

# **Biodisponibilité des HAP dans le bassin de la Seine et influence des matières organiques du milieu.**

Catherine Lorgeoux<sup>1</sup>, Catherine Gourlay<sup>2</sup>, Catherine Bollaert<sup>1</sup> et Jean-Marie Mouchel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>. Cereve. ENPC, 6-8, avenue Blaise Pascal, Cité Descartes, 77455 MARNE LA VALLEE Cedex

<sup>2</sup>. Cemagref, HBAN, Parc de Tourvoie, BP 44 92163 ANTONY Cedex

Le carbone organique dissous joue potentiellement un rôle important sur la biodisponibilité des contaminants organiques hydrophobes. En travaillant avec des acides humiques notamment, de nombreux auteurs ont montré que l'impact des contaminants organiques hydrophobes, et des HAP en particulier, était considérablement réduit en présence de matières organiques dissoutes. Ainsi, la mesure des concentrations de contaminants dissous ne suffit pas pour évaluer les risques encourus par la plupart des organismes pour lesquels la voie principale pour la captation des contaminants organiques est le contact direct des branchies en particulier avec l'eau.

Pour étudier cette question, nous avons utilisé deux voies d'approches parallèles : (i) un travail réalisé avec des daphnies, au laboratoire, pour mesurer la quantité d'un HAP (le benzo(a)pyrène, BaP) fixée par les daphnies au cours d'essais de courte durée en présence de diverses concentrations et divers types de matières organiques et (ii) une approche in situ pour laquelle des SPMD ont été utilisées pour mesurer les HAP disponibles (i.e. non fixés sur de la matière organique). Les SPMD sont réputées mimer les membranes biologiques en ce qui concerne leur capacité à laisser passer les contaminants organiques hydrophobes. En utilisant les daphnies comme modèle biologique, nous avons vérifié également que cette propriété était raisonnablement vérifiée pour un ensemble de molécules organiques dissoutes modèle, et pas seulement pour des acides humiques, les plus généralement étudiés.

## **1. Influence des Matières organiques sur la biodisponibilité des HAP : évolution au cours de leur biodégradation**

Au laboratoire, nous avons cherché à évaluer l'impact de matières organiques de milieux anthropisés sur la biodisponibilité des HAP. Ces MO diffèrent des MO naturelles par leur origine, leur composition et leur biodégradabilité. Elles sont en général moins hydrophobes, et sont susceptibles d'évoluer dans le milieu. Leur évolution peut entraîner une variation dans leur capacité à moduler la biodisponibilité des contaminants.

Nous avons ainsi cherché à obtenir des MO de biodégradabilité décroissante, provenant d'un même substrat initial et d'analyser leur influence sur la biodisponibilité du benzo[a]pyrène (BaP). Le BaP a été choisi comme molécule-modèle pour cette étude de laboratoire. La biodisponibilité a été évaluée par des mesures de bioaccumulation dans *Daphnia magna*, petits crustacés de la colonne d'eau. L'influence sur la biodisponibilité du BaP des matières organiques particulières (MOP) a aussi été étudiée. Le rôle des particules est en effet double, puisque les MOP sont susceptibles à la fois de fixer les HAP et donc de protéger les organismes, mais aussi d'être un vecteur de la contamination via l'ingestion.

### **1.1. Matériels et méthodes**

L'étude s'est déroulée en deux étapes : nous avons d'abord étudié uniquement la MOD, afin de ne considérer que l'accumulation par contact direct et d'éviter la bioaccumulation par voie trophique. Puis nous avons pris en considération l'influence de la MOP sur la biodisponibilité, et par conséquent pris en compte la contamination via l'ingestion de particules.

### 1.1.1 Matières organiques utilisées

Deux substrats ont été testés. Ils ont été choisis comme modèles de MO présentes dans les eaux anthropisées : rejets domestiques et MO produite lors des phénomènes d'eutrophisation :

- matières organiques algales (modèle de MO autochtone) provenant de la souche *Pseudokirchneriella subcapitata*. Pour l'étude du compartiment dissous, les extraits d'algues ont été obtenus après lyse de cellules par passage à l'autoclave.
- matières organiques issues de la dégradation d'un substrat mimant un effluent domestique (Viandox dilué). Le Viandox est un « jus de viande » de synthèse, composé principalement de sucres et de protéines. C'est un substrat dont la dégradation est proche de celle des eaux usées domestiques ((Tusseau-Vuillemin et al., 2002)).

#### Etude de la MOD

Pour obtenir des MOD de biodégradabilités décroissantes, environ cinq litres de substrat ont été inoculés avec quelques mL de boues de station d'épuration. La biodégradation a été suivie en réacteur thermostaté. Le réacteur a été échantillonné régulièrement. Les échantillons issus du réacteur à différents temps de dégradation étaient filtrés et utilisés pour l'analyse de l'influence de la MOD sur la bioaccumulation du benzo[a]pyrène. De plus, leur aromaticité était évaluée par mesure de l'absorption spécifique à 254 nm (SUVA).

#### Etude de la MOP

Pour l'étude de l'influence de la MOP, des algues fraîches et des MOP d'origine bactériennes ont été utilisées. Les algues provenaient de la culture de *S. capricornutum* maintenue au laboratoire, alors que les échantillons d'origine bactérienne provenaient du réacteur contenant du Viandox en cours de dégradation. Dans ce dernier cas, la MO était donc constituée de bactéries de boues activées, de biomasse détritique et du substrat initial en cours de dégradation ; deux prélèvements ont été effectués : le 3<sup>ème</sup> jour et le 7<sup>ème</sup> jour de la dégradation.

Plusieurs raisons justifient de travailler sur des substrats modèles plutôt que des matrices réelles :

- intérêt d'avoir des expériences reproductibles
- intérêt de séparer les deux sources de matière organique, algale et urbaine
- nécessité d'avoir des MO non contaminées par des produits pouvant induire des effets toxiques direct sur les organismes biologiques (métaux lourds ou ammonium dans les eaux de STEP par exemple)
- besoin d'avoir des solutions concentrées en carbone organique pour pouvoir effectuer des dilutions dans les milieux d'exposition tout en ayant des teneurs en COD ou COP assez élevées (de l'ordre de 10mg/L de COD) pour observer un effet sur l'accumulation.

### 1.1.2 Expériences de bioaccumulation dans *Daphnia magna*

L'influence de la MO sur la biodisponibilité a été évaluée en comparant l'accumulation du BaP dans les daphnies dans des milieux contenant ou non des MO et toujours 1 µg/L de BaP, suivant un protocole développé et validé au laboratoire (Gourlay et al., 2003). Pour chaque type de MO, entre 5 et 7 milieux avec des concentrations de MO différentes sont préparés. Les concentrations maximales en CO sont de 30 mg/L. La durée d'équilibration entre MO et HAP avant exposition a été fixée à une heure. L'exposition dure 4 heures, durée assez faible pour éviter au maximum l'évolution des MO dégradables au cours de l'exposition.

Après exposition, les HAP bioaccumulés sont extraits par ultra-son dans un solvant organique, et les HAP extraits sont mesurés par spectrofluorimétrie. Nous avons pu montrer ((Gourlay et al., 2002)) que l'intensité maximale du pic de fluorescence (notée  $F$ ) permet l'estimation du BaP bioaccumulé.  $F_0$  étant l'intensité de fluorescence de l'extrait de daphnies exposé dans un milieu sans MO, le rapport  $F/F_0$  est utilisé comme mesure relative de la bioaccumulation.

### 1.1.3 Quantification de l'effet de la MO sur la biodisponibilité

#### En présence de MOD uniquement

Pour quantifier l'effet de la MOD sur la bioaccumulation dans les daphnies, nous avons repris le modèle du polluant libre ((Kukkonen et al., 1990)) selon lequel le facteur de bioconcentration ( $BCF$ ) est proportionnel à la fraction libre du BaP :

$$BCF_{MOD} = \frac{1}{1 + K_{DOC}[COD]} BCF_0 \quad \text{Équation 1}$$

Par analogie, nous définissons un coefficient de partition estimé *biologiquement*,  $K_{DOC}(biol)$ , à partir du rapport des hauteurs des pics de fluorescence  $F$  mesurées avec ( $F$ ) et sans MO ( $F_0$ ).

$$\frac{F}{F_0} = \frac{1}{1 + K_{DOC}(biol).[COD]} \quad \text{Équation 2}$$

Ainsi,  $K_{DOC}(biol)$  est estimé par régression non linéaire des données  $F/F_0$  en fonction du COD.

#### En présence de MOD et de MOP

Les résultats de bioaccumulation en présence de MOD et MOP ont été interprétés en supposant une cinétique d'accumulation du premier ordre par contact direct (HAP supposés dissous libres) et voie trophique (HAP fixés sur les particules ingérées) :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u C_{libre} + k_i C_{MOP} - k_d C_{org} \quad \text{Équation 3}$$

En supposant que le BaP dans le milieu est réparti à l'équilibre entre les formes libre, fixée sur les MOD (coefficient de partition  $K_{DOC}$ ) et fixée sur les MOP (coefficient de partition  $K_{POC}$ ), le rapport des concentrations bioaccumulées en présence ou non de matière organique s'exprime donc en fonction de constantes de partition  $K_{DOC}$ ,  $K_{POC}$  et des coefficients d'accumulations par contact direct ( $k_u$ ) et par voie trophique ( $k_i$ ) :

$$\frac{C_{daph,OM}}{C_{daph,0}} = \frac{F}{F_0} = \frac{1 + \frac{k_i}{k_u} K_{POC}[COP]}{1 + K_{DOC}[COP] + K_{POC}[COP]} \quad \text{Équation 4}$$

De façon similaire à l'étude du compartiment dissous, une régression non linéaire permet, à partir du rapport  $F/F_0$ , d'estimer  $K_{POC}(biol)$  et  $K_{DOC}(biol)$ , ainsi que le rapport des constantes d'accumulation par voie trophique et par contact  $k_i/k_u$ .

Les régressions non linéaires ont été effectuées à l'aide du logiciel XLStat, fonctionnant avec Excel. Il utilise la méthode de Levenberg-Marquadt. L'algorithme d'optimisation permet aussi de calculer les écart-types locaux sur les paramètres optimisés à partir des dérivées secondes de la fonction (en supposant la distribution des erreurs pour les données gaussienne),

## 1.2. Résultats

### 1.2.1 Dégradation des matières organiques en réacteur

Les profils de dégradation des deux substrats sont similaires (Figure 1). Après un palier, attribuable à l'adaptation des boues activées au substrat et à l'initialisation du processus de dégradation, la décroissance du COD est très rapide, et coïncide avec la croissance du COP et de la consommation d'oxygène. Cette phase correspond à la biodégradation de la matière organique rapidement dégradée couplée à une forte croissance bactérienne, observable par l'augmentation du COP et de la consommation d'oxygène.

Après cette phase de dégradation rapide, la consommation d'oxygène chute, la diminution du COD devient plus lente et le COP diminue. Cette deuxième phase correspond à la biodégradation des MOD plus lentement dégradables, et à la mortalité et au recyclage des bactéries. L'activité bactérienne engendre une nouvelle forme de MOD, les produits microbiens solubles (« soluble microbial products », SMP) , issus de la lyse des bactéries et de leur activité enzymatique. Les bactéries hétérotrophes s'alimentent de ces SMP et des matières organiques du substrat plus lentement biodégradables.

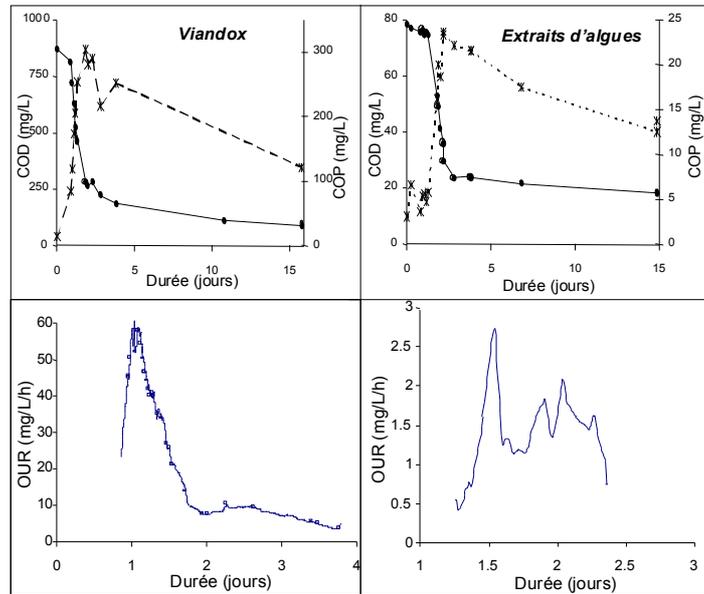


Figure 1 : dégradation du Viandox (gauche) et des extraits d'algues (droite): évolution des teneurs en carbone et de la consommation d'oxygène par les bactéries hétérotrophes (OUR)

#### Aromaticité des matières organiques dissoutes

Le suivi de l'aromaticité des MOD des eaux usées domestiques en cours de dégradation a confirmé que les rejets urbains devenaient de plus en plus aromatiques au fur et à mesure de leur dégradation (Figure 2). La même tendance a été observée avec le Viandox, ce qui renforce par ailleurs la similitude entre cet effluent artificiel et une vraie eau usée.

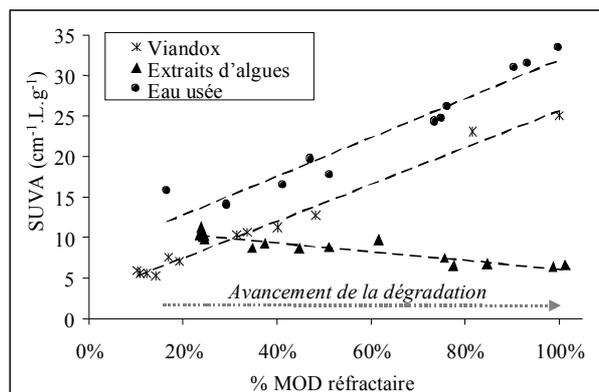


Figure 2 : Evolution de l'absorbance spécifique UV (SUVA) des MOD en fonction de leur origine et de leur état de biodégradation. En abscisse est indiquée la fraction réfractaire restant au fur et à mesure de biodégradation (issu de (Gourlay et al., in press)).

Au contraire, l'absorbance spécifique des extraits d'algues est très faible et diminue légèrement au cours de la biodégradation (Figure 2). Ces observations confirment le caractère peu aromatique de la MOD d'origine autochtone (Zumstein et Buffle, 1989; Imai et al., 2001). La très

faible absorbance des molécules algales réfractaires est en partie attribuable à la présence des molécules aliphatique peu dégradables issues des parois algales (Allard et al., 1998).

Les valeurs obtenues dans les réacteurs sont comparables aux SUVA mesurés pour les MOD issues du bassin versant de la Seine. Ainsi, nous avons pu mesurer la MO sur le bassin versant forestier de l'Orgeval était de  $32 \text{ cm}^1.\text{g.L}^{-1}$ , les valeurs de SUVA mesuré à Saint Maurice dans la Marne et à Andrésy dans la Seine, à l'aval de la STEP de Seine-Aval sont entre  $15$  et  $18 \text{ cm}^1.\text{g.L}^{-1}$ . (Tusseau-Vuillemin et al., 2003).

### 1.2.2 Influence des MOD sur la bioaccumulation

Pour les deux types de substrats, les matières organiques dissoutes fraîches ou dégradées réduisent significativement de plus de 20% la bioaccumulation de BaP par les daphnies à moins de 6 mg/L de COD (Figure 3)

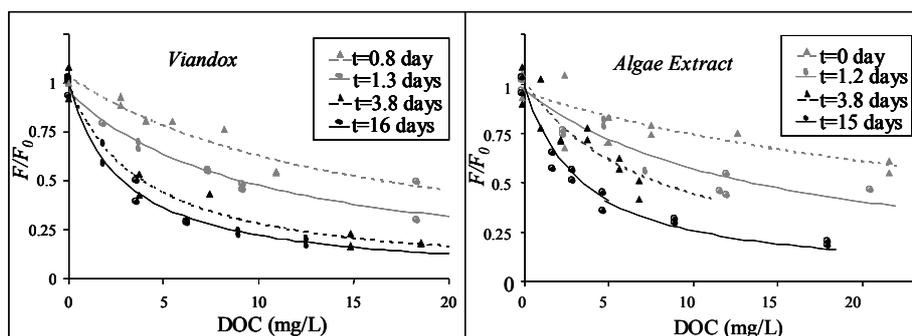


Figure 3 : bioaccumulation du benzo[a]pyrene dans *D. magna* en présence de MOD à différents temps de biodégradation.

De plus, la capacité à influencer la biodisponibilité du BaP augmente avec l'état de dégradation de la MOD (Figure 4). Les coefficients de partage  $K_{DOC(biol)}$  atteignent  $35 \times 10^4 \text{ L/kg}$  pour le Viandox dégradé et  $22 \times 10^4 \text{ L/kg}$  pour les algues (pour comparaison,  $K_{DOC(biol)}$  pour les acides humiques Aldrich a été estimé à  $67 \times 10^4 \text{ L/kg}$ ).

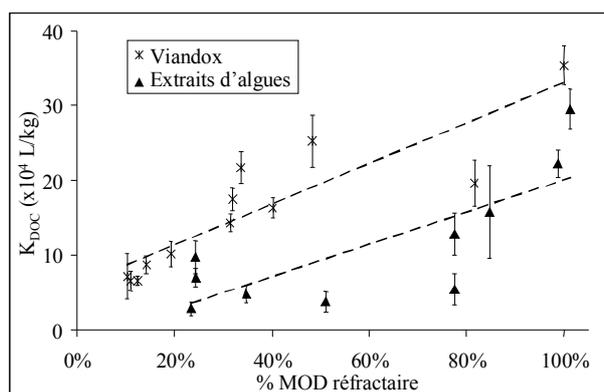


Figure 4 : Evolution de la capacité de la MOD à réduire la bioaccumulation ( $K_{DOC(biol)}$ ) en fonction de son origine et de son état de biodégradation (issu de (Gourlay et al., in press))

L'augmentation de l'affinité du BaP pour la MOD au cours de sa dégradation peut être expliquée par la relative résistance des macro-molécules hydrophobes ayant une grande capacité de fixation du BaP comparativement aux molécules plus petites, plus facilement dégradables, et fixant moins le BaP. Les SMP qui apparaissent au cours de la dégradation et peuvent expliquer l'augmentation des interactions. Nous avons montré que les SMP formés au cours de la biodégradation du glucose avaient une forte capacité à influencer la biodisponibilité du BaP ( $K_{DOC(biol)} = 25 \times 10^4 \text{ L/kg}$ ).

Nous n'avons pas pu montrer de relation univoque entre l'aromaticité de MOD et leur capacité à interagir avec le BaP. Pour les extraits algaux en particulier, nous obtenons une anti-corrélation entre  $K_{DOC}(biol)$  et  $SUVA$ . Ces résultats peuvent être attribués à la présence dans les extraits algaux réfractaires de sites hydrophobes propices aux interactions avec les HAP, tout en ne présentant pas de structure aromatique. Ces résultats sur des MOD confirment les observations déjà faites pour les matière organiques particulières extraites de végétaux et d'algues ((Chefetz et al., 2000; Salloum et al., 2002)) et montrent les limites des relations entre les coefficients de partage  $K_{DOC}$  et les caractéristiques d'aromaticité établies pour les substances humiques et les MOD des eaux naturelles ((Chin et al., 1997; Haitzer et al., 1999)).

### 1.2.3 Influence de la MOP

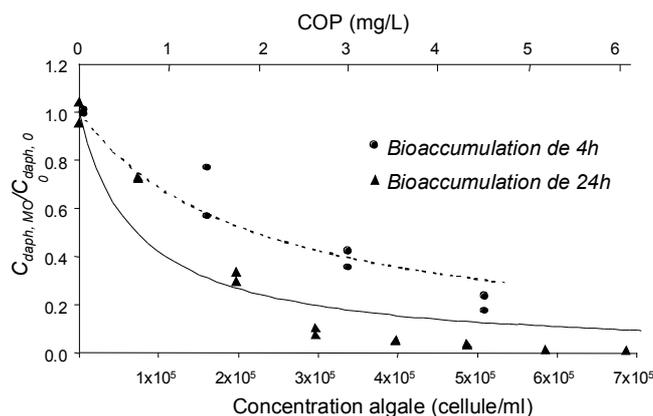


Figure 5 : bioaccumulation relative de BaP en présence de matière organique d'origine algale (issu de (Gourlay et al., in press))

La présence d'algues induit une forte diminution de la bioaccumulation (Figure 5) : la bioaccumulation sur 24 heures est diminuée de 99% en présence de  $6 \times 10^5$  cell/ml d'algues. Les algues étant par ailleurs quasi uniquement particulières ( $[COD] < 1$  mg/L), la fixation du BaP sur la MOD était négligée dans les essais conduits en présence d'algues.

Les échantillons provenant du réacteur contenant au départ du Viandox, contiennent finalement des MOD et des MOP. C'est pourquoi deux types d'essais de bioaccumulation (avec MOD seulement et avec des MO de l'ensemble de l'échantillon) ont été menés en parallèle, afin de pouvoir discerner l'influence des MOP de celle des MOD. Pour ces expériences, la présence de MOP accentue la diminution de bioaccumulation déjà observé en présence de MOD, comme le montre la Figure 6. Par exemple, la présence de 7,2 mg/L de COD induit une diminution de 45% de la bioaccumulation de BaP en 4 heures dans les daphnies. A partir de la même dilution de l'échantillon du réacteur non filtré, (qui amène 2,1 mg/L de COP dans le milieu), la diminution de la bioaccumulation atteint 69%.

Nous confirmons donc ici que la MOP joue un rôle de piège du BaP pour les daphnies.

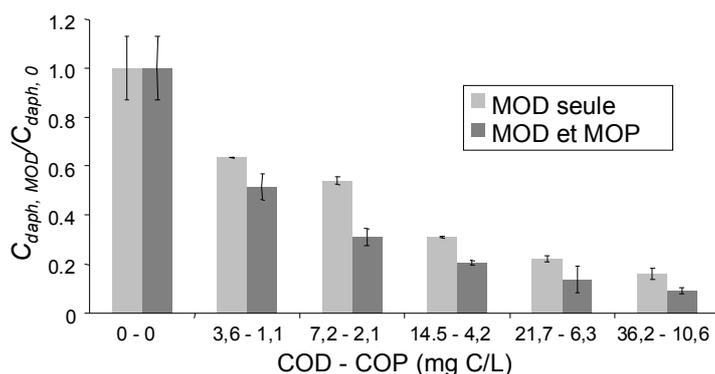


Figure 6 : bioaccumulation relative de BaP en présence de matière organique issue du réacteur dégradant du Viandox (3<sup>ème</sup> jour de dégradation). Gris clair : bioaccumulation en présence de MOD uniquement (dilution de l'échantillon filtré). Gris foncé : bioaccumulation en présence de MOD et de MOP (même dilution, échantillon brut) (issu de (Gourlay et al., in press))

Il a été possible d'estimer les coefficients de partage à partir des données de bioaccumulation. Les constantes de partition  $K_{POC(biol)}$  évaluées sont de  $16 \times 10^4$  et  $46 \times 10^4$  L/kg pour les MOP issues du réacteur dégradant du Viandox (essentiellement de la biomasse plus ou moins auto-lysée) et de  $49 - 149 \times 10^4$  L/kg pour les algues (selon que l'on considère l'accumulation en 4 heures ou 24 heures).

La minimisation des écarts au modèle a conduit à estimer une constante d'ingestion  $k_i$  nulle pour toutes les régressions. Ainsi, nos données couplées au modèle prédisent qu'il n'y a pas d'accumulation mesurable de BaP par voie trophique. Le suivi des concentrations en algues sur 24 heures montre cependant que les daphnies ingèrent les particules. Il semble donc que le BaP ingéré ne soit pas assimilé par l'organisme. Les expériences menées ne permettent pas cependant de comprendre les phénomènes physico-chimiques qui modulent la répartition du BaP dans le milieu et la toxico-cinétique du BaP au cours de la bioaccumulation. L'évolution des concentrations et de la qualité de la matière organique au cours de l'exposition, et la répartition du BaP dans ce milieu doivent être plus approfondies. Le rôle apparemment négligeable de la voie trophique doit aussi être confirmé.

### 1.3. Conclusion

La bioaccumulation du BaP est fortement influencée par des teneurs en matières organiques semblables aux concentrations environnementales de rivières ou de lacs. Nous avons montré une relation entre l'état de biodégradabilité des MO et leur capacité à moduler la biodisponibilité du BaP. Les constantes de partition  $K_{DOC}$  augmentent systématiquement avec le vieillissement de la matière organique. Après quelques jours de dégradation seulement, la capacité de la MO à interagir avec les POH se rapproche déjà de celle des acides humiques ou fulviques, alors que ces derniers se constituent sur des échelles de temps beaucoup plus élevées.

La démarche employée pour cette étude donne une vision macroscopique des relations entre répartition et biodisponibilité. La répartition du polluant dans le milieu n'y est pas abordée d'un point de vue chimique, mais elle permet une estimation des formes biodisponibles du polluant dans le milieu en tenant compte pour partie de l'évolution des caractéristiques des matières organiques. Un exemple d'application est illustré dans la Figure 7. La répartition du BaP entre les phases aqueuse, MOD et MOP est estimée dans différents milieux modèles à partir des coefficients de partage obtenus. Cet exemple illustre que, selon les caractéristiques, l'origine et les concentrations en MO dans le milieu, la biodisponibilité du BaP pour les daphnies peut varier très fortement : 1% seulement du BaP total est biodisponible dans le réseau d'assainissement alors que 20% est biodisponible dans une rivière en fin de bloom.

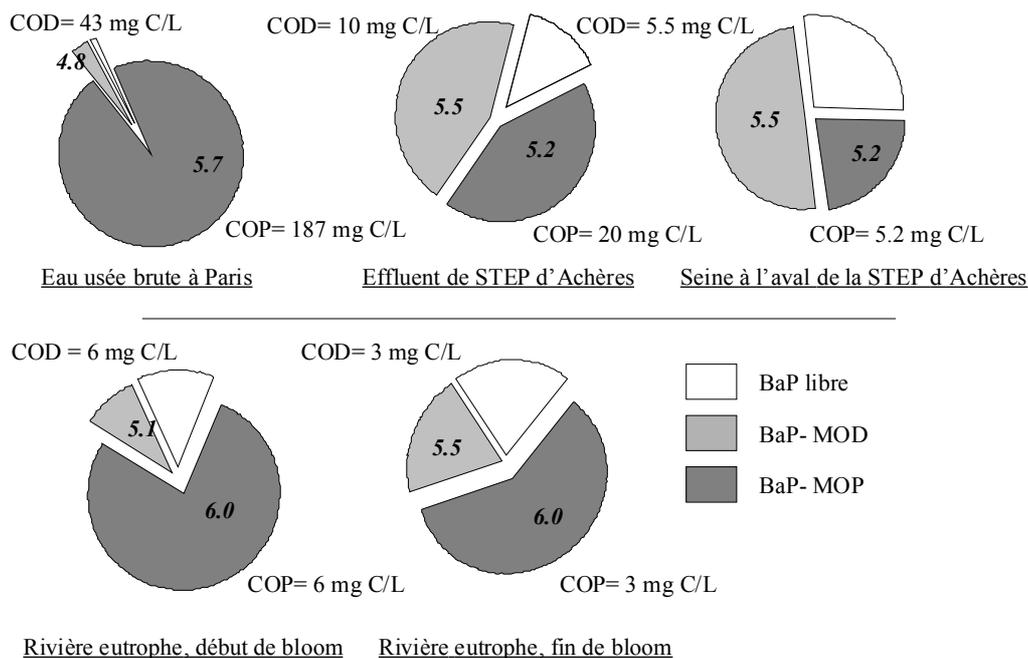


Figure 7 : répartition théorique du BaP entre les phases aqueuse, MOD et MOP, estimée à partir des coefficients de partition obtenus par les expériences de bioaccumulation. En italique sont indiquées les valeurs de  $\log K_{DOC}$  et  $\log K_{POC}$  utilisées pour l'estimation. Les concentrations en MOD et MOP dans les différents milieux sont indiquées et proviennent de (Garnier et al., 1998; Seidl et al., 1998; Servais et al., 1998; Tusseau-Vuillemin et Le Réveillé, 2001)

## 2. Les SPMD mesurent-ils les HAP biodisponibles ?

Les études destinées à évaluer la pertinence du SPMD comme « mime » de la bioaccumulation sont nombreuses. En effet, la technique SPMD est souvent comparée à l'analyse de la contamination des milieux par « biomonitoring ». Le biomonitoring consiste en la mesure des POH accumulés dans des organismes biologiques, soit prélevés directement dans le milieu, soit placés pour une durée fixée. La biodisponibilité des polluants est évaluée par cette méthode aux processus de détoxification près. Comme le SPMD, c'est une méthode d'échantillonnage intégrée.

Les critères de comparaison entre SPMD et bioaccumulation se situent au niveau de la capacité pour chaque accumulateur à accumuler les POH, en termes de cinétiques et de facteur d'accumulation à l'équilibre (BCF pour les organismes biologiques et « Device Concentration Factor », pour les SPMD). Les organismes les plus couramment comparés aux SPMD sont les moules, qui, comme les SPMD sont statiques dans le milieu et pour lesquelles les toxico-cinétiques sont lentes. Ces études comparatives sont faites en laboratoires ( par exemple (Kolok et al., 1996; Sabaliūnas et al., 1998)) ou, plus souvent, sur le terrain (Peven et al., 1996; Axelman et al., 1999; Granmo et al., 2000). Ces études montrent une bonne concordance générale entre les accumulations dans les SPMD et dans les organismes, bien que l'accumulation des POH dans le SPMD reste une très grande simplification des processus complexes de toxico-cinétiques qui peuvent avoir lieu dans le milieu aquatique.

Ces études de comparaison entre l'accumulation dans les SPMD et la bioaccumulation présupposent que les fractions de POH biodisponibles (par contact) et SPMD-disponibles sont identiques. A notre connaissance, cette hypothèse est uniquement basée sur la comparaison théorique entre la taille moyenne de pores du polyéthylène (entre 5 et 10 Å, (Huckins et al., 1990)) et une estimation de la taille des pores des organismes biologiques (Chiou, 1985).

Il nous a semblé important dans cette étude, de vérifier que les fractions accumulables dans les organismes et dans les SPMD étaient effectivement comparables (en se restreignant aux milieux où l'ingestion n'est pas une voie d'accumulation).

Ainsi, nous avons comparé l'accumulation de trois HAP (fluoranthène, pyrène et BaP) dans les deux systèmes en présence de MOD de plusieurs origines, l'objectif étant de tester si les fractions biodisponible SPMD-disponible sont les mêmes.

## 2.1. Matériels et méthodes

Cette étude a été menée en deux temps :

- Dans une première série d'expériences, la comparaison a été menée pour cinq MOD et trois HAP, et l'accumulation dans les daphnies et dans les SPMD ont été étudiées séparément.
- Pour la seconde série, seul le BaP a été utilisé, 4 MOD ont été testées, et SPMD et daphnies ont été exposées dans le même milieu.

### 2.1.1 Matières organiques et HAP utilisées :

#### Première série d'étude :

Cinq matières organiques ont été utilisées : trois MOD naturelles extraites de différentes rivières : Suwannee (Floride, E.U.), Gartempe et Appremont (France). Ces MOD ont été fournies par le Laboratoire Chimie de l'Eau et de l'Environnement de Poitiers. Le Viandox a aussi été utilisé, ainsi que les acides humiques commerciaux Aldrich.

#### Deuxième série d'étude :

Quatre MOD extraites du bassin de la Seine suivant le protocole de l'IHSS (Leenheer et al., 2000) ont été utilisées : 100 L d'eau ont été prélevées à Saint Maurice (Marne en amont de Paris, avril 2003) et à Andrésy (Seine, aval de Paris et de la STEP de Seine-aval, mai 2003). Les échantillons ont été filtrés et acidifiés, puis fractionnés par passage en série sur colonne XAD 8 et XAD 4. Les fractions hydrophobes (retenues sur XAD 8) et transphiliques (retenues sur XAD 4) des MOD ont été éluées par un mélange d'eau et d'acétonitrile. Les éluats ont été lyophilisés jusqu'à l'obtention de la MOD en poudre.

Pour toutes les expériences, les solutions de matières organiques sont préparées par dilution, puis éventuellement filtrées pour ne garder que la fraction dissoute (les MOP retenues alors sur le filtre représentent moins de 5% de l'ensemble de la MO). Les milieux d'exposition sont constitué d'eau d'Evian, de MOD et de HAP et sont laissés une heure au repos avant introduction des SPMD et/ou des daphnies. Les concentrations en MOD varient entre 0 et 20 mg/L de COD.

- Au cours de la première série l'expériences, les SPMD ont été exposés à un mélange de 5 HAP (fluoranthène, pyrène, benzo[a]pyrène, benzo[e]pyrène et benzo[k]fluoranthène), à environ 0,5 µg/L chacun. Les daphnies ont été exposées à un seul HAP à la fois. Seul le fluoranthène, le pyrène et le BaP ont été testés.
- Pour la seconde série d'expériences, seul le BaP a été étudié, à une concentration dans le milieu d'environ 0,8 µg/L dans le milieu d'exposition.

### 2.1.2 Comparaison des accumulations

Pour évaluer l'impact des MOD sur la biodisponibilité pour la daphnie,  $K_{DOC}(biol)$  est estimé après bioaccumulation de 4 heures, comme décrit précédemment.

Pour évaluer la « SPMD-disponibilité », des SPMD de petite taille ont été utilisés (5 cm de long, 2.5 cm de large, 0.05 ml de trioléine). Ils ont été fournis par Exposmeter (Suède). La durée d'exposition des SPMD a été de trois heures.

- Dans la première série d'expériences, chaque SPMD a été placé dans 500 ml d'Evian pur ou contenant 10 mg/L de COD. Deux répliqués ont été réalisés pour chaque mesure.

- Dans la deuxième série, les expositions de SPMD ont été également réalisées en duplicats, à 4 concentrations en MOD différentes (dont une sans MO). Pour ces expériences, 15 daphnies et une SPMD ont été exposés en même temps dans une solution de 500 ml.

Après exposition, les HAP accumulés dans les SPMD ont été extraits par dialyse (48 heures dans l'heptane) et analysés par HPLC.

De la même manière que pour la définition de  $K_{DOC}(biol)$ , on définit un coefficient de partage  $K_{DOC}(SPMD)$  entre les HAP disponibles pour l'accumulation dans la SPMD (que l'on suppose être les HAP dissous libres dans l'eau) et les HAP non disponibles (fixés sur les MOD).

$$K_{DOC}(SPMD) = \frac{[HAP-MO]_{nonSPMD-disp}}{[HAP]_{SPMD-disp} \cdot [COD]} \quad \text{Équation 5}$$

Dans un milieu contenant de la MO, la fraction SPMD-disponibles  $f_{SPMD-disp}$  peut s'écrire :

$$f_{SPMD-disp} = \frac{1}{1 + K_{DOC}(SPMD) \cdot [COD]} \quad \text{Équation 6}$$

Dans un milieu sans MO, tous les HAP sont disponibles. En supposant que les SPMD, de la même forme, ont toute la même constante d'accumulation  $k_u$ , la fraction SPMD disponible dans le milieu peut s'évaluer par le ratio des concentrations accumulées dans les milieux avec et sans MO :

$$\frac{C_{SPMD-MO}}{C_{SPMD-0}} = \frac{k_u \cdot C_{SPMD-disp} \cdot t}{k_u \cdot C_{total} \cdot t} = f_{SPMD-disp} = \frac{1}{1 + K_{DOC}(SPMD) \cdot [COD]} \quad \text{Équation 7}$$

Le rapport des teneurs en HAP accumulé dans les SPMD avec et sans MOD permet donc d'évaluer la constante de partition  $K_{DOC}(SPMD)$ .

Pour plus de lisibilité, nous avons choisi de représenter la capacité des MOD à réduire l'accumulation par un paramètre dérivé  $F_{10}$  défini par :

$$F_{10} = \frac{1}{1 + K_{DOC} \cdot 10^{-5}} \quad \text{Équation 8}$$

$F_{10}(biol)$  et  $F_{10}(SPMD)$  représentent les fractions de HAP disponibles pour les daphnies et les SPMD respectivement en présence de 10 mg/L de COD. Plus  $F_{10}$  est petit (i.e. plus  $K_{DOC}$  est grand), plus la MOD joue un rôle de piège des contaminants et réduit l'accumulation.

La comparaison des fractions  $F_{10}(biol)$  et  $F_{10}(SPMD)$  permet de vérifier si le SPMD reproduit le processus de bioaccumulation dans les daphnies. Un test de Student bilatéral est utilisé pour vérifier si les différences entre  $F_{10}(biol)$  et  $F_{10}(SPMD)$  sont significatives.

## 2.2. Résultats et discussion

### 2.2.1 Comparaison des fractions accumulées

L'ensemble des résultats est présenté dans la Figure 8. Les fractions accumulées dans les deux modèles, biologique et SPMD, sont proches pour le benzo[a]pyrène et pour le pyrène. Les différences entre les fractions de HAP disponibles n'excèdent pas 26% (pour le BaP et les MOD hydrophobes de la Marne) et sont en moyenne de 14%. Elles sont significatives dans 4 cas sur 12, en partie du fait du très faible écart-type sur les mesures dans les SPMD. Les différences significatives observées correspondent à une différence de moins de 0,5 unité de  $\log K_{DOC}$ , unité généralement utilisée pour comparer les constantes de partition. Cette différence reste minime compte tenu des incertitudes liées au protocole expérimental, aux mesures, et aux régressions mathématiques.

Les fractions sont en revanche assez différentes pour le fluoranthène. On constate que la fraction SPMD-disponible est significativement plus faible que la fraction biodisponible pour la daphnie. Ainsi, la présence de 10 mg C/L de Viandox n'influence pas la bioaccumulation du fluoranthène dans la daphnie alors qu'elle réduit de 37% l'accumulation dans le SPMD. Il semble donc que le SPMD sous-estime la fraction biodisponible du fluoranthène, bien que ces résultats nécessitent une confirmation sur d'autres matières organiques.

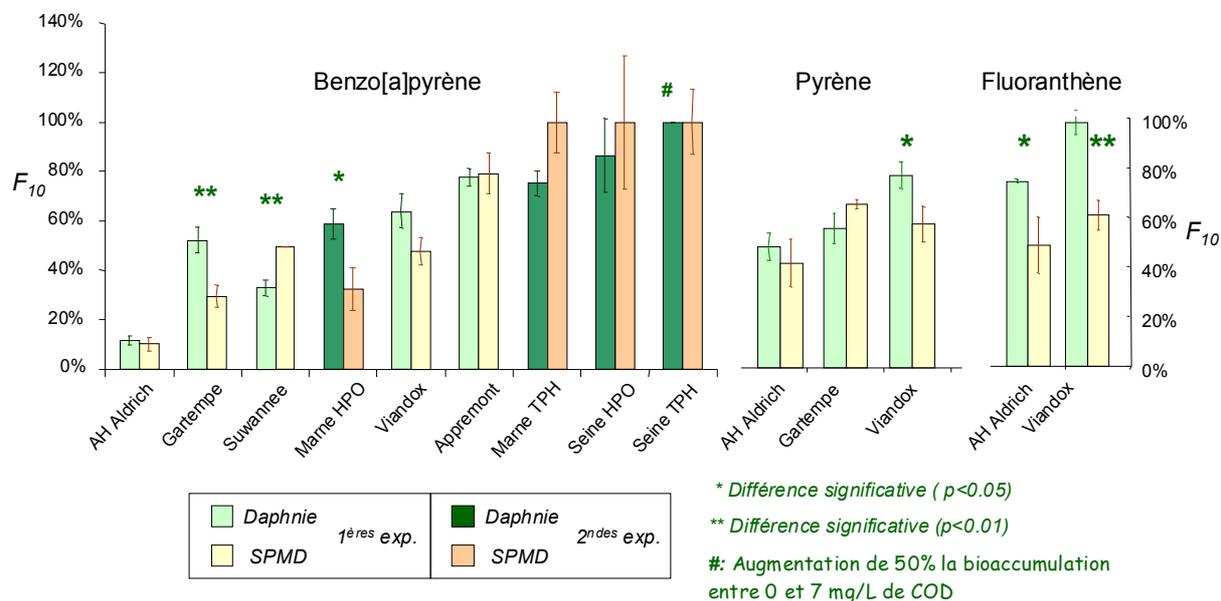


Figure 8 : Fraction de HAP accumulée par les SPMD et par les daphnies en présence de 10 mg/L de COD ( $F_{10}$ )

Sur l'ensemble des 14 points de comparaison, la fraction SPMD-disponible correspond à la fraction biodisponible à moins de 25 % près dans 11 cas et le SPMD sous-estime de plus de 25% la biodisponibilité dans 3 cas. L'erreur maximale sur  $F_{10}$  est de 37%, pour le fluoranthène.

La sous-estimation que l'on observe peut être due à un critère de taille des membranes des « accumulateurs ». Certains complexes peuvent traverser les membranes biologiques et ne pas être disponibles pour le SPMD, la membrane du SPMD est plus restrictive que les membranes biologiques. Une autre hypothèse peut être la limitation de l'accumulation par la présence de MOD, qui occupe les pores de la membrane du SPMD, réduisant ainsi la cinétique d'accumulation. Enfin, la différence peut être due au caractère plus ou moins « labile » de certains HAP fixés faiblement sur les MOD, qui seraient désorbés au contact de la membrane biologique, mais resteraient inaccessibles pour le SPMD. Dans le cas des métaux, il a déjà été montré que la capacité de dissociation des complexes métaux-MOD, et par conséquent leur disponibilité pour les organismes vivants ou les échantillonneurs passifs dépendaient de la durée de contact et de la nature des membranes (biologiques ou physiques) ((Tusseau-Vuillemin et al., 2003)). Ces mêmes paramètres pourraient être à l'origine des différences d'accumulation entre les daphnies et les SPMD. Les expériences réalisées ici ne permettent pas de discriminer entre les différentes hypothèses. De plus, les écarts entre SPMD et daphnies restent limités.

### 2.2.2 Variabilité de $F_{10}$ selon l'origine de la matière organique.

Les résultats concernant le benzo[a]pyrène permettent de mettre en évidence la forte variabilité de la capacité à moduler la disponibilité du POH selon la nature de la MO. Pour une même concentration en COD, les acides Aldrich réduisent de 90% l'accumulation dans les daphnies et les SPMD, alors que les acides humiques issus de la Seine à l'aval de la station d'épuration Seine-Aval n'ont pas d'effet sur la disponibilité du BaP pour les daphnies ou les SPMD.

D'une manière générale, les matières organiques naturelles et humiques ont un effet plus important que les matières organiques plus hydrophiles, comme les fractions transphiliques des MOD

du bassin versant de la Seine. Le Viandox, largement biodégradable mais qui contient aussi des sites de fixation pour le BaP présente une effet intermédiaire entre les MO naturelles très humiques et les MOD issues de rivières anthropisées.

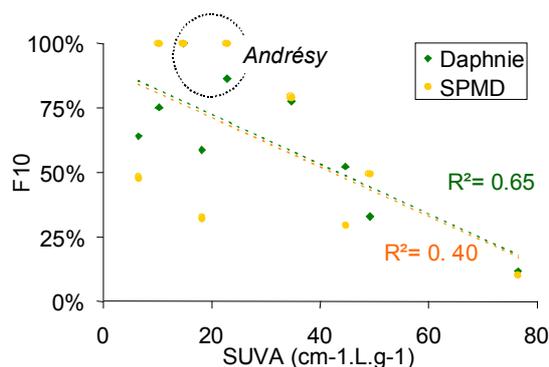


Figure 9 : Relation entre les  $F_{10}$  pour chaque accumulateur et l'aromaticité des MOD.

Il n'est aujourd'hui pas possible de donner des explications précises sur ces effets, car les modes d'interactions des HAP avec la MOD sont nombreux et cette dernière très complexe dans sa composition. Comme le montre la Figure 9, l'aromaticité des MO ne peut par vraiment expliquer les variabilités observées entre les différentes MOD. Des travaux sont en cours (au Cemagref de Lyon notamment) pour tenter de mieux appréhender ces facteurs explicatifs, en allant au delà de critères trop globaux tels que l'aromaticité

### 2.3. Conclusion

Cette étude montre une raisonnablement bonne corrélation entre la fraction SPMD-disponible et la fraction biodisponible pour les daphnies pour les deux HAP les plus lourds, le pyrène et le benzo [a]pyrène. Dans quelques cas, pour le fluoranthène en particulier, la SPMD sous-estime la fraction biodisponible, la fraction de HAP échantillonnée étant plus restrictive. L'erreur faite en estimant la biodisponibilité par une mesure SPMD en présence de 10 mg/L de COD est de moins de 25% dans 11 cas sur 14. Dans tous les cas, elle est inférieure à 40%.

Ces divergences nous paraissent acceptables compte tenu des variabilités dans les estimations des constantes de partition, et de la difficulté de pouvoir estimer la biodisponibilité in situ.

## 3. Application des SPMD dans le bassin de la Seine

Ils ont été déployés en 6 stations dans le bassin de la Seine, à l'exutoire de bassins versants de superficie très différentes, depuis une partie du bassin versant de l'Orgeval jusqu'à la station d'Andrésy, en rive gauche, qui représente essentiellement le bassin de la Seine à l'amont de sa confluence avec l'Oise (Figure 10)

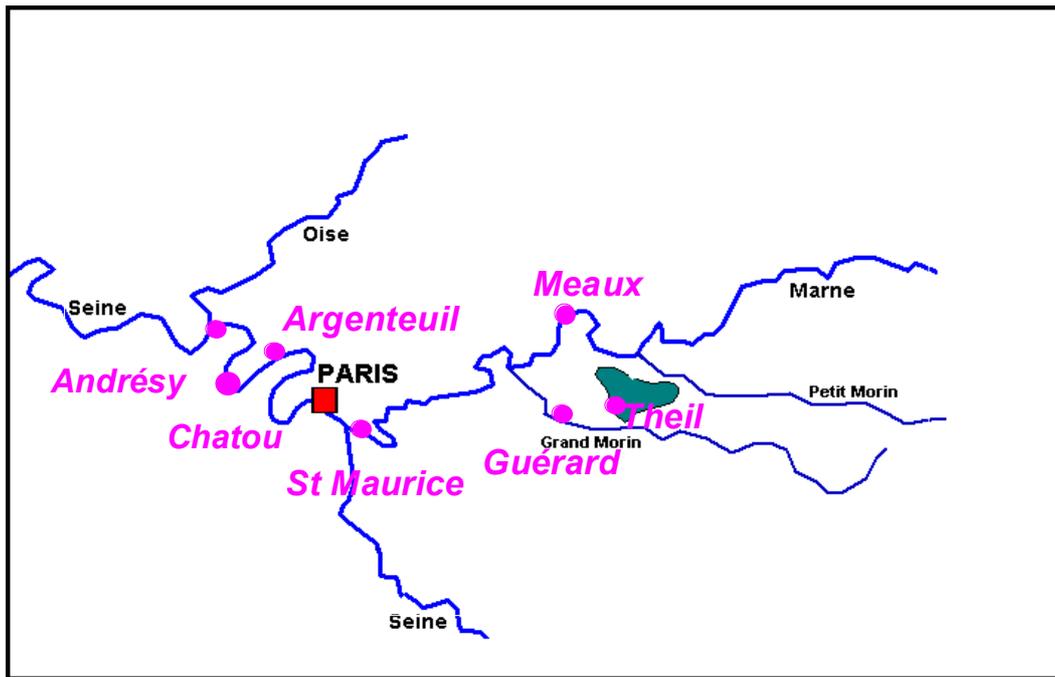


Figure 10 : Positionnement des stations d'échantillonnage dans le bassins de la Seine pour les campagnes SPMD.



Figure 11 : Exemples de positionnement de SPMD. A Andrésy, à gauche, à la point de l'écluse (vitesse lente) ou à l'amont du barrage (vitesse rapide). Au Theil, à droite, vue du site en haut, et vue des SPMD en place en bas

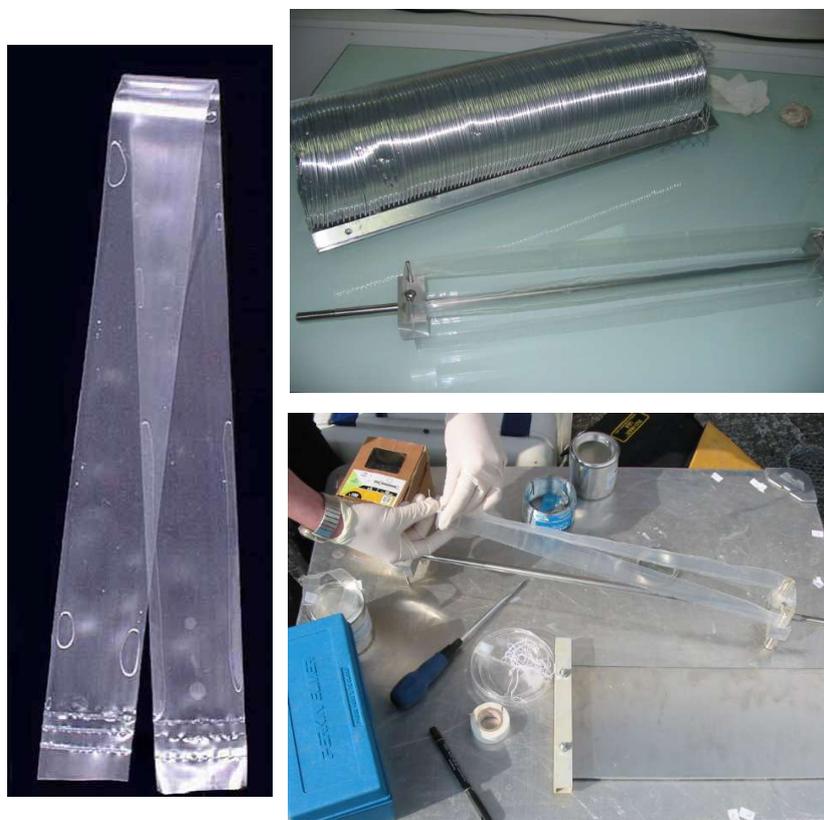
Les SPMD étaient implantés dans des cages cylindriques faites d'inox et d'aluminium. Les cages cylindriques, ouvertes aux deux extrémités, mais protégées par une grille, étaient placées dans

le sens du courant pour favoriser les échanges entre le SPMD et l'eau. Les cages étaient directement placées sur le fond au Theil, ou munies d'une dérive et suspendues à partir de perches quand la profondeur le permettait.

### 3.1. Rappels sur le fonctionnement des SPMD

Les systèmes SPMD (Figure 12) sont un système d'échantillonnage intégratif, composé d'une membrane en polyéthylène contenant une lipide (trioleïne) et qui fonctionne en dialysant le milieu externe (Huckins et al., 1993). Les SPMD sont des échantillonneurs passifs diffusifs. La trioleine ne peut pas franchir la membrane, et les HAP, comme la plupart des autres contaminants hydrophobes, diffusent vers la trioleine au travers de la membrane où ils peuvent se concentrer en fonction de leur hydrophobie. La trioleine est un lipide naturellement présent dans de nombreux organismes, ce qui a valu aux systèmes SPMD le surnom de "poisson artificiel".

Nous avons utilisé les SPMD avec des PRC (Permeability Reference Compounds) qui sont injectés dans la trioleine avant l'implantation des SPMD sur le terrain et dont on peut mesurer la vitesse de sortie vers l'eau du milieu au cours de l'exposition, pour lieux évaluer l'intensité des phénomènes de diffusion.



*Figure 12 : Un SPMD, la longueur totale est d'environ 1 mètre. Vue de la cage cylindrique utilisée pour les implanter in situ et du système d'installation des SPMD. Mise en œuvre sur le terrain (possible au laboratoire, en salle blanche, si l'implantation se fait dans la journée.*

Alors que le SPMD est utilisé pour évaluer la biodisponibilité, nous cherchons également dans ce travail à évaluer le rôle des matières organiques dissoutes sur la biodisponibilité. Les données obtenues grâce aux SPMD seront donc comparées à des données dissoutes et comparées aux teneurs en COD pour évaluer son rôle spécifique.

### 3.1.1 Modèle de diffusion simple

Théoriquement, en prenant un modèle d'accumulation simple, on peut simuler le comportement d'un SPMD par les équations suivantes en reprenant les notations proposées par Huckins et al. (1999) :

$$\frac{dC_{SPMD}}{dt} = k_u C_w - k_e C_{SPMD}$$

Toutes les concentrations, dans l'eau comme dans la SPMD sont données en ng.L<sup>-1</sup>.

A l'équilibre, on a :

$$\frac{C_{SPMD}}{C_w} = K_{SPMD} = \frac{k_u}{k_e}$$

En phase d'accumulation linéaire, soit lorsque  $k_u C_w \gg k_e C_{SPMD}$ , soit encore lorsqu'on est encore loin de l'équilibre on a :

$$\frac{dM_{SPMD}}{dt} = V_{SPMD} \frac{dC_{SPMD}}{dt} = V_{SPMD} k_u C_w = V_{SPMD} k_e K_{SPMD} C_w = R_S C_w,$$

ce qui définit  $R_S$ , qu'on peut considérer comme équivalent au volume d'eau échantillonné par le SPMD chaque jour. Attention, en réalité le processus physique n'est pas l'épuisement d'un volume d'eau chaque jour, mais un phénomène diffusif, et  $R_S$  dépend de nombreux facteurs, dont le composé hydrophobe accumulé.  $R_S$  dépend aussi de la température et de l'agitation.

En phase de désorption, en supposant les concentrations dans l'eau toujours nulles, ce qui est le cas des PRC, on a :

$$\frac{dC_{SPMD}}{dt} = -k_e C_{SPMD}$$

ce qui permet d'identifier facilement les valeurs de  $k_e$  à partir d'un suivi des concentrations en PRC au cours de l'exposition.

L'équation générale qui donne l'évolution au cours du temps d'un composé de concentration initialement nulle dans le SPMD est donnée par :

$$C_{SPMD} = C_w K_{SPMD} (1 - \exp(-k_e \times t)) \quad \text{Équation 9}$$

ce qui permet de retrouver la concentration disponible dans l'eau à partir d'une concentration mesurée dans le SPMD par :

$$C_w = \frac{C_{SPMD}}{K_{SPMD} (1 - \exp(-k_e \times t))} \quad \text{Équation 10}$$

### 3.1.2 Relation entre le coefficient d'échange et $K_{ow}$ .

Vrana et Schüürmann (2002) ont proposé un modèle à deux couches pour simuler la phénomène de diffusion de l'eau vers la trioleine. Ce modèle simule conceptuellement la fait que les HAP doivent traverser deux couches : une couche limite d'eau immobile à proximité du film plastique et le film plastique lui-même. En réalité, cette vision est simpliste d'une part parce que le film plastique lui-même fixe une partie importante des HAP, d'autre part parce que la trioleine, progressivement inondée par les HAP provenant de l'extérieur n'est pas forcément un milieu complètement homogène. Malgré ses imperfections, ce modèle rend compte du fait que deux facteurs limitants peuvent contrôler la vitesse de diffusion : la diffusion au travers de la couche limite aqueuse et la diffusion au travers du film plastique.

En état permanent le flux de diffusion peut s'écrire :

$$F = A \frac{\alpha_w \alpha_M K_{MW}}{\alpha_w + \alpha_M K_{MW}} \left( C_w^\infty - \frac{C_L}{K_{LW}} \right) = A \alpha_G \left( C_w^\infty - \frac{C_L}{K_{LW}} \right),$$

où  $K_{MW}$  et  $K_{LW}$  sont les coefficients de partage membrane-eau et lipide-eau respectivement,  $C_w^\infty$  est la concentration dans l'eau loin de la membrane et où  $C_L$  est la concentration dans la trioléine.  $\alpha_M$  et  $\alpha_w$  sont les coefficients de diffusion dans la membrane et dans l'eau.  $\alpha_G$  est le coefficient de diffusion global qui tend vers  $\alpha_w$  ou  $\alpha_M K_{MW}$  selon que le processus limitant est la diffusion au travers de la couche externe (couche limite aqueuse éventuellement colmatée par du biofilm) ou la membrane. Le  $K_{OW}$ , le coefficient de partage n-octanol-eau, est une propriété physique réputée connue pour presque tous les contaminants hydrophobes, elle caractérise leur hydrophobicité. L'idée générale est que lorsque  $K_{OW}$  croît (pour les molécules plus hydrophobes), le terme  $\alpha_M K_{MW}$  l'emporte sur le terme  $\alpha_w$  et que la diffusion dans la couche limite aqueuse devient limitante.

En identifiant au formalisme du paragraphe précédent, on obtient :

$$k_e = \frac{A \times \alpha_G}{V_{SPMD} \times K_{LW}} \text{ et } k_u = \frac{A \times \alpha_G}{V_{SPMD}}.$$

Comme  $K_{LW}$ , et  $K_{SPMD}$  sont positivement reliés à  $K_{OW}$ ,  $k_e$  devrait diminuer fortement avec le degré d'hydrophobie alors que  $k_u$  devrait être relativement constant, aux variations du coefficient de diffusion près. C'est effectivement ce que montrent au laboratoire Huckins et al. (1999) dans un article de référence (Figure 13).

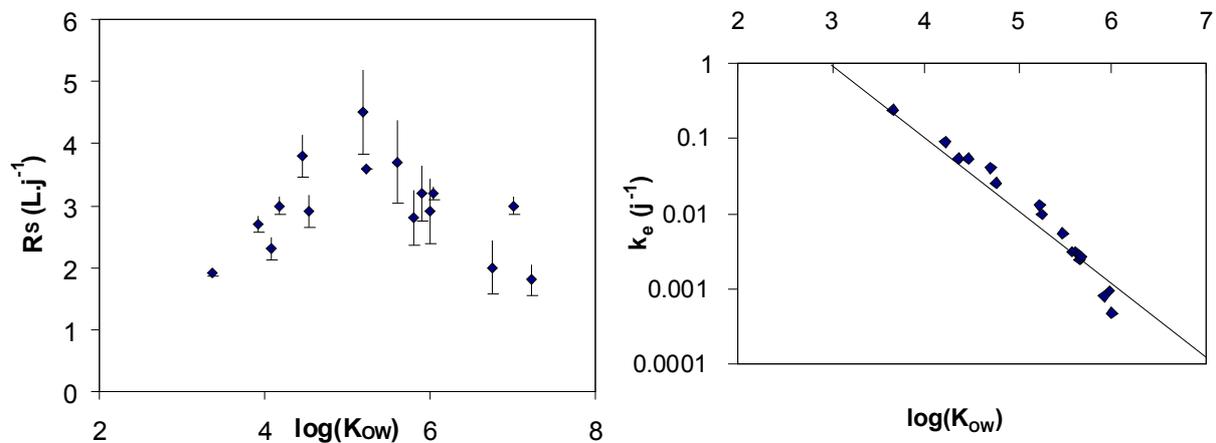


Figure 13 : Les  $R_s$  (proportionnels aux  $k_u$ , par définition) à 10°C au laboratoire (à gauche) et les  $k_e$  correspondants estimés à partir des valeurs de  $k_u$  et des constantes d'équilibre (à droite), selon Huckins et al. (1999). La droite tracée sur la figure de droite a pour pente -1.

### 3.2. Evaluation de la diffusion in situ

Les coefficients  $k_e$  peuvent être estimés à partir des cinétiques de disparition du PRC dans le SPMD lorsque qu'une étude cinétique est faite (plusieurs relevés de SPMD placés en parallèle au cours du temps). En l'absence d'étude cinétique spécifique, la procédure standard consiste à estimer directement le  $k_e$  à partir d'un seul point, soit la teneur en PRC restant en fin d'exposition. On observe bien (Figure 14) que les  $k_e$  sont plus faibles pour les composés les plus hydrophobes.

Pour une évaluation précise d'un  $k_e$  à partir de la mesure d'un traceur au bout d'un temps fixé (typiquement deux semaines), il faut que la variation de concentration soit forte pour qu'une différence puisse être mesurée, mais le ne fait pas qu'elle soit trop forte car des concentrations très

faibles en PRC indiquent que le  $k_e$  est élevé, mais ne permettent pas de l'évaluer précisément. La Figure 14 montre que l'anthracène-D10 semble un bon candidat dans les conditions rencontrées en Seine.

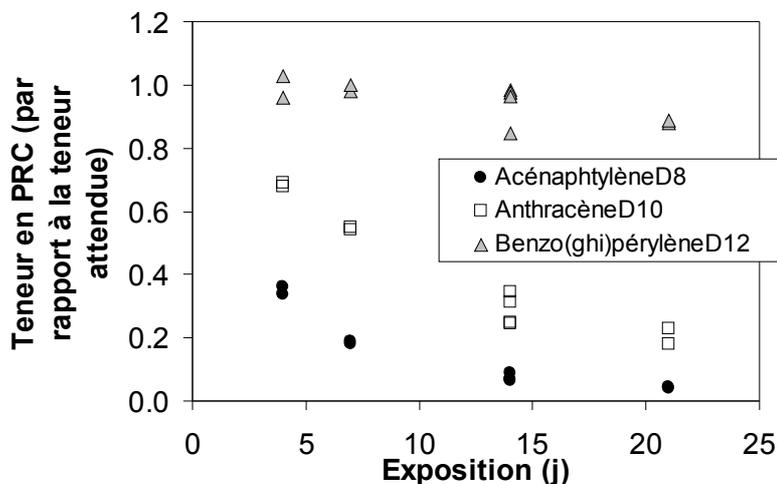


Figure 14 : Evolution des teneurs en PRC dans les SPMD positionnées à Andrésy en Août pour un essai cinétique. Le plus hydrophobe des trois traceurs est le Benzo(ghi)pérylène, injectées sous forme deutérée ( $D_{12}$ ), le moins hydrophobe est l'acénaphthylène- $D_8$ .

Pour mettre en évidence l'importance de l'utilisation de PRC, on peut comparer les valeurs de  $k_e$  obtenues in situ avec celles qu'avait estimées Huckins et al. (1999) au laboratoire. Les  $k_e$  obtenus in situ sont très différents des  $k_e$  obtenus au laboratoire, l'utilisation directe des données de référence fournies par Huckins et al. (1999) aurait généré des erreurs d'un facteur environ 3.

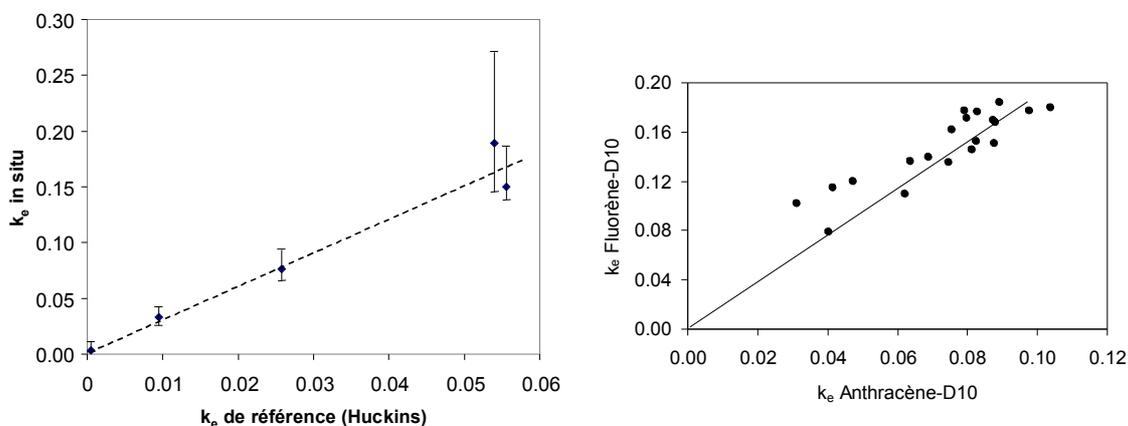


Figure 15 : A gauche (a) : Relation entre les  $k_e$  mesurés in situ et les  $k_e$  estimés au laboratoire par Huckins et al. (1999). Il s'agit des données de la campagne d'août, on représente pour chacun des traceurs utilisés (AcénaphthylèneD8, FluorèneD10, AnthracèneD10, FluoranthèneD10 et Benzo(ghi)pérylèneD12) le  $k_e$  moyen observé (pour les 6 stations, le  $k_e$  minimum et le  $k_e$  maximum). A droite (b) : relation entre les  $k_e$  de l'anthracène-D10 et du fluoranthène-D10, non plus en moyenne, mais pour l'ensemble des données de la campagne d'août.

Par ailleurs, la bonne relation obtenue entre les  $k_e$  mesurés in situ et les  $k_e$  mesurés au laboratoire (Figure 15) suggère que tous les  $k_e$  sont contrôlés par le même facteur physique. Ceci invalide l'hypothèse selon laquelle le facteur limitant devient la diffusion dans la membrane pour les  $K_{OW}$  les plus faibles (les HAP les plus légers) et la diffusion dans la couche limite aqueuse pour les HAP les plus lourds. Si tel était le cas, les  $k_e$  seraient constants pour les PRC de plus faibles  $K_{OW}$  (Acénaphthylène-D8 et Fluorène-D10 dont les  $\log(K_{OW})$  sont respectivement de 3.92 et 4.18). Or, la Figure 15 montre que les  $k_e$  des HAP moins hydrophobes sont corrélés à ceux des HAP plus hydrophobes non constants, de surcroît différents de ceux qu'avait proposés Huckins et al. (1999).

Ces résultats justifient l'utilisation de la méthode suivante pour l'estimation des concentrations biodisponibles dans l'eau :

On choisit d'utiliser l'anthracène-D10 comme traceur pour l'évaluation de  $k_e$  parce que les résultats obtenus pour cette molécule sont moins soumis à erreur statistique (une fraction significative de l'anthracène-D10 est éliminée des SPMD durant l'exposition, mais cette fraction reste éloignée de 100%). On applique un facteur de correction constant à tous les  $k_e$  estimés par Huckins et al. (1999), tirant parti de la droite de la Figure 15(a). Une fois les  $k_e$  connus pour les conditions rencontrées *in situ*, on applique l'équation 10 pour calculer les concentrations disponibles dans l'eau, les constantes d'équilibres ( $K_{SPMD}$ ) étant issues de la littérature.

Une autre conséquence des valeurs plus fortes de prévisions des  $k_e$  est que les échanges entre l'eau et les SPMD sont plus rapides que prévus. La constante de temps caractéristique du processus d'échange est  $1/k_e$ . Pour nos conditions expérimentales, et en fonction de la plage de variation des  $K_{OW}$  des HAP étudiés, elle varie de 5 jours à un an. Ceci signifie que pour les HAP les plus légers, la concentration obtenue dans le SPMD reflète un équilibre avec les concentrations des 5 derniers jours environ plutôt que l'effet d'une accumulation constante au cours de la période d'exposition. Pour les HAP les plus lourds par contre, l'hypothèse d'accumulation constante est clairement valide. La frontière se situe approximativement à la limite entre les HAP à 4 et 5 cycles. Pour des conditions expérimentales moyennes en Seine, on peut estimer que le pyrène et le fluoranthène sont les derniers HAP pour lequel l'hypothèse un effet non linéaire sera perceptible en 2 semaines d'exposition, leur constante de temps d'accumulation dans les SPMD étant de 1 mois.

### 3.3. Evaluation du niveau de contamination par des SPMD *in situ*

Des exemples de données recueillies dans des SPMD sont donnés sur la Figure 16. Elles confirment que l'équilibre est atteint pour l'HAP le plus léger (pour autant que les teneurs soient effectivement constantes dans la Seine), alors que l'hypothèse de croissance linéaire est bien acceptable pour le HAP plus lourd. Les concentrations dissoutes SPMD-disponibles estimées par l'équation 10 à partir de chacun des points de ces cinétiques ne sont pas tout à fait constantes, alors qu'elles devraient l'être sous deux hypothèses : (i) le modèle de calcul est bon et les valeurs de  $k_e$  bien estimées et (ii) les concentrations disponibles sont effectivement constantes durant l'exposition. On note sur les graphiques plusieurs imperfections. Deux valeurs plus élevées dans les SPMD à 14 jours sont dues à un positionnement des SPMD dans un courant plus rapide. La prise en compte des mesures de  $k_e$  devrait corriger cet effet, mais il reste un bruit de mesure significatif. Une correction de blanc initial devrait également être faite, alors que l'équation 9 suppose que les teneurs initiales dans les SPMD sont nulles. Cette correction descendrait les deux premières valeurs estimées pour l'acénaphthylène, et serait très faible pour le BaP, étant donné les blancs observés à  $t=0$ . Ces graphiques nous donnent un ordre de grandeur de la marge d'erreur globale des mesures faites avec les SPMD. Toutes les données de concentrations SPMD-disponibles données en annexe ont été acquises avec des temps d'exposition de 2 semaines (13 ou 14 jours).

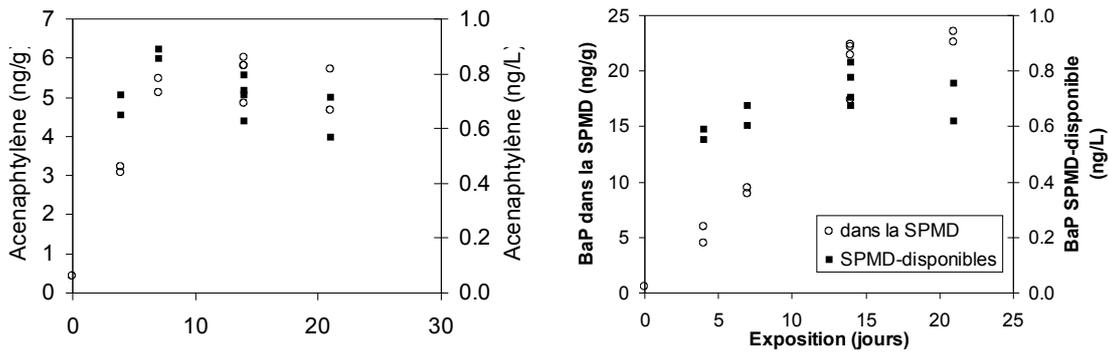


Figure 16 : Teneurs en HAP dans les SPMD en fonction du temps d'exposition. Campagne d'août, essai cinétique réalisé à Andrésy. Les cercles blancs sont les données brutes mesurées dans les SPMD. Les carrés noirs sont les concentrations dissoutes disponibles calculées par l'équation 9, en tenant compte des valeurs de  $k_e$  estimées indépendamment pour chaque SPMD

Alors que les données de teneurs SPMD-disponibles figurent en annexe, la Figure 17 donne une information plus synthétique en cumulant les HAP légers et les HAP lourds. Une tendance générale à la croissance est bien vérifiée d'amont en aval, avec cependant des inversions possibles entre les trois stations du bassin de la Marne (Guérard sur le Grand Morin, Meaux et St Maurice sur la Marne), dont le niveau de contamination est globalement très proche. Par ailleurs, Chatou apparaît souvent plus contaminé qu'Andrésy.

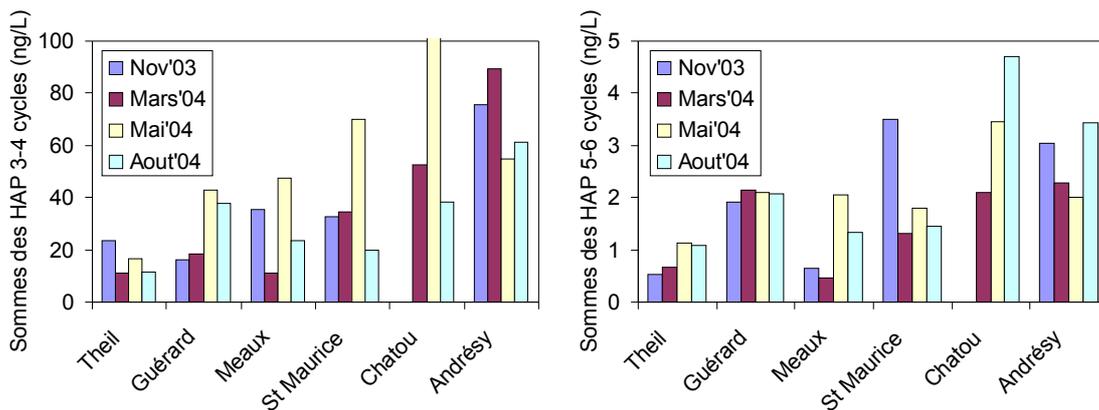


Figure 17 : Evolution amont-aval des concentrations totales en HAP légers et HAP lourds tels que mesurés par les SPMD. On rappelle que la station nommée "Chatou" a été déplacée, les données de mars ayant été acquises à Argenteuil dans des conditions délicates (SPMD partiellement hors d'eau an raison de la très forte agitation due au passage des bateaux). On note à Chatou en Mai une valeur hors échelle de plus de 500 ng/L.

### 3.4. Comparaison aux teneurs dissoutes, rôle des matières organiques dissoutes

La Figure 18 démontre des tendances amont-aval pour les HAP dissous totaux conformes à celles qu'on avait obtenues pour les concentrations SPMD-disponibles. On notera cependant que dans le cas des HAP les plus lourds, les valeurs ne sont pas directement comparables (mais seulement la tendance) car les 3 HAP les plus lourds n'ont pas été pris en compte pour les dissous totaux.

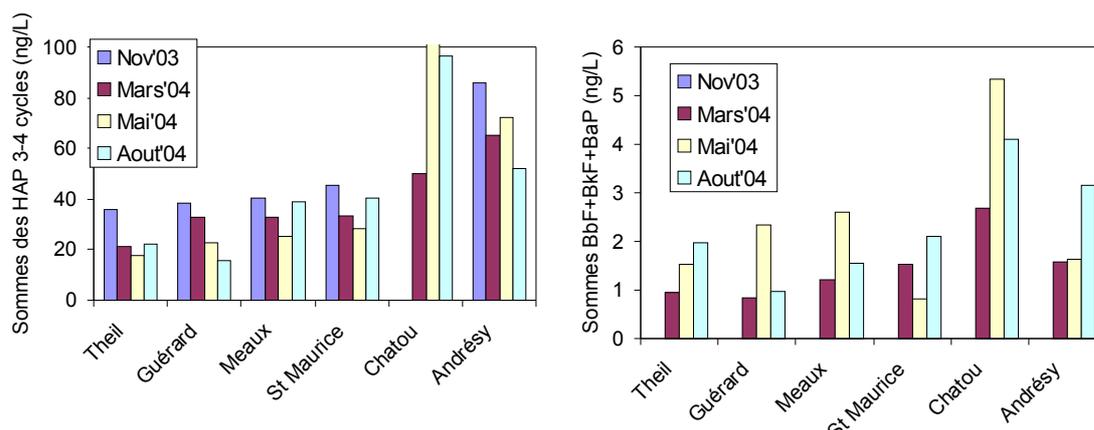


Figure 18 : Concentrations dissoutes obtenues par extraction sur phase solide. La valeur hors échelle à Chatou en mai était de près de 4000  $\mu\text{g/L}$ . Pour les HAP les plus lourds, les données de novembre n'ont pas été représentées (blancs trop élevés lors de cette campagne), ni les trois HAP les plus lourds, toujours pour un problème de blanc, qui était très (trop) peu inférieur aux mesures.

Au delà de ces considérations qualitatives, on peut chercher à quantifier l'intensité du niveau de protection offert par les matières organiques en calculant un  $K_{\text{DOC}}$  selon l'équation 2. Il s'agit *stricto sensu* d'un  $K_{\text{DOC}}$  "SPMD" et non plus d'un  $K_{\text{DOC}}$  biologique. Etant donné les bruits de mesure (des HAP dissous, des HAP disponibles, des  $k_e$  etc...) chacun des données est entachée d'incertitudes. En particulier, il arrive que les concentrations disponibles apparaissent supérieures aux données dissoutes. Dans un tel cas, le point sera manquant sur le graphe de la Figure 19. Cette figure synthétise une grande partie des résultats obtenus et marque en quelque sorte l'état d'avancement du projet. Plusieurs remarques doivent être faites pour la commenter.

On note tout d'abord que les points "Andrésey" ou même les points "Guérard" sont systématiquement dans la partie basse des séries de données (faibles  $K_{\text{DOC}}$ ), alors que les points "Theil" ou "Meaux" sont dans la partie haute. Ceci indique des variations significatives de la qualité des matières organiques dissoutes. Nos travaux menés au laboratoire en utilisant des daphnies montrent que les matières organiques plus vieilles ont des  $K_{\text{DOC}}$  plus élevés. Il n'est pas illogique que les  $K_{\text{DOC}}$  les plus faibles soient trouvés à Andrésey ou une partie des matières organiques dissoutes proviennent de la station d'épuration Seine-Aval. Bien que vieilles par le processus de traitement des eaux (et l'âge des boues pour ce qui concerne le relargage de SMP), elles sont beaucoup plus jeunes que les matières organiques dissoutes issues des sols qu'on pourra trouver au Theil. Il est possible qu'à Guérard, l'influence de la commune de Coulommiers soit significative (la station d'épuration de Guérard bien que proche du point d'échantillonnage, est très petite), mais ce point reste à préciser.

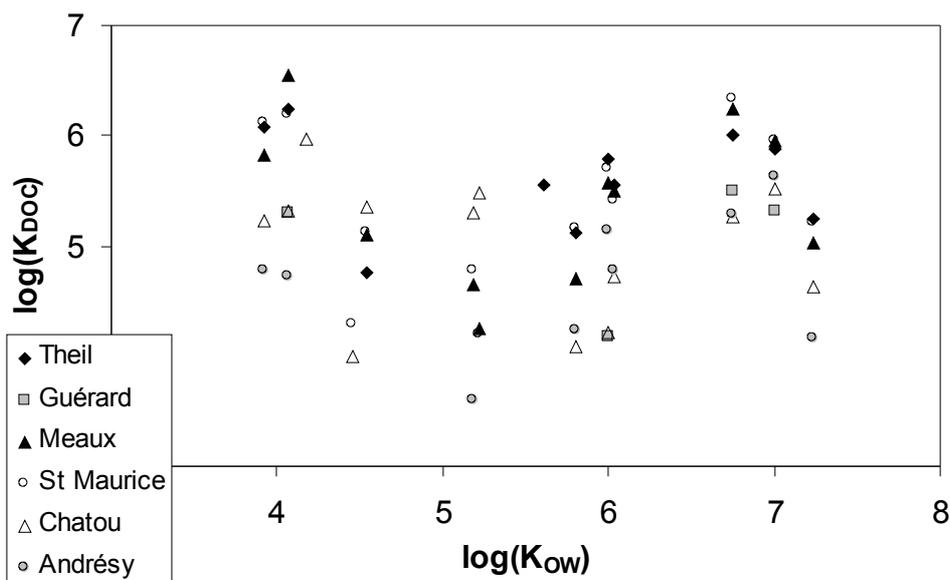


Figure 19 : Valeurs de  $K_{DOC}$  obtenues au mois d'Août selon la méthodologie décrite dans ces paragraphes, en fonction des  $K_{OW}$  (constantes de partage octanol-eau), caractéristiques de l'hydrophobicité.

Les valeurs des  $K_{DOC}$  obtenues sont de l'ordre de  $10^4$  à  $10^6$  pour le BaP, ce qui est bien dans l'ordre de grandeur des valeurs obtenues au laboratoire.

On peut noter une évolution significative des  $K_{DOC}$  des différents HAP en fonction des  $K_{OW}$ . On s'attend à une relation positive entre les  $K_{DOC}$  et les  $K_{OW}$  car ces deux paramètres sont reliés à l'hydrophobicité des molécules. La Figure 19 montre que les résultats obtenus ne sont que partiellement en accord avec la théorie, avec des  $K_{DOC}$  apparemment trop élevés pour les HAP les plus légers (les trois plus légers notamment) et des  $K_{DOC}$  trop faibles pour le plus lourd (le benzo(ghi) pérylène, alors que la partie centrale des données correspond bien aux résultats attendus. Nous n'avons pas aujourd'hui d'explication plausible pour expliquer ce comportement. Il nous paraît impossible qu'une erreur systématique d'un facteur 10 (le graphe est en échelle logarithmique) ait pu apparaître. Peut-on envisager des processus par lesquels les HAP les plus légers seraient retenus en dehors des SPMD, hormis l'effet protecteur des MOD ? Peut-on envisager un processus par lequel le benzo(ghi) pérylène serait spécifiquement incorporé aux SPMD ? les  $K_{OW}$  ou  $K_{SPMD}$  de la littérature sont-ils erronés ? Nous n'avons pas de réponse aujourd'hui à ces questions, elle devront faire l'objet de réflexions complémentaires.

#### 4. Conclusions

Les résultats obtenus nous donnent une vision cohérente de la biodisponibilité des HAP dans les eaux du bassin de la Seine. Nous avons pu montrer la bonne cohérence entre l'estimation de la disponibilité par l'outil "daphnies" et par l'outil "SPMD", ce qui donne une signification écotoxicologique importante au deuxième. Nous avons ensuite pu montrer au laboratoire l'effet du vieillissement des matières organiques influait fortement sur les  $K_{DOC}$ , avec des  $K_{DOC}$  (un effet protecteur plus important pour les matières organiques les plus vieilles). Ainsi, la plupart des données de  $K_{DOC}$  données dans la littérature pour des acides humiques sont dans la plage des  $K_{DOC}$  élevés. Cependant, les matières organiques jeunes ont des  $K_{DOC}$  suffisant pour que, aux concentrations naturelles en COD, un effet protecteur significatif puisse être obtenu pour les HAP les plus lourds, tels le BaP.

Ces résultats sont concordants avec ceux qu'on a obtenu en Seine, avec des  $K_{DOC}$  du même ordre de grandeur que les  $K_{DOC}$  de laboratoire, des  $K_{DOC}$  qui évoluent d'amont en aval (plus faibles à Andrésey où les matières organiques sont probablement plus jeunes).

Ainsi, la biodisponibilité des HAP, des plus lourds notamment, augmente d'amont en aval sous l'effet cumulé de deux facteurs : d'une part les concentrations dissoutes totales augmentent, d'autre part l'effet protecteur du aux matières organiques dissoutes diminue, probablement parce qu'elles sont plus jeunes.

## 5. Bibliographie

- Allard, B., Templier, J., Largeau, C. 1998. An improved method for the isolation of artifact-free algaenans from microalgae. *Org. Geochem.* 28, 543-548.
- Axelmann, J., Naes, K., Naf, C., Broman, D. 1999. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in semipermeable membrane devices and caged mussels (*Mytilus Adilus L.*) in relation to water column phase distribution. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2454-2461.
- Chefetz, B., Deshumukh, A.P., Hatcher, P.G. 2000. Pyrene sorption by natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2925-2930.
- Chin, Y.-P., Aiken, G.R., Danielsen, K.M. 1997. Binding of pyrene and commercial humic substances : the role of molecular weight and aromaticity. *Environ. Sci. Technol.* 31, 1630-1635.
- Chiou, C.T. 1985. Partition coefficients of organic compounds in Lipid-water systems and correlations with fish bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.* 19, 57-62.
- Garnier, J., Billen, G., Hanset, P., Testard, P., Coste, M. 1998. Chapitre 13: Développement algal et eutrophisation dans le réseau hydrographique de la Seine. Meybeck, M., de Marsily, G. et Fustec, E. *La Seine en son bassin: fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé.* Paris, Elsevier: pp. 483-529.
- Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J. et Mouchel J.M. (2003). Effect of dissolved organic matter of various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *daphnia magna* *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 22, No. 6, pp. 1288–1294, 2003
- Gourlay, C., Miège, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Mouchel, J.-M., Garric, J. 2002. The use of spectrofluorimetry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna*. *Polycyclic Arom. Comp.* 22, 501-516.
- Gourlay, C., Mouchel, J.-M., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Garric, J. in press. Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in *Daphnia magna*. *Sci. Tot. Environ.*
- Gourlay, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Garric, J., Mouchel, J.-M. 2003. Effect of non-humic dissolved organic matter from various origins and biodegradabilities on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 1288-1294.
- Gourlay, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Mouchel, J.-M., Garric, J. in press. The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases during DOM biodegradation. *Ecotox. Environ. Saf.*
- Granmo, A., Ekelund, R., Berggren, M., Brorström-Lunden, E., Bergqvist, P.A. 2000. Temporal trend of organochlorine marine pollution indicated by concentrations in caged mussels, semipermeable membrane devices and sediment. *Environ. Sci. Technol.* 34, 3323-3329.
- Haitzer, M., Abbt-Braun, G., Traunspurger, W., Seinberg, C.E.W. 1999. Effects of humic substances on the bioconcentration of polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations with spectroscopic and chemical properties of humic substances. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2782-2788.
- Huckins J.N., Manuweera G.K., Petty J.D., Mackay D. and Lebo J.A. (1993). *Lipid-containing semipermeable membrane devices for monitoring organic contaminants in water.* *Environ. Sci. Technol.*, **27**: 2489-2496)
- Huckins J.N., Petty J.D., Orazio C.E., Lebo J.A., Clark R.C., Gibson V.L., Gala W.R. and Echols K.R. (1999). Determination of uptake kinetics (sampling rates) by lipid-containing semipermeable membrane devices (SPMDs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water. *Environ. Sci. and Technol.*, **33**: 3918-3923.
- Huckins, J.N., Tbergen, M.W., Manuweera, G.K. 1990. Semipermeable membrane devices containing model lipid: a new approach to monitoring the bioavailability of lipophilic contaminants and estimating their bioconcentration potential. *Chemosphere* 20, 533-552.

- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H. 2001. Fractionation and characterization of dissolved organic matter in a shallow eutrophic lake, its inflowing rivers and other organic matter sources. *Wat. Res.* 35, 4019-4028.
- Kolok, A.S., Huckins, J.N., Petty, J.D., Oris, J.T. 1996. The role of water ventilation and sediment ingestion in the uptake of benzo[a]pyrene in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 1752-1759.
- Kukkonen, J., McCarthy, J.F., Aimo, O. 1990. Effects of XAD-8 fractions of dissolved organic carbon on the sorption and bioavailability of organic micropollutants. *Arch. Environ. Cont. Toxicol.* 19, 551-557.
- Leenheer, J.A., Croué, J.-P., Benjamin, M., Korshin, G.V., Hwang, C.J., Bruchet, A., Aiken, G.R. 2000. Comprehensive Isolation of Natural Organic Matter from Water for Spectral Characterizations and Reactivity Testing. Barret, S.E., Krasner, S.W. et Amy, G.L. *Natural Organic Matter and Disinfection By-Products: Characterization and Control in Drinking water.*, American Chemical Society. ACS Symposium Series 761: pp. 68-83.
- Meadows J.C., Echols K.R., Huckins J.N., Borsuk F.A., Carline R.F. and Tillitt D.E. (1998). Estimation of uptake rate constants for PCB congeners accumulated by semipermeable membrane devices and brown trout (*Salmo trutta*). *Environ. Sci. Technol.*, 32: 1847-1852.
- Miège C., Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M.H., Wang D., Durand S., Garric J. et Mouchel J.M. (accepté) Variability of SPMD (Semi-Permeable Membrane Device)-availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in river waters and wastewater treatment plant effluents (accepté dans Polycyclic Aromatic Hydrocarbons), donné en annexe.
- Peven, C.S., Uhler, A.D., Querzoli, F.J. 1996. Caged mussels and semipermeable membrane devices as indicators of organic contaminant uptake in Dorchester and Duxbury bays, Massachusetts. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 144-149.
- Rantalainen A.L., Cretney W.J. and Ikonomou M.G. (2000). Uptake rates of semipermeable membrane devices (SPMDs) for PCDDs, PCDFs and PCBs in water and sediment. *Chemosphere*, 40: 147-158.
- Sabaliunas, D. and A. Södergren (1997). "Use of semi-permeable membrane devices to monitor pollutants in water and assess their effects : a laboratory test and field verification." *Environmental Pollution* 96(2): 195-205.
- Sabaliunas, D., J. Lazutka, et al. (1998). "Use of semipermeable membrane devices for studying effects of organic pollutants : comparison of pesticide uptake by semipermeable membrane devices and mussels." *Environ. Toxicol. and Chem.* 17(9): 1815-1824.
- Sabaliūnas, D., Lazutka, J., Sabaliūniene, I., Södergren, A. 1998. Use of semipermeable membrane devices for studying effects of organic pollutants : comparison of pesticide uptake by semipermeable membrane devices and mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 1815-1824.
- Salloum, M.J., Chefetz, B., Hatcher, P.G. 2002. Phenanthrene sorption by aliphatic-rich natural organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1953-1958.
- Seidl, M., Servais, P., Martaud, M., Gandouin, C., Mouchel, J.-M. 1998. Organic carbon biodegradability and heterotrophic bacteria along a combined sewer catchment during rain events. *Wat. Sci. Technol.* 37, 25-33.
- Servais, P., Billen, G., Garnier, J., Idlafkih, Z., Mouchel, J.-M., Seidl, M., Meybeck, M. 1998. Chapitre 11: Carbone organique: origines et biodégradabilité. Meybeck, M., de Marsily, G. et Fustec, E. *La Seine en son bassin: fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé.* Paris, Elsevier: pp. 483-529.
- Tusseau-Vuillemin M.H., De Almeida S., Chardon I., Buzier R., Elbaz-Poulichet F. et Seidel J.L., (2004). Contamination en métaux biodisponibles : variabilités temporelles en amont et en aval de Paris. Ce volume.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gilbin, R., Taillefert, M. 2003. A Dynamic Numerical Model To Characterize Labile Metal Complexes Collected with Diffusion Gradient in Thin Films Devices. *Environ. Sci. Technol.* 37, 1645-1652.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Lagarde, F., Chauvière, C., Héduit, A. 2002. Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) as a source of dissolved oxygen in COD-degradation respirometric experiments. *Wat. Res.* 36, 793-798.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Le Réveillé, G. 2001. Le carbone organique biodégradable dans les eaux traitées des stations d'épuration du bassin de la Seine. *Ingénieries* 25, 3-12.

- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Miège, C., Gourlay, C., Gilbin, R., Ravelet, C., Elbaz-Poulichet, F., Seidel, J.-L., Garric, J. 2003. Systèmes d'estimation intégrative de la contamination par les micro-polluants et de leur biodisponibilité. Rapport d'activité du PIREN-Seine 2002. Paris, Disponible sur <http://www.sisyphes.jussieu.fr/internet/piren/index.html>
- Zumstein, J., Buffle, J. 1989. Circulation of pedogenic and aquagenic organic matter in an eutrophic lake. *Wat. Res.* 23, 229-239.

Annexe : Teneurs mesurées dans les SPMD pour 16 HAP, toutes données en ng/g de SPMD, après deux semaines d'exposition.

<b>Novembre 2003</b>	<b>Theil</b>	<b>Guérard</b>	<b>Meaux</b>	<b>St Maurice</b>	<b>Chatou</b>	<b>Andrésy</b>
Naphtalène	21.17	17.76	0.00	26.80		104.05
Acénaphthylène	0.45	0.52	0.48	1.02		1.09
Acénaphtène	6.62	1.21	4.52	1.87		9.03
Fluorène	2.91	1.97	4.64	6.16		13.09
Phénanthrène	4.87	3.28	8.88	14.80		18.01
Anthracène	0.59	0.76	1.47	0.72		3.36
Fluoranthène	4.47	3.48	8.60	3.11		13.13
Pyrène	2.51	3.31	4.98	3.10		13.77
Benzo(a)anthracène	0.72	0.55	0.48	0.43		1.35
Chrysène	0.55	0.95	1.29	1.66		2.76
Benzo(b)fluoranthène	0.30	0.74	0.37	0.68		1.09
Benzo(k)fluoranthène	0.02	0.17	0.10	0.15		0.32
Benzo(a)pyrène	0.20	0.40	0.17	0.33		0.56
Indéno(123)pyrène	0.00	0.38	0.00	0.98		0.65
Dibenzo(ah)anthracène	0.00	0.00	0.00	0.85		0.00
Benzo(ghi)pérylène	0.00	0.22	0.00	0.50		0.41
somme 3-4 cycles	23.69	16.03	35.34	32.85		75.59
somme 5-6 cycles	0.52	1.90	0.64	3.49		3.04
<b>Mars 2004</b>	<b>Theil</b>	<b>Guérard</b>	<b>Meaux</b>	<b>St Maurice</b>	<b>Argenteuil</b>	<b>Andrésy</b>
Naphtalène	19.37	19.56	0.76	25.56	24.60	32.86
Acénaphthylène	0.50	0.67	2.68	1.68	1.64	2.07
Acénaphtène	1.44	2.50	3.49	4.85	9.42	19.07
Fluorène	1.80	2.79	0.00	7.50	10.79	18.32
Phénanthrène	3.18	4.40	0.51	11.87	15.71	23.97
Anthracène	0.31	0.64	3.52	1.20	1.73	4.91
Fluoranthène	1.92	3.26	0.32	3.42	6.12	9.45
Pyrène	1.36	2.75	0.00	3.04	5.38	9.35
Benzo(a)anthracène	0.19	0.57	0.45	0.43	0.68	1.11
Chrysène	0.28	0.70	0.11	0.56	0.88	1.06
Benzo(b)fluoranthène	0.21	0.51	0.12	0.34	0.89	0.68
Benzo(k)fluoranthène	0.06	0.20	0.00	0.15	0.27	0.26
Benzo(a)pyrène	0.07	0.24	0.12	0.19	0.35	0.36
Indéno(123)pyrène	0.10	0.31	0.00	0.17	0.20	0.27
Dibenzo(ah)anthracène	0.07	0.37	0.23	0.15	0.04	0.23
Benzo(ghi)pérylène	0.15	0.50	0.00	0.33	0.35	0.48
somme 3-4 cycles	10.97	18.29	11.07	34.55	52.34	89.31
somme 5-6 cycles	0.66	2.14	0.46	1.32	2.10	2.28
<b>Mai 2004</b>	<b>Theil</b>	<b>Guérard</b>	<b>Meaux</b>	<b>St Maurice</b>	<b>Argenteuil</b>	<b>Andrésy</b>
Naphtalène	4.26	7.17	11.44	6.61	810.62	13.19
Acénaphthylène	0.32	0.66	0.49	0.51	5.28	0.91
Acénaphtène	0.88	4.09	2.34	2.13	174.16	9.86
Fluorène	1.25	2.66	2.44	2.54	71.33	5.95
Phénanthrène	8.71	20.73	25.26	41.14	114.55	12.93
Anthracène	0.44	1.46	1.09	1.54	19.04	2.32
Fluoranthène	2.49	6.67	7.68	10.55	25.97	9.10
Pyrène	1.69	5.36	6.97	10.65	18.40	11.44
Benzo(a)anthracène	0.28	0.59	0.44	0.35	2.20	1.14
Chrysène	0.40	0.84	0.74	0.69	2.00	1.17
Benzo(b)fluoranthène	0.35	0.61	0.67	0.55	1.12	0.64
Benzo(k)fluoranthène	0.13	0.26	0.24	0.21	0.48	0.25
Benzo(a)pyrène	0.14	0.29	0.30	0.19	0.75	0.37
Indéno(123)pyrène	0.16	0.28	0.22	0.23	0.36	0.20

Dibenzo(ah)anthracène	0.13	0.19	0.18	0.22	0.14	0.16
Benzo(ghi)pérylène	0.21	0.47	0.44	0.39	0.62	0.38
somme 3-4 cycles	16.47	43.06	47.46	70.10	432.93	54.81
somme 5-6 cycles	1.12	2.10	2.05	1.80	3.46	2.00
<b>Aout 2004</b>	<b>Theil</b>	<b>Guérard</b>	<b>Meaux</b>	<b>St Maurice</b>	<b>Argenteuil</b>	<b>Andrésy</b>
Naphtalène	62.42	151.08	19.32	3.81	1.86	421.74
Acénaphthylène	0.14	0.86	0.33	0.34	0.42	0.72
Acénaphthène	1.24	6.15	2.57	2.17	4.66	6.14
Fluorène	0.99	5.91	2.62	2.53	3.03	5.18
Phénanthrène	3.19	11.50	5.69	4.51	3.69	5.54
Anthracène	0.26	1.55	0.73	0.61	1.72	2.93
Fluoranthène	3.18	5.56	6.14	4.72	8.81	14.08
Pyrène	1.78	4.72	4.17	4.07	12.81	21.67
Benzo(a)anthracène	0.26	0.67	0.46	0.46	1.76	2.75
Chrysène	0.28	0.88	0.56	0.56	1.44	2.47
Benzo(b)fluoranthène	0.47	0.89	0.56	0.56	2.05	1.24
Benzo(k)fluoranthène	0.11	0.26	0.14	0.17	0.61	0.35
Benzo(a)pyrène	0.12	0.26	0.14	0.16	0.92	0.75
Indéno(123)pyrène	0.11	0.17	0.10	0.13	0.31	0.22
Dibenzo(ah)anthracène	0.05	0.09	0.05	0.06	0.13	0.15
Benzo(ghi)pérylène	0.21	0.40	0.36	0.37	0.69	0.74
somme 3-4 cycles	11.31	37.81	23.28	19.98	38.35	61.48
somme 5-6 cycles	1.07	2.07	1.35	1.45	4.70	3.44