24	0,024	10

NB Les facteurs de sécurité pour l'extrapolation au milieu et la génotoxicité ne sont pas cumulés.

### 4.1 SEUILS DE QUALITE DANS L'EAU

En procédant de la même façon pour chacun des seuils on obtient le Tableau 42 qui récapitule l'ensemble des seuils après application de tous les facteurs de sécurité aux seuils bruts.

Tableau 42 Récapitulatif des seuils de qualité des HAP dans l'eau en ( $\mu\text{g/L}$ ).

Nom	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4	Seuil Kalf	Seuil Suter	Seuil 1 WRC
Benzo(k)fluoranthène	0,003	0,05	0,8	12	0.04		0.004
Benzo(a)anthracène	0,005	0,08	1,2	19	0.01	0.027	
Benzo(b)fluoranthène	0,001	0,02	0,3	5			0.004
Benzo(ghi)pérylène	0,003	0,04	0,6	9	0.03		0.004
Benzo(a)pyrène	0,0003	0,005	0,08	1	0.05	0.014	0.005
Dibenzo(a,h)anthracène	0,00006	0,0009	0,014	0,2			
Acénaphène	0,7	11	160	2600		23	
Acénaphthylène	0,4	6,3	99	1500			
Anthracène	0,09	1,3	21	320	0.07	0.73	
Fluorène	0,3	5	77	1200		3.9	
Chrysène	0,006	0,1	1,5	24	0.34		
Fluoranthène	0,024	0,4	6	91	0.3	6.16	0.004
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	0,0016	0,025	0,4	6	0.04		0.004
Naphtalène	1,9	30	460	7200	1.2	12	
Phénanthrène	0,11	1,7	27	410	0.3	6.3	
Pyrène	0,024	0,4	6	91			

Chaque valeur a été arrondie de façon à ne conserver que deux chiffres significatifs. Les seuils proposés par d'autres auteurs (en ne tenant pas compte de la génotoxicité) sont indiqués à titre de comparaison.

Dans le cas des mélanges de HAP nous pouvons utiliser les seuils " internes " du Tableau 28 page 66 en appliquant les facteurs de sécurité sur les coefficients de la combinaison linéaire. Les valeurs seuils à atteindre pour cette combinaison linéaire des 16 HAP sont rappelées pour chacun des niveaux de qualité dans le Tableau 43 page 86. Le **Erreur! Référence non valide pour un signet.** indique les coefficients de la combinaison linéaire.

Tableau 43 : Valeurs cibles des combinaisons linéaires des concentrations des différents HAP dans l'eau.

Type de seuil	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Valeur cible	41 000	631 000	9 900 000	150 000 000

Ces valeurs correspondent à celles du Tableau 28 page 66 après arrondi.

Tableau 44 : Coefficients de la combinaison linéaire des concentrations de HAP en mélange.

Substance	Coefficient
Benzo(k)fluoranthène	8,11
Benzo(a)anthracène	7,91
Benzo(b)fluoranthène	8,46
Benzo(ghi)pérylène	7,22
Benzo(a)pyrène	9,13
Dibenzo(a,h)anthracène	9,84
Acénaphène	4,78
Acénaphtylène	5,00
Anthracène	5,68
Fluorène	5,11
Chrysène	7,81
Fluoranthène	7,23
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	8,4
Naphtalène	4,33
Phénanthrène	5,57
Pyrène	6,23

*Les coefficients sont exprimés en logarithmes décimaux. Ces coefficients tiennent compte des facteurs de sécurité pour chaque substance.*

## 4.2 SEUILS DE QUALITE POUR LES SEDIMENTS

Nous avons vu au chapitre 3.3.6 page 78 la démarche qui nous a permis d'obtenir des seuils de qualité pour les sédiments. Nous avons ensuite (chapitre 3.4) étudié la génotoxicité qui nous a conduit à affecter les seuils d'un facteur de sécurité supplémentaire pour deux substances : le Benzo(a)pyrène et le Dibenzo(a,h)anthracène (Cf Tableau 41 page 85).

Nous devons donc appliquer des seuils de façon différenciée à deux catégories de HAP selon leur génotoxicité. Ces seuils sont présentés dans le Tableau 45. Dans le cas de mélanges de HAP il conviendra de vérifier que les sommes des concentrations pour chacune des catégories de HAP sont inférieures aux seuils considérés.

Tableau 45 : Seuil de qualité pour les HAP dans les sédiments tenant compte de la génotoxicité (en µg/Kg).

Nom	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Benzo(a)pyrène Dibenzo(a,h)anthracène	5	50	750	11 000
Benzo(k)fluoranthène Benzo(a)anthracène Benzo(b)fluoranthène Chrysène Fluoranthène Indéno(1,2,3,cd)pyrène Benzo(ghi)pérylène	50	500	7500	110 000
Acénaphène Acénaphylène Anthracène Fluorène Naphtalène Phénanthrène Pyrène				

Nous avons ainsi défini des seuils de qualité pour l'eau et les sédiments, qui tiennent compte de la toxicité chronique et de la génotoxicité et qui restent cohérents entre eux, c'est à dire qu'un seuil dans l'eau correspond au seuil à l'équilibre dans les sédiments pour une teneur en carbone organique de 5%.

Ces données sont présentées sous forme de monographies par substance en annexe de ce rapport.

## CONCLUSION

---

Les seuils de qualité pour les HAP ont pu être déterminés à partir de jeux de données obtenues par l'INERIS et de données issues de la littérature scientifique internationale. Les valeurs de la littérature sont hétérogènes et ne couvrent pas l'ensemble des substances. A la fin de cette étude nous disposons d'un jeu de données d'écotoxicité chronique dans l'eau obtenu dans des conditions homogènes sur la série complète des 16 HAP de la liste prioritaire. Nous avons pu grâce à ces données produire une relation structure activité quantitative simple et démontrer que l'effet narcotique était vraisemblablement une règle générale pour les HAP. En revanche nous ne disposons pas d'une telle information sur les sédiments ce qui nous conduira à des conclusions plus prudentes sur ce compartiment.

En utilisant l'effet narcotique nous avons pu construire un modèle simple intégrant l'ensemble des données de toxicité chronique de la littérature pondérées par le coefficient de partage octanol-eau de chaque substance. Le nombre de données ainsi disponible nous a permis d'estimer la distribution des sensibilités des espèces à l'effet générique des HAP et donc d'atteindre une valeur protectrice pour 95% des espèces.

Nous pouvons ainsi déterminer pour chacun des HAP, en fonction de son coefficient de partage octanol-eau un seuil de qualité dans l'eau en termes d'écotoxicité chronique.

L'examen de trois mélanges de HAP nous a permis de constater que l'effet de ces mélanges était en général additif sauf quelques cas d'antagonisme. Nous avons pu généraliser ce fait et proposer des seuils pour des mélanges de HAP basés sur cette propriété.

Concernant le compartiment sédimentaire nous avons généralisé l'approche et obtenu un jeu de données cohérent tant avec les données issues des essais de toxicité sédimentaire de la littérature que par le calcul à partir des valeurs dans l'eau en utilisant l'équilibre de partage eau sédiment. Nous avons, par précaution, appliqué un facteur de sécurité de 40 aux seuils que nous avons calculés pour les sédiments. Cette approche, stricte application du principe de précaution, serait probablement notablement modifiée si des essais de toxicité sur plusieurs espèces benthiques étaient réalisés sur l'ensemble des 16 HAP. Nous ne pouvons que recommander qu'une telle étude ait lieu afin de baser sur une investigation complète l'ensemble du calcul des seuils de qualité.

Les données de génotoxicité de la littérature sont très peu concordantes, il n'existe pas de données éco-épidémiologiques en cas de mono-contamination et les cas de multi-contamination que nous avons rencontrés sont rarement documentés par une analyse complète des 16 HAP de la liste prioritaire de l'US EPA.

Nous avons mesuré la génotoxicité des 16 HAP dans des essais de fluctuation sur deux souches afin de disposer d'une telle série de données homogène en matière de génotoxicité. Nous avons pu ensuite classer les substances et proposer de pénaliser les plus génotoxiques par un facteur 100. Nous pourrions également recommander qu'une étude plus poussée de la génotoxicité des HAP soit engagée pour préciser ces seuils. Cependant une telle étude devrait s'appuyer sur des valeurs de génotoxicité sur eucaryotes, de tels essais sont malheureusement encore trop rares pour que nous puissions recommander la mise en place d'une étude complémentaire à l'instar de nos recommandations concernant les sédiments.

Cette démarche, malgré ses approximations concernant la génotoxicité et la nécessité d'appliquer le principe de précaution pour les sédiments, a permis de fournir un tableau complet des seuils de qualité des 16 HAP de la liste de l'US EPA pour l'eau et les sédiments. Ces seuils peuvent sans attendre être utilisés pour la classification de la qualité du milieu dans le cadre des campagnes de surveillance environnementales. Il importera cependant à l'avenir de faire en sorte d'améliorer la précision des analyses pour utiliser pleinement toute la gamme des seuils de qualité.

## REFERENCES

---

### DOCUMENTS DE SYNTHÈSE

- BATES D. et CUBBAGE J. (1995) Summary of guidelines for contaminated freshwater sediments. Environmental investigations and laboratory services program, Olympia, Washington 98504-7710. 16 pages.
- JONES D.S., SUTER G.W. et HULL R.N. (1997) Toxicological benchmarks for screening contaminants of potential concern for effects on sediment-associated biota : 1997 revision. US department of energy. 30 pages + annexes.
- KALF D.F., CROMMENTUIJN G.H., POSTHUMUS R. et Van de PLASSCHE E.J. (1995) Integrated environmental objectives for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). RIVM report no 679101 018. 154 pages.
- SLOOF W., JANUS J.A., MATHHIJSEN A.J.C.M., MONTIZAN G.K. et ROS J.P.M. (1989) Integrated criteria document PAHs. RIVM report no 758474011. 199 pages.
- SUTER G.W. et TSAO C.L. (1996) Toxicological benchmarks for screening potential contaminants of concern for effects on aquatic biota : 1996 revision. Health Sciences Research Division, Oak Ridge. 54 pages + annexes.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1993) Sediment quality criteria for the protection of benthic organisms : Acenaphthene. *EPA-822-R-93-013*.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1993) Sediment quality criteria for the protection of benthic organisms : Fluoranthene. *EPA-822-R-93-012*.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1993) Sediment quality criteria for the protection of benthic organisms : Phenanthrene. *EPA-822-R-93-014*.

### REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALDENBERG T., SLOB W. (1993). Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 25:48-63.
- HORNESS B.H., LOMAX D.P., JOHNSON L.L.L., MYERS M.S., PIERCE S.M., COLLIER T.K. (1998). Sediment quality thresholds: estimates from hockey stick regression of liver lesion prevalence in english sole (*pleuronectes vetulus*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 17:872-882.
- 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.
- MYERS M.S., JOHNSON L.L., HOM T., COLLIER T.K., STEIN J.E., VARANASI U. (1998). Toxicopathic hepatic lesions in subadult english sole (*Pleuronectes vetulus*) from puget sound, Washington, USA: relationships with other biomarkers of contaminant exposure. *Marine Environmental Research* 45:47-67.
- MYERS M.S., LANDAHL J.T., KRAHN M.M., JOHNSON L.L., MCCAIN B.B. (1990). Overview of studies on liver carcinogenesis in english sole from puget sound; evidence for a xenobiotic chemical etiology I: pathology and epizootiology. *The Science of the Total Environment* 94:33-50.
- MYERS M.S., STEHR C.M., OLSON O.P., JOHNSON L.L., MCCAIN B.B., CHAN S.L., VARANASI U. (1994). Relationships between toxicopathic hepatic lesions and exposure to chemical contaminants in english sole (*Pleuronectes vetulus*), and white croaker (*Genyonemus lineatus*) from selected marine sites on the pacific coast, USA. *Environmental Health Perspectives* 102:200-215.
- SMITH S.L., MACDONALD D.D., KEENLEYSIDE K.A., GAUDET C.L. (1996). The development and implantation of Canadian Sediment Quality Guidelines. *Development and Progress in Quality Assessment : Rationale, Challenges, Techniques & Strategies* 233-249.

- ADDISON R.F., EDWARDS A.J.(1988). Hepatic microsomal mono-oxygenase activity in flounder *Platichthys flesus* from polluted sites in Langesundfjord and from mesocosms experimentally dosed with diesel oil and copper. *Marine Ecology - Process Series, Mar. Eco*
- ADKINS, B., JR., S. E. W. VAN, ET AL. (1986). "Oncogenic response of strain A/J mice to inhaled chemicals." *Journal Of Toxicology And Environmental Health* 17(2-3): 311-22.
- ALDEN III R.W., BUTT A.J.(1987). Statistical classification of the toxicity and polynuclear aromatic hydrocarbon contamination of sediments from a highly industrialized seaport. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6 (9):673-684.
- AL-SABTI K.(1986). Clastogenic effects of five carcinogenic-mutagenic chemicals on the cells of the common carp, *Cyprinus carpio* l. *Comparive Biochemistry and Physiology*, 85C (1):5-9.
- AL-SABTI K.(1985). Comparative micronucleated erythrocyte cell induction in three cyprinids by five carcinogenic-mutagenic chemicals. *Cytobios*, 47:147-154.
- AMACHER, D. E. AND G. N. TURNER (1980). "Promutagen activation by rodent-liver post mitochondrial fractions in the L5178Y/TK cell mutation assay." *Mutation Research* 74: 485-501.
- AMACHER, D. E., S. C. PAILLET, ET AL. (1980). "Point mutations at thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells. II. Test validation and interpretation." *Mutation Research* 72: 447-474.
- AMACHER, D., S. PAILLET, ET AL. (1981). "The metabolism of N-acetyl-2-aminofluorene to a mutagen in L5178/TK+/- mouse lymphoma cells." *Mutation Research* 89: 311-320.
- AMIN, S., K. HUIE, ET AL. (1985). "Mutagenicity and tumor initiating activity of methylated benzo[b]fluoranthene." *Carcinogenesis* 6(7): 1023-1025.
- AMIN, S., N. HUSSAIN, ET AL. (1985). "Mutagenicity and tumor initiating activity of methylated benzo[k] fluoranthenes." *Cancer Letters* 26(3): 343-7.
- ANDERSEN J.W., ROSSI S.S., TUKEY R.H., VU T., QUATTROCHI L.C.(1995). A biomarker, P450 RGS, for assessing the induction potential of environmental samples. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (7):1159-1169.
- ANDERSON, L. M. AND J. A. STYLES (1978). "An evaluation of 6 short-test tests for detecting organic chemical carcinogens. Appendix 2. The bacterial mutation test." *British Journal Of Cancer* 37(6): 924-930.
- ANDREWS, A. W., L. H. THIBAUD, ET AL. (1978). "The relationship between carcinogenicity and mutagenicity of some polynuclear hydrocarbons." *Mutation Research* 51: 311-318.
- ANKLEY G.T., ERICKSON R.J., PHIPPS G.L., MATTSON V.R., KOSIAN P.A., SHEEDY B.R., COX J.S.(1995). Effects of light intensity on the phototoxicity of fluoranthene to a benthic macroinvertebrate. *Environmental Science and Technology*, 29 (11):2828-2833.
- ANKLEY G.T., ERICKSON R.J., SHEEDY B.R., KOSIAN P.A., MATTSON V.R., COX J.S.(1997). Evaluation of models for predicting the phototoxic potency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Aquatic Toxicology*, 37 (1):37-50.
- ANONYMOUS (1983). "Benz[a]anthracene." *Iarc Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Humans* 32: 135-45.
- ASHBY, J. AND B. KILBEY (1981). "Summary report on the performance of bacterial repair, phase induction, degranulation, and nuclear enlargement assays.In: Evaluation of Short-Term tests for Carcinogens. Report of the international Collaborative Program."
- BABICH H., BORENFREUND E.(1987). Fathead minnow FHM cells for use in in Vitro cytotoxicity assays of aquatic pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 14:78-87.
- BABSON, J. R., S. E. RUSSO-RODRIGUEZ, ET AL. (1986). "Microsomal activation of fluoranthene to mutagenic metabolites." *Toxicology And Applied Pharmacology* 85(3): 355-66.
- BADGER, G. M., J. W. COOK, ET AL. (1940). "The production of cancer by pure hydrocarbons." *V. Proc. R. Soc.* 129: 439-467.
- BAGNASCO M., CAMOIRANO A., DE FLORA S., MELODIA F., ARILLO A.(1991). Enhanced liver metabolism of mutagens and carcinogens in fish living in polluted seawater. *Mutation Research*, 262:129-137.
- BAKER, R. S. U., A. M. BONIN, ET AL. (1980). "Comparison of rat and guinea pig as sources of S9 fraction in salmonella/mammalian microsome mutagenicity test." *Mutation Research* 71: 43-52.

- BALCH G.C., METCALFE C.D., HUESTIS S.Y.(1995). Identification of potential fish carcinogens in sediment from Hamilton Harbour, Ontario, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (1):79-91.
- BARFKNECHT, T. R., B. M. ANDON, ET AL. (1981). Soot and mutation in bacteria and human cell. In: *Chemical Analysis and Biological Fate: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. M. Cooke and A. J. Dennis. Columbus: 231-242.
- BAUMANN P.C., SMITH W.D., PARLAND W.K.(1987). Tumor frequencies and contaminant concentrations in brown bullheads from an industrialized river and a recreational lake. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116 (1):79-86.
- BENMOUSSA H., MARTIN G., TONNARD F., RICHARD Y., LEPRINCE A.(1986). Etude de l'inhibition de la nitrification par les composés organiques. *Water Research*, 20 (12):1465-1470.
- BENTIVEGNA C.S., COOPER K.R.(1993). Reduced chromosomal puffing in chironomus tentans as a biomarker for potentially genotoxic substances. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12:1001-1011.
- BESTEN DEN P.J., LEMAIRE P., LIVINGSTONE D.R., WOODIN B., STEGEMAN J.J., HERWIG H.J. , SEINEN W.(1993). Time-course and dose-response of the apparent induction of the cytochrome P450 monooxygenase system of pyloric caeca microsomes of the female sea star
- BEYER J., SANDVIK M., HYLLAND K., FJELD E., EGAAS E., AAS E., SKARE J.U., GOKSOYR A.(1996). Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in
- BIANCIFIORI, C. AND F. CASHERA (1962). "The relation between pseudopregnancy and the chemical induction by four carcinogens of mammary and ovarian tumors in Balb/c mice." *British Journal Of Cancer* 16: 722-730.
- BIHARI N., BATEL R., ZAHN R.K.(1990). DNA damage determination by the alkaline elution technique in the haemolymph of mussel *mytilus galloprovincialis* treated with benzo(a)pyrene and 4-nitroquinoline-N-oxide. *Aquatic Toxicology*, 18 (1):13-22.
- BLACK J.J.(1988). Carcinogenicity tests with rainbow trout embryos : a review. *Aquatic Toxicology*, 11 (1, 2):129-142.
- BLACK J.J., BAUMANN P.C.(1991). Carcinogens and cancers in freshwater fishes. *Environmental Health Perspectives*:27-33.
- BLACK J.J., MACCUBBIN A.E., JOHNSTON C.J.(1988). Carcinogenicity of benzo(a)pyrene in rainbow trout resulting from embryo microinjection. *Aquatic Toxicology*, 13 (4):297-308.
- BOESE B.L., LAMBERSON J.O., SWARTZ R.C., OZRETICH R.J.(1997). Photoinduced toxicity of fluoranthene to seven marine benthic crustaceans. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32:389-393.
- BOESE B.L., OZRETICH R.J., LAMBERSON J.O., SWARZ R.C., COLE F.A., PELLETIER J., JONES J. (1999) Toxicity and phototoxicity of a mixture of highly lipophilic PAH compounds in marine sediments: can the  $\Sigma$ -PAH model be extrapolated ? *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 36, 270-280
- BOLOGNESI C., RABBONI R., ROGGIERI P.(1996). Genotoxicity biomarkers in *M. Galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 113C (2):319-323.
- BOMBOI M.T., HERNANDEZ A.(1991). Hydrocarbons in urban runoff : their contribution to the wastewaters. *Water Research*, 25 (5):557-565.
- 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*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58:158-165.
- BOS, R. P., J. L. G. THEUWS, ET AL. (1988). "Mutagenicity of bi-, tri- and tetra-cyclic aromatic hydrocarbons in the 'taped-plate assay' and in the conventional *Salmonella* mutagenicity assay." *Mutation Research* 204: 203-206.
- BOUCHEZ M., BLANCHET D., HAESELER F. AND VANDECASTEELE J-P., (1996), Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement : propriétés, origines, devenir, *Revue de l'Institut Français du Pétrole*. Vol 51, N°3, mai-juin, pp 407 - 419.
- BRANNON J.M., PRICE C.B., REILLY F.J., PENNINGTON J.C., MCFARLAND V.A.(1993). Effects of sediment organic carbon on distribution of radiolabeled fluoranthene and PCBs among sediment, interstitial water, and biota. *Bulletin of Environmental Contamination a*
- BRICKSON-SASSON G., BURTON G.A.(1991). In situ and laboratory sediment toxicity testing with *ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10 (2):201-207.

- BRIDGES, B. A., D. B. MCGREGOR, ET AL. (1981). Summary report on the performance of in vitro mammalian assays. Evaluation of short term tests for carcinogens. Report of the international collaborative program. Progress in Mutation Research. Amsterdam, Elsevier.
- BRITVIC S., LUCIC D., KURELEC B.(1993). Bile fluorescence and some early biological effects in fish as indicators of pollution by xenobiotics. Environmental Toxicology and Chemistry, 12:765-773.
- BROOKES, P. AND R. J. PRESTON (1981). Summary report on the performance of in vitro mammalian assays. Evaluation of short term tests for carcinogens. Report of the international collaborative program. Progress in Mutation Research. Amsterdam, Elsevier. 1:
- BRUNE, H. and R. P. DEUTCH-WENZEL (1981). "Investigation of tumorigenic response to benzo[a] pyrene in aqueous caffeine solution applied orally to Sprague-Dawley rats." Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology 102(2): 153-157.
- BUENING, M. K., A. W. LEVIN, ET AL. (1979). "Tumorigenicity of the dihydrodiols of dibenz[a,h]anthracene on mouse skin and in newborn mice." Cancer Research 39: 1310-1314.
- BUENING, M. K., W. LEVIN, ET AL. (1979). "Tumorigenicity of bay-region epoxides and other derivatives of chrysene and phenanthrene in newborn mice." Cancer Research 39: 5063-5068.
- BURGEOT T., BOCQUENE G., TRUQUET P., LE DEAN F., GALGANI F.(1994). Induction of EROD activity in red mullet (*mullus barbatus*) along the french mediterranean coasts. The Science of the Total Environment, 142:213-220.
- BURGEOT T., HIS E., GALGANI F.(1995). The micronucleus assay in *Crassostrea gigas* for the detection of seawater genotoxicity. Mutation Research, 342:125-140.
- BURKHARD L.P., SHEEDY B.R., MCCAULEY D.J.(1994). Prediction of chemical residues in aquatic organisms for a field discharge situation. Chemosphere, 29 (1):141-153.
- BURMASTER D.E., MENZIE C.A., FRESHMAN J.S., BURRIS J.A., MAXWELL N.I., DREW S.R.(1991). Assessment of methods for estimating aquatic hazards at superfund-type sites: a cautionary tale. Environmental Toxicology and Chemistry, 10:827-842.
- BUSBY, W. F., JR., M. E. GOLDMAN, ET AL. (1984). "Tumorigenicity of fluoranthene in a newborn mouse lung adenoma bioassay." Carcinogenesis 5(10): 1311-6.
- CASTO, B. C. (1979). Polycyclic hydrocarbons and Syrian hamster embryo cells ; cell transformation, enhancement of viral transformation and analysis of DNA damage. Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. P. W. Jones and P. Leber. Ann Arbor: 51-66.
- CASTO, B. C., N. JANOSKO, ET AL. (1977). "Development of a focus assay model for transformation, enhancement of viral transformation and analysis of DNA damage." Cancer Research 37: 3508-3515.
- CATALLO W.J., SCHLENKER M., GAMBRELL R.P., SHANE B.S.(1995). Toxic chemicals and trace metals from urban and rural louisiana lakes : recent historical profiles and toxicological significance. Environmental Science and Technology, 29 (6):1436-1445.
- CELANDER M., BROMAN D., FORLIN L., NAF C.(1995). Effects of petroleum hydrocarbons on the hepatic cytochrome P450 1A1 System in rainbow trout. Marine Environmental Research, 39:61-65.
- CHANG, R. L., W. LEVIN, ET AL. (1983). "Tumorigenicity of enantiomers of chrysene 1,2-dihydrodiol and the diastereomeric bay-region chrysene 1,2-diol-3,4-epoxides on mouse skin and in newborn mice." Cancer Research 43: 192-196.
- CHAPMAN P.M., BARRICK R.C., NEFF J.M., SWARTZ R.C.(1987). Four independent approaches to developing sediment quality criteria yield similar values for model contaminants. Environmental Toxicology and Chemistry, 6:723-725.
- CHAPMAN P.M., FAIRBROTHER A., BROWN D. (1998) A critical evaluation of safety (uncertainty) factors for ecological risk assessment - Environmental Toxicology and Chemistry, 17:99-108
- CHEN, T. T. AND C. HEIDELBERGER (1969). "Quantitative studies of the malignant transformation of mouse prostate cells by carcinogenic hydrocarbons in vitro." International Journal Of Cancer 4: 166-178.
- CHEUNG Y.L., GRAY T.J.B., IOANNIDES C.(1993). Mutagenicity of chrysene, its methyl and benzo derivatives, and their interactions with cytochromes P-450 and the Ah-receptor ; relevance to their carcinogenic potency. Toxicology, 81:69-86.

- COLES J.A., FARLEY S.R., PIPE R.K.(1994). Effects of fluoranthene on the immunocompetence of the common marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquatic toxicology*, 30 (4):367-379.
- COLLIER T.K., ANULACION B.F., STEIN J.E., GOKSOYR A., VARANASI U.(1995). A field evaluation of cytochrome P4501A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (1):143-152.
- COLLIER T.K., STEIN J.E., WALLACE R.J.(1986). Xenobiotic metabolizing enzymes in spawning english sole (*Parophrys vetulus*) exposed to organic-solvent extracts of marine sediments from contaminated and reference areas. *Comparative Biochemistry and Physiology*
- CONNOR, T. H., J. C. THEISS, ET AL. (1985). "Genotoxicity of organic chemicals frequently found in the air of mobile homes." *Toxicology Letters* 25: 33-40.
- CONOLLY R.B.(1995). Cancer and non-cancer risk assessment : not so different if you consider mechanisms. *Toxicology*, 102:179-188.
- COOK, J. W. (1932). "The production of cancer by pure hydrocarbons - Part II." *Proceedings Of The Royal Society Of London. Series B: Biological Sciences* 11: 485-496.
- CORNELISSEN G. , VAN NOORT P.C.M. , GOVERS H.A.J.(1997). Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with Tenax and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environm*
- CORNFIELD J.(1977). Carcinogenic risk assessment. *Science*, 198:693-699.
- CRESPI, C. L. AND W. G. THILLY (1984). "Assay for gene mutation in a human lymphoblast line, AHH-1, competent for xenobiotic metabolism." *Mutation Research* 128(2): 221-230.
- DAVILA D.R., MOUNHO B.J., BURCHIEL S.W.(1997). Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the human immune system: models and mechanisms. *Toxicology and Ecotoxicology News*, 4 (1):5-9.
- DAY K.E., KIRBY R.S., REYNOLDSON T.B.(1995). The effect of manipulations of freshwater sediments on responses of benthic invertebrates in whole-sediment toxicity tests . *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14:1333-1343.
- DE FLORA, S., A. ZANACCHI, ET AL. (1984). "Genotoxic activity and potency of 35 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test." *Mutation Research* 133(3): 161-198.
- DE FLORA, S., A. ZANACCHI, ET AL. (1984). "Genotoxic activity and potency of 35 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test." *Mutation Research* 133(3): 161-198.
- DE MAAGD P.G-J., TEN HULSCHER D.TH.E.M., VAN DEN HEUVEL H., OPPERHUIZEN A. AND SIJM D.T.H.M., (1998), Physicochemical properties of polycyclic aromatic hydrocarbons : aqueous solubilities, n-octanol/water partition coefficients, and Henry's law constants. *Environmental Toxicology and Chemistry*, n°2, pp. 251-257.
- DE SERRES, F. J., G. R. HOFFMAN, ET AL. (1981). Summary report on the performance of in vitro mammalian assays. Evaluation of short term tests for carcinogens. Report of the international collaborative program. *Progress in Mutation Research*. Amsterdam, El
- DE VOOGT P., VAN HATTUM B., LEONARDS P., KLAMER J.C., GOVERS H.(1991). Bioconcentration of polycyclic heteroaromatic hydrocarbons in the guppy (*poecilia reticulata*). *Aquatic Toxicology*, 20:169-194.
- DE WITT T.H., OZRETICH R.J., SWARTZ R.C., LAMBERSON J.O., SCHULTS D.W., DITSWORTH G.R., JONES J.K.P., HOSELTON L., SMITH L.M.(1992). The influence of organic matter quality on the toxicity and partitioning of sediment-associated fluoranthene. *Environmenta*
- DEN BENSTEN P.J., LEMAIRE P., O'HARA S.C.M., LIVINGSTONE D.R.(1993). Metabolism of benzo(a)pyrene by the sea star *asterias rubens* . *Polycyclic Aromatic Compounds*, 3:1055-1061.
- DEN BESTEN P.J., LEMAIRE P., LIVINGSTONE D.R.(1994). NADPH, NADH and cumene hydroperoxide-dependent metabolism of benzo(a)pyrene by pyloric caeca microsomes of the sea star *Asteria rubens* L. (echinodermata : asteroidea). *Xenobiotica*, 24 (10):989-1001.
- DESALIVA, R., R. MESCHINI, ET AL. (1988). "Induction of sister-chromatid exchanges by procarcinogens in metabolically competent Chinese hamster epithelial liver cells." *Mutation Research* 207(2): 69-75.
- DEUTSCH-WENZEL, R., BRUNE, H., GRIMMER, G., DETTBARN, G. AND MISFELD, J. (1983). Experimental studies in rat lungs on the carcinogenicity and dose response relationships of eight frequently occurring environmental polycyclic aromatic hydrocarbons. *Journal*

- DEVILLERS J., CHAMBON P., ZAKARYA D., CHASTRETTE M., CHAMBON R.(1987). A predictive structure-toxicology model with daphnia magna. *Chemosphere*, 16 (6):1149-1163.
- DEWITT T.H., SWARTZ R.C., LAMBERSON J.O.(1989). Measuring the acute toxicity of estuarine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8:1035-1048.
- DIAMOND S.A., ORIS J.T., GUTTMAN S.I.(1995). Adaptation to fluoranthene exposure in a laboratory population of fathead minnows. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (8):1393-1400.
- DIPAOLLO, J. A., J. P. DONOVAN, ET AL. (1969). "Quantitative studies of in vitro transformation by chemical carcinogens." *Journal Of The National Cancer Institute* 42(5): 867-874.
- DIPAOLLO, J. A., J. P. DONOVAN, ET AL. (1969). "Quantitative studies of in vitro transformation by chemical carcinogens." *Journal Of The National Cancer Institute* 42(5): 867-874.
- DIPAOLLO, J. A., J. P. DONOVAN, ET AL. (1971). "Transformation of hamster cells in vitro by polycyclic hydrocarbons without cytotoxicity." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 68(12): 2958-2961.
- DIPAOLLO, J. A., K. TAKANO, ET AL. (1972). "Quantitation of chemically induced neoplastic transformation of BALB/3T3 cloned cell lines." *Cancer Research* 32: 2686-2695.
- DOUABUL A.A.Z., HEBA H.M.A., FAREED K.H.(1997). Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in fish from the red sea coast of Yemen. *Hydrobiologia*, 352 :251-262.
- DRISCOLL S.K., HARKEY G.A., LANDRUM P.F.(1997). Accumulation and toxicokinetics of fluoranthene in sediment bioassays with freshwater amphipods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (4):742-753.
- DRISCOLL S.K., LANDRUM P.F.(1997). A comparison of equilibrium partitioning and critical body residue approaches for predicting toxicity of sediment-associated fluoranthene to freshwater amphipods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (10):2179-2186
- DRISCOLL S.K., LANDRUM P.F., TIGUE E.(1997). Accumulation and toxicokinetics of fluoranthene in water-only exposures with freshwater amphipods. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (4):754-761.
- DUNIER M., SIWICKI A.K.(1993). Effects of pesticides and other organic pollutants in the aquatic environment on immunity of fish : a review. *Fish & Shellfish Immunology*, 3:423-438.
- DUNKEL, V. C. AND V. F. SIMON (1980). Mutagenic activity of chemicals previously tested for carcinogenicity in the National Cancer Institute Bioassay Program. *Molecular and Cellular Aspects of Carcinogenic Screening Tests*. R. Montesano, H. Bartsch and L. T
- DUNN B.P.(1991). Carcinogen adducts as an indicator for the public health risks of consuming carcinogen-exposed fish and shellfish. *Environmental Health Perspectives*, 90:111-116.
- DUXDURY C.L., DIXON D.G., GREENBERG B.M.(1997). Effects of simulated solar radiation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the duckweed *Lemna gibba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (8):1739-1748.
- EDSALL C.C.(1991). Acute toxicities to larval rainbow trout of representative compounds detected in great lakes fish. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46 (2):173-178.
- EGGENS M.L., BERGMAN A., VETHAAK D., VAN DER WEIDEN M.E.J., CELANDER M., BOON J.P.(1995). Cytochrome P4501A indices as biomarkers of contaminant exposure : results of a field study with plaice (*Pleuronectes platessa*) and flounder (*Platichthys flesus*) from
- EGGENS M.L., OPPERHUIZEN A., BOON J.P.(1996). Temporal variation of CYP1A indices, PCB and 1-OH pyrene concentration in flounder, *Platichthys flesus*, from the Dutch Wadden Sea. *Chemosphere*, 33 (8):1579-1596.
- ELSKUS A.A., STEGEMAN J.J.(1989). Induced cytochrome P-450 in *Fundulus heteroclitus* associated with environmental contamination by polychlorinated biphenyls and polynuclear aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 27:31-50.
- EMERY V.L., DILLON T.M.(1996). Chronic toxicity of phenanthrene to the marine polychaete worm, *Nereis (Neanthes) arenaceodentata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56:265-270.
- EMURA, M. AND ET AL. (1982). *Journal Of Applied Toxicology* 2(3): 167-171.

- ENGWALL M., BRUNSTROM B., BREWER A., NORRGREN L.(1994). Cytochrome P4501A induction by a coplanar PCB, a PAH mixture, and PCB-contaminated sediment extracts following microinjection of rainbow trout sac-fry. *Aquatic Toxicology*, 30 (4):311-324.
- ENZMINGER J.D., AHLERT R.C.(1987). Environmental fate of polynuclear aromatic hydrocarbons in coal tar. *Environmental Technology Letters*, 8:269-278.
- EVANS, C. H. AND J. A. DIPAOLO (1975). "Neoplastic transformation of guinea pig fetal cells in culture induced by chemical carcinogens." *Cancer Research* 35: 1035-1044.
- FABACHER D.L., BESSER J.M., SCHMITT C.J., HARSHBARGER J.C., PETERMAN P.H., LEBO J.A.(1991). Contaminated sediments from tributaries of the great lakes : chemical characterization and carcinogenic effects in Medaka (*Oryzias latipes*). *Archives of Environmen*
- FAHMY, O. G. AND M. J. FAHMY (1973). "Oxidative activation of benz(a)anthracene and methylated derivatives in mutagenesis and carcinogenesis." *Cancer Research* 33: 2354-2361.
- FARR A.J., CHABOT C.C., TAYLOR D.H.(1995). Behavioral avoidance of fluoranthene by fathead minnows (*Pimephales promelas*). *Neurotoxicology and Teratology*, 17 (3):265-271.
- FENET H. (1997) Les biomarqueurs chez l'anguille européenne en cage : application à la surveillance des eaux superficielles. Thèse de l'Université de Montpellier I. 151p.
- FERNANDEZ P., GRIFOLL M., SOLANAS A.M., BAYONA J.M., ALBALGES J.(1996). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environmental Science and Toxicology*, 26 (4):817-829.
- FERRARO S.P., LEE II H., OZRETICH R.J., SPECHT D.T.(1990). Predicting bioaccumulation potential : a test of fugacity-based model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19:386-394.
- FLORIN, I., L. RUTBERG, ET AL. (1980). "Screening of tobacco smoke constituents for mutagenicity using the Ames' test." *Toxicology* 18: 219-232.
- FOLMAR L.C.(1993). Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish : a bibliography and synopsis of selected effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12:337-375.
- FORAN J.A., HOLST L.L., GIESY J.P.(1991). Effects of photoenhanced toxicity of anthracene on ecological and genetic fitness of *Daphnia magna* : a reappraisal. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10:425-427.
- FOSS H.E., FORBES V.E.(1997). Effects of the polycyclic aromatic hydrocarbon fluoranthene on growth rate nucleic acid composition of *capitella* sp. I. *Marine Biology*, 129:489-497.
- FOSSI M.C., LARI L., CASINI S., MATTEI N., SAVELLI C., SANCHEZ-HERNANDEZ J.C., CASTELLANI S., DEPLEDGE M., BAMBER S., WALKER C., SAVVA D., SPARAGANO O.(1996). Biochemical and genotoxic biomarkers in the mediterranean crab *carcinus aestuarii* experimentally
- FREEMAN, A. E., E. K. WEISBURGER, ET AL. (1973). "Transformation of cell cultures as an indication of the carcinogenic potential of chemicals." *Journal Of The National Cancer Institute* 51: 799-808.
- FRENCH B.L., REICHERT W.L., HOM T., NISHIMOTO M., SANBORN H.R., STEIN J.E.(1996). Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in english sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquatic Toxicology*, 36 (1-2):1-16
- FROLICH, A. AND F. E. WURGLER (1990). "Drosophila wing-spot test: improved detectability of genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons." *Mutation Research* 234(2): 71-80.
- GAGNE F., BLAISE C.(1995). Evaluation of the genotoxicity of environmental contaminants in sediments to rainbow trout hepatocytes. *Environemental Toxicology and Water Quality, An International Journal*, 10:217-229.
- GALA W.R., GIESY J.P.(1992). Photo-induced toxicity of anthracene to the green alga, *Selenastrum capricornutum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23:316-323.
- GALA W.R., GIESY J.P.(1994). Flow cytometric determination of the photoinduced toxicity of anthracene to the green alga *selenastrum capricornutum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (5):831-840.
- GALASSI S., MINGAZZINI M., VIGANO L., CESAREO D., TOSATO M.L.(1988). Approaches to modeling toxic responses of aquatic organisms to aromatic hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 16:158-169.
- GALGANI F., BOCQUENE G., TRUQUET P., BURGEOT T., CHIFFOLEAU J.F., CLAISSE D.(1992). Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the french coasts. *Oceanologia Acta*, 15 (4):355-364.

- GARBERG, P., E. AKERBLUM, ET AL. (1988). "Evaluation of a genotoxicity test measuring DNA-stran breaks in mouse lymphoma cells by alkaline unwinding and hydroxyapatite elution." *Mutation Research* 203: 155-176.
- GARDNER G.R., YEVIK P.P.(1988). Comparative histopathological effects of chemically contaminated sediment on marine organisms. *Marine Environmental Research*, 24:311-316.
- GARRETT, N. E. AND J. LEWTAS (1983). "Cellular toxicity in Chinese hamster ovary cell cultures. I. Analysis of cytotoxicity endpoints for twenty-nine priority pollutants." *Environmental Research* 32(2): 455-465.
- GARRETT, N. E. AND J. LEWTAS (1983). "Cellular toxicity in Chinese hamster ovary cell cultures. I. Analysis of cytotoxicity endpoints for twenty-nine priority pollutants." *Environmental Research* 32(2): 455-465.
- GARRIC J, BALIGAND M.P, FLAMMARION P, GOUY V, MONTUELLE B, ROULIER J.L. (1998) Etude d'établissement de seuils de qualité pour les sédiments. Rapport Cemagref, Groupement de Lyon.
- GARRIGUES P., RAOUX C., LEMAIRE P., MATHIEU A., RIBERA D., NARBONNE J.F., LAFAURIE M.(1990). In situ correlations between polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and PAH metabolizing system activities in mussels and fish in the mediterranean sea : prelimin
- GARRIGUES P., RAOUX C. (1997). Inhibition sélective de la fluorescence des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) : applications à la chromatographie en phase liquide. *Analysis* 25 : 243-246.
- GATEHOUSE, D. (1980). "Mutagenicity of 1,2 ring-fused acenaphthenes against *S. typhimurium* TA 1537 and TA 1535: structure-activity relationship." *Mutation Research* 78(2): 121-135.
- GIDDINGS J.M.(1979). Acute toxicity to *selenastrum capricornutum* of aromatic compounds from Coal Conversion. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 23:360-364.
- GODDARD K.A., SCHULTZ R.J., STEGEMAN J.J.(1987). Uptake, toxicity, and distribution of benzo(a)pyrene and monooxygenase induction in the topminnows *Poeciliopsis monacha* and *Poeciliopsis lucida*. *Drug Metabolism and Disposition*, 15 (4):449-455.
- GOGOLEV A., WILKE B.M.(1997). Combinaison effects of heavy metals and fluoranthene on soil bacteria. *Biol. Fertil. Soils*, 25:274-278.
- GOKSOYR A., BEYER J., HUSOY A.M., LARSEN E.H., WESTRHEIM K., WILHELMSSEN S., KLUNGSOYR J.(1994). Accumulation and effects of aromatic and chlorinated hydrocarbons in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) caged in a polluted fjord (Sorfjorden, Norway). *Aquat*
- GOKSOYR A., HUSOY A.M., LARSEN E.H., KLUNGSOYR J., WILHELMSSEN S., MAAGE A., BREVIK E.M., ANDERSSON T., CELANDER M., PESONEN M., FORLIN L.(1991). Environmental contaminants and biochemical responses in flatfish from the Hvaler Archipelago in Norway. *Archiv*
- GOLOVANOVA I.L., CHUIKO G.M., PAVLOV D.F.(1994). Effects of cadmium, naphthalene, and DDVP on gut carbohydrases activity in bream (*Abramis brama* L.) and Mozambique Tilapia (*Oreochromis mossambicus* Peters). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxi*
- GRADY A.W., MC LAUGHLIN R.M., CALDWELL C.W., SCHMITT C.J., STALLING D.L.(1992). Flow cytometry, morphometry and histopathology as biomarkers of benzo(a) pyrene exposure in brown bullheads (*Ameiurus nebulosus*). *Journal of Applied Toxicology*, 12 (3):165-17
- GRANT, G. A. AND F. J. C. ROE (1963). "The effect of phenanthrene on tumor induction by 3,4-benzopyrene administered to newly born mice." *British Journal Of Cancer* 17: 261-265.
- GREEN M.H.L., MURIEL W.J., BRIDGES B.A., (1976). Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens, *Mutat. Res.*, 38, 33-42.
- GREER C., MASSON L., COMEAU Y., BROUSSEAU R., SAMSON R.(1993). Application of molecular biology techniques for isolating and monitoring pollutant-degrading bacteria . *Water Pollution Research Journal of Canada*, 28:275-287.
- GRIFOLL M., SOLANAS A.M., BAYONA J.M.(1990). Characterization of genotoxic components in sediments by mass spectrometric techniques combined with salmonella, microsome test. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 19:175-184.
- GRUNDY M.M., RATCLIFFE N.A., MOORE M.N.(1996). Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 42 (1-4):187-190.

- GUOBAITIS R.J., ELLINGHAM T.J., MADDOCK M.B.(1986). The effects of pretreatment with cytochrome P-450 inducers and preincubation with a cytochrome P-450 effector on the mutagenicity of genotoxic carcinogens mediated by hepatic and renal S9 from two specie
- GUSTEN H., HORVATIC D., SABLJIC A.(1991). Modelling n-octanol, water partition coefficients by molecular topology: polycyclic aromatic hydrocarbons and their alkyl derivatives. *Chemosphere*, 23 (2):199-213.
- HAAS C.N.(1993). Risk analysis as a standard setting tool. *Risk Assessment*, 4:30-33.
- HALL A.T., ORIS J.T.(1991). Anthracene reduces reproductive potential and is maternally transferred during long-term exposure in fathead minnows. *Aquatic Toxicology*, 19 (3):249-264.
- HARDY J.T., CRECELIUS E.A., ANTRIM L.D., BROADHURST V.L., APTS C.W., GURTISEN J.M., FORTMAN T.J.(1987). The sea-surface microlayer of puget sound : part II. concentrations of contaminants and relation to toxicity. *Marine Environmental Research*, 23 :251-27
- HARKEY G.A., DRISCOLL S.K., LANDRUM P.F.(1997). Effect of feeding in 30-day bioaccumulation assays using *Hyalella azteca* in fluoranthene-dosed sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (4):762-769.
- HARKEY G.A., LANDRUM P.F., KLAINE S.T.(1994). Comparison of whole sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays . *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (8):1315-1329.
- HASHIZUME T., UEDA K., TOKUTSU S., HANAWA I., KINAE N.(1992). Monitoring of mutagens in river and marine sediments by salmonella, microsome assay combined with blue cotton method. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 49 (4):497-503.
- HAWKINS W.E., OVERSTREET R.M., WALKER W.W.(1988). Carcinogenicity tests with small fish species. *Aquatic Toxicology*, 11 (1, 2):113-128.
- HAWKINS W.E., WALKER W.W., OVERSTREET R.M., LYTLE J.S., LYTLE T.F.(1990). Carcinogenic effects of some polycyclic aromatic hydrocarbons on the japanese medaka and guppy in waterborne exposures. *The Science of the Total Environment*, 94:155-167.
- HAWKINS W.E., WALKER W.W., OVERSTREET R.M., LYTLE T.F., LYTLE J.S.(1988). Dose-related carcinogenic effects of water-borne benzo(a)pyrene on livers of two small fish species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 16:219-231.
- HENDRICKS J.D., MEYERS T.R., SHELTON D.W., CASTEEL J.L., BAILEY G.S.(1985). Hepatocarcinogenicity of benzo[a]pyrene to rainbow trout by dietary exposure and intraperitoneal injection. *J.N.C.I.*:839-851.
- HERMANN, M. (1981). "Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixture." *Mutation Research* 90: 399-409.
- HERMANN, M., DURAND, J.P. AND CARPENTIER, J.M. (1980). Correlation of mutagenic activity with polynuclear aromatic hydrocarbon content of various mineral oils. *Polynuclear aromatic hydrocarbons. Part 3. Chemistry and Biological effects*. A. Bjorseth and A.
- HO, C.-H., B. R. CLARK, ET AL. (1981). "Analytical and biological analyses of test materials from synthetic fuel technologies. IV. Studies of chemical structure-mutagenic activity relationships of aromatic nitrogen compounds relevant synfuels." *Mutation R*
- HO, C.-H., B. R. CLARK, ET AL. (1981). "Analytical and biological analyses of test materials from synthetic fuel technologies. IV. Studies of chemical structure-mutagenic activity relationships of aromatic nitrogen compounds relevant synfuels." *Mutation R*
- HO, Y. L. AND S. K. HO (1981). "Screening of carcinogens with the prophage lambda CLTS857 induction test." *Cancer Research* 41: 532-536.
- HOEL D.G., KAPLAN N.L., ANDERSON M.W.(1983). Implication of nonlinear kinetics on risk estimation in carcinogenesis. *Science*, 219:1032-1037.
- HOFFMANN, D., F. RATHKAMP, ET AL. (1972). "Fluoranthène : Quantitative determination in cigarette smoke, formation by pyrolysis and tumor-initiating activity." *Journal Of The National Cancer Institute* 49(4): 1165-1175.
- HOKE R.A., ANKLEY G.T., PETERS J.F.(1995). Use of a freshwater sediment quality database in an evaluation of sediment quality criteria based on equilibrium partitioning and screening-level concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (3):451

- HOLST L.L., GIESY J.P.(1989). Chronic effects of the photoenhanced toxicity of anthracene on daphnia magna reproduction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8:933-942.
- HONTELA A., DUMONT P., DUCLOS D., FORTIN R.(1995). Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St Lawrence river. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (4):725-731.
- HORTON, A. W. AND G. M. CHRISTIAN (1974). "Cocarcinogenic versus incomplete carcinogenic activity among aromatic hydrocarbons: Contrast between chrysene and benzo [b] triphenylene." *Journal Of The National Cancer Institute* 53(4): 1017-1020.
- Hoy, C. A., E. P. Salazar, et al. (1984). "Rapid detection of DNAdamaging agents using repair-deficient CHO cells." *Mutation Research* 130: 321-332.
- HUANG X.D., DIXON D.G., GREENBERG B.M.(1993). Impacts of UV radiation and photomodification on the toxicity of PAHs to the higher plant *lemna gibba* (duckweed). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12 (6):1067-1077.
- HUANG X.D., DIXON D.G., GREENBERG B.M.(1995). Increased polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity following their photomodification in natural sunlight : impacts on the duckweed *lemna gibba* L. G-3. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 32 (2):194-200.
- HUANG X.D., KRYLOV S.N., REN L., MCCONKEY B.J., DIXON D.G., GREENBERG B.M.(1997). Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons : II an empirical model for the toxicity of
- HUANG X.D., MCCONKEY B.J., BABU T.S., GREENBERG B.M.(1997). Mechanisms of photoinduced toxicity of photomodified anthracene to plants : inhibition of photosynthesis in the aquatic higher plant *Lemna gibba* (duckweed). *Environmental Toxicology and Chemistry*
- HUGHES, N. C. AND D. H. PHILLIPS (1993). "32P-postlabelling analysis of the covalent binding of benzo[ghi]perylene to DNA in vivo and in vitro." *Carcinogenesis* 14(1): 127-33.
- HUSOY A.M., MYERS M.S., GOKSOYR A.(1996). Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sorfj
- IANNUZZI T.J., HUNTLEY S.L., SCHMIDT C.W., FINLEY B.L., MCNUTT R.P., BURTON S.J.(1997). Combined sewer overflows (CSOs) as sources of sediment contamination in the lower Passaic River, New Jersey. I Priority pollutants and inorganic chemicals. *Chemosphere*
- IARC (1973). Certain Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and heterocyclic compounds. Lyon, France.
- IARC (1983). Benzo[a]Pyrene. *Iarc Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Humans*. 32: 211-224.
- IARC (1983). Benzo[ghi]perylene. *Iarc Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Humans*. 32: 195-204.
- IARC (1983). Chrysene. *Iarc Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Humans*. 32: 247-61.
- IARC (1983). Fluoranthene. *Iarc Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Humans*. 32: 355-64.
- IARC (1983). Indeno(1,2,3-cd)pyrene. *Iarc Monographs On The Evaluation Of The Carcinogenic Risk Of Chemicals To Humans*. 32: 373-8.
- INGERSOLL C.G., NELSON M.K.(1990). Testing sediment toxicity with *Hyalella azteca* (amphipoda) and *Chironomus riparius* (diptera) . In : *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, edited by ASTM, Philadelphia:93-109.
- IRELAND D.S., BURTON G.A., HESS G.G.(1996). In situ toxicity evaluations of turbidity and photoinduction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (4):574-581.
- JACOBS M.W., COATES J.A., DELFINO J.J., BITTON G., DAVIS W.M., GARCIA K.L.(1993). Comparison of sediment extract microtox toxicity with semi-volatile organic priority pollutant concentrations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 24:461
- JAISWAL K., SAROJINI R., NAGABHUSHANAM R.(1989). Effects of naphthalene on freshwater prawn, *macrobrachium kistnensis* in relation to different moult stages. *Geobios*, 16:225-226.

- JAMES M.O., ALTMAN A.H., LI C.L.J., BOYLE S.M.(1992). Dose and time dependent formation of benzo[a]pyrene metabolite DNA adducts in the spiny lobster, *panulirus argus*. *Marine Environmental Research*, 34:299-302.
- JAMES M.O., SCHELL J.D., BOYLE S.M., ALTMAN A.H., CROMER E.A.(1991). Southern flounder hepatic and intestinal metabolism and DNA binding of benzo(a)pyrene (BaP) metabolites following dietary administration of low doses of BaP, BaP-7,8-dihydrodiol or a BaP
- JENNER N.K., OSTRANDER G.K., KAVANAGH T.J., LIVESEY J.C., SHEN M.W., KIM S.C., HOLMES E.H.(1990). A flow cytometric comparison of DNA content and glutathione levels in hepatocytes of english sole (*Parophrys vetulus*) from areas of differing water quality.
- JHA A.N., HUTCHINSON T.H., MACKAY J.M., ELLIOTT B.M., DIXON D.R.(1996). Development of an in vivo genotoxicity assay using the marine worm *platynereis dumerilii* (Polychaeta : nereidae). *Mutation Research*, 359:141-150.
- JIMENEZ B.D., CIRMO C.P., MCCARTHY J.F.(1987). Effects of feeding and temperature on uptake, elimination and metabolism of benzo(a)pyrene in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquatic Toxicology*, 10:41-57.
- JOHNSON B.T.(1990). Rainbow trout liver activation systems with the ames mutagenicity test. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9:1183-1192.
- JOHNSON B.T.(1993). Genotoxicity testing with fish hepatic S9 for evaluation of complex mixtures in the aquatic environment : the use of channel catfish as a model. *Aquatic Toxicology*, 27 (3-4):293-314.
- JOHNSON L.L., CASILLAS E., COLLIER T.K., MCCAIN B.B., VARANASI U.(1988). Contaminants effects on ovarian development in english sole (*parophrys vetulus*) from puget sound, washington. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 45:2133-2146.
- JOHNSON L.L., STEIN J.E., COLLIER T.K., CASILLAS E., VARANASI U.(1994). Indicators of reproductive development in prespawning female winter flounder (*pleuronectes americanus*) from urban and non-urban estuaries in the northeast United States. *The Science o*
- JONGENELEN F.J.(1997). Methods for routine biological monitoring of carcinogenic. *The Science of the Total Environment*, 199:141-149.
- JOTZ, M. M. AND A. D. MITCHELL (1981). Effects of 20 coded chemicals on the forward mutation frequency at the thymidine kinase locus in L5178Y mouse lymphoma cells. In: *Evaluation of short-term t*
- KADEN, D. A., R. A. HITES, ET AL. (1979). "Mutagenicity of soot and associated polycyclic aromatic hydrocarbons to *Salmonella typhimurium*." *Cancer Research* 39: 4152-4159.
- KAGAN J., SINNOTT D., KAGAN E.D.(1987). The toxicity of pyrene in the fish *pimephales promelas* : synergism by piperonyl butoxide and by ultraviolet light. *Chemosphere*, 16 (10-12):2291-2298.
- Kakunaga, T. (1973). "A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from BALB/3T3." *International Journal Of Experimental Pathology* 12: 463-473.
- KALF D.F. , CROMMENTUIJN T. , VAN DE PLASSCHE E.J.(1997). Environmental quality objective for 10 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 36:89-97.
- KANTONIEMI A.(1996). The capacity of liver microsomes to form benzo(a)pyrene-diolepoxide-DNA adducts and induction of cytochrome P450 1A in feral fish exposed to pulp mill effluents. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35:136-141.
- KENNAWAY, E. L. (1924). "On cancer producing tars and tar-fractions." *Journal Of Industrial Hygiene* 5(12): 462-488.
- KENNAWAY, E. L. (1930). "Further experiments on cancer-producing substances." *Biochemical Journal* 24: 497-504.
- KENNEDY C.J., GILL K.A., WALSH P.J.(1989). Thermal modulation of benzo(a)pyrene uptake in the gulf toadfish, *opsanus beta* . *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8:863-869.
- KINAE, D. A., T. HASHIZUME, ET AL. (1979). "Studies on the toxicity of pulp and paper mill effluents - 1. Mutagenicity of the sediment samples derived from kraft paper mills." *Water Research* 15: 17-24.
- KLAMER H.J.C., VILLERIUS L.A., ROELSMA J., DE MAAGD P.G.J., OPPERHUIZEN A.(1997). Genotoxicity testing using the mutatox assay : evaluation of benzo[a]pyrene as a positive control. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (5):857-861.

- KLEIN, M. (1952). "Effect of croton oil on induction of tumors by 1,2-benzanthracene, desoxycholic acid, or low doses of 20-methylcholanthrene in mice." *Journal Of The National Cancer Institute* 13: 333-341.
- KLEIN, M. (1963). "Susceptibility of strain B6AF/J hybrid infant mice to tumorigenesis with 1,2-benzanthracene, desoxycholic acid, and 3-methylcholanthrene." *Cancer Research* 23: 1701-1707.
- KLEKOWSKI E.J., CORREDOR J.E.J.R., MORELL J.M., DEL CASTILLO C.A.(1994). Petroleum pollution and mutation in mangroves. *Marine Pollution Bulletin*, 28 (3):166-169.
- KNAPP, A., C. GOSE, ET AL. (1981). Summary report on the performance of in vitro mammalian assays. Evaluation of short term tests for carcinogens. Report of the international collaborative program. *Progress in Mutation Research*. Amsterdam, Elsevier. 1: 60
- KNAUF, L. and G. RICE (1992). Statistical evaluation of several Benzo [a] pyrene Bioassays. Memorandum to R. Schoeny, U.S. EPA, Cincinnati.
- KNUTZEN J.(1995). Effects on marine organisms from polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and other constituents of waste water from aluminium smelters with examples from Norway. *The Science of the Total Environment*, 163:107-122.
- KOCAN R.M., MARTY G.D., OKIHIRO M.S., BROWN E.D., BAKER T.T.(1996). Reproductive success and histopathology of individual prince william sound Pacific herring 3 years after the Exxon Valdez oil spill. *Canadian Journal Fish Aquatic Science*, 53:2388-2393.
- KOCHHAR, T. S. (1982). "Effects of polycyclic hydrocarbons on the induction of chromosomal aberrations in absence of an exogenous metabolic activation system in cultured hamster cells." *Experientia* 38(7): 845-6.
- KOELMAN A.A., GILLISSEN F., MAKATITA W., VAN DEN BERG M.(1997). Organic carbon normalisation of PCB, PAH and pesticide concentrations in suspended solids. *Water Research*, 31 (3):461-470.
- KRAHN, D. F. AND H. C. (1977). "Liver homogenate-mediated mutagenesis in chinese hamster V79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins." *Mutation Research* 46: 27-44.
- KRAHN, D. F. AND H. C. (1977). "Liver homogenate-mediated mutagenesis in chinese hamster V79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins." *Mutation Research* 46: 27-44.
- KRANTZBERG G., BOYD D.(1992). The biological significance of contaminants in sediment from hamilton harbour, lake Ontario. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 (11):1527-1540.
- KRYLOV S.N., HUANG X.D., ZEILER L.F., DIXON D.G., GREENBERG B.M.(1997). Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons : I. physical model based on chemical kinetics in a two-
- KUKKONEN J., LANDRUM P.F.(1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene to lumbriculus variegatus (oligochaeta). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (9):1457-1468.
- KUKKONEN J., LANDRUM P.F.(1995). Effects of sediment-bound polydimethylsiloxane on the bioavailability and distribution of benzo(a)pyrene in lake sediment to lumbriculus variegatus. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (3):523-531.
- KUKKONEN J., LANDRUM P.F.(1996). Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. *Chemosphere*, 2 (6):1063-1076.
- KUKKONEN J., OIKARI A.(1987). Effects of aquatic humus on accumulation and acute toxicity of some organic micropollutants. *The Science of the Total Environment*, 62:399-402.
- KURE L.K., FORBES T.L.(1997). Impact of bioturbation by arenicola marina on the fate of particle-bound fluoranthene. *Marine Ecology Progress series*, 156 (25):157-166.
- KURELEC B., CHACKO M., GUPTA R.C.(1988). Postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts in Mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Environmental Research*, 24:317-320.
- KURELEC B., GARG A., KRCA S., GUPTA R.C.(1989). DNA adducts as biomarkers in genotoxic risk assessment in the aquatic environment. *Marine Environmental Research*, 28:317-321.
- KURELEC B., KRCA S., GARG A., GUPTA R.C.(1991). The potential of carp to bioactivate benzo(a)pyrene to metabolites that bind to DNA. *Cancer Letters*, 57:255-260.
- LACASSAGNE, A., N. P. BUU-HOI, ET AL. (1963). "Activité cancérogène des d'hydrocarbures polycycliques aromatiques à noyau fluoranthène." *Un. Int. Cancer Acta* 19(3-4): 490-496.

- LAFURIE M., NARBONNE J.F. et GALGANI F. (1992) Indicateurs biochimiques de contamination de l'environnement marin. *Analisis magazine*, 20 (6): 27-33.
- LAKE, R. S., M. L. KROPKO, ET AL. (1978). "Chemical induction of unscheduled DNA synthesis in human skin epithelial cell culture." *Cancer Research* 38: 2091-2098.
- LANDRUM P.F.(1988). Toxicokinetics of organic xenobiotics in the amphipod, *Pontoporeia hoyi* : role of physiological and environmental variables. *Aquatic Toxicology*, 12 (3):245-271.
- LANDRUM P.F., DUPUIS W.S., KUKKONEN J.(1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene in *diporeia* spp.: examination of equilibrium-partitioning theory and residue-based effects for assessing hazard. *Environmental Toxicology*
- LANDRUM P.F., EADIE B.J., FAUST W.R.(1991). Toxicokinetics and toxicity of a mixture of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons to the amphipod *diporeia* sp.. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10 (1):35-46.
- LANDRUM P.F., GOSSIAUX D.C., KUKKONEN J.(1997). Sediment characteristics influencing the bioavailability of nonpolar organic contaminants to *diporeia* spp.. *Chemical Speciation and Bioavailability*, 9 (2):43-55.
- LAVOIE, E. J., D. T. COLEMAN, ET AL. (1985). "Tumor-initiating activity, mutagenicity, and metabolism of methylated anthracenes." *Carcinogenesis* 6(10): 1483-1488.
- LAVOIE, E. J., J. L. TULLEY-FREILER, ET AL. (1981). Comparative studies on the tumor initiating activity and metabolism of methylfluorenes and methylbenzofluorenes. *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. M. Cooke and A. J. Dennis. Columbus, Bagatelle press: 4
- LAVOIE, E. J., L. TULLEY-FREILER, ET AL. (1981). "Mutagenicity, tumor-initiating activity, and metabolism of methylphenanthrenes." *Cancer Research* 41: 3441-3447.
- LAVOIE, E. J., S. S. HECHT, ET AL. (1982). "Identification of the mutagenic metabolites of fluoranthene, 2-methylfluoranthene, and 3-methylfluoranthene." *Carcinogenesis* 3(8): 841-6.
- LAVOIE, E. J., V. BEDENKO, ET AL. (1979). A comparison of the mutagenicity, tumor-initiating activity and complete carcinogenicity of polynuclear aromatic hydrocarbons. *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons*. P. E. Jones and P. Leber. Ann Arbor, Ann Arbor Scie
- LAVOIE, E. J., Z. W. CAI, ET AL. (1994). "Tumorigenic activity of fluoranthene, 2-methylfluoranthene and 3-methylfluoranthene in newborn CD-mice." *Carcinogenesis* 15(10): 2131-5.
- LAVOIE, E.J., AMIN, S., HECHT, S.S., FURUYA, K. AND HOFFMANN, D. (1982). Tumour initiating activity of dihydrodiols of benzo[b]fluoranthene, benzo[j]fluoranthene, and benzo[k]fluoranthene. *Carcinogenesis* 3(1): 49-52.
- LAVOIE, E.J., BRALEY, J., RICE, J.E. AND RIVENSON, A. (1987). Tumorigenic activity of non-alternant polynuclear aromatic hydrocarbons in newborn mice. *Cancer Letters* 34(1): 15-20.
- LAVOIE, E.J., HECHT, S.S., AMIN, S., BEDENKO, V. AND HOFFMANN, D. (1980). Identification of mutagenic dihydrodiols as metabolites of benzo(j)fluoranthene and benzo(k)fluoranthene. *Cancer Research* 40(12): 4528-32.
- LAW F.C.P., MENG J.X., HE Y.T., CHUI Y.C.(1994). Urinary and biliary metabolites of pyrene in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Xenobiotica*, 24 (3):221-229.
- LEMAIRE P., BERHAUT J., LEMAITRE-GONY S., LAFURIE M.(1992). Ultrastructural changes induced by benzo[a]pyrene in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) liver and intestine: importance of the intoxication route. *Environmental Research*, 57:59-72.
- LEMAIRE P., DEN BESTEN P.J., O'HARA S.G.M., LIVINGSTONE D.R.(1993). Comparative metabolism of benzo(a) pyrene by microsomes of hepatopancreas of the shore crab *maenas* l. and digestive gland of the common mussel *mytilus edulis* l.. *Polycyclic Arom*
- LEMAIRE P., LAFURIE M., WEISSBART D., DURST F., PFLIEGER P., MIOSKOWSKI C., SALAUN J.P.(1992). Subterminal hydroxylation of lauric acid by microsomes from a marine fish. *Lipids*, 27 (3):187-191.
- LEMAIRE P., LIVINGSTONE D.R.(1995). Effects of the inhibitor ellipticine on cytochrome  $\text{P}450$  - reductase and cytochrome P450 (1A) function in hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*). *Marine Environmental Research*, 39:73, 77.
- LEMAIRE P., MATHIEU A., CARRIERE S., DRAI P., GIUDICELLI J., LAFURIE M.(1990). The uptake metabolism and biological half-life of Benzo(a) pyrene in different tissues of sea bass, *dicentrarchus labrax*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20:223-233.

- LEMAIRE P., MATHIEU A., CARRIERE S., NARBONNE J.F., LAFURIE M., GIUDICELLI J.(1992). Hepatic biotransformation enzymes in aquaculture european sea bass (*dicentrarchus labrax*) : kinetic parameters and induction with benzo(a)pyrene. *Comparative Biochemistr*
- LEMAIRE P., MATHIEU A., GIUDICELLI J., LAFURIE M.(1992). Effect of Benzo(a)pyrene on hepatic biotransformation activities : time course of induction in aquaculture european sea bass (*dicentrarchus labrax*). *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2:263-273.
- LEMAIRE-GONY S., LEMAITRE P., PULSFORD A.L.(1995). Effects of cadmium and benzo(a) pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of European sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquatic Toxicology*, 31:297-313.
- LEMKE M.A., KENNEDY C.J.(1997). The uptake, distribution and metabolism of benzo[a]pyrene in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) during the parr-smolt transformation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (7):1384-1388.
- LEVIN, W., A. W. WOOD, ET AL. (1978). "Evidence for bay region activation of chrysene 1,2-dihydrodiol to an ultimate carcinogen." *Cancer Research* 38: 1831-1834.
- LI, A. P. (1984). "Use of aroclor 1254-induced rat liver homogenate in the assaying of promutagens in Chinese hamster ovary cells." *Environmental Mutagenesis* 6(4): 539-544.
- LIVINGSTONE D.R., LEMAITRE P., MATTHEWS A., PETERS L.D., PORTE C., FITZPATRICK P.J., FORLIN L., NASCI C., FOSSATO V., WOOTTON N., GOLDFARB P.(1995). Assessment of the impact of organic pollutants on goby (*zosterisessor ophiocephalus*) and mussel (*mytilus ga*
- LONG E.R.(1992). Ranges in chemical concentrations in sediments associated with adverse biological effects. *Marine Pollution Bulletin*, 24 (1):38-45.
- LONG E.R., FIELD L.J., Mac DONALD D.D. (1998) Predicting toxicity in marine sediments with numerical sediment quality guidelines. *Environ. Toxicol. & Chem.*, 17, 714-728
- LOTUFO G.R.(1997). Toxicity of sediment-Associated PAHs to an Estuarine copepod : effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Marine Environmental Research*, 44 (2):149-166.
- LOTUFO G.R., FLEEGER J.W.(1996). Toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene to *Limnodrilus hoffmeisteri* (Oligochaeta: tubificidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15 (9):1508-1516.
- LOTUFO G.R., FLEEGER J.W.(1997). Effects of sediment-associated phenanthrene on survival, development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Marine Ecology Progress Series*, 151:91-102.
- LOWE D.M., SOVERCHIA C., MOORE M.N.(1995). Lysosomal membrane responses in the blood and digestive cells of mussels experimentally exposed to fluoranthene. *Aquatic Toxicology*, 33 (2):105-112.
- LUBET R.A., BRUNDA M.J., TARAMELLI D., DANSIE D., NEBERT D.W., KOURI R.E.(1984). Induction of immunotoxicity by polycyclic hydrocarbons : role of the Ah locus. *Archives of Toxicology*, 56:18-24.
- LUBET, R. A., G. M. CONNOLLY, ET AL. (1983). "Dibenz[a,h]anthracene-induced subcutaneous tumors in mice. Strain sensitivity and the role of carcinogen metabolism." *Carcinogenesis* 4(5): 513-7.
- LUBET, R. A., G. M. CONNOLLY, ET AL. (1983). "Dibenz[a,h]anthracene-induced subcutaneous tumors in mice. Strain sensitivity and the role of carcinogen metabolism." *Carcinogenesis* 4(5): 513-7.
- LUN R., LEE K., DE MARCO L., NALEWAJKO C., MACKAY D.(1998). A model of the fate of polycyclic aromatic hydrocarbons in the saguenay fjord, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (2):333-341.
- Lutz, W. K. (1979). "In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis." *Mutation Research* 65: 289-356.
- MACCUBBIN A.E., BLACK J.J., DUNN B.P.(1990). 32P-postlabeling detection of DNA adducts in fish from chemically contaminated waterways. *The Science of the Total Environment*, 94:89-104.
- MACHALA M., NEZVEDA K., PETRIVALSKY M., JAROSOVA A.B., PIACKA V., SVOBODOVA Z.(1997). Monooxygenase activities in carp as biochemical markers of pollution by polycyclic and polyhalogenated aromatic hydrocarbons: choice of substrates and effects of tempera
- MACHALA M., PETRIVALSKY M., NEZVEDA K., ULRICH R., DUSEK L., PIACKA V., SVOBODOVA Z.(1997). Responses of carp hepatpancreatic 7-ethoxyresorufin-o-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants - a field study. *Environmental Toxicology*

- MALINS D.C., HAIMANOT R.(1991). The etiology of cancer : hydroxyl radical-induced DNA lesions in histologically normal livers of fish from a population with liver tumors. *Aquatic Toxicology*, 20:123-130.
- MALINS D.C., MC CAIN B.B., MYERS M.S., BROWN D.W., KRHAN M.M., ROUBAL W.T., SCHIEWE M.H., LANDAHL J.T., CHAN S.L.(1987). Field and laboratory studies of the etiology of liver neoplasms in marine fish from puget sound. *Environmental Health Perspectives*, 71
- MALINS D.C., MCCAIN B.B., BROWN D.W., VARANASI U., KRAHN M.M., MYERS M.S., CHAN S.L.(1987). Sediment-associated contaminants and liver diseases in bottom-dwelling fish. *Hydrobiologia*, 149:67-74.
- MALINS D.C., MCCAIN B.B., LANDAHL J.T., MYERS M.S., KRAHN M.M., BROWN D.W., CHAN S.L., ROUBAL W.T.(1988). Neoplastic and other diseases in fish in relation to toxic chemicals: an overview. *Aquatic Toxicology*, 11:43-67.
- MALTBY L., BOXALL A.B.A., FORROW D.M., CALOW P., BETTON C.I.(1995). The effects of motorway runoff on freshwater ecosystems : 2. identifying major toxicants. *Environmental and Chemistry*, 14 (6):1093-1101.
- MAMBER, S., V. BRYSON, ET AL. (1983). "The Escherichia coli WP2/WP100 rec assay for detection of potential chemical carcinogens." *Mutation Research* 119: 135-144.
- MAMBER, S., V. BRYSON, ET AL. (1984). "Evaluation of the Escherichia coli K12 inductest for detection of potential chemical carcinogens." *Mutation Research* 130: 141-151.
- MARQUARDT, H. AND C. HEIDELBERGER (1972). "Influence of feeder cells and inducers and inhibitors of microsomal mixed function oxidases on hydrocarbon-induced malignant transformation of cells derived from C3H mouse prostate." *Cancer Research* 32: 721-725.
- MARSH J.W., CHIPMAN J.K., LIVINGSTONE D.R.(1992). Activation of xenobiotics to reactive and mutagenic products by the marine invertebrates *Mytilus edulis*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*. *Aquatic Toxicology*, 22 (2):115-128.
- MARTIN, C. N. AND A. C. MCDERMID (1981). Summary report on the performance of in vitro mammalian assays. Evaluation of short term tests for carcinogens. Report of the international collaborative program. *Progress in Mutation Research*. Amsterdam, Elsevier.
- MARTIN, C. N., A. C. MCDERMID, ET AL. (1978). "Testing of known carcinogens and non-carcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in Hela cells." *Cancer Research* 38: 2621-2627.
- MARTIN-ALGUACIL N., BABICH H., ROSENBERG D.W., BORENFREUND E.(1991). In vitro response of the brown bullhead catfish cell line, BB, to aquatic pollutants. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20 :113-117.
- MARTY G.D., SHORT J.W., DAMBACH D.M., WILLITS N.H., HEINTZ R.A., RICE S.D., STEGEMAN J.J., HINTON D.E.(1997). Ascites, premature emergence, increased gonadal cell apoptosis, and cytochrome P4501A induction in pink salmon larvae continuously exposed to oil
- MARUYA K.A., RISEBROUGH R.W., HORNE A.J.(1997). The bioaccumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by benthic invertebrates in an intertidal marsh. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (6):1087-1097.
- MASFARAUD J.F., PFOHL-LESZKOWIC A., MALAVEILLE C., KEITH G., MONOD G.(1992). 7 Ethylresorufin O-deethylase activity and level of DNA-adducts in trout treated with benzo[a]pyrene. *Marine Environmental Research*, 34:351-354.
- MATIJASEVIC, Z. AND E. ZEIGER (1985). "Mutagenicity of pyrene in Salmonella." *Mutation Research* 142(4): 149-52.
- MAXON C.L., BARNETT A.M., DIENER D.R.(1997). Sediment contaminants and biological effects in southern california : use of a multivariate statistical approach to assess biological impact. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (4):775-784.
- MAY W.E., (1980), The solubility behavior of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous systems. *Advances in chemistry series*, Vol 185, pp. 143-192.
- MC CARTHY J.F., JACOBSON D.N., SHUGART L.R., JIMENEZ B.D.(1989). Pre-exposure to 3-methylcholanthrene increases benzo(a)pyrene adducts on DNA of bluegill sunfish. *Marine Environmental Research*, 28:323-328.
- MC CLOSKEY J.T., ORIS J.T.(1993). Effect of anthracene and solar ultraviolet radiation exposure on gill ATPase and selected hematologic measurements in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquatic Toxicology*, 24 (3-4):207-218.

- MC ELROY A.E., CAHILL J.M., SISSON J.D., KLEINOW K.M.(1991). Relative bioavailability and DNA adduct formation of benzo[a]pyrene and metabolites in the diet of the winter flounder. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C (1-2):29-32.
- MC CANN, J., E. CHOI, ET AL. (1975). "Detection of carcinogens as mutagens in Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals." *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 72(12): 5135-5139.
- MC CARROLL, N. E., B. H. KEECH, ET AL. (1981). "A microsuspension adaptation of the Bacillus subtilis 'rec' assay." *Environmental Mutagenesis* 3: 607-616.
- MC CLOSKEY J.T., ORIS J.T.(1991). Effect to water temperature and dissolved oxygen concentration on the photo-induced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*). *Aquatic Toxicology*, 21 (3, 4):145-156.
- MC CONKEY B.J., DUXBURY C.L., DIXON D.G., GREENBERG B.M.(1997). Toxicity of a PAH photooxidation product to the bacteria photobacterium phosphoreum and the duckweed leman gibba : effects of phenanthrene and its primary photoproduct, phenanthrenequinone. En
- MC DONALD S.J., WILLET K.L., THOMSEN J., BEATTY K.B., CONNOR K., NARASIMHAN T.R., ERICKSON C.M. et SAFE S.H. (1996) Sublethal detoxification responses to contaminant exposure associated with offshore production platforms. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53: 2606-2617.
- MC GRODDY S.E., FARRINGTON J.W., GSCHWEND P.M.(1996). Comparison of the in situ and desorption sediment-water partitioning of polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls . *Environmental Science and Technology*, 30 (1):172-177.
- MC MASTER M.E., VAN DER FRAAK G.J., MUNKITTRICK K.R.(1996). An epidemiological evaluation of the biochemical basis for steroid hormonal depressions in fish exposed to industrial wastes. *Journal of Great Lakes Research*, 22 (2):153-171.
- MEADOR J.P., STEIN J.E., REICHERT W.L., VARANASI U.(1995). Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Marine Organisms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 143:79-165.
- MEKENYAN O.G., ANKLEY G.T., VEITH G.D., CALL D.J.(1994). QSARs for Photoinduced toxicity : I. acute lethality of polycyclic aromatic hydrocarbons to daphnia magna. *Chemosphere*, 28 (3):567-582.
- MELCER H., STEEL P., BEDFORD W.K.(1995). Removal of polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic nitrogen compounds in a municipal treatment plant. *Water Environment Research*, 67 (6) :926-934.
- MENZIE C.A., POTOCKI B.B., SANTODONATO J.(1992). Exposure to carcinogenic PAHs in the environment. *Environment Science and Technology*, 26 (7):1278-1284.
- MERSCH-SUNDERMANN, V., H. S. ROSENKRANZ, ET AL. (1992). "Structural basis of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons." *Mutagenesis* 7(3): 211-218.
- METCALFE C.D.(1988). Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows (*Umbra limi*) and brown bullheads (*Ictalurus nebulosus*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 40:489-195.
- METCALFE C.D., BALCH G.C., CAIRNS V.W., FITZSIMONS J.D., DUNN B.P.(1990). Carcinogenic and genotoxic activity of extracts from contaminated sediments in western lake Ontario. *The Science of the Total Environment*, 94:125-141.
- MICHEL X.R., BEASSE C., NARBONNE J.F.(1995). In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 28:215-222.
- MICHEL X.R., CASSAND P.M., NARBONNE J.F.(1993). Activation of benzo(a)pyrene and 2-aminoanthracene to bacteria mutagens by mussel digestive gland postmitochondrial fraction. *Mutation Research*, 301:113-119.
- MISITANO D.A., CASILLAS E., HALEY C.R.(1994). Effects of contaminated sediments on viability, length, DNA and protein content of larval surf smelt, *hypomesus pretiosus*. *Marine Environmental Research*, 37:1-21.
- MORRIS, H. P., C. A. VELAT, ET AL. (1960). "Studies of carcinogenicity in the rate of derivatives of aromatic amines related to N-2-fluorenyl acetamide." *Journal Of The National Cancer Institute* 24: 149-180.
- MORTELMANS, K., S. HAWORTH, ET AL. (1986). "Salmonella mutagenicity tests: II. results from the testing of 270 chemicals." *Environmental Mutagenesis* 8(Suppl. 7): 1-119.
- MOSSANDA, K., F. PONCELET, ET AL. (1979). "Detection of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons Africa smoke fish." *Food Cosmet. Toxicol.* 17(141-143).

- MOY F.E., WALDAY M.(1996). Accumulation and depuration of organic micro-pollutants in marine hard bottom organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 33 (1-6):56-63.
- MÜLLER, E. (1968). "Carcinogenic substances in water and soils. XX. Studies on the carcinogenic properties of 1,12-benzoperylene (Ger)." *Arch. Hyg.* 152: 23-52.
- MUNOZ M.J., TARAZONA J.V.(1993). Synergistic effect to two- and four-component combinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons : Phenanthrene, Anthracene, Naphthalene and Acenaphthene on *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*
- MURDOCH M.H., HEBERT P.D.N.(1994). Mitochondrial DNA diversity of brown bullhead from contaminated and relatively pristine sites in the great lakes. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (8):1281-1289.
- MURPHY D.L., GOOCH J.W.(1997). Erod and cyp1a protein in channel catfish (*ictalurus punctatus*) from an urban estuary relative to that in benzo(a)pyrene-exposed hatchery specimens:235-239.
- NACCI D.E., CAYULA S., JACKIM E.(1996). Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology*, 35 (3-4):197-210.
- NAKAMURA, S., Y. ODA, ET AL. (1987). "SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination of 151 chemicals." *Mutation Research* 192: 239-246.
- NAKAMURA, S., Y. ODA, ET AL. (1987). "SOS-inducing activity of chemical carcinogens and mutagens in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002: examination of 151 chemicals." *Mutation Research* 192: 239-246.
- NAMDARI R., LAW F.C.P.(1996). Toxicokinetics of waterborne pyrene in rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) following branchial or dermal exposure. *Aquatic Toxicology*, 35 (3-4):221-235.
- NARBONNE, J. F., P. CASSAND, ET AL. (1987). "Structure activity relationships of the N-methylcarbamate series in *Salmonella typhimurium*." *Mutation Research* 191: 21-27.
- NARBONNE J.F., GARRIGUES P., RIBERA D., RAOUX C., MATHIEU A., LEMAIRE P., SALAUN J.P. et LAFAURIE M. (1991) Mixed-function oxygenase enzymes as tools for pollution monitoring : field studies on the French coast of the Mediterranean sea. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C: 37-42.
- NEWSTED J.L., GIESY J.P.(1987). Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *daphnia magna*, *strausia* (cladocera, crustacea). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6 (6):445-461.
- NIIMI A.J., PALAZZO V.(1986). Biological half-lives of eight polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in rainbow trout (*Salmo Gairdneri*). *Water Research*, 20 (4):503-507.
- NIKINMAA M.(1992). How does environmental pollution affect red cell function in fish ?. *Aquatic toxicology*, 22 (4):227-238.
- NIPPER M.G., ROPER D.S., WILLIAMS E.K., MARTIN M.L., VAN DAM L.F., MILLS G.N.(1998). Sediment toxicity and benthic communities in mildly contaminated mudflats. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (3):502-510.
- NISBET I.C.T., LAGOY P.K.(1992). Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 16:290-300.
- NORDQVIST, M., D. R. THAKKER, ET AL. (1979). "The highly tumorigenic 3,4-dihydrodiol is a principal metabolite formed from dibenz[a,h]anthracene by liver enzymes." *Molecular Pharmacology* 16: 643-655.
- NORDQVIST, M., D. R. THAKKER, ET AL. (1981). "Metabolism of chrysene and phenanthrene to bay-region diol epoxides by rat liver enzymes." *Molecular Pharmacology* 19: 168-178.
- OBERLY, T., B. BEUSEY, ET AL. (1984). "An evaluation of L5178Y TK+/mouse lymphoma forward mutation assay using 42 chemicals." *Mutation Research* 125: 291-306.
- O'CONNOR T.P., DASKALAKIS K.D., HYLAND J.L., PAUL J.F., SUMMERS J.K. (1998) Comparisons of sediment toxicity with predictions based on chemical guidelines. *Environ. Toxicol. & Chem.*, 17, 468-471
- OESCH, F., M. BUCKER, et al. (1981). "Activation of phenanthrene to mutagenic metabolites and evidence for at least two different activation pathways." *Mutation Research* 81: 1-10.
- OLIVEIRA M.F.T., HAWKINS W.E., OVERSTREET R.M., WALKER W.W.(1994). Hepatocellular neoplasm in a wild-caught sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) from the northern gulf of Mexico. *Gulf Research Reports*, 9 (1):65-67.
- OLLIVON D., GARBAN B., CHESTERIKOFF A.(1995). Analysis of the distribution of some polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended matter in the river Seine (France). *Water, Air and Soil Pollution*, 81:135-152.

- ORIS J.T., GIESY J.P.(1986). Photoinduced toxicity of anthracene to juvenile bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus rafinesque*) : photoperiod effects and predictive hazard evaluation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5 (8):761-768.
- ORIS J.T., GIESY J.P.(1987). The photo-induced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Chemosphere*, 16 (7):1395-1404.
- ORIS J.T., HALL A.T., TYLKA J.D.(1990). Humic acids reduce the photo-induced toxicity of anthracene to fish and daphnia. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9:575-583.
- ORIS J.T., WINNER R.W., MOORE M.V.(1991). A four-day survival and reproduction toxicity test for *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10:217-224.
- OSTRANDER G.K., ANDERSON J.J., FISHER J.P., LANDOLT M.L., KOCAN R.M.(1990). Decreased performance of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* emergence behaviors following embryonic exposure to benzo(a)pyrene. *Fishery Bulletin*, 88:551-555.
- OSTRANDER G.K., KUEHN R.L., BERLIN K.D., HAWKINS W.E.(1995). Anthropogenic contaminants and fish health along an urban waterway. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10:207-215.
- OSTRANDER G.K., LANDOLT M.L., KOCAN R.M.(1988). The ontogeny of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) behavior following embryonic exposure to benzo(a)pyrene. *Aquatic Toxicology*, 13 (4):325-346.
- OSTRANDER G.K., LANDOLT M.L., KOCAN R.M.(1989). Whole life history studies of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) following embryonic exposure to benzo(a)pyrene. *Aquatic Toxicology*, 15 (2):109-126.
- PAHLMAN, R. AND O. PELKONEN (1987). "Mutagenicity studies of different polycyclic aromatic hydrocarbons: the significance of enzymatic factors and molecular structure." *Carcinogenesis* 8: 773-778.
- PAL, K. (1981). "The induction of sister-chromatid exchanges in Chinese Hamster ovary cells by K-region epoxides and some dihydrodiols derived from benz[a]anthracene." *Mutation Research* 84: 389-398.
- PALITTI, F., R. COZZI, ET AL. (1986). "An in vitro and in vivo study on mutagenic activity of fluoranthene: comparison between cytogenetic studies and HPLC analysis." *Mutation Research* 174(2): 125-30.
- PANGREKAR J., KANDASWAMI C., KOLE P., KUMAR S., SIKKA H.C.(1995). Comparative metabolism of benzo(a)pyrene, chrysene and phenanthrene by brown bullhead liver microsomes. *Marine Environmental Research*, 39:51-55.
- PASSINO D.R.M., SMITH S.B.(1987). Acute bioassays and hazard evaluation of representative contaminants detected in great lakes fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6 (11):901-907.
- PASSINO-READER D.R., BERLIN W.H., HICKEY J.P.(1995). Chronic bioassays of rainbow trout fry with compounds representative of contaminants in great lakes fish. *Journal of Great Lakes Research*, 21 (3):373-383.
- PATEL B., EAPEN J.T.(1989). Physiological evaluation of naphthalene intoxication in the tropical acrid clam *Anadara granosa*. *Marine Biology*, 103:193-202.
- PAYNE J.F., FANCEY L.F.(1989). Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on immune responses in fish: change in melanomacrophage centers in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) exposed to hydrocarbon-contaminated sediments. *Marine Environmental Research*
- PAYNE J.F., KICENIUK J., FANCEY L.L., WILLIAMS U.(1988). What is a safe level of polycyclic aromatic hydrocarbons for fish : subchronic toxicity study on winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Canadian Journal of Fish Aquatic Science*, 45:1983-19
- PELLETIER C., BURGESS R.M., HO K.T., KUHN A., MCKINNEY R.A., RYBA S.A.(1997). Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (10):2190-2199
- PETERS L.D., MORSE H.R., WATERS R., LIVINGSTONE D.R.(1997). Responses of hepatic cytochrome P450 1A and formation of DNA-adducts in juveniles of turbot (*Scophthalmus maximus* L.) exposed to water-borne benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology*, 38:67-82.
- PETERS L.D., O'HARA S.C.M., LIVINGSTONE D.R.(1996). Benzo(a)pyrene metabolism and xenobiotic-stimulated reactive oxygen species generation by subcellular fraction of larvae of turbot (*Scophthalmus maximus* l.). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114C

- PIENTA, R. J., J. A. POILEY, ET AL. (1977). "Morphological transformation of early passage golden Syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens." *International Journal of Environmental Health Research*, 1(1):65-76.
- PIPE R.K., MOORE M.N.(1986). An ultrastructural study on the effects of phenanthrene on lysosomal membranes and distribution of the lysosomal enzyme B-glucuronidase in digestive cells of the periwinkle *Littorina littorea*. *Aquatic Toxicology*, 8 (1):65-76.
- PITTINGER C.A., BUIKEMA A.L., FALKINHAM III J.O.(1987). In situ variations in oyster mutagenicity and tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6 (1):51-60.
- POPESCU, N. C., D. TURNBULL, ET AL. (1977). "Sister chromatid exchange and chromosome aberration analysis with the use of several carcinogens and noncarcinogens: Brief communication." *Journal Of The National Cancer Institute* 59(1): 289-293.
- PROBST, G. S., R. E. MCMAHON, ET AL. (1981). "Chemically-induced unscheduled DNA synthesis in primary rat hepatocyte cultures: A comparison with bacterial mutagenicity using 218 compounds." *Environmental Mutagenesis* 3: 11-32.
- PURCHASE, I. F. H. AND V. RAY (1981). "Summary report on the performance of in vivo assays. In: Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens. Report of the International Collaborative Program." *Progress in Mutation Research* 1: 86-95.
- PURDY J.E.(1989). The effects of brief exposure to aromatic hydrocarbons on feeding and avoidance behaviour in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Journal of Fish Biology*, 34:621-629.
- QUARLES, J. M., M. W. SEGA, ET AL. (1979). "Transformation of hamster fetal cells by nitrated pesticides in a transplacental assay." *Cancer Research* 39: 4525-4533.
- RAO V.R., MITZ S.V., HADDEN C.T., CORNABY B.W.(1996). Distribution of contaminants in aquatic organisms from East Fork Poplar Creek. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 33:44-54.
- RAOUC C., LEMAIRE P., MATHIEU A., GARRIGUES P., LAFAURIE M.(1989). Bioprotective system activities in *Serranus scriba* from the Mediterranean Sea : relation between pollutant content and enzymatic activities. *Océanis*, 15 (4):623-627.
- RAY S., DUNN B.P., PAYNE J.F., FANCEY L., HELBIG R., BELAND P.(1991). Aromatic DNA-carcinogen adducts in beluga whales from the Canadian Arctic and Gulf of St Lawrence. *Marine Pollution Bulletin*, 22 (8):392-396.
- RAZAK I.A.A., LI A., CHRISTENSEN E.R.(1996). Association of PAHs, PCBs, 137 Cs, and 210 Pb with clay, silt, and organic carbon sediments. *Water Science and Technology*, 34:29-35.
- REBHUN M. , KALABO R. , GROSSMAN L. , MANKA J. , RAV-ACHA CH.(1992). Sorption of organics on clay and synthetic humic-clay complexes simulating aquifer processes. *Water Research*, 26 (1):79-84.
- REDDY P.S., KATYAYANI R.V., FINGERMAN M.(1996). Cadmium and naphthalene-induced hyperglycemia in the fiddler crab, *Uca pugilator* : differential modes of action on the neuroendocrine system. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 56:425-43
- RELEXANS J.C., LERAT L., ETCHEBER H.(1988). Une stratégie d'étude des effets de quelques polluants (Cd, Zn, BaP) sur la respiration de communautés benthiques maintenues in vitro. *Océanis*, 14 (4):411-421.
- REN L., HUANG X.D., MCCONKEY B.J., DIXON D.G., GREENBERG B.M.(1994). Photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (Fluoranthene, Pyrene, and Naphthalene) to the Duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 28 (2)
- RETEUNA C., VASSEUR P., CABRIDENC R.(1989). Performances of three bacterial assays in toxicity assessment. *Hydrobiologia*, 188, 189:149-153.
- REZNIKOFF, C. A., J. S. BERTRAM, ET AL. (1973). "Quantitative and qualitative studies of chemical transformation of cloned C3H mouse embryo cells sensitive to postconfluence inhibition of cell division." *Cancer Research* 33: 3239-3249.
- RHIM, J. S., D. K. PARK, ET AL. (1974). "Evaluation of an in vitro assay system for carcinogens based on prior infection of rodent cells with non transforming RNA tumor virus." *Journal Of The National Cancer Institute* 52(4): 1167-1173.
- RIBERA D., NARBONNE J.F., SUTEAU P., RAOUC C., GARRIGUES P., LAFAURIE M.(1989). Activities of the PAH metabolizing system in the mussel as a biochemical indicator for pollution : french coasts of the Mediterranean Sea. *Océanis*, 15 (4):443-449.

- RICE C.A., PLESHA P.D., CASILLAS E., MISITANO D.A., MEADOR J.P.(1995). Growth and survival of three marine invertebrate species in sediments from the hudson-raritan estuary, New-York. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (11):1931-1940.
- RICE, J. E., D. E. COLEMAN, ET AL. (1985). On the metabolism, mutagenicity, and tumor-initiating activity of indeno(1,2,3-cd)pyrene on mouse skin. *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons: mechanism, methods and metabolism*. M. Cooke and A. J. Dennis. Columbus, O
- RICE, J. E., D. T. COLEMAN, ET AL. (1985). "Identification of mutagenic metabolites of indeno[1,2,3-cd]pyrene formed in vitro with rat liver enzymes." *Cancer Research* 45(11 Pt 1): 5421-5.
- RICE, J. E., M. C. DEFLORIA, ET AL. (1988). "The influence of fluoranthene on the metabolism and DNA binding of benzo[a]pyrene in vivo in mouse skin." *Chemico Biological Interactions* 68(1-2): 127-36.
- RICE, J. E., T. J. HOSTED, JR., ET AL. (1984). "Fluoranthene and pyrene enhance benzo[a]pyrene--DNA adduct formation in vivo in mouse skin." *Cancer Letters* 24(3): 327-33.
- RICE, J. E., T. J. HOSTED, JR., ET AL. (1986). "Tumor -initiating activity of major in vivo metabolites of indeno (1,2,3-cd)pyrene on mouse skin." *Carcinogenesis* 7(10): 1761-4.
- RIEGEL, B., W. B. WATMAN, ET AL. (1951). "Delay of methylcholanthrene skin carcinogenesis in mice by 1,2,5, 6-dibenzofluorene." *Cancer Research* 11: 301-303.
- ROBERTS M.H., HARGIS W.J., STROBEL C.J., DE LISLE P.F.(1989). Acute toxicity of PAH contaminated sediments to the estuarine fish, *leostomus xanthurus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42 (1):142-149.
- ROE, F. J. C. (1962). "Effect of phenanthrene on tumor-iniation by 3,4-benzopyrene." *British Journal Of Cancer* 16: 503-506.
- ROE, F. J. C. AND G. A. GRANT (1964). "Tests of pyrene and phenanthrene for incomplete carcinogenic and anticarcinogenic activity." *Br. Emp. Cancer Campaign* 41: 59-69.
- ROMEO M., COSSON R.P., GNASSIA-BARELLI M., RISSO C., STIEN X., LAFAURIE M.(1997). Metallothionein Determination in the Liver of the Sea Bass *Dicentrarchus labrax* Treated with Copper and B(a)P. *Marine Environmental Research*, 44 (3):275-284.
- RONCO A.E., SOBRERO M.C., ROSSINI G.B.(1994). Pollution studies in the Rio Santiago Basin, tributary of the Rio de la Plata Estuary : preliminary risk assessment evaluation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 51 (5):657-664.
- ROQUES D.E., OVERTON E.B., HENRY C.B.(1994). Using gas chromatography, mass spectroscopy fingerprint analyses to document process and progress of oil degradation . *Journal of Environment Quality*, 23:851-855.
- ROSENKRANTZ, H. S. AND L. A. POIRIER (1979). "Evaluation of th mutagenicity and DNA modifying activity of carcinogens and non-carcinogens in microbial systems." *Journal Of The National Cancer Institute* 62(4): 873-892.
- ROSENKRANTZ, H. S. AND L. A. POIRIER (1979). "Evaluation of the mutagenicity and DNA modifying activity of carcinogens and non-carcinogens in microbial systems." *Journal Of The National Cancer Institute* 62(4): 873-892.
- ROSTAD C.E., PEREIRA W.E.(1987). Creosote compounds in snails obtained from pensacola bay, florida, near an onshore hazardous-waste site. *Chemosphere*, 16 (10-12):2397-2404.
- ROSZINSKY-KOCHER, G., A. BASLER, ET AL. (1979). "Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons. V. Induction of sister-chromatid exchanges in vivo." *Mutation Research* 66: 65-67.
- SAKAI, M., D. YOSHIDA, ET AL. (1985). "Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and quinones on *Salmonella typhimurium* TA97." *Mutation Research* 156: 61-67.
- SALAMAN, M. H. AND F. J. C. ROE (1956). "Further tests for tumor-initiating activity: N,N-di-(2-chloroethyl)-p-aminophenylbutyric acid (CB1348) as an initiator of skin tumor formation in the mouse." *British Journal Of Cancer* 10(6): 363-378.
- SALAMONE, M. F., J. A. HEDDLE, ET AL. (1979). "The mutagenic activity of thirty polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and oxides in urban airborne particulates." *Environ. Int.* 2: 37-43.
- SANTODONATO J.(1997). Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons : relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*, 34 (4):835-848.

- SAVINO J.F., TANABE L.L.(1989). Sublethal effects of phenanthrene, nicotine, and pinane on *Daphnia pulex*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 42:778-784.
- SCHAEFFER D.J.(1993). Planarians as a model system for *in vivo* tumorigenesis studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 25:1-18.
- SCHAFFNER L.C., DICKHUT R.M., MITRA S., LAY P.W., BROUWER-RIEL C.(1997). Effects of physical chemistry and bioturbation by estuarine macrofauna on the transport of hydrophobic organic contaminants in the benthos. *Environmental Science and Technology*, 31:3
- SCHIEWE M.H., WEBER D.D., MYERS M.S., JACQUES F.J., REICHERT W.L., KRONE C.A., MALINS D.C., MCCAIN B.B., CHAN S.L., VARANASI U.(1991). Induction of foci of cellular alteration and other hepatic lesions in english sole (*parophrys vetulus*) exposed to an ext
- SCHIRMER K., CHAN A.G.J., GREENBERG B.M., DIXON D.G., BOLS N.C.(1997). Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in Vitro*, 11:107-119.
- SCHMAHL, D. (1955). "Examination of the carcinogenic action of naphthalene and anthracene in rats." *Z. Krebsforsch* 60: 697-710.
- SCHMELTZ, I., J. TOSK, ET AL. (1978). "Bioassays of naphthalene and alkyl naphthalenes for co-carcinogenic activity. Relation to tobacco carcinogenesis." *Carcinogenesis* 3: 47-60.
- SCHOENY R., CODY T., WARSHAWSKY D., RADIKE M.(1988). Metabolism of mutagenic polycyclic aromatic hydrocarbons by photosynthetic algal species. *Mutation Research*, 197:289-302.
- SCHUBAUER-BERIGAN M.K., ANKLEY G.T.(1991). The contribution of ammonia, metals and nonpolar organic compounds to the toxicity of sediment interstitial water from an illinois river tributary. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10 (7):925-939.
- SCRIBNER, J. D. (1973). "Brief communication: tumor initiation by apparently noncarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons." *Journal Of The National Cancer Institute* 50: 1717-1719.
- SEELEY K.R., WEEKS-PERKINS B.A.(1997). Suppression of natural cytotoxic cell and macrophage phagocytic function in oyster toadfish exposed to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *Fish & Shellfish Immunology*, 7 :115-121.
- SEIXAS, G. M., B. N. ADON, ET AL. (1982). "The aza-arene as mutagens for *Salmonella typhimurium*." *Mutation Research* 102: 201-212.
- SEUBERT J.M., KENNEDY C.J.(1997). The toxicokinetics of benzo(a)pyrene in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. *Fish Physiology and Biochemistry*, 16:437-447.
- SHEAR, M. J. (1938). "Studies in carcinogenesis. V. Methyl derivatives of 1,2-benzanthracene." *American Journal Of Cancer* 33(4): 499-537.
- SHEAR, M. J. and J. LEITER (1941). "Studies in carcinogenesis. XVI. Production of subcutaneous tumors in mice by miscellaneous polycyclic compounds." *Journal Of The National Cancer Institute* 2: 241-258.
- SHUGART L., MC CARTHY J., JIMENEZ B., DANIELS J.(1987). Analysis of adduct formation in the bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) between benzo(a)pyrene and DNA of the liver and hemoglobin of the erythrocyte. *Aquatic Toxicology*, 9 (6):319-325.
- SHUGART L.R.(1988). Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. *Aquatic Toxicology*, 13 (1):43-52.
- SIKKA H.C., RUTKOWSKI J.P., KANDASWAMI C.(1990). Comparative metabolism of benzo(a)pyrene by liver microsomes from brown bullhead and carp. *Aquatic Toxicology*, 16 (2):101-112.
- SIKKA H.C., RUTKOWSKI J.P., KANDASWAMI C., KUMAR S., EARLEY K., GUPTA R.C.(1990). Formation and persistence of DNA adducts in the liver of brown bullheads exposed to benzo(a)pyrene. *Cancer Letters*, 49:81-87.
- SIKKA H.C., STEWARD A.R., KANDASWAMI C., RUTKOWSKI J.P., ZALESKI J., KUMAR S., EARLEY K., GUPTA R.C.(1991). Metabolism of benzo(a)pyrene and persistence of DNA adducts in the brown bullhead (*Ictalurus nebulosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1
- SIMMON, V. F. (1979). "In vitro assays of recombinogenic activity of chemical carcinogens and related compounds with *saccharomyces cerevisiae* D3." *Journal Of The National Cancer Institute* 62(4): 901-909.

- SIMMON, V. F. (1979). "In vitro mutagenicity assays of chemical carcinogens and related compounds with salmonella typhimurium." *Journal Of The National Cancer Institute* 62(4): 893-899.
- SINA, J., C. BEAN, ET AL. (1983). "Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential." *Mutation Research* 113: 357-391.
- SINA, J., C. BEAN, ET AL. (1983). "Evaluation of the alkaline elution/rat hepatocyte assay as a predictor of carcinogenic/mutagenic potential." *Mutation Research* 113: 357-391.
- AMIN, S., HUSSAIN, N., BALANIKAS, G., HUIE, K. AND HECHT, S.S. (1985). *Mutageni*
- SLAGA, T. J., G. L. GLEASON, ET AL. (1980). "Comparison of the skin tumor-initiative of dihydrodiols and diol-epoxides by various polycyclic aromatic hydrocarbons." *Cancer Research* 40: 1981-1984.
- SLAGA, T. J., J. K. HUBERMAN, ET AL. (1978). "Carcinogenicity and mutagenicity of benzo(a)anthracene diols and diol-epoxides." *Cancer Research* 38: 1699-1704.
- SLEIDERINK H.M., BEYER J., EVERAATS J.M., BOON J.P.(1995). Influence of temperature on cytochrome P450 1A in dab (*Limanda limanda*) from the Southern North Sea : results from field surveys and a laboratory study. *Marine Environmental Research*, 39:67-71.
- SLOOFF W., JANUS J.A. , MATTHIJSSEN G.K., MONTIZAAN G.K., ROS J.P.M.(1989). Integrated criteria document PAHs. Effect of 10 selected compounds.. RIVM, report n0 758474011..
- SMITH I.R., KIRBY G.M., FERGUSON H.W., HAYES M.A.(1993). Benzo(a)pyrene metabolism and excretion in white suckers with chronic liver diseases. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12:897-901.
- SMITH I.R., PORTT C.B., ROKOSH D.A.(1991). Hepatic mixed function oxidases induced in populations of white sucker, *Catostomus commerson*, from areas of lake superior and the St. Marys River. *Journal Great Lakes Resource*, 17(3):382-393.
- SNELL, K. C. AND H. L. STEWART (1962). "Pulmonary adenomatosis induced in DBA/2 mice by oral administration of dibenz(a,h)anthracene." *Journal Of The National Cancer Institute* 28(5): 1043-1049.
- SNELL, K. C. AND H. L. STEWART (1963). "Induction of pulmonary adenomatose in DBA/2 mice by oral administration of dibenz(a,h)anthracene." *Acta Un Int Cancer* 19: 692-694.
- SPIES R.B., RICE D.W., FELTON J.(1988). Effects of organic contaminants on reproduction of the starry flounder *platichthys stellatus* in San Francisco bay : I. hepatic contamination and mixed-function oxidase (MFO) activity during the reproductive season.
- SPIES R.B., STEGEMAN J.J., HINTON D.E., WOODIN B., SMOLOWITZ R., OKIHIRO M., SHEA D.(1996). Biomarkers of hydrocarbon exposure and sublethal effects in embiotocid fishes from a natural petroleum seep in the Santa Barbara Channel. *Aquatic Toxicology*, 34:19
- STANTON, M. F., E. MILLER, ET AL. (1972). "Experimental induction of epidermoid carcinoma in the lungs of rats by cigarette smoke condensate." *Journal Of The National Cancer Institute* 49(3): 867-877.
- STEADMAN B.L., FARAG A.M., BERGMAN H.L.(1991). Exposure-related patterns of biochemical indicators in rainbow trout exposed to No. 2 fuel oil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10:365-374.
- STEIN J.E., COLLIER T.K., REICHERT W.L.(1992). Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects : studies with benthic fish in Puget Sound, Washington. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11:701-714.
- STEIN J.E., HOM T., COLLIER T.K., BROWN D.W., VARANASI U.(1995). Contaminant exposure and biochemical effects in outmigrant juvenile chinook salmon from urban and nonurban estuaries of puget sound, Washington. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (6
- STEIN J.E., REICHERT W.L., FRENCH B., VARANASI U.(1993). 32P-postlabeling analysis of DNA adduct formation and persistence in english sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to benzo(a)pyrene and 7h-dibenzo(c,g)carbazole. *Chem.-Biol. Interactions*, 88:55-69.
- STEIN J.E., REICHERT W.L., NISHIMOTO M., VARANASI U.(1990). Overview of studies on liver carcinogenesis in english sole from puget sound ; evidence for a xenobiotic chemical etiology II : biochemical studies . *The Science of the Total Environment*, 94:51-6
- STEINER, P. E. (1955). "Carcinogenicity of multiple chemicals simultaneously administered." *Cancer Research* 15: 632-635.

- STEINER, P. E. AND H. L. FALK (1951). "Summation and inhibition effects of weak and strong carcinogenic hydrocarbons: 1,2-benzanthracene, chrysene, dibenzanthracene and 20-methylcholanthrene." *Cancer Research* 11: 56-63.
- STEINER, P. E. AND J. H. EDGEComb (1952). "Carcinogenicity of 1,2-benzanthracene." *Cancer Research* 12: 657-659.
- STEWART A.R., KANDASWAMI C., CHIDAMBARAM S., ZIPER C., RUTKOWSKI J.P., SIKKA H.C.(1990). Disposition and metabolic fate of benzo(a)pyrene in the common carp. *Aquatic toxicology*, 20 :205-218.
- STEWART K.M., THOMPSON R.S.(1995). Fluoranthene as a model toxicant in sediment studies with *Chironomus riparius*. *Journal of Aquatic Ecosystem Health*, 4:231-238.
- STIEN X., RISSO C., GNASSIA-BARELLI M., ROMEO M., LAFAURIE M.(1997). Effect of copper chloride in vitro and in vivo on the hepatic erod activity in the fish *Dicentrarchus labrax*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (2):214-219.
- STOCKER, K. J., W. R. HOWARD, ET AL. (1996). "Assessment of the potential in vivo genotoxicity of fluoranthene." *Mutagenesis* 11(5): 493-6.
- SUEDEL B.C., RODGERS J.H.(1996). Toxicity of fluoranthene to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, and *Stylaria lacustris* in water-only and whole sediment exposures . *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 57:132-138.
- SUEDEL B.C., RODGERS J.H.J., CLIFFORD P.A.(1993). Bioavailability of fluoranthene in freshwater sediment toxicity tests . *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12:155-165.
- SUNTZEFF, V., A. B. CRONINGER, ET AL. (1957). "Use of sebaceous-gland test of primary cigarette-tar fractions and of certain noncarcinogenic polycyclic hydrocarbons." *Cancer* 10(2): 250-254.
- SVED D.W., ROBERTS M.H.(1995). A novel use for the continuous-flow serial diluter : aquatic toxicity testing of contaminated sediments in suspension. *Water Research*, 29 (4):1169-1177.
- SWARTZ R.C. (1999) Consensus sediment quality guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons mixtures - *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18, 780-787
- SWARTZ R.C., FERRARO P., LAMBERSON J.O., COLE F.A., OZRETICH R.J., BOESE B.L., SCHULTS D.W., BEHRENFELD M., ANKLEY G.T.(1997). Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in marine sediment. *Environmental Toxicology*
- SWARTZ R.C., KEMP P.F., SCHULTS D.W., DITSWORTH G.R., OZRETICH R.J.(1989). Acute toxicity of sediment from eagle harbor, washington, to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8 (3):215-222.
- SWARTZ R.C., SCHULTS D.W., DEWITT T.H., DITSWORTH G.R., LAMBERSON J.O.(1990). Toxicity of fluoranthene in sediment to marine amphipods : a test of the equilibrium partitioning approach to sediment quality criteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*,
- SWARTZ R.C., SCHULTS D.W., OZRETICH R.J., LAMBERSON J.O., COLE F.A., DEWITT T.H., REDMOND M.S., FERRARO S.P.(1995). Σ-PAHs : a model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments. *Environmental Toxicology*
- TABATA M., KOBAYASHI Y., NAKAJIMA A., SUZUKI S.(1990). Evaluation of pollutant toxicity in aquatic environment by assay of enzymes released from lysosomes. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 45 (1):31-38.
- TAY K.L., DOE K.G., WADE S.J.(1992). Sediment bioassessment in halifax harbour. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 11 (11):1567-1581.
- THEODORAKIS C.W., D'SURNEY S.J., BICKHAM J.W., LYNE T.B., BRADLEY B.P., HAWKINS W.E., FARKAS W.L., MCCARTHY J.F., SHUGART L.R.(1992). Sequential expression of biomarkers in bluegill sunfish exposed to contaminated sediment. *Ecotoxicology*, 1:45-73.
- THEODORAKIS C.W., D'SURNEY S.J., SHUGART L.R.(1994). Detection of genotoxic insult as DNA strand breaks in fish blood cells by agarose gel electrophoresis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (7):1023-1031.
- THYSSEN, J., J. ALTHOFF, et al. (1981). "Inhalation studies with benzo [a] pyrene in Syrian golden hamsters." *Journal Of Cancer Research And Clinical Oncology* 66: 575-577.
- THOMAS P.(1988). Reproductive endocrine function in female atlantic croaker exposed to pollutants. *Marine Environmental Research*, 24:179-183.

- TIEHM A.(1994). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*, 60 (1):258-263.
- TOKIWA, H., K. MORETA, ET AL. (1977). "Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants." *Mutation Research* 48: 237-248.
- TOKIWA, H., K. MORITA, ET AL. (1986). "Detection of mutagenic activity in particulate air pollutants." *Mutation Research* 48: 237-248.
- TONG, C., M. F. LASPIA, ET AL. (1981). "The use of adult rat liver cultures in the detection of the genotoxicity of various polycyclic aromatic hydrocarbons." *Environmental Mutagenesis* 3(477-487).
- TONG, C., S. V. BRAT, ET AL. (1981). "Sister-chromatid exchange induction by polycyclic aromatic hydrocarbons in a intact cell system of adult rat-liver epithelial cells." *Mutation Research* 91: 467-473.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1990). Drinking water criteria document for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Prepared by the office of health and environmental assessment. Cincinnati, OH, US-EPA.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1991). Drinking water criteria document for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Prepared by the office of health and environmental assessment. Cincinnati, OH, US-EPA.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1993) (Hansen D.J., Berry W.J., Di Toro D.M., Paquin P.R., De Rosa L.D., Stancil F.E. and Zarba C.S.), , Sediment quality criteria for the protection of benthic organisms : Acenaphthene. rapport 90 pages. EPA/822/R-93/013
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1993). Sediment quality criteria for the protection of benthic organisms : Fluoranthene. EPA-822-R-93-012.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1993). Sediment quality criteria for the protection of benthic organisms : Phenanthrene. EPA-822-R-93-014.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994). U.S. Environmental Protection Agency's Integrated Risk Information System (IRIS), Natinal Library of Medecine's TOXNET system US-EPA (1980). Ambient water quality criteria document : acenaphthene., US-EPA.
- VALENCIA, R. AND K. HOUTCHENS (1981). Mutagenic activity of 10coded compounds in the Drosophila sex-linked recessive lethal test;In: Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens.Report of the International Collaborative Program.
- VAN DER OOST R., GOKSOYR A., CELANDER M., HEIDA H., VERMEULEN N.P.E.(1996). Biomonitoring of aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). II. Biomarkers: pollution-induced biochemical responses. *Aquatic Toxicology*, 36:189-222.
- VAN DER OOST R., HEIDA H., OPPERHUIZEN A., VERMEULEN N.P.E.(1991). Interrelationships between bioaccumulation of organic trace pollutants (PCBs, organochlorine pesticides and PAHs), and MFO-induction in fish. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 100C
- VAN DER OOST R., VAN GASTEL L., WORST D., HANRAADS M., SATUMALAY K., VAN SCHOOTEN F., HEIDA H., VERMEULEN N.P.E., (1994). Biochemical markers in feral roach (*rutilus rutilus*) in relation to the bioaccumulation of organic trace pollutants. *Chemosphere*, 29
- VAN DER OOST R., VINDIMIAN E., VAN DEN BRINK P.J., SATUMALAY K., HEIDA H., VERMEULEN N.P.E.(1997). Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationship between contaminant exposure and biomarkers. A
- VAN DER WEIDEN M.E.J., HANEGRAAF F.H.M., EGGENS M.L.(1994). Temporal induction of cytochrome P450 1A in the mirror carp (*Cyprinus carpio*) after administration of several polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 13 (5):13 (
- VAN DUUREN, B. L. AND B. M. GOLDSCHMIDT (1976). "cocarcinogenic and tumor promoting agents in tobacco carcinogenesis." *Journal Of The National Cancer Institute* 56(6): 1237-1242.
- Van Duuren, B. L. and B. M. Goldschmidt (1976). "Cocarcinogenic and tumor promoting agents in tobacco carcinogenesis." *Journal Of The National Cancer Institute* 56(6): 1237-1242.
- VAN DUUREN, B. L., C. KATZ, ET AL. (1973). "Brief communication: cocarcinogenic agents in tobacco carcinogenesis." *Journal Of The National Cancer Institute* 51(2): 703-705.
- VAN DUUREN, B.L., A. S., A. S., ORRIS, L. AND LANGSETH, L. (1966). The tumor promoting agents of tobacco leaf and tobacco smoke condensate. *Journal Of The National Cancer Institute* 37(4): 519-526.

- VAN LEEUWEN C.J., VAN DER ZANDT P.T.J., ALDENBERG T., VERHAAR H.J., HERMENS J.L.M. (1992) Application of QSARs, extrapolation and equilibrium partitioning in aquatic effects assessment. I. Narcotic industrial pollutants. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 11, 2
- VAN STRAALLEN N.M., VERWEIJ R.A.(1991). Effects of benzo(a)pyrene on food assimilation and growth efficiency in porcellio scaber (isopoda). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46:134-140.
- VAN VELD P.A., STEGEMAN J.J., WOODIN B.R., PATTON J.S., LEE R F.(1988). Induction of monooxygenase activity in the intestine of spot (*Leiostomus xanthurus*), a marine teleost, by dietary polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug Metabolism and Disposition*, 16
- VAN VELD P.A., VETTER R.D., LEE R.F., PATTON J.S. (1987) Dietary fat inhibits the intestinal metabolism of the carcinogen benzo(a)pyren in fish. *Journal of Lipid Research*, 28 : 810-817.
- VAN VELD P.A., VOGELBEIN W.K., COCHRAN M.K., GOKSOYR A., STEGEMAN J.J.(1997). Route-specific cellular expression of cytochrome P4501A (CYP1A) in fish (*Fundulus heteroclitus*) following exposure to aqueous and dietary benzo(a)pyrene. *Toxicology and Applied*
- VAN VELD P.A., VOGELBEIN W.K., SMOLOWITZ R., WOODIN B.R., STEGEMAN J.J.(1992). Cytochrome P450IA1 in hepatic lesions of a teleost fish (*Fundulus heteroclitus*) collected from a polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated site. *Carcinogenesis*, 3 (3):505-507.
- VANDERMEULEN J.H., MOSSMAN D.(1996). Sources of variability in seasonal hepatic microsomal oxygenase activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from a coal tar contaminated estuary. *Canadian Journal Fish Aquatic Science*, 53:1741-1753.
- VARANASI U., GMUR D.J.(1981). Hydrocarbons and metabolites in english sole (*Parophrys vetulus*) exposed simultaneously to [<sup>3</sup>H]benzo[a]pyrene and [<sup>14</sup>C]naphthalene in oil-contaminated sediment. *Aquatic Toxicology*, 1:49-67.
- VARANASI U., REICHERT W.L., STEIN J.E.(1989). <sup>32</sup>P-postlabeling analysis of DNA adducts in liver of wild english sole (*Parophrys vetulus*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Cancer Research*, 49:1171-1177.
- VARANASI U., STEIN J.E., HOM T.(1981). Covalent binding of benzo(a)pyrene to DNA in fish liver. *Biochemical and Biophysical Research Communications*:780-787.
- VEGA M.M., FERNANDEZ C., BLAZQUEZ T., TARAZONA J.V., CASTANO A.(1996). Biological and chemical tools in the toxicological risk assessment of jarama river, Madrid, Spain. *Environmental Pollution*, 93 (2):135-139.
- VENIER P., CANOVA S.(1996). Formation of DNA adducts in the gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* treated with benzo[a]pyrene. *Aquatic Toxicology*, 34 (2):119-133.
- VENIER P., MARON S., CANOVA S.(1997). Detection of micronuclei in gill cells and haemocytes of mussels exposed to benzo(a)pyrene. *Mutation Research*, 390:33-44.
- VERBURGH J.J., HANSEN B.G., KARCHER W.(1996). Clustering of environmental risks of PAH. *Fresenius Environmental Bulletin*, 5:505-510.
- VIARENGO A., MOORE M.N., MANCINELLI G., MAZZUCOTELLI A., PIPE R.K., FARRAR S.V.(1987). Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels : the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Marine Biology*,
- VIGANO L., ARILLO A., MELODIA F., ARLATI P., MONTI C.(1998). Biomarker responses in cyprinds of the middle stretch of the river Po, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (3):404-411.
- VIGNIER V., VANDERMEULEN J.H., SINGH J., MOSSMAN D.(1994). Interannual mixed function oxidase (MFO) activity in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from a coal tar contaminated estuary. *Canadian Journal Fish Aquatic Science*, 51:1368-1375.
- VRZOC M., PETRAS M.L.(1997). Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutation Research*, 381:31-40.
- VYAS, K. P., W. LEVIN, ET AL. (1982). "Stereoselective metabolism of the (+) - and (-) -enantiomers of trans-1,2-dihydroxy-1,2-dihydrochrysene to bay-region 1,2-diol-3,4-epoxide diastereomers by rat liver enzymes." *Molecular Pharmacology* 22: 182-189.
- WAITHE, W. I., M. MICHAUD, ET AL. (1991). "The Ah receptor, cytochrome P450IA1 mRNA induction, and aryl hydrocarbon hydroxylase in a human lymphoblastoid cell line." *Biochemical Pharmacology* 41(1): 85-92.

- WALCZAK B.Z., BLUNT B.R., HODSON P.V.(1987). Phagocytic function of monocytes and haematological changes in rainbow trout injected intraperitoneally with benzo(a)-pyrene (B(a)P) and benzo(a)anthracene (B(a)A). *Journal of Fish Biology*, 31 (supplement A):25
- WALKER S.E., TAYLOR D.H., ORIS J.T.(1998). Behavioral and histopathological effects of fluoranthene on bullfrog larvae (*Rana catesbeiana*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (4):734-739.
- WANG R., O'LAUGHLIN W.J.(1992). Determination of DNA-Benzo(a)pyrene adducts by high-performance liquid chromatography with laser-induced fluorescence detection. *Environmental Science and Technology*, 26:2294-2297.
- WANG Z., FINGAS M., SERGY G.(1995). Chemical characterization of crude oil residues from an Arctic Beach by GC, MS and GC, FID. *Environmental Science and Technology*, 29 (10):2622-2631.
- WANG, J. S. AND W. F. BUSBY, JR. (1993). "Induction of lung and liver tumors by fluoranthene in a preweanling CD-1 mouse bioassay." *Carcinogenesis* 14(9): 1871-4.
- WANG, J. S., W. F. BUSBY, ET AL. (1995). "Tissue distribution of DNA adducts in pre-weanling BLU:Ha mice treated with a tumorigenic dose of fluoranthene." *Cancer Letters* 92(1): 9-19.
- WANG, J. S., W. F. BUSBY, JR., ET AL. (1995). "Formation and persistence of DNA adducts in organs of CD-1 mice treated with a tumorigenic dose of fluoranthene." *Carcinogenesis* 16(11): 2609-16.
- WATSON D.E., GIULIO R.T.D.(1997). Hepatic CYP1A in brown bullhead catalyzes the binding of 2-aminoanthracene to DNA in vivo and in vitro. *Aquatic Toxicology*, 37:21-36.
- WATZIN M.C., MCINTOSH A.W., BROWN E.A., LACEY R., LESTER D.C., NEWBROUGH K.L., WILLIAMS A.R.(1997). Assessing sediment quality in heterogeneous environments : a case study of a small urban harbor in lake Champlain, Vermont, USA. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(10): 2037-2047.
- WEBB O.F., PHELP T.J., BIENKOWSKI P.R., DIGRAZIA P.M., REED G.D., APPLGATE B., WHITE D.C., SAYLER G.S.(1991). Development of a differential volume reactor system for soil biodegradation studies . *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 28-29:5-19.
- WEIL C.S.(1972). Statistics vs safety factors and scientific judgment in the evaluation of safety for man. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 21:454-463.
- WEINSTEIN J.E., ORIS J.T., TAYLOR D.H.(1997). An Ultrastructural examination of the mode of UV-induced toxic action of fluoranthene in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. *Aquatic Toxicology*, 39 (1):1-22.
- WERNERSSON A.S., DAVE G. (1997) Phototoxicity identification by solid phase extraction and photoinduced toxicity to daphnia magna. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 32 : 268-273.
- WEST W.R., SMITH P.A., BOOTH G.M., LEE M.L.(1988). Isolation and Detection of genotoxic components in a black river sediment. *Environmental Science and Technology*, 22 (2):224-228.
- WEST W.R., SMITH P.A., BOOTH G.M., WISE S.A., LEE M.L.(1986). Determination of genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbons in a sediment from the black river (Ohio). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 15 :241-249.
- WHITE P.A., RASMUSSEN J.B., BLAISE C.(1998). Genotoxic substances in the St Lawrence system I : industrial genotoxins sorbed to particulate matter in the St Lawrence, St Maurice, and Saguenay rivers , Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (2)
- WHITE P.A., RASMUSSEN J.B., BLAISE C.(1998). Genotoxic substances in the St Lawrence system II : extracts of fish and macroinvertebrates from the St Lawrence and Saguenay rivers, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17 (2):304-316.
- WHONG, W. Z., J. D. STEWART, ET AL. (1994). "Induction of in vivo DNA adducts by 4 industrial by-products in the rat-lung-cell system." *Mutation Research* 312(2): 165-72.
- WILDI E., NAGEL R., STEINBERG C.E.W.(1994). Effects of pH on the bioconcentration of pyrene in the larval midge, *Chironomus riparius* . *Water Research*, 28(12):2553-2559.
- WILLIAMS C.D., FAISAL M., HUGGETT R.J.(1992). Polynuclear aromatic hydrocarbons and fish lens cataract : effects of benzo[a]pyrene 7,8 dihydrodiol on the macromolecular synthesis of cultured eye cells. *Marine Environmental Research*, 34:333-337.
- WILLIAMS, G. M. (1977). "Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cultures." *Cancer Research* 37(37).

- WILLIAMS, G., H. MORI, ET AL. (1989). "Structure activity relationships in the rat hepatocyte DNA-repair test for 300 chemicals." *Mutation Research* 221: 263-286.
- WILSON, R. H., F. DEEDS, ET AL. (1947). "The carcinogenic activity of 2-acetaminofluorene. IV. Action of related compounds." *Cancer Research* 7: 453-458.
- Basler, A., B. Herbold, et al. (1977). "Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons. II. Monitoring genetic
- WIRGIN I.I., KREAMER G.L., GRUNWALD C., SQUIBB K., GARTE S.J.(1992). Effects of prior exposure history P4501A mRNA induction by PCB congener 77 in Atlantic tomcod. *Marine Environmental Research*, 34:103-108.
- WISLOCKI, P. G., E. S. BAGAN, ET AL. (1986). "Tumorigenicity of nitrated derivatives of pyrene, benz[a]anthracene, chrysene and benzo[a]pyrene in the newborn mouse assay." *Carcinogenesis* 7(8): 1317-1322.
- WISLOCKI, P. G., E. S. BAGAN, ET AL. (1986). "Tumorigenicity of nitrated derivatives of pyrene, benz[a]anthracene, chrysene and benzo[a]pyrene in the newborn mouse assay." *Carcinogenesis* 7(8): 1317-1322.
- WOLKERS J., JORGENSEN E.H., NIJMEIJER S.M., WITKAMP R.F.(1996). Time-dependent induction of two distinct hepatic cytochrome P4501A catalytic activities at low temperatures in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) after oral exposure to benzo(a)pyrene. *Aquatic*
- WOOD L.W., O'KEEFE P., BUSH B.(1997). Similarity analysis of PAH and PCB bioaccumulation patterns in sediment-exposed chironomus tentans larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16 (2):283-292.
- WOOD, A. W., R. L. CHANG, ET AL. (1979). "Mutagenicity and tumorigenicity of phenanthrene and chrysene epoxides and diol epoxides." *Cancer Research* 39: 4069-4077.
- WOOD, A. W., W. LEVIN, ET AL. (1977). "High mutagenicity of metabolically activated chrysene 1,2-dihydrodiol: Evidence for bay region activation of chrysene." *Biochemical And Biophysical Research Communications* 78(3): 847-854.
- WOOD, A. W., W. LEVIN, ET AL. (1978). "Metabolic activation of dibenzo[a,h]anthracene and its dihydrodiols to bacterial mutagens." *Cancer Research* 38(7): 1967-1973.
- WOOTON A.N., GOLDFARB P.S., LEMAIRE P., O'HARA S.C.M., LIVINGSTONE D.R.(1996). Characterization of the presence and seasonal variation of a CYP1A-Like enzyme in digestive gland of the common mussel, *mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 42 (1-4):
- WRISBERG M.N., RHEMREV R.(1992). Detection of genotoxins in the aquatic environment with the mussel *Mytilus Edulis*. *Water Science and Technology*, 25 (11):317-324.
- WYNDER, E. L. AND D. HOFFMANN (1959). "A study of tobacco carcinogenesis. VII. The role of higher polycyclic hydrocarbons." *Cancer* 12: 1079-1086.
- WYNDER, E.L. AND HOFFMANN, D. (1959). The carcinogenicity of benzofluoranthènes. *Cancer* 12: 1194-1199.
- ZAROOGIAN G., VOYER R.A.(1965). Interactive cytotoxicities of selected organic and inorganic substances to brown cells of *Mercenaria mercenaria*. *Cell Biology and Toxicology*, 11:263-271.
- ZHONG, B. Z., Z. W. GU, ET AL. (1995). "Micronucleus formation induced by three polycyclic aromatic hydrocarbons in rat bone marrow and spleen erythrocytes following intratracheal instillation." *Mutation Research* 326(2): 147-53.

## 5 ANNEXE : SYNTHÈSE DES DONNÉES PAR SUBSTANCE

### 5.1 BENZO(K)FLUORANTHÈNE

#### 5.1.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité détectée sur *Daphnia magna* en dessous du seuil de solubilité de 1,1 µg/L dans le milieu d'essai.

Pas de toxicité détectée sur *Pseudokirchneriella subcapitata* en dessous du seuil de solubilité de 1 µg/L dans le milieu d'essai.

Pas de toxicité détectée sur *Ceriodaphnia dubia* en dessous du seuil de solubilité de 1,1 µg/L

Effet mutagène obtenu sur *Salmonella typhimurium* à 0,74 mg/L sur les deux souches TA 98 et TA 100.

#### 5.1.2 Données bibliographiques

##### 5.1.2.1 Données d'écotoxicité

La toxicité de cette substance présente la particularité de ne pas être correctement estimée par l'utilisation de relations structure activité (substance non narcotique) (Van Leuween 1992).

Aucune donnée de toxicité sur l'eau n'a pu être trouvée dans la littérature sur ce composé.

Phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 7.4eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
sédiment	<1,6	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)
	15	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
	18,7	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	2,9	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	59,7	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	65,5	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	10	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)

##### 5.1.2.2 Données de génotoxicité

Le potentiel carcinogène du Benzo(k)Fluoranthène a été initialement testé sur deux souches de souris femelles par application dermique, quelques rares papillomes cutanés ont été mis en évidence pour la dose la plus forte (0,5%) (Wynder and Hoffmann 1959).

Il a été testé dans un système initiation/promotion sur peau de souris, et s'est révélé être actif comme initiateur tumoral. Si une application unique de 11 mg de Benzo(k)Fluoranthène sur 20 souris Swiss, ne conduit à aucune apparition de tumeur au bout de 63 semaines (Van Duuren, A. et al. 1966), les mêmes doses suivies d'une application d'huile de croton conduisent à l'apparition de papillomes (18/20) et de carcinomes (5/20). Lavoie et al. ont confirmé ces résultats en 1982 en montrant une relation dose dépendante entre l'apparition de tumeurs et la quantité de Benzo(k)Fluoranthène appliquée (en utilisant le TPA comme promoteur) (LaVoie, Amin et al. 1982). Ce résultat est lui-même conforté par ceux de Amin et al. qui montrent une induction de tumeur pour le Benzo(k)Fluoranthène et ses principaux métabolites (2-méthyl, 8-méthyl ou 9-méthyl BkF et 7,12-diméthyl BkF) pour une dose totale appliquée de 4  $\mu$ moles ( $\approx 1000\mu\text{g}$ ) (Amin, Hussain et al. 1985).

Dans une expérimentation par injection sous-cutanée chez la souris, il a été constaté une apparition de sarcomes aux sites d'injections. Le Benzo(k)Fluoranthène provoque également une apparition dose-dépendante de tumeurs "squamous-cell carcinomas" du poumon chez le rat après implantation directe dans le tissu pulmonaire (Deutsch-Wenzel, Brune et al. 1983).

L'incidence d'adénomes hépatiques est augmentée chez les souris "nouveau-nés" (CD1) après injection intra-péritonéale (126 $\mu\text{g}$ /animal en moyenne) aux jours 1, 8 et 15 après la naissance mais uniquement chez les mâles (résultat non significatif). Par contre des adénomes pulmonaires ont été reportés aussi bien chez les mâles que chez les femelles (Lavoie, Braley et al. 1987).

Un test de transformation d'une culture de cellules embryonnaires pulmonaires de hamster syrien a été développé et standardisé pour comparer de façon quantitative les effets toxiques et les effets sur la transformation cellulaire de 10 HAP présents dans l'environnement. Le Benzo(k)Fluoranthène conduit, dans ce test, à une augmentation du nombre de colonies pour des doses voisines du  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Emura and et al. 1982).

Les données des tests à court terme ont été jugées insuffisantes pour permettre de conclure (IARC monographs vol 32, Décembre 1983).

Le Benzo(k)Fluoranthène est mutagène sur les souches *Salmonella Typhimurium* TA100 et TA98 après activation métabolique (fraction S<sub>9</sub>) à des concentration de 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (LaVoie, Hecht et al. 1980) et 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (Hermann, Durand et al. 1980) respectivement.

### 5.1.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0.04 $\mu\text{g}/\text{L}$  (RIVM) ; 0,004  $\mu\text{g}/\text{L}$  (WRC 1)

Sédiment : 2,4 mg/Kg (RIVM)

### 5.1.4 Seuils calculés par cette étude

En $\mu\text{g}/\text{L}$ ou $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,003	0,05	0,8	12
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.2 BENZO(A)ANTHRACENE

### 5.2.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité détectée sur *Daphnia magna* en dessous du seuil de solubilité de 9,1 µg/L dans le milieu d'essai.

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* : 1,2 µg/L.

Pas de toxicité détectée sur *Ceriodaphnia dubia* en dessous du seuil de solubilité de 8,7 µg/L dans le milieu d'essai.

Effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 et TA 100 respectivement à partir de 0,07 mg/L et de 0,13 mg/L.

### 5.2.2 Données bibliographiques

#### 5.2.2.1 Données d'écotoxicité

Les données de la bibliographie sont d'un tout autre ordre de grandeur. La valeur de CE50 pour algue est de 46000µg/L alors que la solubilité est de 13µg/L. On trouve également une CE50 de 260µg/L pour *Vibrio fisheri*.

Phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 7.4eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	260	non	microorganisme	Photobacterium phosphoreum	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	3000	non	poisson	Ictalurus nebulosus	toxicité cellulaire (6 jours)	LOEC	Martin-alguacil et al. (1991)
	3904	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
	46000	non	algue	Selenastrum capricornutum	croissance 72h	50%	Schoeny et al. (1988)
sédiment	8,8	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	56	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	80	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	100	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
	179	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	196	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	<1,9	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)

#### 5.2.2.2 Données de génotoxicité

L'administration de Benzo(a)anthracène par voie orale (Klein 1963), en application cutanée, en injection sous cutanée (Steiner and Falk 1951; Steiner and Edgecomb 1952), en injection intra-péritonéale (Wislocki, Bagan et al. 1986), provoque une augmentation de l'incidence des tumeurs.

Un groupe de souris B6AF1/J mâles a été exposé par voie orale trois fois par semaine pendant 5 semaines (dose totale de 225 mg/souris ou 500 mg/kg/j) (Klein 1963). Bien qu'aucune analyse statistique n'ait été reportée, on note une augmentation de l'incidence des adénomes pulmonaires et des hépatomes pour les deux durées d'observation (440 et 547 jours).

Une étude par injection intra-péritonéale chez la souris (CD-1, Amin et al. 1985)

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	5250	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
sédiment	0,6	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	1,5	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)
sédiment	4,1	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	5,5	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
	13	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	14,3	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)

### 5.3.2.2 Données de génotoxicité

Le Benzo(b)fluoranthène a été déclaré comme cancérigène chez l'animal de laboratoire (1973; Anonymous 1983). Il provoque l'apparition de tumeurs après mise en place d'implants pulmonaires chez le rat (Deutsch-Wenzel, Brune et al. 1983). Par injection intra-péritonéale chez la souris CD-1, le Benzo(b)fluoranthène (126µg/souris) provoque chez les mâles une augmentation significative de l'incidence des adénomes hépatiques et des hépatomes (Lavoie, Braley et al. 1987). En injection sous cutanée chez la souris, il provoque l'apparition de sarcomes aux sites d'injections (Lacassagne, Buu-Hoi et al. 1963). Le Benzo(b)fluoranthène s'est révélé être positif dans les tests sur peau comme cancérigène complet et comme initiateur tumoral sur les souris swiss (Wynder and Hoffmann 1959). Ces résultats ont été confirmés par les études de Lavoie ((LaVoie, Amin et al. 1982) et Amin (Amin, Huie et al. 1985; Amin, Hussain et al. 1985).

Des résultats positifs ont été reportés pour le test de mutation reverse sur *Salmonella Typhimurium* TA98. Par contre des résultats positifs et négatifs ont été observés sur la souche TA100 (LaVoie, Bedenko et al. 1979; Hermann 1981; Amin, Huie et al. 1985; Amin, Hussain et al. 1985)

### 5.3.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0,004 µg/L (WRC 1)

### 5.3.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,001	0,02	0,3	5,3
Sédiment	50	500	7500	110 000

Pas de toxicité détectée sur *Pseudokirchneriella subcapitata* en dessous du seuil de solubilité de 0,16 µg/L dans le milieu d'essai.

CE<sub>10</sub> *Ceriodaphnia dubia* de 0,08 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 en dessous de 2,8 mg/L, en revanche effet mutagène sur la souche TA 100 à 0,35 mg/L.

## 5.4.2 Données bibliographiques

### 5.4.2.1 Données d'écotoxicité

Pas de données sur les effets écotoxicologiques

Phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 7.4eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	1000	non	poisson	<i>Ictalurus nebulosus</i>	toxicité cellulaire (6 jours)	LOEC	Martin-alguacil et al. (1991)
	5000	non	poisson	<i>Ictalurus nebulosus</i>	toxicité cellulaire (6 jours)	50%	Martin-alguacil et al. (1991)
	5000	non	poisson	<i>Ictalurus nebulosus</i>	toxicité cellulaire (6 jours)	LOEC	Martin-alguacil et al. (1991)
	20000	non	poisson	<i>Ictalurus nebulosus</i>	toxicité cellulaire (6 jours)	50%	Martin-alguacil et al. (1991)
sédiment	2,9	oui	poisson	<i>Leiostomus xanthurus</i>	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	18,7	oui	poisson	<i>Leiostomus xanthurus</i>	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	30	oui	invertébré	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	52	oui	poisson	<i>Pleuronectes vetulus</i>	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
	59,7	oui	poisson	<i>Leiostomus xanthurus</i>	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	65,5	oui	poisson	<i>Leiostomus xanthurus</i>	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	<1,7	oui	poisson	<i>Pleuronectes vetulus</i>	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)

### 5.4.2.2 Données de génotoxicité

L'ensemble des données de cancérogenèse expérimentale a été jugé 'inadéquate' et, en l'absence de données chez l'homme, le benzo(ghi)pérylène a été classé D (non carcinogène chez l'homme).

Le benzo(ghi)pérylène en implant pulmonaire augmente les tumeurs (Deutsch-Wenzel, Brune et al. 1983). Dans les tests sur peau de souris, il s'est révélé être négatif aussi bien comme carcinogène complet que comme initiateur tumoral (Wynder and Hoffmann 1959; Van Duuren, Katz et al. 1973; IARC 1983). En injection sous cutanée, il n'induit pas la formation de tumeur (Müller 1968). Chez la souris, la capacité du benzo(ghi)pérylène à se comporter comme un co-carcinogène en présence de benzo(a)pyrène a été démontrée (Van Duuren, Katz et al. 1973; Van Duuren and Goldschmidt 1976)

Le benzo(ghi)pérylène a produit des résultats positifs sur différentes souches de *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100 et TM677) Avec activation métabolique, il est positif à 20 µg/boîte sur la souche TA100, dans une gamme de 0,1 à 1000 µg/boîte pour la souche TA98 et à 72 nmole/ml sur la souche TM677 (Andrews, Thibaud et al. 1978; Kaden, Hites

et al. 1979; Mossanda, Poncelet et al. 1979; Salamone, Heddle et al. 1979; Sakai, Yoshida et al. 1985). Un test d'altération de l'ADN sur cellules d'ovaire de hamster chinois a également conduit à des résultats positifs (Garrett and Lewtas 1983). Par contre, il est négatif sur une étude de transformation cellulaire sur cellules embryonnaires de hamster (Quarles, Sega et al. 1979).

Ces données ont été jugées insuffisantes pour conclure à l'activité mutagène du benzo(ghi)pérylène (IARC 1983)

Plus récemment, il a été démontré que le benzo(ghi)pérylène était capable de se lier de façon covalente à l'ADN aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Hughes and Phillips 1993). Cette capacité de liaison dans un système sur peau de souris permettrait de lui prédire au minimum des propriétés d'initiateur tumoral modéré.

### 5.4.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0.03µg/L (RIVM) ; 0,004 µg/L (WRC 1)

Sédiment : 7.5 mg/Kg (RIVM)

### 5.4.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,003	0,04	0,6	9,3
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.5 BENZO(A)PYRENE

### 5.5.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité détectée sur *Daphnia magna* en dessous du seuil de solubilité de 2,7 µg/L dans le milieu d'essai.

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* : 0,78 µg/L dans le milieu d'essai.

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 0,5 µg/L

Effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 à 1,8 mg/L et TA 100 à 0,14 mg/L.

### 5.5.2 Données bibliographiques

#### 5.5.2.1 Données d'écotoxicité

CL<sub>50</sub> 24h sur *Daphnia magna* de 40µg/L

CE<sub>50</sub> 72h sur *Pseudokirchneriella subcapitata* de 20µg/L.

Phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 6.8eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	0,5	non	invertébré	Crassostrea gigas	micronoyau sur cellule cardiaque	LOEC	Burgeot et al. (1995)

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicon- tamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
					(48h ou 96h)		
	2	non	poisson	<i>Oryzias latipes</i>	néoplasmes (52 semaines)	NOEC	Hawkins et al. (1990)
	5	non	invertébré	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	adduits ADN (48 et 72h)	NOEC	Venier et Canova (1996)
	5	non	invertébré	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	micronoyau cellules branchiales (48h)	NOEC	Venier et al. (1997)
	10	non	poisson	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	émergence des embryons	LOEC	Ostrander et al. (1988)
	10	non	poisson	<i>Fundulus heteroclitus</i>	cytochrome P450 1A (4 jours)	LOEC	Van Veld et al. (1997)
	20	non	poisson	<i>Poecilia reticulata</i>	néoplasmes (52 semaines)	NOEC	Hawkins et al. (1990)
	25	non	algue	<i>Selenastrum capricornutum</i>	croissance 72h	50%	Schoeny et al. (1988)
	25	non	poisson	<i>Oncorhynchus kisutch</i>	effet sur nombre de jours pour éclosion	LOEC	Ostrander et al. (1988)
	25	non	poisson	<i>Scophthalmus maximus</i>	EROD (24h)	LOEC (induction 2,5)	Peters et al. (1997)
	25	non	poisson	<i>Scophthalmus maximus</i>	adduits ADN (16h)	LOEC (induction 6)	Peters et al. (1997)
	29	non	poisson	<i>Oryzias latipes</i>	néoplasmes (52 semaines)	18%	Hawkins et al. (1990)
	40	non	invertébré	<i>Daphnia magna</i>	survie 24 heures	50%	Wernersson et Dave (1997)
	50	non	invertébré	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	adduits ADN (48 et 72h)	LOEC	Venier et Canova (1996)
	50	non	invertébré	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	micronoyau cellules branchiales (48h)	LOEC	Venier et al. (1997)
eau	76	non	poisson	<i>Anguilla anguilla</i>	anormalité de noyaux d'érythrocytes (larves 3 jours)	NOEC	Pacheco et Santos (1997)
	209	non	poisson	<i>Poecilia reticulata</i>	néoplasmes (52 semaines)	23%	Hawkins et al. (1990)
	227	non	poisson	<i>Anguilla anguilla</i>	EROD larves 3 jours	NOEC	Pacheco et Santos (1997)
	227	non	poisson	<i>Anguilla anguilla</i>	anormalité de noyaux d'érythrocytes (larves 3 jours)	LOEC	Pacheco et Santos (1997)
	261	non	poisson	<i>Oryzias latipes</i>	néoplasmes (52 semaines)	40%	Hawkins et al. (1990)
	400	non	bactérie	<i>Salmonella typhimurium</i>	mutagenécité	50%	Schoeny et al. (1988)
	681	non	poisson	<i>Anguilla anguilla</i>	EROD larves 3 jours	LOEC	Pacheco et Santos (1997)
	969	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
	1250	non	poisson	<i>Poeciliopsis lucida</i>	survie 24h	NOEC	Goddard et al. (1987)
	3000	non	poisson	<i>Ictalurus nebulosus</i>	toxicité cellulaire (6 jours)	LOEC	Martin-alguacil et al. (1991)
	3750	non	poisson	<i>Poeciliopsis lucida</i>	survie 24h	LOEC	Goddard et al. (1987)
	4000	non	plante	<i>Lemna gibba</i>	croissance	50%	Huang et al. (1993)
	8110	non	microorganisme	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	10000	non	poisson	<i>Ictalurus nebulosus</i>	toxicité cellulaire (6 jours)	50%	Martin-alguacil et al. (1991)
	46174	non	poisson	<i>Pimephales promelas</i>	cellules épithéliales (in vitro)	50%	Babich et Borenfreund (1987)
	92097	non	poisson	Bluegill sunfish	cellules épithéliales (in vitro)	50%	Babich et Borenfreund (1987)

Compartiment	Concentration ( $\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/kg}$ )	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
	>10000	non	plante	Lemna gibba	croissance	LOEC	Huang et al. (1993)
	>8000	non	plante	Lemna gibba	croissance 8 jours	50%	Huang et al. (1995)
sédiment	2,5	oui	poisson	Leiosomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	10	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	15,8	oui	poisson	Leiosomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	24	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
	50,2	oui	poisson	Leiosomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	55,2	oui	poisson	Leiosomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	<1,7	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)

### 5.5.2.2 Données de génotoxicité

Le benzo(a)pyrène a été déclaré cancérigène chez l'animal et a été classé en B2 cancérigène probable chez l'homme (IARC 1983; US-EPA 1994).

Des études expérimentales ont été réalisées par gavage, diète, inhalation, instillation intratrachéale, exposition cutanée et injection sous-cutanée sur différentes souches d'au moins 4 espèces de rongeur et différents primates. L'administration répétée de benzo(a)pyrène a pu être associée à l'augmentation de l'incidence du nombre de tumeurs et des tumeurs au site d'exposition. Des tumeurs systémiques ont également été observées pour différentes voies d'exposition. Le benzo(a)pyrène est fréquemment utilisé comme témoin positif dans les études de cancérogenèse (Brune and Deutch-Wenzel 1981; Thyssen, Althoff et al. 1981; IARC 1983; US-EPA 1991; Knauf and Rice 1992).

Le benzo(a)pyrène est génotoxique sur une grande variété de tests sur procaryotes et eucaryotes (US-EPA 1991).

Sur procaryotes, le B(a)P est positif dans les tests d'altération de l'ADN ainsi que dans les tests de mutations 'forward' et 'reverse'. Sur cellules eucaryotes, le benzo(a)pyrène est positif pour les tests d'altérations de l'ADN, de mutations, d'effets chromosomiques et de transformations cellulaires.

Le benzo(a)pyrène est un cancérigène indirect qui nécessite une activation métabolique en composés électrophiles capables de se lier de façon covalente avec l'ADN (Lutz 1979). Il est largement utilisé comme témoin positif dans les tests de mutagenèse.

### 5.5.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0,05 $\mu\text{g/L}$  (RIVM) ; 0,014  $\mu\text{g/L}$  (Suter) ; 0,005  $\mu\text{g/L}$  (WRC 1)

Sédiment : 2.7 mg/Kg (RIVM)

#### 5.5.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,0003	0,005	0,07	1,1
Sédiment	5	50	750	11 000

### 5.6 DIBENZO(A,H)ANTHRACENE

#### 5.6.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité détectée sur *Daphnia magna* en dessous du seuil de solubilité de 0,35 µg/L dans le milieu d'essai.

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* : 0,14 µg/L.

Pas de toxicité détectée sur *Ceriodaphnia dubia* en dessous du seuil de solubilité (0,03 µg/L dans le milieu d'essai)

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 en dessous de 3,8mg/L mais présence d'effets mutagènes sur *Salmonella typhimurium* souche TA 100 à 0,24mg/L.

#### 5.6.2 Données bibliographiques

##### 5.6.2.1 Données d'écotoxicité

Pas de données d'effet écotoxique sur l'eau

Phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 7.5eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
sédiment	<1,5	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)
	<1,8	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)

##### 5.6.2.2 Données de génotoxicité

Le dibenzo(a,h)anthracène s'est révélé être carcinogène chez l'animal. Par voie orale chez la souris des doses journalières de 0,85 mg/jour (mâles) et 0,76 mg/jour (femelles) provoquent l'apparition d'adénomes pulmonaires (100% des traités) au bout de 279 et 237 jours respectivement (Snell and Stewart 1962; Snell and Stewart 1963). Des carcinomes mammaires ont également été observés pour deux souches de souris femelles après gavage avec du dibenzo(a,h)anthracène (Biancifiiori and Cashera 1962).

Le dibenzo(a,h)anthracène donne des résultats positifs dans les tests sur peau de souris. Les études montrant son activité comme cancérigène complet et comme initiateur tumoral sont synthétisées dans les revues faites par l'IARC et par l'US-EPA (1973; US-EPA 1990).

Par injection sous cutanée unique, il provoque l'apparition de sarcomes aux sites d'injection pour différentes espèces. De plus, il a été montré pour certaines souches de souris que cette injection était associée à l'apparition de fibrosarcomes (Lubet, Connolly et al. 1983). Pour les souches C3H et C57Bl/6, l'incidence des tumeurs peut être augmentée par traitement avec un inducteur hépatique (méthylcholanthrène). Par contre, les souches AKR/J et BDA/2J ne répondent pas au traitement.

Le dibenzo(a,h)anthracène est positif dans les tests bactériens d'altération de l'ADN et de mutagenèse ainsi que sur cellules eucaryotes dans les tests d'altération de l'ADN, de mutagenèse et de transformation.

Les tests d'altération de l'ADN ont donné des résultats positifs sur bactéries (*Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*) pour des niveaux d'exposition compris entre 12 et 50 µg/puits. Le dibenzo(a,h)anthracène est positif sur les souches de salmonelle TA100 et TA98 (3-5 µg/boîte) ainsi que sur la souche TM677 (21µg/ml) (McCann, Choi et al. 1975; Andrews, Thibaud et al. 1978; Kaden, Hites et al. 1979; Baker, Bonin et al. 1980; Hermann 1981).

Sur cellules de mammifères, des résultats positifs ont été observés sur cellules épithéliales humaines (sans induction des MFO) pour des concentrations comprises entre 1 et 100 µg/ml et sur cellules Hela à 28 µg/ml avec activation par le 3-méthylcholanthrène (Lake, Kropko et al. 1978; Martin, McDermid et al. 1978). Par contre, les résultats sont négatifs sur cellules embryonnaires de hamster et sur hépatocytes de rat en l'absence d'activation des MFO par un inducteur (Casto 1979; Probst, McMahan et al. 1981). Le dibenzo(a,h)anthracène est mutagène sur cellules embryonnaires de hamster pour des concentrations supérieures à 1µg/ml (Krahn and C. 1977). Il est capable de transformer différents types de cellules incluant des cellules embryonnaires de hamster chinois, des cellules C3H10T 1/2 de souris et des cellules C3H de prostate de souris (Chen and Heidelberger 1969; DiPaolo, Donovan et al. 1969; Reznikoff, Bertram et al. 1973; Casto, Janosko et al. 1977; Pienta, Poiley et al. 1977; Casto 1979; Lubet, Connolly et al. 1983).

Les théories actuelles sur le mécanisme d'action des HAP sont cohérentes avec le potentiel carcinogène du dibenzo(a,h)anthracène. Le dibenzo(a,h)anthracène possède une structure "bay-region" susceptible d'être métabolisée par les oxydases à fonction mixte en dihydrodiols qui sont mutagènes chez les bactéries et cancérigènes chez la souris (tests sur peau et injection chez la souris nouveau-né) (Wood, Levin et al. 1978; Buening, Levin et al. 1979; Nordqvist, Thakker et al. 1979; Slaga, Gleason et al. 1980).

### 5.6.3 Seuils de qualité existants

### 5.6.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,00006	0,0009	0,01	0,02
Sédiment	5	50	750	11 000

## 5.7 ACENAPHTENE

### 5.7.1 Résultats obtenus au laboratoire

CL<sub>50</sub> 48h sur *Daphnia magna* de 958 µg/L

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* de 38 µg/L

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 42 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 et TA 100 en dessous de 2,53 mg/L.

## 5.7.2 Données bibliographiques

### 5.7.2.1 Données d'écotoxicité

CL<sub>50</sub> 48h sur *Daphnia magna* de 1275µg/L

CI<sub>50</sub> sur *Vibrio fisheri* de 740µg/L

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	740	non	microorganisme	Photobacterium phosphoreum	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	1275	non	invertébré	Daphnia magna	mortalité 48h	50%	Munoz et Tarazona (1993)
	>3000	non	invertébré	Daphnia magna	mortalité 24h	50%	Munoz et Tarazona (1993)
sédiment	150	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	41400	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)
	69300	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1997)
	106200	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)

### 5.7.2.2 Données de génotoxicité

Il n'existe pas de données de cancérogenèse expérimentale sur l'acénaphène.

Peu d'études de génotoxicologie sont disponibles.

L'acénaphène n'est pas génotoxique sur *Salmonella typhimurium* après activation métabolique (Gatehouse 1980; US-EPA 1980; Pahlman and Pelkonen 1987). Il est négatif avec le SOS-chromotest sur *Escherichia coli* (Mersch-Sundermann, Rosenkranz et al. 1992).

### 5.7.3 Seuils de qualité existants

Eau : 23 µg/L (Suter)

### 5.7.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,68	11	160	2 600
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.8 ACENAPHTYLENE

### 5.8.1 Résultats obtenus au laboratoire

CL<sub>50</sub> 48h sur *Daphnia magna* de 1 800 µg/L. On note une évolution importante de la toxicité avec le temps qui semble indiquer un phénomène de bioaccumulation en cours d'essai.

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* : 82 µg/L.

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 64 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 en dessous de 2,82 mg/L mais présence d'effets mutagènes sur *Salmonella typhimurium* souche TA 100 à 1,41 mg/L.

### 5.8.2 Données bibliographiques

#### 5.8.2.1 Données d'écotoxicité

CL<sub>50</sub> *Vibrio fischeri* de 310µg/L

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	310	non	microorganisme	Photobacterium phosphoreum	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	22308	non	poisson	Pimephales promelas	cellules épithéliales (in vitro)	50%	Babich et Borenfreund (1987)
	37908	non	poisson	Bluegill sunfish	cellules épithéliales (in vitro)	50%	Babich et Borenfreund (1987)
sédiment	20	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)

#### 5.8.2.2 Données de génotoxicité

Les données de cancérogenèse expérimentale ont été jugées insuffisantes et, en l'absence de données chez l'homme, l'acénaphthylène a été classé D (non carcinogène chez l'homme).

Aucune tumeur n'a été observée dans une étude 'vie entière' chez la souris où l'acénaphthylène avait été appliqué sur la peau à 0.25% (Cook 1932). La survie à 6 mois était de 65 % et à 1 an de 35%. Il n'a été fait mention d'aucun groupe témoin dans cette étude, cependant d'autres HAP testés dans cette étude ont conduit à l'apparition de tumeurs.

Une dose de 1mM d'acénaphthylène a conduit à l'apparition de mutations sur *Salmonella typhimurium* (forward mutation assay) (Kaden, Hites et al. 1979). Par contre, l'acénaphthylène s'est révélé être négatif par le test d'Ames sur les souches TA98 et TA100 de *Salmonella typhimurium* en présence d'une activation métabolique (Bos, Theuws et al. 1988). Il est également négatif sur les souches TA1537 et TA1538 (Gatehouse 1980).

### 5.8.3 Seuils de qualité existants

### 5.8.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,41	6,3	99	1 500
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.9 ANTHRACENE

### 5.9.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité détectée sur *Daphnia magna* en dessous du seuil de solubilité de 25 µg/L dans le milieu d'essai.

CE<sub>10</sub> *Pseudokirchneriella subcapitata* : 7,8 µg/L

Pas de toxicité détectée sur *Ceriodaphnia dubia* en dessous du seuil de solubilité de 3,4 µg/L dans le milieu d'essai.

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 et TA 100 en dessous respectivement de 1,42 et 2,84 mg/L.

### 5.9.2 Données bibliographiques

#### 5.9.2.1 Données d'écotoxicité

La toxicité de cette substance présente la particularité de ne pas être correctement estimée par l'utilisation de relations structure activité (substance non narcotique) (Van Leuween 1992). Il faudra tenir compte de ce fait dans l'éventualité d'estimation de données manquantes par relations structure activité.

CE<sub>10</sub> *Pseudokirchneriella subcapitata* 7.8µg/L à 22h sous UVA

CL<sub>50</sub> 48h *Daphnia magna* 95µg/L

NOEC 21j *Daphnia magna* : 2.1 µg/L

Phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 7.3eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	2,1	non	invertébré	<i>Daphnia magna</i>	Rm 21 jours	NOEC	Foran et al. (1991)
	2,1	non	invertébré	<i>Daphnia magna</i>	reproduction 21 jours	LOEC	Holst et Giesy (1989)
	3	non	algue	<i>Selenastrum capricornutum</i>	croissance 22 heures	NOEC	Gala et Giesy (1992)
	4	non	invertébré	<i>Daphnia magna</i>	Rm 21 jours	LOEC	Foran et al. (1991)
	6	non	poisson	<i>Pimephales promelas</i>	éclosion	NOEC	Tilgman Hall et Oris (1991)
	6	non	poisson	<i>Pimephales promelas</i>	nombre d'oeufs dans la période 3-6 semaines	50%	Tilgman Hall et Oris (1991)
	7,8	non	algue	<i>Selenastrum capricornutum</i>	croissance 22 heures (UVA=125µW/cm2)	10%	Gala et Giesy (1992)

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
	8	non	poisson	Lepomis macrochirus	survie (96h)	50%	Mc Closkey et Oris (1991)
	8,3	non	algue	Selenastrum capricornutum	stress index (cytométrie de flux) + (UVA=125µW/cm2)	10%	Gala et Giesy (1994)
	12	non	poisson	Pimephales promelas	éclosion	LOEC	Tilgman Hall et Oris (1991)
	12	non	poisson	Lepomis macrochirus	survie (48h)	50%	Mc Closkey et Oris (1991)
	12	non	algue	Selenastrum capricornutum	croissance 22 heures	LOEC	Gala et Giesy (1992)
	16,1	non	algue	Selenastrum capricornutum	stress index (cytométrie de flux) + (UVA=125µW/cm2)	50%	Gala et Giesy (1994)
	37,4	non	algue	Selenastrum capricornutum	croissance 22 heures (UVA=125µW/cm2)	50%	Gala et Giesy (1992)
	51	non	invertébré	Nereis arenaceodontata	survie des juvéniles émergents 4 jours	50%	Emery et Dillon (1996)
	95	non	invertébré	Daphnia magna	mortalité 48h	50%	Munoz et Tarazona (1993)
	100	non	plante	Lemna gibba	inhibition fluorescence 4heures	NOEC	Huang et al. (1997)
	200	non	plante	Lemna gibba	croissance	50%	Huang et al. (1993)
	211	non	invertébré	Daphnia magna	mortalité 24h	50%	Munoz et Tarazona (1993)
eau	501	non	invertébré	Nereis arenaceodontata	survie des adultes 14 jours	50%	Emery et Dillon (1996)
	1000	non	plante	Lemna gibba	croissance	LOEC	Huang et al. (1993)
	1100	non	plante	Lemna gibba	croissance 8 jours	50%	Huang et al. (1995)
	2000	non	plante	Lemna gibba	inhibition fluorescence 4heures	50%	Huang et al. (1997)
	2919	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
	33400	non	microorganisme	Photobacterium phosphoreum	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	36000	non	algue	Selenastrum capricornutum	croissance 72h	50%	Schoeny et al. (1988)
sédiment	6,6	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	42,2	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	70	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	135	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	148	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)

### 5.9.2.2 Données de génotoxicité

L'ensemble des données de cancérogenèse expérimentale a été jugé 'inadéquante' et, en l'absence de donnée chez l'homme, l'anthracène a été classé D (non carcinogène chez l'homme).

Les premières expérimentations datent de 1955, où un groupe de 28 rats exposés à 28 mg/kg/jour a été suivi pendant 700 jours (dose totale de 4,5 g d'anthracène). Aucune tumeur n'a été observée (Schmahl 1955). Aucune tumeur n'a pu également être observée

après implantation pulmonaire unique (0,5 mg/rat soit 2 mg/kg) (Stanton, Miller et al. 1972).

Les tests sur peau dans un système initiation/promotion (anthracène/TPA) chez la souris se sont révélés négatifs, aucune tumeur n'ayant pu être observée (Lavoie, Coleman et al. 1985). Ce résultat a été confirmé par l'étude de Scribner en 1972 où l'application cutanée de 10 µm d'anthracène (dans du benzène) suivie d'une application deux fois par semaine pendant 35 semaines de 5 µm de TPA a conduit à l'apparition de 2 tumeurs contre 1 seule chez le témoins TPA seul (Scribner 1973).

Les tests d'altération de l'ADN et de mutations géniques chez les procaryotes se sont révélés généralement négatifs. Des résultats négatifs ont été observés dans les tests d'altération de l'ADN chez *Escherichia coli* jusqu'à des concentrations de 250 µg/ml et chez *Bacillus subtilis* à 62µg/ml (Rosenkrantz and Poirier 1979; McCarroll, Keech et al. 1981; De Flora, Znacchi et al. 1984). Des résultats négatifs ont également été obtenus par le test de mutation reverse sur six souches de *Salmonella typhimurium* à des concentrations allant jusqu'à 1000 µg/boîte (McCann, Choi et al. 1975; LaVoie, Bedenko et al. 1979; Salamone, Heddle et al. 1979; Simmon 1979; Ho, Clark et al. 1981; De Flora, Znacchi et al. 1984; Bos, Theuws et al. 1988). L'anthracène a été testé dans une étude circulaire internationale regroupant 20 laboratoires. Un laboratoire a reporté un résultat positif sur TA 100 sans activation métabolique, et un laboratoire sur TA98 et TA100 avec activation métabolique. Tous les autres laboratoires ont obtenu des résultats négatifs (Bridges, McGregor et al. 1981).

L'anthracène est négatif sur les différents tests sur levures (recombinaison, mutation et perte de chromosomes) (De Serres, Hoffman et al. 1981).

Les tests d'altération de l'ADN, de mutation, d'effets chromosomiques et de transformation sur cellules eucaryotes ont donné globalement des résultats négatifs. L'anthracène est négatif pour le test d'altération de l'ADN sur culture primaire d'hépatocyte à 1 µg/ml, sur cellules CHO à 1000 µg/ml et sur cellules Hela à 100 µg/ml (Williams 1977; Martin, McDermid et al. 1978; Martin and McDermid 1981; Probst, McMahan et al. 1981; Garrett and Lewtas 1983), Il est négatif dans les tests de mutation sur cellules V79 (125 µg/ml), sur cellules de lymphome de souris L5178Y (18 µg/ml) et sur cellules lymphoblastoïdes humaines (36 µg/ml) (Amacher, Paillet et al. 1980; Amacher and Turner 1980; Knapp, Gose et al. 1981).

Les résultats obtenus dans les tests d'échange de chromatides sœurs et de cassures chromosomiques sont également négatifs. Les résultats des tests de transformation cellulaire à des concentration allant jusqu'à 30 µg/ml sur cellules de souris Balb/3T3, sur cellules embryonnaires de cochon d'Inde, de hamster et de souris se sont révélés être négatifs (DiPaolo, Takano et al. 1972; Evans and DiPaolo 1975; Pienta, Poiley et al. 1977; Lubet, Connolly et al. 1983). Dans une étude en collaboration internationale l'anthracène est reporté comme négatif dans les tests de synthèse non programmée de l'ADN, d'échange de chromatides sœurs, d'aberration chromosomique et de mutation génique (Brookes and Preston 1981).

### 5.9.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0,07µg/L (RIVM) ; 0,73 µg/L (Suter)

Sédiments : 0,12mg/Kg (RIVM)

## 5.9.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,085	1,3	21	320
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.10 FLUORENE

### 5.10.1 Résultats obtenus au laboratoire

CL<sub>50</sub> 48h *Daphnia magna* : 408 µg/L

CE<sub>10</sub> *Pseudokirchneriella subcapitata* : 82 µg/L

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 25 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 en dessous du seuil de solubilité de 3,68 mg/L.

### 5.10.2 Données bibliographiques

#### 5.10.2.1 Données d'écotoxicité

CI50 *Vibrio fisheri* 3230µg/L

Non-phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 8.5eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	3230	non	microorganisme	Photobacterium phosphoreum	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	7310	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
sédiment	31,3	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	200	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	210	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	638	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	700	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)

#### 5.10.2.2 Données de génotoxicité

L'ensemble des données de cancérogenèse expérimentale a été jugé 'inadéquate' et, en l'absence de données chez l'homme, le fluorène a été classé D (non carcinogène chez l'homme).

Par voie orale chez le rat, une dose journalière de 11 mg/kg/j pendant 6 mois n'a pas permis de mettre en évidence une augmentation statistiquement significative du nombre de tumeurs. Le même type de résultats a été observé pour des rats exposés oralement (0,05%) pendant 18 mois ( dose moyenne totale de 2553 mg/rat) (Morris, Velat et al. 1960).

Différentes études sur le fluorène afin de déterminer son activité comme carcinogène complet, comme initiateur tumoral ou comme co-carcinogène du 3-méthylcholanthrène ont

donné des résultats négatifs où n'ont pas permis de conclure (Kennaway 1924; Riegel, Watman et al. 1951; LaVoie, Bedenko et al. 1979; LaVoie, Tulley-Freiler et al. 1981).

Aucune tumeur n'a été observée après sept injections sous cutanée de 10 mg de fluorène chez la souris (souche A) dans une étude sur 18 mois (Shear 1938).

L'administration par voie orale chez le rat albinos de différentes concentration de benzofluorène (0,062-1%) n'a donné aucune augmentation de la fréquence d'apparition de tumeur (Wilson, DeEds et al. 1947).

Le fluorène est négatif dans les tests d'Ames sur les 5 souches de *Salmonella typhimurium* à des concentration allant jusqu'à 1000 µg/boîte. Il est également négatif sur la souche TM677 à 50µg/ml (McCann, Choi et al. 1975; Kaden, Hites et al. 1979; LaVoie, Bedenko et al. 1979; LaVoie, Tulley-Freiler et al. 1981; Sakai, Yoshida et al. 1985; Bos, Theuws et al. 1988).

Dans un test d'altération de l'ADN sur la souche TA 1535 (*Salmonella typhimurium*), le fluorène est négatif à des concentrations allant jusqu'à 16,5 µg/ml (Nakamura, Oda et al. 1987). Des résultats négatifs ont également été observés sur *Escherichia coli* à des concentrations allant jusqu'à 2µg/ml (Mamber, Bryson et al. 1983; Mamber, Bryson et al. 1984) ainsi que sur cultures primaires d'hépatocytes de rat à une concentration de 3 mM (Sina, Bean et al. 1983).

Dans le test de synthèse non programmée de l'ADN, l'exposition de culture primaire d'hépatocytes de rat à des concentrations de 10 et 100 mmol/ml a conduit à des résultats négatifs (Probst, McMahan et al. 1981; Williams, Mori et al. 1989). Le fluorène s'est révélé être positif dans un test d'altération de l'ADN sur cellules de lymphome de souris L5178Y (cassures simple brin) à 0,15µM en présence d'un homogénat de foie et à 0,5 µM sans activation métabolique (Garberg, Akerblom et al. 1988). Dans des tests de mutation sur cellules L5178Y le fluorène est négatif pour des concentrations allant jusqu'à 30 et 60 µg/ml en présence et en absence d'activation métabolique, respectivement (Amacher, Paillet et al. 1981; Oberly, Beusey et al. 1984).

### 5.10.3 Seuils de qualité existants

Eau : 3,9 µg/L (Suter)

### 5.10.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,32	5	77	1 200
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.11 CHRYSENE

### 5.11.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité sur *Daphnia magna* à la limite de solubilité de 1,3 µg/L dans le milieu d'essai

Pas de toxicité détectée sur CE<sub>10</sub> *Pseudokirchneriella subcapitata* : à la limite de solubilité de 1,0 µg/L dans le milieu d'essai.

Pas de toxicité détectée sur *Ceriodaphnia dubia* à la limite de solubilité de 0,09 µg/L dans le milieu d'essai.

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 en dessous de 6,3 mg/L et présence d'effets mutagènes détectés sur *Salmonella typhimurium* souche TA 100 à la concentration de 2,4mg/L.

## 5.11.2 Données bibliographiques

### 5.11.2.1 Données d'écotoxicité

CI50 *Vibrio fisheri* 1490µg/L

Phototoxique :énergie de transition HOMO-LUMO = 7.7eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	1490	non	microorganisme	Photobacterium phosphoreum	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	16664	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
sédiment	7,9	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	50,7	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	80	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	100	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
	162	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	177	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	<1,8	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)

### 5.11.2.2 Données de génotoxicité

Le chrysène a été déclaré cancérigène chez l'animal et a été classé en B2 cancérigène probable chez l'homme (IARC 1983).

En injection intra-péritonéale chez la souris le chrysène provoque une augmentation de l'incidence des tumeurs hépatiques (Buening, Levin et al. 1979; Wislocki, Bagan et al. 1986) et une augmentation de l'incidence des lymphomes et des tumeurs pulmonaires (Wislocki, Bagan et al. 1986). Les tests sur peau chez la souris sont positifs aussi bien comme initiateur tumoral que comme carcinogène complet (Wynder and Hoffmann 1959).

Le chrysène a donné des résultats positifs sur les souches TA97, TA98 et TA100 de *Salmonella typhimurium* dans le test de mutation reverse (McCann, Choi et al. 1975; Wood, Levin et al. 1977; LaVoie, Bedenko et al. 1979; Dunkel and Simon 1980; Sakai, Yoshida et al. 1985; Tokiwa, Morita et al. 1986) ainsi que dans le test sur la souche TM677 (Kaden, Hites et al. 1979)

Des effets chromosomiques ont été observés sur cellules de hamster chinois, sur ovocytes de souris et spermatogonies de hamster après gavages à des doses de 450 et 900 mg/kg (Basler, Herbold et al. 1977; Roszinsky-Kocher, Basler et al. 1979). Dans les tests de transformation, des résultats positifs ont été obtenus à 10 µg/ml sur cellules embryonnaires

de hamster alors que sur cellules prostatiques G3HG23 de souris, les résultats sont restés négatifs (Marquardt and Heidelberger 1972; Pienta, Poiley et al. 1977).

Le chrysène est métabolisé par les oxygénases à fonctions mixtes en diol époxydes (Nordqvist, Thakker et al. 1981; Vyas, Levin et al. 1982) mutagènes dans les tests bactériens et cancérigènes dans les tests sur peau et par injection chez la souris nouveau-né (Wood, Levin et al. 1977; Levin, Wood et al. 1978; Wood, Chang et al. 1979; Slaga, Gleason et al. 1980; Chang, Levin et al. 1983).

### 5.11.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0,34µg/L (RIVM)

Sédiments : 10,7mg/Kg (RIVM)

### 5.11.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,0063	0,098	1,5	24
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.12 FLUORANTHENE

### 5.12.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité sur *Daphnia magna* à la limite de solubilité de 112 µg/L

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* : 8,6 µg/L.

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 1,2 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 et TA 100 en dessous de 2,97 mg/L.

### 5.12.2 Données bibliographiques

#### 5.12.2.1 Données d'écotoxicité

NOEC reproduction *Ceriodaphnia dubia* 7 jours 33.5µg/L

CL50 48h *Daphnia magna* 196µg/L

Phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 7.7eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	8,6	non	poisson	<i>Pimephales promelas</i>	évitement	NOEC	Farr et al. (1995)
	11	non	amphibien	<i>Rana catesbeiana</i>	comportement 4 jours	NOEC	Walker et al. (1998)
	14	non	poisson	<i>Pimephales promelas</i>	mortalité larves 96h	15%	Diamond et al. (1995)
	14,7	non	poisson	<i>Pimephales promelas</i>	évitement	LOEC	Farr et al. (1995)
	18	non	poisson	<i>Pimephales promelas</i>	mortalité larves 96h	80%	Diamond et al. (1995)
	18	non	invertébré	<i>Hyallela azteca</i>	Survie sur 10 jours	NOEC	Suedel et Rodgers

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicon- tamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
							(1996)
	20	non	mollusque	<i>Mytilus edulis</i>	immunocompétence	NOEC	Coles et al. (1994)
	30	non	invertébré	<i>Chironomus tentans</i>	Survie sur 10 jours	NOEC	Suedel et Rodgers (1996)
	30,3	non	invertébré	<i>Hyallela azteca</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et Rodgers (1996)
	32	non	invertébré	<i>Chironomus tentans</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1992)
	33,5	non	invertébré	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	reproduction 7 jours	50%	Oris et al. (1991)
	36	non	crustacé benthique	<i>Grandidierella japonica</i>	survie 4 jours	50%	Boese et al. (1997)
	37,8	non	invertébré	<i>Chironomus tentans</i>	Survie sur 10 jours	50%	Suedel et Rodgers (1996)
	40	non	amphibien	<i>Rana catesbeiana</i>	comportement 4 jours	LOEC	Walker et al. (1998)
	43	non	invertébré	<i>Chironomus riparius</i>	Succes dans le developement des larves sur 28 jours	NOEC	Stewart et Thompson (1995)
	43	non	invertébré	<i>Chironomus riparius</i>	emergence des larves sur 28 jrs	NOEC	Stewart et thompson (1995)
	45	non	invertébré	<i>Hyallela azteca</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1992)
	45	non	invertébré	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	survie 48h	50%	Oris et al. (1991)
eau	60	non	poisson	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	cellules branchiales in vitro 101 heures (obscurité)	NOEC	Schirmer et al. (1997)
	74	non	crustacé benthique	<i>Emerita analoga</i>	survie 4 jours	50%	Boese et al. (1997)
	85	non	crustacé benthique	<i>Corophium insidiosum</i>	survie 4 jours	50%	Boese et al. (1997)
	88	non	invertébré	<i>Chironomus riparius</i>	emergence des larves sur 28 jrs	67%	Stewart et thompson (1995)
	89	non	invertébré	<i>Chironomus riparius</i>	emergence des larves sur 28 jrs	2%	Stewart et thompson (1995)
	90	non	invertébré	<i>Daphnia magna</i>	Survie sur 10 jours	NOEC	Suedel et Rodgers (1996)
	102,6	non	invertébré	<i>Daphnia magna</i>	Survie sur 10 jours	50%	Suedel et Rodgers (1996)
	103	non	invertébré	<i>Daphnia magna</i>	survie sur 10 jours	50%	Suedel et al. (1992)
	106	non	invertébré	<i>Hyallela azteca</i>	survie	50%	Driscoll et al. (1997)
	196	non	invertébré	<i>Daphnia magna</i>	survie 24 heures	50%	Wernersson et Dave (1997)
	200	non	mollusque	<i>Mytilus edulis</i>	immunocompétence	LOEC	Coles et al. (1994)
	200	oui	microorga- nisme	bactéries du sol	croissance	89%	Gogolev et Wilke (1997)
	200	oui	microorga- nisme	bactéries du sol	croissance	75%	Gogolev et Wilke (1997)
	200	oui	microorga- nisme	bactéries du sol	croissance	NOEC	Gogolev et Wilke (1997)
	500	non	plante	<i>Lemna gibba</i>	croissance	NOEC	Ren et al. (1994)
	2020	non	microorga- nisme	<i>Photobacterium phosphoreum</i>	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	3270	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
	7500	non	plante	<i>Lemna gibba</i>	croissance 8 jours	50%	Huang et al. (1995)
	16000	non	plante	<i>Lemna gibba</i>	croissance	50%	Ren et al. (1994)
	>500	non	microorga- nisme	bactéries du sol	croissance	73% à 90%	Gogolev et Wilke (1997)
	>70	non	crustacé benthique	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 4 jours	50%	Boese et al. (1997)
	>70	non	crustacé benthique	<i>Eohaustorius estuarius</i>	survie 4 jours	50%	Boese et al. (1997)
	>70	non	crustacé benthique	<i>Excirrolana vancouverensis</i>	survie 4 jours	50%	Boese et al. (1997)
	>98	non	crustacé	<i>Leptocheirus</i>	survie 4 jours	50%	Boese et al. (1997)

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicon- tamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
			benthique	plumulosus			
eau intestitielle	12	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1989)
	23,8	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1989)
	23,9	non	invertébré	Corophium spenicorne	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1989)
sédiment	3,3	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)
	23,6	non	invertébré	Chironomus tentans	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et Rodgers (1996)
	59,2	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	60,6	non	invertébré	Hyallega azteca	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et Rodgers (1996)
	110,5	non	invertébré	Daphnia magna	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et Rodgers (1996)
	379	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	580	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
	600	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	1209	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	1327	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	1500	non	invertébré	Hyallega azteca	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
	1700	non	invertébré	Chironomus tentans	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
	2300	non	invertébré	Hyallega azteca	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
sédiment	2400	non	invertébré	Daphnia magna	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
	3000	non	invertébré	Chironomus tentans	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
	4200	non	invertébré	Daphnia magna	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
	4200	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	5100	oui	invertébré	Eohaustorius estuarius	survie 10 jours	50%	De Witt et al. (1989)
	5500	non	invertébré	Hyallega azteca	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
	7300	non	invertébré	Chironomus tentans	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
	10100	non	invertébré	Capitella sp	Réduction taux de croissance sur 14 jours	50%	Foss et Forbes (1997)
	10600	oui	invertébré	Eohaustorius estuarius	survie 10 jours	50%	De Witt et al. (1989)
	11400	non	invertébré	Hyallega azteca	survie 16 jours	NOEC	Driscoll et Landrum (1997)
	13100	non	invertébré	Daphnia magna	survie sur 10 jours	NOEC	Suedel et Rodgers (1996)
	13900	non	invertébré	Chironomus tentans	survie sur 10 jours	NOEC	Suedel et Rodgers (1996)
	15000	non	invertébré	Daphnia magna	survie sur 10 jours	50 %	Suedel et al. (1992)
	15400	oui	invertébré	Hyallega azteca	survie 10 jours	50%	De Witt et al. (1989)
	21000	non	invertébré	Hyallega azteca	survie 16 jours	LOEC	Driscoll et Landrum (1997)
	31000	non	invertébré	Chironomus riparius	Succes dans le developement des larves sur 28 jours	NOEC	Stewart et Thompson (1995)
	31000	non	invertébré	Chironomus riparius	emergence des larves sur 28 jrs	NOEC	Stewart et thompson (1995)
	38000	non	invertébré	Schizopera knabeni	reproduction 14 jours	50%	Lotufo (1997)
	46800	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
	80000	non	invertébré	<i>Hyalalella azteca</i>	survie 16 jours	50%	Driscoll et Landrum (1997)
	80000	non	invertébré	<i>Chironomus riparius</i>	emergence des larves sur 28 jrs	67%	Stewart et thompson (1995)
	94000	non	invertébré	<i>Schizopera knabeni</i>	alimentation 30 heures	50%	Lotufo (1997)
	99300	non	invertébré	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1997)
	170000	non	invertébré	<i>Chironomus riparius</i>	emergence des larves sur 28 jrs	2%	Stewart et thompson (1995)
	181000	non	invertébré	<i>Hyalalella azteca</i>	croissance en poids sur 30 jours	NOEC	Harkey et al. (1996)
	249000	non	invertébré	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 4 jours	NOEC	Lotufo (1997)
	451000	non	invertébré	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 4 jours	LOEC	Lotufo (1997)
	<12900	non	invertébré	<i>Hyalalella azteca</i>	survie sur 10 jours	NOEC	Suedel et Rodgers (1996)
	>2100000	non	invertébré	<i>Schizopera knabeni</i>	survie 4 jours	50%	Lotufo (1997)
	7000-15000	non	invertébré	<i>Rhepoxynius abronius</i>	survie 10 jours	50%	De Witt et al. (1991)

### 5.12.2.2 Données de génotoxicité

Les données de cancérogenèse expérimentale ont été jugées insuffisantes en 1983 et, en l'absence de données chez l'homme, le fluoranthène a été classé D (non carcinogène chez l'homme) (IARC 1983).

Le fluoranthène a été testé par application cutanée chez la souris dans différentes études à des doses variant de 1,5 mg/souris/semaine pendant 52 semaines à 100 mg/souris/semaine pendant 82 semaines. Les résultats de ces études ont toujours été négatifs (Suntzeff, Croninger et al. 1957; Wynder and Hoffmann 1959; Hoffmann, Rathkamp et al. 1972; Horton and Christian 1974).

Dans un test *in vivo* à court terme chez la souris CD-1, l'incidence des adénomes et adénocarcinomes pulmonaires est augmentée 24 semaines après injection intra-péritonéale de fluoranthène (815 mg/kg) (Busby, Goldman et al. 1984). Ce résultat a été confirmé dans une expérimentation sur 52 semaines où l'incidence des tumeurs hépatiques et pulmonaires est augmentée pour une dose totale de 3,46 µmole de fluoranthène (LaVoie, Cai et al. 1994). Différentes études sur souris CD-1 ou BLU:Ha ont également permis de montrer l'induction de tumeurs hépatiques et rénales par le fluoranthène ainsi que la formation d'adduit à l'ADN (Waithe, Michaud et al. 1991; Wang and Busby 1993; Wang, Busby et al. 1995; Wang, Busby et al. 1995).

Par voie orale à des doses allant jusqu'à 2g/kg, le fluoranthène s'est révélé être négatif dans le test des micronoyaux sur moelle osseuse de souris ainsi que dans le test de synthèse non programmée de l'ADN sur hépatocytes de rat (Stocker, Howard et al. 1996).

Dans un test sur peau chez la souris, la combinaison de benzo(a)pyrène et fluoranthène provoque une augmentation des adduits B(a)P-ADN (Rice, Defloria et al. 1988).

Les résultats de mutagenèse du fluoranthène sont ambigus. Il est positif dans le test d'Ames en particulier sur les souches TA98 e TA100 à 5 et 10 µg/boîte respectivement (Hermann, Durand et al. 1980; LaVoie, Hecht et al. 1982). Par contre, il est négatif sur les 5 souches de *Salmonella typhimurium* à des doses allant jusqu'à 1000 µg/boîte (Salamone, Heddle et al. 1979). D'autres études le classent, soit positif (Kaden, Hites et al. 1979;

Kinae, Hashizume et al. 1979; LaVoie, Hecht et al. 1982; Babson, Russo-Rodriguez et al. 1986; Bos, Theuws et al. 1988) soit négatif (Tokiwa, Moreta et al. 1977; Kinae, Hashizume et al. 1979; Bos, Prinsen et al. 1987).

Les résultats sur cellules eucaryotes sont également ambiguë. En effet, les tests d'effets chromosomiques sur cellules de hamster se sont révélés être à la fois positifs (Palitti, Cozzi et al. 1986) et négatifs (DeSaliva, Meschini et al. 1988). Un test de mutation génique sur cellules lymphoblastiques humaines a donné des résultats positifs (Crespi and Thilly 1984) alors que les résultats sur différents mutants de lignées cellulaires d'ovaire de hamster chinois ont donné des résultats à la fois positifs (Hoy, Salazar et al. 1984; Li 1984) et négatifs (Hoy, Salazar et al. 1984).

### 5.12.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0.30 µg/L (RIVM) ; 6,16 µg/L (Suter) ; 0,004 µg/L (WRC 1)

Sédiments : 2.6 mg/Kg (RIVM)

### 5.12.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,024	0,37	5,8	91
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.13 INDENO(1,2,3,CD)PYRENE

### 5.13.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité sur *Daphnia magna* à la limite de solubilité de 357 µg/L dans le milieu d'essai

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* : 1,5 µg/L.

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 0,27 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 et TA 100 en dessous respectivement de 1,98 et 1,07 mg/L.

### 5.13.2 Données bibliographiques

#### 5.13.2.1 Données d'écotoxicité

Pas de données d'écotoxicologie aquatique

Pas de données de phototoxicité

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
sédiment	<1,5	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)
	1,8	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
sédiment	0,8	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	17,2	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	18,9	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	5,4	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)

### 5.13.2 Données de génotoxicité

L'indéno(1,2,3-cd)Pyrène a été déclaré cancérigène chez l'animal et a été classé en B2, cancérigène probable chez l'homme (IARC 1983).

L'indéno(1,2,3-cd)Pyrène produit des tumeurs chez la souris après implantation pulmonaire (Deutsch-Wenzel, Brune et al. 1983), injections sous cutanée (Lacassagne, Buu-Hoi et al. 1963) et application cutanée (Rice, Coleman et al. 1985; Rice, Hosted et al. 1986).

L'indéno(1,2,3-cd)Pyrène est mutagène dans le test de mutation reverse sur *Salmonella typhimurium* pour les souche TA100 et TA98 pour des doses comprises entre 2 et 3 µg/boîte. (LaVoie, Bedenko et al. 1979; Hermann, Durand et al. 1980; Rice, Coleman et al. 1985).

### 5.13.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0,04µg/L (RIVM) ; 0,004 µg/L (WRC 1)

Sédiments : 5,9mg/Kg (RIVM)

### 5.13.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,0016	0,025	0,39	6,1
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.14 NAPHTALENE

### 5.14.1 Résultats obtenus au laboratoire

CL<sub>50</sub> 48h *Daphnia magna* : 1 664 µg/L

Pas de toxicité détectée sur *Pseudokirchneriella subcapitata* à la limite de solubilité de 4 270 µg/L dans le milieu d'essai.

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 514 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 et TA 100 en dessous du seuil de solubilité de 1,24 mg/L.

## 5.14.2 Données bibliographiques

### 5.14.2.1 Données de toxicité

CE10 48h *Daphnia magna* : 2194 à 4660µg/L

Non-phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 10.1eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	680	non	microorganisme	Photobacterium phosphoreum	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	2000	non	invertébré	Macrobrachium kistensis	survie 96h	50%	Jaiswal et al. (1989)
	2194	non	invertébré	Daphnia magna	mortalité 48h	50%	Munoz et Tarazona (1993)
	2305	non	invertébré	Daphnia magna	mortalité 24h	50%	Munoz et Tarazona (1993)
	4000	non	invertébré	Macrobrachium kistensis	survie 24h	50%	Jaiswal et al. (1989)
	4500	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	survie de larves (4 jours)	50%	Cotant Edsal (1991)
	4660	non	invertébré	Daphnia magna	survie 48h	50%	Cotant Edsal (1991)
	8600	non	invertébré	Daphnia magna	Immobilisation 48h	50%	LeBlanc, 1980
	3400	non	invertébré	Daphnia magna	Immobilisation 48h	50%	Crider et al, 1982
	22600	non	invertébré	Daphnia magna	Immobilisation 48h	50%	Eastmond et al, 1984
	24100	non	invertébré	Daphnia magna	Immobilisation 48h	50%	Parkhurst, 1982
	2160	non	invertébré	Daphnia magna	Immobilisation 48h	50%	Millemann et al, 1984
	3000	non	invertébré	Daphnia magna	reproduction 28j	NOEC	Parkhurst (1982)
	2920-3890	non	invertébré	Daphnia pulex	Immobilisation 48h	50%	Geiger and Buikema, 1982
	1000	non	invertébré	Daphnia pulex	Immobilisation 96h	50%	Geiger and Buikema, 1982
	no effect @ 600	non	invertébré	Daphnia pulex	chronic		Geiger and Buikema, 1982
	5020	non	invertébré	Physa gyrina	survie 48h	50%	Millemann et al, 1984
	3930	non	invertébré	Gammarus minus	survie 48h	50%	Millemann et al, 1984
	2810	non	invertébré	Chironomus tentans	survie 48h	50%	Millemann et al, 1984
	33000	non	algue	Chlorella vulgaris	croissance population 72h	50%	Kauss and Hutchinson (1975)
	2960	non	algue	Selenastrum capricornutum	taux d'assimilation 14C	50%	Milleman et al (1984)
	2820	non	algue	Nitzschia palae	taux d'assimilation 14C	50%	Milleman et al (1984)
	25000	non	algue	Selenastrum capricornutum	croissance population 14j	50%	Gaur (1988)
	188850	non	microorganisme	Tetrahymena pyriformis	Croissance population 60h	50%	Schultz et al (1983)
	29000	non	microorganisme	Nitrosomonas	consommation NH3 72h	50%	Blum and Speece (1991)
	900-1010	non	Poisson	Onchorhynchus gorboscha	survie 48h	50%	Rice and Thomas, 1989
	2100	non	Poisson	Onchorhynchus kisutch	survie 96h	50%	Moles et al, 1981
	1600	non	Poisson	Onchorhynchus mykiss	survie 96h	50%	DeGraeve et al, 1982
	7800	non	Poisson	Pimephales	survie 96h	50%	DeGraeve et al, 1982

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
				promelas			
	1990	non	Poisson	Pimephales promelas	survie 96h	50%	Millemann et al, 1984
	7900	non	Poisson	Oreochromis mossambicus	survie 96h	50%	Dange, 1986
	150000	non	Poisson	Gambusia affinis	survie 96h	50%	Wallen et al, 1957
	110	non	Poisson	Oncorhynchus mykiss	survie larvaire 96h	50%	Black et al (1983)
	510	non	Poisson	Micropterus salmoides	survie larvaire 96h	50%	Black et al (1983)
	120	non	Poisson	Oncorhynchus mykiss	survie larvaire 96h	50%	Milleman et al (1984)
	680	non	Poisson	Micropterus salmoides	survie larvaire 96h	50%	Milleman et al (1984)
	450-850	non	Poisson	Pimephales promelas	survie 30j	MATC	DeGraeve et al (1982)
	120	non	Poisson	Oncorhynchus kisutch	poids humide 40j	NOEC	Moles et al (1981)
	2100	non	Amphibien	Xenopus laevis	dépigmentation 96h	50%	Edmisten and Bantle (1982)
sédiment	2,4	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	15,2	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	30	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	48,5	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	53,2	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)

#### 5.14.2.2 Données de génotoxicité

Un groupe de 28 rats a été exposé à du naphthalène dans leur alimentation à raison de 6 fois par semaine jusqu'à ce que la dose totale atteigne 10 g/rat. La dose journalière était approximativement 10 à 20 mg. Les tumeurs ont été évaluées lors des décès spontanés des animaux (700-800 jours). Aucune tumeur n'a pu être observée (Schmahl 1955). Dans une étude à court terme par inhalation chez la souris (souche A/J femelles), on observe une augmentation du nombre des adénomes pulmonaires mais cette augmentation n'est pas dose-dépendante (Adkins, Van et al. 1986).

Le naphthalène s'est révélé être négatif dans les tests sur peau chez la souris comme cancérigène complet et comme initiateur tumoral (Kennaway 1930; Schmeltz, Tosk et al. 1978).

Les données de cancérogenèse expérimentale ont été complétées en 1991 dans le cadre du 'National Program of Toxicology' (USA) par une étude sur deux ans sur des souris B6C3F1. Dans les conditions de cette expérience, les conclusions du NTP sont qu'il n'existe pas d'évidence d'effet carcinogène chez les mâles. Par contre, pour les femelles exposées par inhalation 5 jours par semaine, 6 heures par jour, pendant 103 semaines, il existe une augmentation de l'incidence des adénomes bronchiques et pulmonaires.

À une exception près (Narbonne, Cassand et al. 1987), l'ensemble des tests de génotoxicité a donné des résultats négatifs. Dans le test de mutation reverse sur différentes souches de *Salmonella typhimurium* (TA97, TA98, TA100, TA1535, TA 1537, TA1538, UTH8413, UTH8414), le naphthalène à des concentrations allant jusqu'à 2,5 mg/boîte est négatif avec

ou sans activation métabolique (McCann, Choi et al. 1975; Anderson and Styles 1978; Florin, Rutberg et al. 1980; Gatehouse 1980; Ho, Clark et al. 1981; Connor, Theiss et al. 1985; Sakai, Yoshida et al. 1985; Mortelmans, Haworth et al. 1986; Bos, Theuws et al. 1988). A des concentrations allant jusqu'à 1,6 mM, le naphthalène n'est pas positif dans le test de mutation 'forward' sur *Salmonella typhimurium* (Kaden, Hites et al. 1979; Seixas, Adon et al. 1982). Le naphthalène est positif dans le test d'altération de l'ADN sur *S. typhimurium* TA1535 à une concentration de 83 µg/ml (Nakamura, Oda et al. 1987). Dans le test d'induction de phage utilisant *Escherichia coli* comme hôte, le naphthalène est négatif à des concentrations allant jusqu'à 2 mg/ml (Ho and Ho 1981; Mamber, Bryson et al. 1983). Dans les tests d'altération de l'ADN, le naphthalène est négatif sur *E. coli* (Mamber, Bryson et al. 1984) ainsi que sur culture primaire d'hépatocytes de rat (Sina, Bean et al. 1983). Les tests de transformation sur cellules embryonnaires de souris Swiss (Rhim, Park et al. 1974) et sur cellules embryonnaires de rat (Freeman, Weisburger et al. 1973) donnent des résultats négatifs.

### 5.14.3 Seuils de qualité existants

Eau : 1.2µg/L (RIVM) ; 12 µg/L (Suter)

Sédiments : 0.14mg/Kg (RIVM)

### 5.14.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	1,9	30	460	7 200
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.15 PHENANTHRENE

### 5.15.1 Résultats obtenus au laboratoire

Pas de toxicité sur *Daphnia magna* à la limite de solubilité de 400 µg/L dans le milieu d'essai

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* : 26,4 µg/L.

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 13,4 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 en dessous du seuil de solubilité de 4,72 mg/L.

### 5.15.2 Données bibliographiques

#### 5.15.2.1 Données d'écotoxicité

CE<sub>10</sub> 48h *Daphnia magna* : 350 à 861µg/L

NOEC Reproduction 21jours *Daphnia pulex* : 60µg/L

Non-phototoxique :énergie de transition HOMO-LUMO = 8.2eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicon- tamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
--------------	-------------------------------------	---------------------------	------------------	-----------	------------------	-------------------	----------------------------

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	19	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	comportement (alevins 60 jours)	NOEC	Passino-Reader et al. (1995)
	19	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	poids (alevins 60 jours)	NOEC	Passino-Reader et al. (1995)
	41	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	comportement (alevins 60 jours)	LOEC	Passino-Reader et al. (1995)
	41	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	nage (alevins 60 jours)	NOEC	Passino-Reader et al. (1995)
	41	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	poids (alevins 60 jours)	LOEC	Passino-Reader et al. (1995)
	60	non	invertébré	Daphnia pulex	survie 16 jours	LOEC	Savino et Tanabe (1989)
	60	non	invertébré	Daphnia pulex	fécondité 16 jours	LOEC	Savino et Tanabe (1989)
	60	non	invertébré	Daphnia pulex	croissance 21 jours	LOEC	Savino et Tanabe (1989)
	75	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	poids (alevins 60 jours)	50%	Passino-Reader et al. (1995)
	80	non	invertébré	Daphnia pulex	fécondité 16 jours	50%	Savino et Tanabe (1989)
	81	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	nage (alevins 60 jours)	LOEC	Passino-Reader et al. (1995)
	200	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	survie (alevins 60 jours)	50%	Passino-Reader et al. (1995)
	350	non	invertébré	Daphnia magna	survie 48h	50%	Cotant Edsal (1991)
	383	non	invertébré	Daphnia magna	mortalité 48h	50%	Munoz et Tarazona (1993)
	500	non	plante	Lemna gibba	croissance	50%	Huang et al. (1993)
	530	non	bactérie	Photobacterium phosphoreum	inhibition luminescence	50%	Mc Conkey et al. (1997)
	530	non	microorganisme	Photobacterium phosphoreum	luminescence	50%	Jacobs et al. (1993)
	734	non	invertébré	Daphnia pulex	immobilisation en 48 h	50%	Passino et Smith (1987)
	861	non	invertébré	Daphnia magna	mortalité 24h	50%	Munoz et Tarazona (1993)
	3000	non	plante	Lemna gibba	croissance 8 jours	50%	Huang et al. (1995)
	3000	non	plante	Lemna gibba	croissance	LOEC	Huang et al. (1993)
	3200	non	poisson	Oncorhynchus mykiss	survie de larves (4 jours)	50%	Cotant Edsal (1991)
	5000	non	plante	Lemna gibba	inhibition croissance	44%	Mc Conkey et al. (1997)
	8079	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
sédiment	106	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
sédiment	675	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	950	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	2152	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	2363	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	3680	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 10 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	11000	non	invertébré	Schizopera knabeni	reproduction 10 jours	NOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
	11000	non	invertébré	Nitocra lacustris	survie 10 jours	NOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
	22000	non	invertébré	Schizopera knabeni	survie 10 jours	NOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
	22000	non	invertébré	Schizopera knabeni	reproduction 10 jours	LOEC	Lotufo et Fleeger (1997)

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
	22000	non	invertébré	Nitocra lacustris	survie 10 jours	LOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
	22000	non	invertébré	Nitocra lacustris	reproduction 10 jours	NOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
	40500	non	invertébré	Limnodrilus hoffmeisteri	Production de progéniture sur 28 jours	25 %	Lotufo et Fleeger (1996)
	45000	non	invertébré	Schizopera knabeni	survie 10 jours	LOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
	45000	non	invertébré	Nitocra lacustris	reproduction 10 jours	LOEC	Lotufo et Fleeger (1997)
	51000	non	invertébré	Schizopera knabeni	alimentation 30 heures	LOEC	Lotufo (1997)
	52000	non	invertébré	Schizopera knabeni	reproduction 14 jours	LOEC	Lotufo (1997)
	66600	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1997)
	69300	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)
	109500	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)
	261000	non	invertébré	Schizopera knabeni	survie 4 jours	NOEC	Lotufo (1997)
	297500	non	invertébré	Limnodrilus hoffmeisteri	Survie sur 10 jours	50 %	Lotufo et Fleeger (1996)
	514000	non	invertébré	Schizopera knabeni	survie 4 jours	LOEC	Lotufo (1997)
	524000	non	invertébré	Schizopera knabeni	survie 4 jours	50%	Lotufo (1997)
	43000-105000	non	invertébré	Nitocra lacustris	survie 10 jours	50%	Lotufo et Fleeger (1997)
	84000-349000	non	invertébré	Schizopera knabeni	survie 10 jours	50%	Lotufo et Fleeger (1997)

### 5.15.2.2 Données de génotoxicité

Le phénanthrène a été classé comme non carcinogène en raison de l'absence de données chez l'homme et de l'insuffisance de données expérimentales sur animaux.

Le phénanthrène a été testé partiellement dans deux études chez la souris par application cutanée et aucune tumeur n'a été reportée (Kennaway 1924; Roe and Grant 1964). Dans les 5 autres études où le phénanthrène a été testé sur peau dans un système initiation-promotion, il s'est révélé actif une fois comme initiateur, inactif comme initiateur dans quatre études, et inactif comme promoteur dans une étude (Salaman and Roe 1956; Roe 1962; Scribner 1973; Wood, Chang et al. 1979; Lavoie, Tulley-Freiler et al. 1981).

En injection intra-péritonéale chez la souris Swiss, le phénanthrène (0.25 mg) n'a pas provoqué d'apparition significative de tumeurs (Buening, Levin et al. 1979). Deux études par injection sous cutanée l'une chez la souris albinos avec 40 µg de phénanthrène (Grant and Roe 1963) et l'autre chez la souris C57Bl avec une dose de 5mg (Steiner 1955) n'ont pas provoqué non plus d'apparition de tumeurs.

Dans les tests d'altération de l'ADN, le phénanthrène s'est révélé négatif sur *Bacillus subtilis* et sur *Escherichia coli* (Rosenkrantz and Poirier 1979; McCarroll, Keech et al. 1981). Les tests de mutagenèse sur *Salmonella typhimurium* ont conduit à des résultats positifs (Oesch, Bucker et al. 1981; Sakai, Yoshida et al. 1985; Bos, Theuws et al. 1988) et négatifs (McCann, Choi et al. 1975; Kaden, Hites et al. 1979; Wood, Chang et al. 1979; Lavoie, Tulley-Freiler et al. 1981; Bos, Theuws et al. 1988).

Le test de recombinaison sur *Saccharomyces cerevisiae* (Simmon 1979) ainsi que différents tests d'altération de l'ADN sur cellules eucaryotes se sont révélés négatifs (Lake, Kropko et al. 1978; Probst, McMahon et al. 1981; Rice, Hosted et al. 1984). Un test de mutation sur cellules ovariennes de hamster chinois exposées à 1 µg/ml de phénanthrène a également conduit à des résultats négatifs (Barfknecht, Andon et al. 1981).

Le phénanthrène est également négatifs dans les tests d'échanges de chromatides sœurs et d'aberrations chromosomiques sur cultures de cellules de mammifères (Popescu, Turnbull et al. 1977) ainsi que dans les tests de transformations sur différents types de cellules de mammifères (Marquardt and Heidelberger 1972; Kakunaga 1973; Evans and DiPaolo 1975; Pienta, Poiley et al. 1977).

Le phénanthrène est métabolisé par les oxygénases à fonctions mixtes en diol époxydes réactifs (Nordqvist, Thakker et al. 1981; Vyas, Levin et al. 1982) qui se sont révélés être modérément mutagènes dans différents tests sur bactéries et sur cellules de mammifères (Wood, Chang et al. 1979).

### 5.15.3 Seuils de qualité existants

Eau : 0,3 µg/L (RIVM) ; 6,3 µg/L (Suter)

Sédiments : 0,51 mg/Kg (RIVM)

### 5.15.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,1	1,7	27	410
Sédiment	50	500	7500	110 000

## 5.16 PYRENE

### 5.16.1 Résultats obtenus au laboratoire

CL50 48h *Daphnia magna* : 24,6 µg/L. On note une évolution importante de la toxicité avec le temps qui semble indiquer un phénomène de bioaccumulation en cours d'essai.

CE<sub>10</sub> sur *Pseudokirchneriella subcapitata* : 1,2 µg/L.

CE<sub>10</sub> sur *Ceriodaphnia dubia* : 2,1 µg/L

Pas d'effet mutagène détecté sur *Salmonella typhimurium* souche TA 98 et TA 100 en dessous du seuil de solubilité de 2,89 mg/L.

### 5.16.2 Données bibliographiques

#### 5.16.2.1 Données d'écotoxicité

CE<sub>10</sub> 24h *Daphnia magna* : >1024 µg/L

Phototoxique : énergie de transition HOMO-LUMO = 7.2 eV

Compartiment	Concentration (µg/L ou µg/kg)	Multicontamination ?	Type d'espèce	Organisme	Variable mesurée	Niveau d'effet	Références de l'article
eau	500	non	plante	Lemna gibba	croissance	NOEC	Ren et al. (1994)
	1200	non	poisson	Pimephales promelas	survie 24h	50%	Kagan et al. (1987)
	2152	non	bactérie	MUTATOX	MUTATOX	LOEC	Klamer et al. (1997)
	16000	non	plante	Lemna gibba	croissance	50%	Ren et al. (1994)
	>1024	non	invertébré	Daphnia magna	survie 24 heures	50%	Wernersson et Dave (1997)
sédiment	>8000	non	plante	Lemna gibba	croissance 8 jours	50%	Huang et al. (1995)
	33,8	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 28 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	216	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 12 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	330	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	LOEC	French et al. (1996)
	350	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie sur 4 jours	50 %	Swartz et al. (1988)
	688	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 7 jours	50%	Roberts et al. (1989)
	756	oui	poisson	Leiostomus xanthurus	survie 24 heures	50%	Roberts et al. (1989)
	28800	oui	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)
	59100	non	invertébré	Limnodrilus hoffmeisteri	Production de progéniture sur 28 jours	25 %	Lotufo et Fleeger (1996)
	84300	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	50%	Swartz et al. (1997)
	121000	non	invertébré	Rhepoxynius abronius	survie 10 jours	NOEC	Swartz et al. (1997)
	226000	non	invertébré	Lumbriculus variegatus	evitement du sédiment sur 7 jrs	50 %	Kukkonen et Landrum (1994)
	269000	non	invertébré	Lumbriculus variegatus	survie 7 jrs	83 %	Kukkonen et Landrum (1994)
841000	non	invertébré	Limnodrilus hoffmeisteri	Survie sur 10 jours	NOEC	Lotufo et Fleeger (1996)	
<2,1	oui	poisson	Pleuronectes vetulus	adduits ADN (5 semaines)	NOEC	French et al. (1996)	

### 5.16.2.2 Données de génotoxicité

Le pyrène a été classé comme non carcinogène en raison de l'absence de données chez l'homme et de l'insuffisance de données expérimentales sur animaux.

L'effet carcinogène du pyrène a été testé dans plusieurs expérimentations par application cutanée chez la souris, aucune tumeur n'a été observée (Badger, Cook et al. 1940; Salaman and Roe 1956; Scribner 1973; Horton and Christian 1974; Van Duuren and Goldschmidt 1976). En injection sous cutanée, le pyrène n'a pas provoqué d'apparition de tumeur chez la souris lors d'un suivi sur 18 mois (Shear and Leiter 1941).

Le pyrène n'est pas mutagène dans les tests d'altération de l'ADN sur *Escherichia coli* et sur *Bacillus subtilis* (Ashby and Kilbey 1981). Dans les tests bactériens sur *Salmonella typhimurium*, des résultats positifs (Kaden, Hites et al. 1979; Bridges, McGregor et al. 1981; Kinae, Hashizume et al. 1981; Matijasevic and Zeiger 1985; Sakai, Yoshida et al. 1985; Bos, Theuws et al. 1988) mais aussi des résultats négatifs (McCann, Choi et al. 1975; LaVoie, Bedenko et al. 1979; Ho, Clark et al. 1981; Bos, Theuws et al. 1988) ont été

reportés. Le pyrène induit des mutations géniques chez la levure (De Serres, Hoffman et al. 1981) mais n'a pas d'effet chez la drosophile (Valencia and Houtchens 1981).

Les résultats des tests in vitro sur cellules de mammifères sont ambigus et dépendent également du protocole et de la mesure finale retenus. Dans une étude en collaboration, le pyrène est positif pour le test d'échanges de chromatides sœurs sur cellules CHO (Evans and DiPaolo 1975). Par contre, deux autres laboratoires rapportent des résultats négatifs aussi bien pour le test d'échanges de chromatides sœurs que pour le test d'aberrations chromosomiques sur cellules CHO (Brookes and Preston 1981). Le pyrène n'induit pas d'échanges de chromatides sœurs sur des cellules épithéliales de foie de rat (Tong, Brat et al. 1981). En revanche il est positif dans le test de mutation sur cellules de lymphomes de souris L5178Y (Jotz and Mitchell 1981).

Le pyrène n'induit pas d'aberrations chromosomiques ou d'échanges de chromatides sœurs dans les cellules de la moelle osseuse après injection intra-péritonéale sur diverses souches de souris (Purchase and Ray 1981). Les résultats des tests de transformation sur différents types de cellules ont donné des résultats négatifs (Chen and Heidelberger 1969; DiPaolo, Donovan et al. 1969; DiPaolo, Takano et al. 1972; Kakunaga 1973; Evans and DiPaolo 1975; Pienta, Poiley et al. 1977; Casto 1979).

### 5.16.3 Seuils de qualité existants

### 5.16.4 Seuils calculés par cette étude

En µg/L ou µg/Kg	Seuil 1	Seuil 2	Seuil 3	Seuil 4
Eau	0,02	0,4	5,8	91
Sédiment	50	500	7500	110 000

