



**HAL**  
open science

# Elaboration d'un modèle de chaîne trophique dulçaquicole et application à une étude écotoxicologique du cadmium

Monique Mugel, Jean-François Férard

► **To cite this version:**

Monique Mugel, Jean-François Férard. Elaboration d'un modèle de chaîne trophique dulçaquicole et application à une étude écotoxicologique du cadmium. Sciences de l'environnement. Université Paul Verlaine - Metz, 1978. Français. NNT : 1978METZ010S . tel-01775598

**HAL Id: tel-01775598**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775598>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

N° d'Ordre : 005

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19780195
Cote	S/Mz 78/10
Loc	

# THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 12 Juin 1978  
à l'Unité d'Enseignement et de Recherche d'Ecologie

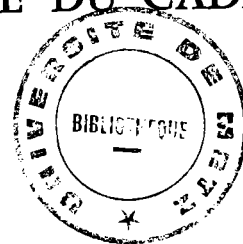
pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN ECOTOXICOLOGIE  
ET CHIMIE DE L'ENVIRONNEMENT  
MENTION : ECOTOXICOLOGIE

par

Monique MUGEL et Jean-François FERARD  
Maîtres ès-Sciences

ÉLABORATION D'UN MODÈLE DE CHAÎNE  
TROPHIQUE DULÇAQUICOLE ET APPLICATION  
A UNE ÉTUDE ECOTOXICOLOGIQUE DU CADMIUM



MEMBRES DU JURY :

Monsieur J.-M. JOUANY, Professeur à l'Université de Metz ..... Président  
Monsieur C. BOUDENE, Professeur à l'Université de Paris XI .....  
Monsieur M. LEX, Responsable Scientifique aux Communautés Européennes }  
Monsieur J.-M. PELT, Professeur à l'Université de Metz ..... Examineurs  
Monsieur J.-C. PIHAN, Maître de Conférences à l'Université de Metz .... }

- Sommaire, III<sup>e</sup> PARTIE, Chapitre IV, §2.2.5., lire "...aux différents lots de daphni
- p. 3, 16<sup>e</sup> ligne, lire "...dans la nature du fait de leur fabrication...".
- p. 4, 10<sup>e</sup> ligne, lire "(Scientific Committee...)"
- p. 18, 6<sup>e</sup> ligne, lire "...AMIARD et AMIARD-TRIQUET, 1975...".
- p. 18, 23<sup>e</sup> ligne, lire "CANTON et coll. (1975), (...), étudient...".
- p. 21, Figure 1c, lire "Scenedesmus" au lieu de "chlorelles".
- p. 23, Tableau II, pour TERHAAR et coll. (1977), la flèche situé entre Poisson et Mollusque est à supprimer et à remplacer par un signe +.
- p. 124, Figure 21, échellé de gauche, lire "D.O. extrait"
- p. 124, Figure 21, la légende des tracés est la suivante :
  - D.O. des extraits méthanoliques à 665 nm.
  - ▼ D.O. des extraits méthanoliques à 430 nm.
  - Opacimétrie à 665 nm.
  - Opacimétrie à 610 nm.
- p. 132, 15<sup>e</sup> ligne, lire  $5,66 \pm 0,50$  au lieu de  $5,63 \pm 0,49$ .
- p. 133, Tableau XVIII, Exp. N°6 :
  - à J 10, lire  $Tx/j = 9,90$  au lieu de  $0,90$ .
  - nombre de jours de ponte, lire 18 au lieu de 19.
  - taux de reproduction, lire 5,94 au lieu de 5,68.
- p. 141, 11<sup>e</sup> ligne, lire "...équipé d'un four HGA-76...".
- p. 150, Figure 28, échelle de l'axe des y, lire "A - hauteur de pic".
- p. 165, Figure 36, échelle de l'axe des y, lire " $\frac{d \text{ D.O.}}{dt} \cdot 10^3$ ".
- p. 184, 8<sup>e</sup> ligne, lire "0 - 0,1 ...".
- p. 184, 9<sup>e</sup> ligne, lire "...à raison de 3 essais par dose."
- p. 185, 12<sup>e</sup> ligne, lire 1,75 mg Cd/l par opacimétrie.
- p. 199, Figure 50, échelle de l'axe des y, lire "Cadmium dans algues en ng/mg"
- p. 235, Figure 59b, échelle de l'axe des y, lire "Cadmium dans daphnies en ng/mg"



## AVANT-PROPOS

*Ce travail de recherche a fait l'objet d'un contrat avec la Commission des Communautés Européennes (contrat n° 049-74-1 E.N.V.F.). Il se poursuit actuellement jusqu'en 79 sous le contrat n° 212-77-1 E.N.V.F., avec une extension de l'expérimentation au zinc et aux hydrocarbures légers.*

*Certains développements techniques de la méthode sont envisagés dans le cadre d'un contrat D.G.R.S.T. n° 76-7-0124 en cours.*

*Par ailleurs, dans l'optique d'une mise au point de tests simplifiés pouvant faire l'objet d'une norme de standardisation, une adaptation de la méthode est en cours sous contrat avec le Ministère de la Culture et de l'Environnement (n° 76-510).*

*Les travaux dont les résultats sont exposés dans ce mémoire ont été effectués à l'U.E.R. d'Ecologie de l'Université de METZ. De ce fait, nous avons bénéficié du merveilleux cadre de travail que constitue l'Institut Européen d'Ecologie. C'est pourquoi, nous tenons d'abord à remercier son Président, Monsieur Jean-Marie PELT, Professeur de Biologie végétale et de Pharmacognosie à l'Université de METZ qui, en nous accueillant avec bienveillance, nous a fait bénéficier d'un environnement scientifique et humain très favorable. L'intérêt qu'il a manifesté pour ce sujet de recherches et les encouragements qu'il nous a prodigués nous ont été une aide précieuse.*

*Monsieur Jean-Michel JOUANY, Président de notre Jury, Professeur de Toxicologie à l'Université de METZ, a été l'instigateur de ce travail et a assuré la direction de nos recherches, montrant ainsi l'intérêt*

qu'il porte à cette nouvelle discipline que constitue l'Ecotoxicologie. Ses connaissances profondes et ses conseils avisés nous ont permis de mener à bien ce travail. Nous tenons à lui exprimer ici notre sincère gratitude et le témoignage de notre amitié.

Nous sommes particulièrement sensibles à la présence, dans notre Jury, du Docteur Maurice LEX qui a accepté de juger notre travail. Qu'il nous soit permis de lui exprimer ici notre reconnaissance.

Nos remerciements s'adressent aussi à Monsieur Claude BOUDENE, Professeur de Toxicologie à l'Université PARIS XI qui, en nous accueillant dans son laboratoire, nous a fait bénéficier de sa grande expérience d'analyste, et nous a ainsi permis de conforter nos résultats analytiques.

Monsieur Jean-Claude PIHAN, Maître de conférences de Biologie animale à l'Université de METZ, a suivi avec bienveillance et attention le déroulement de notre travail. L'aide matérielle ainsi que ses encouragements nous ont été un soutien précieux. Qu'il trouve ici l'expression de notre vive gratitude.

Nous n'aurions garde d'oublier dans nos remerciements : Messieurs Charles GROSSE et André CHIVOT pour la part qu'ils ont pris dans la mise au point et la réalisation "de novo" des modèles de laboratoire utilisés dans cette étude,

Mademoiselle Denise NO et Madame Marie-Claude VILAND pour leurs collaborations techniques précieuses,

Mesdames Danièle BEAUFILS, Colette COUSSEMENT, Marie-Luce FERAUD, Chantal FOUSSE et Irène MANSIET pour la partie dactylographiée,

Monsieur Michel RIBETTE pour la partie offset,

Monsieur DIXNEUF, Professeur de Physique à la Faculté de Pharmacie de NANCY I, pour les traitements mathématiques effectués sur calculateur numérique, ainsi que l'Institut de Recherches Hydrologiques de NANCY pour les dosages d'A.T.P.

Nous tenons également à apporter l'expression de notre durable amitié à tous nos camarades de laboratoire, compagnons de tant d'heures difficiles qui, à des titres divers, ont su nous apporter leur aide.

## SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
<u>PREMIERE PARTIE : GENERALITES</u>	
CHAPITRE I : L'ECOTOXICOLOGIE	3
CHAPITRE II: LA CONTAMINATION DES CHAINES BIOLOGIQUES	8
1. <u>Définition ou terminologie</u>	8
2. <u>La bioaccumulation directe</u>	10
3. <u>La bioaccumulation indirecte</u>	12
3.1. Quelques exemples d'accidents écologiques	12
3.2. Quelques exemples d'enquête "in situ"	14
3.3. Les modèles de chaîne alimentaire aquatique	15
3.4. Discussion	24
CHAPITRE III : LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT	25
1. <u>Généralités</u>	25
2. <u>Emissions et présence dans l'environnement</u>	28
3. <u>Effets toxiques</u>	
3.1. Effets toxiques sur les mammifères et l'homme en particulier	32
3.1.1. Effets chimiques et biologiques	32
3.1.2. Métabolisme du cadmium	37
3.1.3. Rôle de la metallothionéine	39
3.2. Effets sur les autres organismes	40
3.2.1. Effets sur les poissons	41
3.2.2. Effets sur les invertébrés	46
3.2.3. Effets sur les végétaux	51
3.3. Discussion	55
<u>DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES</u>	
CHAPITRE I : LE MATERIEL BIOLOGIQUE	57
1. <u>Les producteurs</u>	57
1.1. Rappels morphologiques et physiologiques	58
1.2. Conditions de culture	59
2. <u>Les consommateurs primaires</u>	64
2.1. Rappels morphologiques et physiologiques	65
2.2. Conditions d'élevage	73
2.2.1. Données bibliographiques	73
2.2.2. Conditions d'élevage utilisées	77
3. <u>Les consommateurs secondaires</u>	84
3.1. Rappels morphologiques	85
3.2. Conditions d'élevage	85

CHAPITRE II : CRITERES D'ETUDE	87
1. <u>Les critères biologiques</u>	87
1.1. <u>Les producteurs</u>	87
1.1.1. Numération	87
1.1.1.1. Description et principe du compteur COULTER	89
1.1.1.2. Précision	93
1.1.1.3. Etude de la croissance	94
1.1.2. Opacimétrie	101
1.1.2.1. Principe	101
1.1.2.2. Vérification de la loi de BEER-LAMBERT	104
1.1.2.3. Etude de la croissance	106
1.1.3. Corrélation entre les quelques critères étudiés	114
1.1.4. Analyse de la distribution de taille des populations algales	117
1.1.5. Critères internes	120
1.1.5.1. Estimation des teneurs en pigments chlorophylliens	120
1.1.5.2. Autres critères	125
1.2. <u>Les consommateurs primaires</u>	127
1.2.1. L'immobilité	127
1.2.1.1. Signification et évaluation	127
1.2.1.2. Variabilité du matériel biologique et reproductibilité des résultats	128
1.2.2. Le taux de reproduction	130
1.2.2.1. Signification et évaluation	130
1.2.2.2. Variabilité du matériel biologique et reproductibilité des résultats	132
1.2.3. Le poids de matière sèche	134
1.2.3.1. Signification et évaluation	134
1.2.3.2. Variabilité du matériel biologique et reproductibilité des résultats	135
1.2.4. Discussion	135
1.3. <u>Les consommateurs secondaires</u>	137
2. <u>Le critère analytique</u>	138
2.1. <u>Préparation de l'échantillon</u>	138
2.1.1. Milieu de culture	138
2.1.2. Matériel biologique	138
2.2. <u>Description de la technique de dosage</u>	141
2.3. <u>Sensibilité et reproductibilité</u>	143
2.4. <u>Concentrations moyennes retrouvées dans les                 organismes considérés</u>	153

### TROISIEME PARTIE : RESULTATS

CHAPITRE I : ETUDES DE TOXICITE DU CADMIUM SUR LES CHLORELLES	154
1. <u>Mode opératoire d'intoxication des cultures</u>	154
2. <u>Recherche des seuils d'inhibition</u>	155
2.1 Opacimétrie	155

2.2. Numération	169
2.3. Autres paramètres	181
2.3.1. Estimation des pigments chlorophylliens	181
2.3.2. Mesure de la concentration en A.T.P.	184
3. <u>Recherche du pouvoir cumulatif</u>	188
3.1. Evolution du cadmium dans le biotope seul	188
3.2. Accumulation du cadmium dans <i>Chlorella vulgaris</i> en fonction de la concentration du cadmium dans le milieu	189
3.3. Evolution de l'accumulation du cadmium dans <i>Chlorella vulgaris</i> en fonction du temps	194
 CHAPITRE II : ETUDES DE TOXICITE DU CADMIUM SUR LES DAPHNIES	 203
1. <u>Méthodes expérimentales utilisées</u>	203
2. <u>Comportement du cadmium dans le biotope</u>	208
2.1. En absence de chlorelles	208
2.2. En présence de chlorelles	209
3. <u>Tests aigus</u>	211
3.1. Contamination par le milieu	212
3.2. Contamination par la nourriture	213
3.3. Discussion	213
4. <u>Test à moyen terme</u>	214
4.1. Contamination par le milieu	215
4.2. Contamination par la nourriture	222
4.3. Contamination par le milieu et par la nourriture	228
5. <u>Discussion générale</u>	234
 CHAPITRE III : ETUDE DE TOXICITE DU CADMIUM SUR LES ABLES	 240
1. <u>Mode opératoire d'intoxication des poissons</u>	240
2. <u>Recherche des seuils de mortalité</u>	241
3. <u>Recherche du pouvoir cumulatif</u>	244
3.1. Contamination par le milieu	244
3.1.1. Accumulation dans les poissons tués en fonction de la concentration initiale dans le milieu	244
3.1.2. Accumulation dans les poissons tués en fonction du temps	250
3.1.3. Accumulation dans les poissons morts au cours de l'expérience	250
3.2. Contamination par les chlorelles	251
3.3. Comparaison des 2 voies de contamination étudiées	252
4. <u>Conclusions</u>	

CHAPITRE IV : MODELE DE CHAINE ALIMENTAIRE PROPOSE	255
1. <u>Méthodologie</u>	255
2. <u>Résultats</u>	261
2.1. Effets biologiques au niveau des chlorelles	261
2.1.1. Comptage cellulaire	261
2.1.2. Biomasses	263
2.2. Résultats analytiques concernant les chlorelles	272
2.2.1. Dosage des surnageants de la première cen- trifugation	274
2.2.2. Dosage des eaux de lavage	274
2.2.3. Dosage du cadmium dans les algues	278
2.2.4. Bilan des différentes données concernant les algues	283
2.2.5. Apport de cadmium par les algues aux diffé- rents lors de daphnies	283
2.3. Effets biologiques au niveau des daphnies	287
2.3.1. La mortalité	287
2.3.2. Le taux de reproduction	290
2.3.3. Le poids de matière sèche	290
2.4. Résultats analytiques concernant les daphnies	294
2.5. Discussion	296
2.6. Effets biologiques au niveau des ables	300
2.7. Résultats analytiques concernant les ables	300
2.8. Discussion	302
2.9. Bilan général	305
3. <u>Discussion</u>	
 <u>QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE</u>	 311
 BIBLIOGRAPHIE	 322

## INTRODUCTION

Cette recherche associe deux aspects complémentaires d'une discipline en pleine évolution : *l'écotoxicologie*. Celle-ci bénéficie de l'apport analytique et expérimental de la toxicologie dont le domaine d'investigation est étendu à tous les êtres vivants grâce à la contribution de l'écologie.

La dégradation de l'environnement à laquelle on assiste depuis quelques années constitue aujourd'hui un nouveau sujet d'inquiétude pour tous ceux que préoccupent les problèmes d'Hygiène publique et de Protection de la nature. Les risques encourus par les différents écosystèmes, et à plus ou moins long terme par l'homme, ont conduit les autorités nationales et internationales à prendre des mesures législatives dans ce domaine. Il suffit de rappeler qu'il existe déjà une législation japonaise en application, que les américains ont développé le programme TOSCA (Toxic Substances Control Act), et que la C.E.E. recherche une harmonisation sur le plan européen.

En FRANCE, en prévision de l'application de la loi du 12 juillet 1977, sur le contrôle des substances chimiques, la recherche de nouveaux tests de toxicité s'est grandement développée.

C'est ainsi que nous avons essayé de mettre au point, dans le laboratoire d'écotoxicologie du Professeur JOUANY à l'U.E.R. d'Ecologie de l'Université de METZ, des tests de toxicité sur les chaînes alimentaires expérimentales, en milieu aquatique.

En effet, la contamination croissante des écosystèmes par les métaux, les pesticides et autres substances chimiques issues de l'activité de l'homme, ainsi que leurs concentrations à travers les chaînes alimentaires ont entraîné des accidents écologiques plus ou moins importants,



notamment vis-à-vis des poissons, des oiseaux et des hommes. C'est la cumulation du méthylmercure à travers les chaînes alimentaires qui causa la désormais célèbre maladie de MINAMATA.

C'est pour tenter d'éviter que ne se reproduisent de tels accidents et afin d'assurer une meilleure qualité de l'environnement, que toute nouvelle molécule chimique devra présenter des garanties, sous l'angle de la toxicité et des potentialités cumulatives en deçà d'un seuil déterminé avant leur mise en circulation sur le marché.

Il faut donc concevoir de nouveaux tests de toxicité, qui utilisent notamment plusieurs espèces, appartenant à différents niveaux trophiques. La toxicité de nouvelles molécules pourra être déterminée classiquement sur chaque espèce, tandis que l'éventuel caractère cumulatif pourra être mis en évidence au dernier niveau trophique, par l'association de 2 ou plusieurs espèces.

Nous avons choisi 3 organismes, faciles à élever au laboratoire et susceptibles d'appartenir à une même chaîne alimentaire d'un écosystème naturel.

Il s'agit d'une algue microscopique d'eau douce, unicellulaire, la chlorelle *Chlorella vulgaris*, qui constitue le premier maillon de la chaîne, celui des producteurs. Ces derniers sont en effet le point de départ obligatoire de toute organisation d'êtres vivants. Cette algue sert d'aliment à un crustacé, la daphnie *Daphnia magna*, constituant le niveau des consommateurs primaires. Le consommateur secondaire est un poisson de petite taille, l'able de HECKEL, *Leucaspis delineatus*, qui occupe ainsi le niveau terminal de cette chaîne alimentaire dulçaquicole.

Nous avons cherché à vérifier l'utilité et l'efficacité de cette chaîne alimentaire, en étudiant sur elle les risques dus à un élément déjà bien connu, le cadmium, dont l'importance dans l'environnement est démontrée par sa présence ubiquiste et ses emplois dispersifs. Malgré certains accidents chez l'homme et de grandes suspicions quant à ses potentialités cumulatives, l'étude de sa toxicité vis-à-vis des écosystèmes n'a été que peu abordée.

C'est ce dernier aspect qui fait l'objet de notre travail.

PREMIÈRE PARTIE : GÉNÉRALITÉS

## CHAPITRE I : L'ÉCOTOXICOLOGIE

Les différentes activités humaines ont utilisé très tôt les éléments du monde minéral, dont notre technologie avancée a poussé à l'extrême l'exploitation, requérant ainsi d'importants besoins énergétiques pour la transformation en produits finis. Cette énergie, l'homme l'a d'abord trouvée dans la combustion de matériaux fossiles, dont on sait les problèmes toxicologiques posés par la diffusion dans l'environnement des  $SO_2$ ,  $NO_x$ ,  $CO_x$  et des poussières afférentes. Actuellement, certains pays industrialisés s'orientent de plus en plus vers une énergie obtenue par voie nucléaire, dont on n'ignore pas la contestation qu'elle soulève.

Parallèlement, depuis la fin du siècle dernier, l'ère chimique dans laquelle nous vivons a vu se développer l'emploi de produits chimiques dans les domaines les plus divers. D'usage ménager, agricole ou industriel, les principaux polluants sont les métaux, les pesticides, les hydrocarbures, les tensio-actifs, les polychlorobiphényles et les phénols.

Qu'ils soient d'origine minérale ou organique, toute une série de composés chimiques est ainsi disséminée dans la nature fait de leur fabrication, de leur transport et de leur stockage, puis de leur utilisation et enfin de leur élimination incomplète. Présents en trop grande quantité, ils peuvent être de ce fait responsables d'effets toxiques ou nocifs vis-à-vis de l'homme et de son environnement.

- . En premier lieu, ils perturbent les équilibres plus ou moins fragiles des écosystèmes, et de leurs constituants dont la plupart n'ont pas la possibilité de s'y adapter rapidement.
- . En second lieu, ils pénètrent dans les cycles biogéochimiques, dont ils peuvent rompre certains maillons.

C'est ainsi que la crainte, puis la confirmation que les retombées de l'activité de l'homme offensaient la Nature et avaient en retour des conséquences fâcheuses, sinon tragiques pour lui, ont logiquement orienté les recherches toxicologiques dans un nouveau domaine se rapprochant de l'Ecologie,

à savoir *l'ECOTOXICOLOGIE* (TRUHAUT et JOUANY, 1977).

Une première définition de ce nouveau domaine de recherches a été donnée au Congrès "Biologie et Devenir de l'homme" (1974) :

*"L'Ecotoxicologie est la branche de la Toxicologie qui étudie les effets toxiques provoqués par les substances naturelles ou polluants d'origine synthétique sur l'ensemble des organismes vivants animaux ou végétaux, terrestres ou aquatiques, constituant la biosphère".*

Une seconde définition a vu le jour dans le cadre du SCOPE (Scientific Committee on problems of Environment) :

*"L'Ecotoxicologie est concernée par les effets toxiques des agents chimiques et physiques sur les organismes vivants, spécialement sur les populations et les communautés à l'intérieur des écosystèmes et elle inclut les interactions de ces agents avec l'environnement et leurs voies de transfert".*

Enfin, on peut citer une troisième définition plus générale donnée par J.M. JOUANY au Congrès "Contamination des chaînes biologiques" (1978) :

*"L'Ecotoxicologie est l'étude des effets de toute nature des toxiques sur toutes les espèces vivantes et leurs organisations, leurs rapports avec la matière inanimée, leurs rapports entre elles et avec l'homme".*

Parmi les divers milieux et les innombrables êtres vivants peuplant la biosphère, les écologistes distinguent un certain nombre d'écosystèmes. Chacune des ces unités fonctionnelles est constituée de l'association d'un biotope et d'une biocoenose.

- . Le biotope représente la matière inanimée accompagnée de tous ses facteurs chimiques et physiques.
- . La biocoenose est constituée par l'ensemble des espèces vivantes trouvées dans le biotope considéré. Les espèces possèdent entre

elles de multiples relations, parmi lesquelles la relation trophique apparaît comme la plus évidente. La somme de ces relations constitue un réseau composé de plusieurs chaînes trophiques assurant la circulation de la matière et donc le transfert d'énergie entre les diverses espèces. L'Ecologie descriptive classe celles-ci en quatre groupes trophiques différents : les producteurs, les consommateurs primaires (ou herbivores), les consommateurs secondaires, tertiaires, quaternaires (ou carnivores), les décomposeurs indispensables à la fermeture du cycle de la matière. L'association de deux ou plusieurs espèces de chaque groupe constitue ainsi une chaîne alimentaire ou chaîne trophique.

L'homme pouvant se trouver à des niveaux intermédiaires ou plus souvent terminaux des chaînes trophiques, et ayant des relations évidentes avec le monde qui l'entoure, on comprend que l'Ecotoxicologie rassemble les deux aspects d'une même réalité : risques écologiques sur la flore et la faune d'une part, risques toxicologiques sur l'homme d'autre part.

C'est au niveau de ces deux composantes -biotope et biocoenose- que l'Ecotoxicologie étudie le devenir et les effets des agents physiques ou chimiques. Cela implique évidemment une approche pluridisciplinaire afin d'intégrer différentes notions. Sans entrer dans les détails, nous mentionnerons ici celles qui nous paraissent les plus importantes.

- (1) La nature, les propriétés physiques et chimiques des agents toxiques ainsi que leur quantité effectivement dispersée représentent les données fondamentales de toute étude écotoxicologique.
- (2) L'émission, la dispersion, la persistance, la dégradabilité abiotique ou les éventuelles transformations sous l'influence de la lumière par exemple, les retombées des facteurs physiques ou des substances chimiques sont les principaux problèmes à aborder au niveau du biotope.
- (3) L'étude des effets toxiques sur les organismes vivants ou les écosystèmes constitue une part essentielle des recherches

écotoxicologiques. On distingue généralement des effets directs et des effets indirects.

● Les effets directs affectent les espèces sans intermédiaire. Ces espèces sont plus ou moins sensibles aux facteurs toxiques agissant par irradiation (rayonnement), par contact, par ingestion ou par inhalation. La gamme des effets peut aller de simples perturbations comportementales à la mort de tout ou partie des populations touchées (ou de leur descendance). A cet égard, l'estimation de la toxicité d'un agent vis-à-vis d'une espèce est une donnée importante. Malheureusement, ces déterminations ne sont pas toujours comparables mais la mise au point de "test-standards" sur quelques espèces représentatives de chaque niveau trophique permettra, dans l'avenir, de mieux classer les différents agents toxiques.

● Les effets indirects sont multiples et nécessitent l'intervention d'une espèce intermédiaire. A titre d'exemple, nous emprunterons à MOORE (1967) quelques effets indirects des pesticides.

- . Une espèce peut être affectée en se nourrissant d'une autre espèce contenant déjà une certaine quantité de l'agent toxique qui s'est accumulée dans cette dernière, soit directement à partir de son environnement, soit par l'intermédiaire d'une autre espèce préalablement contaminée\*. Il en résulte un transfert de l'agent polluant d'une espèce à l'autre par le biais de la nourriture, dont se soucie l'écotoxicologie. Comme pour les effets directs, les effets indirects peuvent aller de simples troubles éthologiques à la disparition d'une partie de toutes les populations concernées.
- . Une espèce non affectée directement peut être affectée par la rupture des équilibres biologiques d'un écosystème. Il peut y avoir manque de nourriture, disparition de concurrents ou de prédateurs, élimination de saprophytes ou tout simplement manque d'abris.

\* Dans cette étude, le terme "contamination" désigne la présence d'un agent chimique. En cas de présence d'un agent bactérien, on parlera alors de contamination bactérienne.

- (4) L'étude des possibilités d'adaptation des organismes aux milieux toxiques (mise en place de mécanismes nouveaux, induction enzymatique, phénomène de résistance), ainsi que la détermination des concentrations sans effets de toxiques dans les écosystèmes sont également des questions importantes sur le plan écotoxicologique.

## CHAPITRE II : LA CONTAMINATION DES CHAINES BIOLOGIQUES

### 1. DEFINITION OU TERMINOLOGIE

Il convient tout d'abord de définir et de développer un certain nombre de notions plus ou moins explicitées par les auteurs, provoquant de ce fait une certaine confusion.

(1) La bioaccumulation ou accumulation biologique représente la capacité d'un organisme à accumuler un composé à partir de son environnement et cela par tous les moyens possibles (ISENSEE et coll., 1973). Equivalente à celle de bioconcentration ou concentration biologique employée par RAMADE (197) cette notion d'accumulation ou de concentration mérite d'être précisée plus avant. On peut ainsi définir une "*bioaccumulation directe*", par opposition à une "*bioaccumulation indirecte*".

. La bioaccumulation directe, terme déjà utilisé, mais non défini par TERHAAR et coll. (1977), désigne la capacité d'un organisme à accumuler un composé à partir du milieu ; celui-ci étant pris dans son acception abiotique, par exemple : l'eau, le sol, l'air.

. La bioaccumulation indirecte est la capacité d'un organisme à accumuler un composé à partir de la nourriture, c'est-à-dire des niveaux trophiques inférieurs.

On en vient tout naturellement à définir ainsi une "*bioaccumulation totale*" représentant les deux voies de bioaccumulation ci-dessus définies.

Cette capacité d'accumuler se traduit quantitativement par calcul d'un *facteur de concentration* ou d'un *facteur de transfert*, fréquemment utilisé en radioécologie, mais qui peut s'appliquer au domaine des pollutions chimiques. Par exemple, en milieu aquatique, BITTEL et LACOURLY (1970) le définissent comme suit :



$$F = \frac{\text{concentration en } \mu\text{g de polluant par kg frais d'organisme}}{\text{concentration en } \mu\text{g de polluant par kg d'eau}}$$

Cette notion a ensuite évolué, et AUBERT et coll. (1972), reprenant les travaux de divers auteurs, la définissent ainsi :

$$F = \frac{\text{concentration dans l'unité de poids de l'organisme frais}}{\text{concentration dans la même unité de poids d'eau}}$$

Ce facteur est supérieur à 1 pour la plupart des éléments. Mais il est évidemment très variable suivant l'espèce, l'élément considéré et de nombreux autres paramètres tant physico-chimiques que biochimiques (BITTEL, 1973 a,b).

Dans ce travail, les facteurs de concentration n'ont pas été calculés sur cette base, car il est difficile, pour certaines espèces, de définir une concentration en poids de matière fraîche. Les facteurs de concentration obtenus représentent donc le rapport de deux concentrations et non une donnée absolue indiquant que le composé étudié concentre ou non.

Du fait des trois types de bioaccumulation ci-dessus présentés, il s'avère nécessaire de définir trois facteurs de transfert différents (LILLELUND, 1974) :

. un facteur de transfert total qui est le rapport de la concentration trouvée dans l'organisme à la concentration trouvée dans le milieu et qui traduit l'accumulation à partir de la nourriture et du milieu,

. un facteur de transfert indirect, traduisant l'accumulation due à la nourriture et qui pourrait se calculer, par exemple, comme le rapport de la concentration du toxique retrouvé dans deux niveaux trophiques successifs,

. un facteur de transfert direct traduisant l'accumulation due au milieu uniquement qui se confond avec le facteur de transfert total pour les organismes autotrophes (producteurs) ou pour les autres niveaux trophiques, lorsque ceux-ci sont étudiés de façon isolée.

Cette distinction s'avère inutile pour les échantillons prélevés dans la nature, car on y détermine uniquement le facteur de transfert total, sans pouvoir faire la part relative de la nourriture et du milieu.

(2) La biomagnification ou magnification biologique que l'on appelle encore amplification biologique indique, selon ISENSEE et coll. (1973), qu'un composé se concentre dans les chaînes biologiques avec une nette augmentation des concentrations dans les tissus des niveaux trophiques successifs.

Cette notion nous semble floue, car on peut se demander ce que représente une augmentation "nette". Signifie-t-elle une augmentation significative au sens statistique ou représente-t-elle un facteur de transfert suffisamment élevé entre deux niveaux trophiques successifs, et dans ce cas, à partir de quel degré y-a-t-il effectivement biomagnification ?

Caractéristique du comportement d'une substance, la notion de biomagnification semble donc s'opposer à celle de "biodégradation", définie par GILBERT et WATSON (1977) comme étant la "dégradation moléculaire résultant de l'action complexe des organismes vivants". Mais il nous paraît nécessaire de qualifier le comportement d'une substance qui ne serait ni l'un, ni l'autre, se caractérisant ainsi par des concentrations équivalentes dans les différents niveaux trophiques. Un tel phénomène pourrait être ainsi appelé "bioparité".

## 2. LA BIOACCUMULATION DIRECTE

Il semble que la plupart des êtres vivants ait, à des degrés divers, la possibilité d'accumuler directement certains composés chimiques. Ce phénomène existe évidemment à l'état naturel. Par exemple, dans l'eau de mer, le fucus et les laminaires concentrent l'iode, le calmar concentre le vanadium et la coquille Saint-Jacques concentre le cadmium.

Ce phénomène est particulièrement visible chez les producteurs, riches en lipides. RAMADE (1977) souligne que "ce sont de véritables concentrateurs biologiques, capables de pomper littéralement les traces infimes d'agents polluants présents dans les sols ou dans les eaux, voire l'atmosphère (cas des lichens) et de les accumuler dans l'organisme". Mais il existe des espèces capables de concentrer certains agents chimiques aux autres niveaux des chaînes alimentaires.

Du fait de leur mode de respiration ou des caractères de perméabilité du tégument, les poissons accumuleraient directement, par l'intermédiaire des branchies ou des glandes muqueuses cutanées. En raison de leur comportement alimentaire, nous pouvons également citer les vers de terre, ou bien certains crustacés et mollusques filtreurs. Par ailleurs, les organismes de faible dimension, caractérisés par un grand rapport surface/poids ont davantage de chances d'accumuler (bactéries, algues microscopiques...).

Cette bioaccumulation directe peut être inoffensive ou bien peut engendrer des dommages physiologiques plus ou moins graves pour les espèces considérées ou pour leur descendance. A cet égard, il faut distinguer la notion de toxicité de celle de bioaccumulation.

La bioaccumulation d'un composé peut être détectée, soit par certaines de ses propriétés physico-chimiques, soit par des "*tests biologiques*".

Certaines propriétés physico-chimiques d'une substance (solubilité dans l'eau, coefficient de partage entre l'eau et l'octanol d'une part, ou l'eau et l'HB-307 -graisse synthétique- d'autre part, capacité à se complexer ou à se chélater) peuvent donner une première indication sommaire sur les possibilités de bioaccumulation directe d'une substance considérée.

Les tests biologiques ont une valeur plus absolue. Ils peuvent être réalisés sur une ou plusieurs espèces appartenant à divers niveaux trophiques et à divers milieux. On conçoit ainsi que ces tests peuvent être nombreux, mais ils ont l'avantage de permettre d'étudier l'évolution du phénomène de bioaccumulation directe en fonction du temps et de montrer la dynamique de la fixation, de l'adsorption ou de l'absorption du composé. Par ailleurs, ces tests permettent d'étudier le phénomène inverse, celui d'élimination en fonction du temps, ainsi que les éventuelles transformations ou métabolisations au demeurant variables selon les êtres vivants envisagés.

En définitive, la bioaccumulation de certains agents polluants représente un danger potentiel important, non seulement pour l'espèce accumulatrice, mais surtout parce qu'elle peut être le point de départ d'une bioaccumulation indirecte pour les niveaux trophiques supérieurs.

### 3. LA BIOACCUMULATION INDIRECTE

La bioaccumulation indirecte, c'est-à-dire induite par la nourriture, se confond avec la bioaccumulation directe pour les êtres autotrophes. Par contre, pour les êtres hétérotrophes, la bioaccumulation indirecte se fait par la voie digestive.

Elle dépend évidemment et étroitement des concentrations accumulées dans les espèces servant de nourriture à un niveau ou à un autre, et donc de la bioaccumulation directe des niveaux inférieurs.

Certaines espèces paraissent plus exposées que d'autres, en particulier :

- . les espèces se nourrissant d'un nombre limité d'espèces courent en principe des risques supérieurs,
- . les espèces appartenant aux niveaux les plus élevés des chaînes trophiques sont exposées à un risque supérieur à celui des espèces des niveaux inférieurs. Transmis d'un niveau à l'autre, le polluant se retrouve à des concentrations d'autant plus élevées que le polluant est stable et que la chaîne est longue.

C'est ainsi, qu'en milieu aquatique, où les chaînes trophiques sont généralement plus longues qu'en milieu terrestre, ont été relevés la plupart des accidents.

#### 3.1. Quelques exemples d'accidents écologiques

Entre les années 1949 et 1957, le CLEAR-LAKE, situé en CALIFORNIE, fut traité à plusieurs reprises au D.D.D. (dichloro diphenyl-dicroéthane) encore connu sous le nom de T.D.E. En effet, un petit moucheron (*Chaoburus astictopus*), bien qu'inoffensif, pullulait sur ce site, et incommodait les baigneurs. Après traitement, on constata que la colonie de grèbes (oiseaux piscivores) subissait une véritable hécatombe, passant de 1000 à 60

Les survivants étaient pour la plupart stériles. Compte-tenu de ces observations, HUNT et BISCHOFF (1960) ont reconstitué la chaîne trophique menant à ces oiseaux et ont dosé l'insecticide aux différents niveaux. Ils ont trouvé :

- . 0,014 ppm dans l'eau
- . 5 ppm dans le phytoplancton
- . 7 à 9 ppm dans les poissons planctonophages
- . 22 à 221 ppm dans les poissons prédateurs
- . 2500 ppm dans les graisses des grèbes, soit un facteur de concentration de 178 500 par rapport aux eaux du lac.

Ce dernier niveau est de loin le plus riche en toxique, ce qui explique les effets observés dus à l'apport toxique par la chaîne trophique et à l'apport constant du milieu qui aggrave encore le phénomène. De manoeuvre bégnine au départ, le phénomène exponentiel rend les événements cataclismiques.

L'homme intervenant comme consommateur final peut être aussi le révélateur de la contamination intempestive de la biosphère par la technologie moderne. Ainsi, la mort de 43 personnes et l'invalidité de plusieurs centaines d'autres à MINAMATA au JAPON, ont montré le danger que représente la concentration du mercure dans les chaînes trophiques, par suite de la faible biodégradabilité de certains de ses dérivés, particulièrement du méthylmercure, cause de ce que l'on appelle la "*maladie de MINAMATA*".

Présent à une concentration inférieure à  $0,1 \mu\text{g}/\text{l}$  dans l'eau de mer, ce composé atteignait 50 mg/kg (de matière sèche) dans les poissons de la baie, soit un coefficient de concentration de 500 000 fois entre l'eau de mer et la nourriture des pêcheurs de cette région.

A NIIGATA, dans une région très éloignée de MINAMATA, on releva la même maladie avec 5 morts sur 30 personnes atteintes. Ces personnes consommaient de grandes quantités de nourriture provenant de la rivière AGANO dont les eaux recevaient les effluents d'une unité de synthèse d'acétaldéhyde.

De la même façon, on a observé chez les habitants du bassin de la rivière JINTSU (centre-nord du JAPON) une maladie inconnue, atteignant

plus particulièrement des femmes multipares d'âge mûr, et caractérisée par de violentes douleurs au dos et des membres inférieurs, d'où le nom de la maladie "*itaï-itaï*" (en japonais : violentes douleurs), qui lui a été donnée. On dénombrait ainsi, en 1968, une centaine de morts sur plus de 200 personnes atteintes. Cette maladie était causée par une grande consommation de riz riche en cadmium, alliée à une déficience en calcium et en protéines. Les effluents d'une mine de zinc se déversaient dans les eaux de rivières utilisées pour irriguer les rizières. On a ainsi trouvé 10 fois plus de cadmium dans le riz de cette région que dans le riz des autres régions du JAPON.

A la suite de ces accidents, les enquêtes hydrobiologiques et écotoxicologiques "in situ" se sont développées afin de fournir une estimation de l'état de contamination d'un ou plusieurs niveaux trophiques des écosystèmes naturels (BUTLER, 1969 - ACKEFORS, 1971 - UI, 1971 - ZITKO, 1971 - RISEBROUGH et DE LAPPE, 1972 - PEDEN et coll., 1972 - ANDERSEN et NEELAKANTAN, 1974 - BOUQUIAUX, 1974 - HOLMES et coll., 1974 - LINKO et coll., 1974 a,b - PETROCELLI et coll., 1974 - ZITKO et coll., 1974 - KOEMAN et coll., 1975 - MARTIN et BROENROW, 1975).

### 3.2. Quelques exemples d'enquêtes "in situ"

KORSCHGEN (1970) a montré, dans une zone cultivée du sud des ETATS-UNIS, la capacité de biomagnification de l'aldrine (1,2,3,4,10,11-hexachloro-1,4,4,5,8,8-~~α~~ hexahydro-1,4-endoexo-5,8-diméthanonaphtalène). Il a trouvé 0,08 ppm dans les sols, 0,56 ppm dans les vers de terre, 2,31 ppm dans les crapauds et 10,5 ppm dans les serpents, soit un facteur de concentration supérieur à 100.

Dans un écosystème aquatique (lac MAJEUR), RAVERA et coll. (1974) ont trouvé une concentration moyenne de 0,28 ppb de cadmium dans l'eau, alors que certaines plantes aquatiques submergées contiennent de 1,06 à 3,02 ppb de cadmium.

MATHIS et KEVERN (1975) ont recherché la concentration moyenne de cadmium dans plusieurs constituants du lac WINTERGREEN (sud-ouest du MICHIGAN). Ils ont trouvé 0,9 ppb dans l'eau ; 1,85 ppm (poids frais) dans

les sédiments ; de 0,04 à 0,29 ppm (poids sec) dans les plantes aquatiques submergées ; 0,40 ppm (poids sec) dans le zooplancton ; de 0,03 à 0,04 ppm (poids sec) dans les poissons prédateurs ; 0,53 ppm (poids frais) dans les feces des oies cendrées.

Bien que BUTLER (1973) souligne les problèmes que posent les résultats de telles études : variations entre les espèces, entre individus en fonction de l'âge, des saisons, et du lieu de prélèvement, ces observations "in situ" sont néanmoins nécessaires, car elles suscitent les tests expérimentaux de laboratoire, tout en leur servant de cadre de référence et de contrôle ultérieur.

### 3.3. Les modèles de chaîne alimentaire aquatique

En milieu aquatique, de nombreux auteurs ont étudié la toxicité d'une substance donnée sur une espèce ou sur plusieurs espèces prises isolément. Par contre, peu d'auteurs ont mis au point des tests d'écotoxicité regroupant deux ou plusieurs espèces, et permettant de mettre en évidence les possibilités de transfert et de concentration d'une substance chimique à travers les chaînes alimentaires.

Les premiers travaux effectués aux ETATS-UNIS datent des années 1960 et sont le fait de spécialistes de radioécologie (TOWNSLEY et coll., 1960 - HOSS, 1964 - OSTERBERG et coll., 1964). En effet, ce sont surtout les possibilités de concentration des radionucléides qui ont préoccupé les organismes de recherche et les administrations. En EUROPE, c'est en milieu marin que les premières expérimentations ont été faites par AUBERT et coll. (1970) sur divers effluents industriels. Ces travaux, et quelques autres qui ont suivi, ont été effectués avec du matériel relativement simple. Par la suite, plusieurs auteurs ont proposé des modèles de plus en plus compliqués faisant appel à du matériel original ou spécialement conçu à cet effet (METCALF et coll., 1971, 1975 - LU et coll., 1975 - ISENSEE et JONES, 1975 - MARTY et coll., 1977 - TERHAAR et coll., 1977 - JOUANY et coll., 1977).

Actuellement, une première distinction peut être faite entre les études effectuées sur microécosystèmes et celles effectuées sur chaînes trophiques expérimentales.

(1) Les microécosystèmes (ou microcosmes) se caractérisent par une enceinte expérimentale unique regroupant plusieurs niveaux trophiques prélevés ou non dans la nature, que l'on introduit ou non au même moment et qu'on laisse évoluer pendant une durée variable.

● L'introduction simultanée des différents niveaux trophiques ne permet guère de quantifier les échanges trophiques d'un niveau à l'autre. Proche des essais en vraie grandeur effectués sur des volumes beaucoup plus importants et avec un nombre d'espèces bien supérieur (VAAJAKORPI et SALONEN, 1972 - THOMANN et coll., 1974 - MIURA et TAKAHASHI, 1975 - NORLAND et MULLA, 1975). Cette méthodologie permet en général de faire uniquement un constat global à la fin de la période de temps considérée.

● Les auteurs se sont plutôt orientés vers une introduction des niveaux trophiques échelonnée dans le temps, permettant de mieux contrôler les échanges trophiques (METCALF et coll., 1971, 1975 - LU et coll., 1975 - ISENSEE et JONES, 1975 - SAWARD et coll., 1975).

Quelque soit la méthode adoptée, de telles études nécessitent un milieu commun aux différentes espèces et des conditions répondant aux exigences moyennes des différentes espèces réunies.

(2) Les chaînes trophiques expérimentales se différencient des précédentes par le fait que les espèces sont élevées dans des enceintes séparées, ce qui oblige généralement l'expérimentateur à intervenir pour nourrir les différents niveaux par les niveaux inférieurs (BUTLER, 1969 - AUBERT et coll., 1970, 1972 - LOWE et coll., 1972 - MASHIKO et coll., 1972 - MORGAN, 1972 - REINERT, 1972 - AMIARD et AMIARD-TRIQUET, 1975 - CANTON et coll., 1975 - LOCK, 1975 - PETROCELLI et coll., 1975 a, b - YOUNG, 1975 - PATRICK et LOUITT, 1976 - FOULQUIER et coll., 1977 - BAUDIN, 1977 - MARTY et coll., 1977 - TERHAAR et coll., 1977 - JOUANY et coll., 1977). Cette méthodologie permet de quantifier et de contrôler un nombre de paramètres beaucoup plus grands. De plus, chaque



unité d'élevage peut être adaptée aux exigences écologiques de chaque espèce. Le fractionnement en plusieurs unités offre, en outre, la possibilité d'intervenir sur un niveau trophique ou son milieu, sans pour autant perturber la totalité du système.

Une seconde distinction importante peut être faite sur les différentes méthodologies proposées. Elle repose sur le mode de contamination étudié.

(1) De nombreux auteurs ont choisi d'étudier la contamination apportée par la nourriture (BUTLER, 1969 - LOWE et coll., 1972 - MASHIKO et coll., 1972 - MORGAN, 1972 - REINERT, 1972 - AMIARD et AMIARD-TRIQUET, 1975 - YOUNG, 1975 - PETROCELLI et coll., 1975 a, b - PATRICK et LOUITIT, 1976 - FOULQUIER et coll., 1977 - BAUDIN, 1977 - MARTY et coll., 1977 - JOUANY et coll., 1977). La substance est d'abord mise en contact avec le premier niveau trophique étudié pendant une durée variable (de 24 heures à 10 jours). Cette période permet à la substance de s'accumuler. Le milieu de culture contaminé est ensuite éliminé et les organismes sont lavés à plusieurs reprises pour être, soit consommés de suite, soit stockés en vue de leur consommation ultérieure par le deuxième niveau trophique choisi. Ce faisant, les organismes situés à ce niveau ne sont contaminés que par la nourriture, vecteur de la substance, puisqu'on n'en introduit plus dans le milieu. Néanmoins, il peut y avoir une certaine désorption de la substance étudiée dans le nouveau milieu. Pour cela, il faut diminuer au maximum le temps de séjour ou, sinon, éviter que la concentration de substance dans le milieu ne devienne trop forte. Cette méthodologie peut, en principe, s'appliquer, soit à une chaîne simple, composée de 2 niveaux trophiques seulement, soit à une chaîne complète à plusieurs niveaux.

● Dans le cas d'une étude portant sur 2 niveaux trophiques, le premier niveau peut être choisi parmi les producteurs (MORGAN, 1972 - PETROCELLI et coll., 1975 a - YOUNG, 1975), les consommateurs primaires (BUTLER, 1969 - PETROCELLI et coll., 1975 b), les consommateurs secondaires (LOWE et coll., 1972) ou encore parmi les décomposeurs (PATRICK et LOUITIT, 1976).

On peut ainsi étudier une chaîne complète par paires successives : producteurs → consommateurs primaires, puis consommateurs primaires → consommateurs secondaires, enfin consommateurs secondaires → consommateurs tertiaires.

L'étude peut également porter sur plusieurs niveaux trophiques (MASHIKO et coll., 1972 - REINERT, 1972 - AMIARD et AMIARD et TRIQUET, 1975 - FOULQUIER et coll., 1977 - BAUDIN, 1977 - MARTY et coll., 1977 - JOUANY et coll., 1977). La méthodologie suit le même principe que précédemment le deuxième niveau trophique ainsi contaminé par la nourriture est donné au troisième niveau trophique, toujours sans addition de substance dans le milieu. Cette manipulation peut se répéter au quatrième niveau trophique.

(2) La contamination peut se faire par la nourriture et par le milieu. Il faut ici distinguer plusieurs méthodologie différentes :

- AUBERT et coll. (1970, 1972) contaminent, à une certaine concentration, le premier niveau avec des effluents industriels ou divers métaux. Il est ensuite fourni au deuxième niveau, lui-même plongé dans la même concentration, et ainsi de suite, sauf pour le dernier niveau constitué par des mammifères où la contamination n'a lieu que par la nourriture. Ce type de test, appelé "*toxicité par induction*" permet d'apprécier au dernier échelon (souris) l'importance de la contamination par la nourriture, par comparaison avec la toxicité directe faite sur niveau séparé.

CANTON et coll. (1975), utilisant une technique similaire, étudie sur le dernier niveau (poisson) non pas la mortalité mais des critères physiologiques plus fins. De ce fait, il peut étudier l'accumulation, puis l'élimination de la substance étudiée ( $\alpha$ -HCH).

- SAWARD et coll. (1975) utilisent un système dynamique : chaque jour, 40% du volume total est remplacé et le cuivre est ajouté de façon à obtenir les concentrations choisies. Une autre caractéristique de ce modèle est la présence au fond du bassin de sable nécessaire à l'élevage des tellines utilisées comme deuxième niveau trophique. Le sédiment ne joue pas,

dans ce cas, d'autre rôle significatif, contrairement aux modèles suivants mis au point par les "écoles américaines" de METCALF et d'ISENSEE.

● La caractéristique essentielle de ces modèles "mixtes" réside dans le fait qu'ils ne sont pas totalement aquatiques.

. Tout d'abord, le modèle de METCALF et coll. (1971, 1975) a été développé pour l'étude de la biodégradabilité et du devenir écotoxicologique de plusieurs pesticides ou PCB. Ces molécules organiques transitent essentiellement par le sol, ce qui explique la présence de sable. Celui-ci est incliné de façon à former une partie proprement terrestre et une partie aquatique (figure 1a). Sur la partie terrestre, sorte de "berge", pousse du sorgho, plante qui s'accommode bien d'un environnement semi-aquatique. La partie aquatique, où le sable joue le rôle de sédiment, comporte cinq espèces (ou mélanges d'espèces) différentes. Dans la méthodologie choisie par METCALF et son équipe, la substance étudiée est déposée sur les feuilles de sorgho, point de départ de la contamination. Ils introduisent ensuite les chenilles (*Estigmene acrea*) pour manger les feuilles de sorgho. Par la suite, "les feces, les détritux, et les larves elles-mêmes" contaminent le sable, l'eau et les espèces aquatiques choisies. Par conséquent, la contamination a lieu à la fois par l'intermédiaire du milieu et de la nourriture.

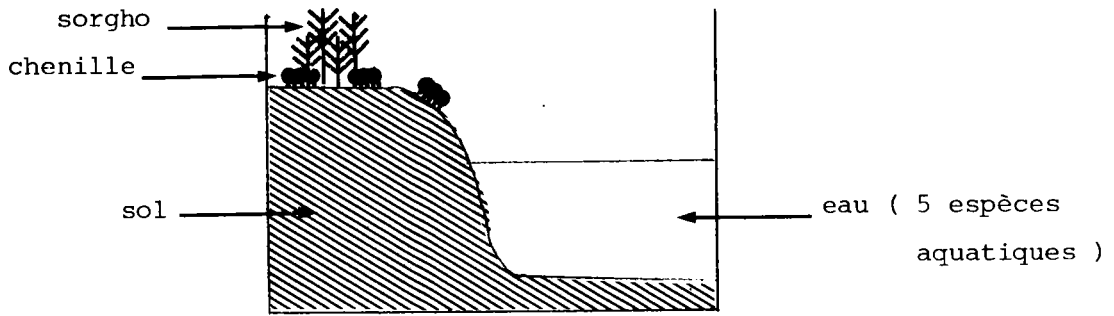
. Le principe de ce modèle a été repris par LU et coll. (1975) pour l'étude de la contamination du plomb et du cadmium, avec quelques changements. Les feuilles de sorgho ne sont plus traitées, mais ce sont différents types de sols qui sont contaminés. Les graines de sorgho poussent ensuite sur ces sols, et comme précédemment, les chenilles vont distribuer le composé dans la partie aquatique (eau et organismes).

. ISENSEE et JONES (1975) ont utilisé un modèle de conception voisine, à la seule différence que le sol n'est pas incliné, mais occupe tout le fond du microécosystème utilisé (figure 1b). La substance étudiée dans ce cas est le TCDD (ou 2,3,7,8 - Tetrachlorodibenzo-p-dioxine), plus simplement appelée dioxine. Mis en contact avec différents types de sols, pour permettre à ce composé de s'y adsorber les auteurs étudient ensuite la désorption de la dioxine à partir du sol disposé au fond de l'aquarium et son devenir dans les différents constituants du microécosystème.

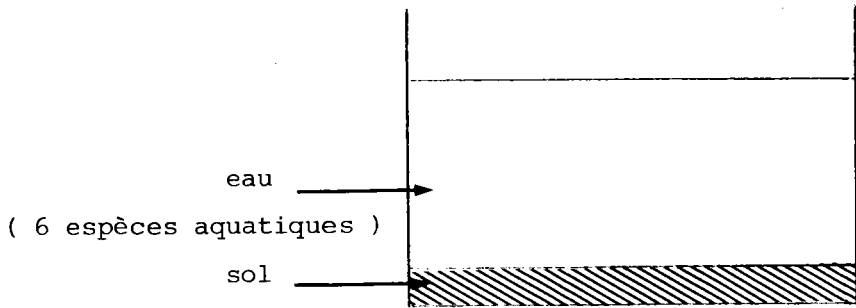
(3) TERHAAR et coll. (1977) proposent un modèle original permettant d'étudier à la fois, et dans les mêmes conditions, la contamination par le milieu et la contamination par la nourriture et le milieu de l'argent et du mercure. Ce système dynamique comporte, en effet, un système de filtre qui permet le passage du milieu contaminé, mais pas celui de la nourriture (figure 1c).

(4) Enfin, LOCK (1975) emploie une méthodologie permettant de mettre en évidence les apports dus, soit au milieu seul, soit à la nourriture seule, soit au milieu et à la nourriture pour des consommateurs primaires et secondaires.

En conclusion de cette étude bibliographique, le tableau I résume les principales caractéristiques des différentes méthodologies que nous venons de développer. Nous avons également jugé utile de figurer, dans le tableau II, les espèces choisies par les différents auteurs.

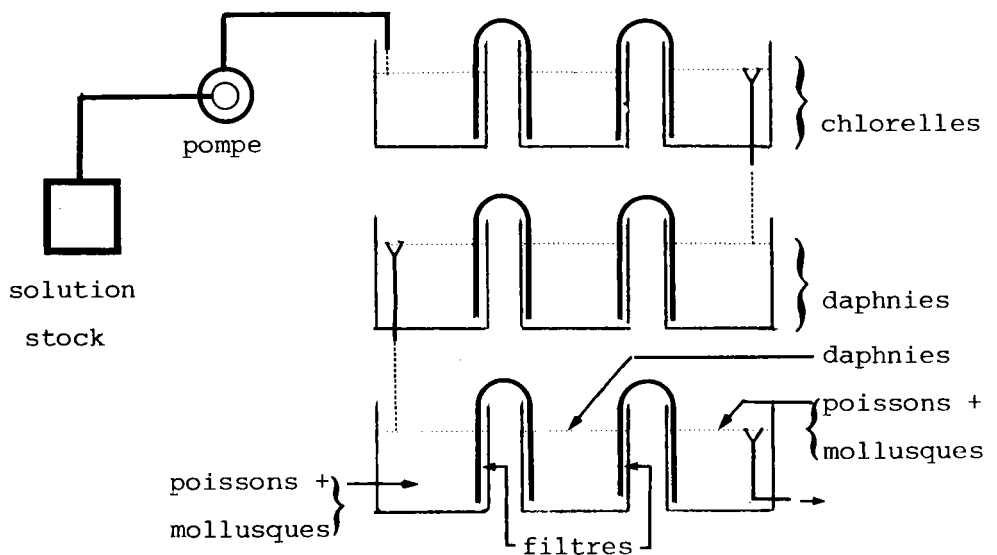


★ Figure 1a : Modèle de METCALF et coll. (1971,1975)  
et de LU et coll. (1975).



★ Figure 1b : Modèle de ISENSEE et JONES (1975)

★ Figure 1c : Modèle de TERHAAR et coll. (1977)



BUTLER (1969)	CTE	N	D.	-	Mar.	DDT
AUBERT et coll. (1970,1972)	μE	M+N	S.	-	Mar.	Différents effluents indus. divers métaux
METCALF et coll. (1971,1975)	μE	M+N	S.	Sol	Dul.	DDT*, DDE*, DDD*, metoxychlor*, PCB*, DDE*
LOWE et coll. (1972)	CTE	N	S.	-	Mar.	Mirex
MASHIKO et coll. (1972)	CTE	N	S.	-	Mar./Dul.	Calcium* (chlorures)
MORGAN (1972)	CTE	N	S.	-	Dul.	PCB et DDT
AMIARD et AMIARD-TRIQUET (1975)	CTE	N	S.	Sol	Mar.	Cobalt* (chlorure)
CANTON et coll. (1975)	CTE	M/M+N	S.	-	Dul.	α-HCH
ISENSEE et JONES (1975)	μE	M+N	S.	Sol	Dul.	TCDD* (Dioxine*)
LOCK (1975)	CTE	M/N/M+N	D.	-	Dul.	Méthylmercure (chlorure)
LÜ et coll. (1975)	μE	M+N	S.	Sol	Dul.	Cadmium et Plomb (chlorures)
PETROCELLI et coll. (1975a)	CTE	N	S.	-	Mar.	Dieldrine
PETROCELLI et coll. (1975b)	CTE	N	S.	-	Mar.	Dieldrine
REINERT (1972)	CTE	N	S.	-	Dul.	Dieldrine
SAWARD et coll. (1975)	μE	M+N	D.	Sol		Cuivre (sulfate)
YOUNG (1975)	CTE	N	S.	-	Mar.	Zinc* et fer* (chlorures)
PATRICK et LOUITIT (1976)	CTE	N	S.	-	Dul.	Chrome, Cuivre, Manganèse, Fer, Plomb, Zinc
BAUDIN (1977)	CTE	N	S.	-	Dul.	Zinc* (chlorure)
FOULQUIER et coll. (1977)	CTE	N	S.	-	Dul.	Césium*
JOUANY et coll. (1977)	CTE	N	S.	-	Dul.	Cadmium (nitrate)
MARTY et coll. (1977)	CTE	N	S.	-	Dul.	Méthylmercure (chlorure)
TERHAAR et coll. (1977)	CTE	M/M+N	D.	-	Dul.	Mercure et Argent (chlorures)

Signification des symboles utilisés : μE = microécosystèmes - CTE = chaînes alimentaires expérimentales  
M = contamination par le milieu - N = contamination par la nourriture  
M+N = contamination par le milieu et par la nourriture  
S. = test statique - D. = test dynamique - Sol = présence de sols  
Mar. = milieu marin - Dul. = milieu dulçaquicole

\* = substances ou éléments marqués

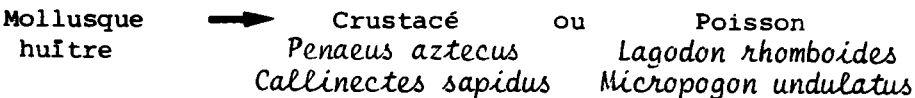
TABLEAU I : PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES DE DIFFÉRENTS MODÈLES DE CHAÎNE ALIMENTAIRE

TABLEAU II : RÉSUMÉ DES ESPÈCES CONSTITUTIVES DES  
DIFFÉRENTS MODÈLES DE CHAÎNE ALIMENTAIRE

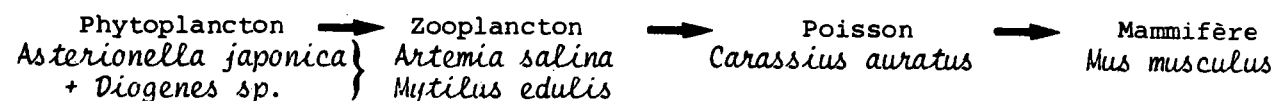
● AMIARD et AMIARD-TRIQUET (1975)	Algue <i>Navicula sp.</i>	→	Mollusque <i>Scrobicularia plana</i>	→	Crustacé <i>Carcinus maenas</i>	
● CANTON et coll. (1975)	Algue <i>Chlorella pyrenoïdosa</i>	→	Crustacé <i>Daphnia magna</i>	→	Poisson <i>Lebistes reticulatus</i>	→ Poisson <i>Salmo gairdneri</i>
● ISENSEE et JONES (1975)	• Algue <i>Oedogonium cardiacum</i>	→	Mollusque <i>Physa sp.</i>			
	Diatomée	}	Crustacé <i>Daphnia magna</i>	→	Poisson <i>Gambusia affinis</i> <i>Ictalurus punctatus</i>	
	• Protozoaire Rotifère					
	• Lentille d'eau <i>Lemna minor</i>					
● LOCK (1975)	Algue <i>Chlamydomonas reinhardii</i>	→	Crustacé <i>Daphnia pulex</i>	→	Poisson <i>Salmo gairdneri</i>	
● PETROCELLI et coll. (1975a)	Algue <i>Dunaliella peircei</i>	→	Mollusque <i>Rangia cuneata</i>			
● PETROCELLI et coll. (1975b)	Mollusque <i>Rangia cuneata</i>	→	Crustacé <i>Callinectes sapidus</i>			
● REINERT (1972)	Algue <i>Scenedesmus obliquus</i>	→	Crustacé <i>Daphnia magna</i>	→	Poisson <i>Poecilia reticulata</i>	
● SAWARD (1975)	Phytoplancton	→	Mollusque <i>Tellina tenuis</i>	→	Poisson <i>Pleuronectes platessa</i>	
● YOUNG (1975)	Algue <i>Fucus serratus</i>	→	Mollusque <i>Littorina obtusata</i>			
● PATRICK et LOUITIT (1976)	Bactérie	→	<del>Invertébré</del> <i>Tubifex + Limnodrilus</i>			
● BAUDIN (1977)	<i>Cladophora sp.</i> ou <i>Cardium glaucum</i>	→	Crustacé <i>Sphaeroma hookeri</i>	→	Crustacé <i>Gammarus aequicauda</i>	→ Poisson <i>Anguilla anguilla</i>
● FOULQUIER et coll. (1977)	Crustacé <i>Daphnia magna</i>	→	Poisson <i>Lebistes reticulatus</i>	→	Poisson <i>Anguilla anguilla</i>	
● JOUANY et coll. (1977)	Algue <i>Chlorella vulgaris</i>	→	Crustacé <i>Daphnia magna</i>	→	Poisson <i>Leucaspis delineatus</i>	
● MARTY et coll. (1977)	Algue <i>Chlorella vulgaris</i>	→	Crustacé <i>Daphnia magna</i>	→	Poisson <i>Gambusia affinis</i>	→ Poisson <i>Salmo gairdneri</i>
● TERHAAR et coll. (1977)	Algue <i>Scenedesmus sp.</i>	→	Crustacé <i>Daphnia magna</i>	→	Poisson <i>Pimephales promelas</i>	→ Mollusque <i>Ligumia sp. + Margaritifera margaritana</i>



● BUTLER (1969)



● AUBERT et coll. (1970)

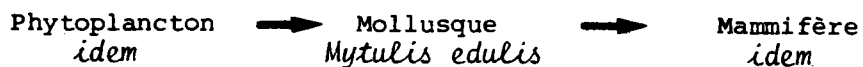


● AUBERT (1972)

● CHAINE PELAGIQUE



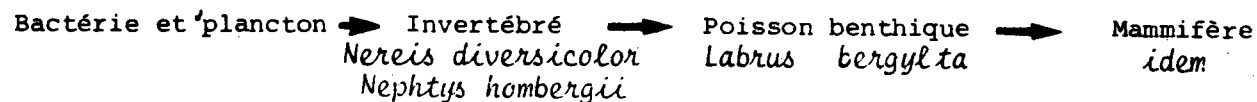
● CHAINE NERITIQUE A MOLLUSQUES



● CHAINE NERITIQUE A CRUSTACES

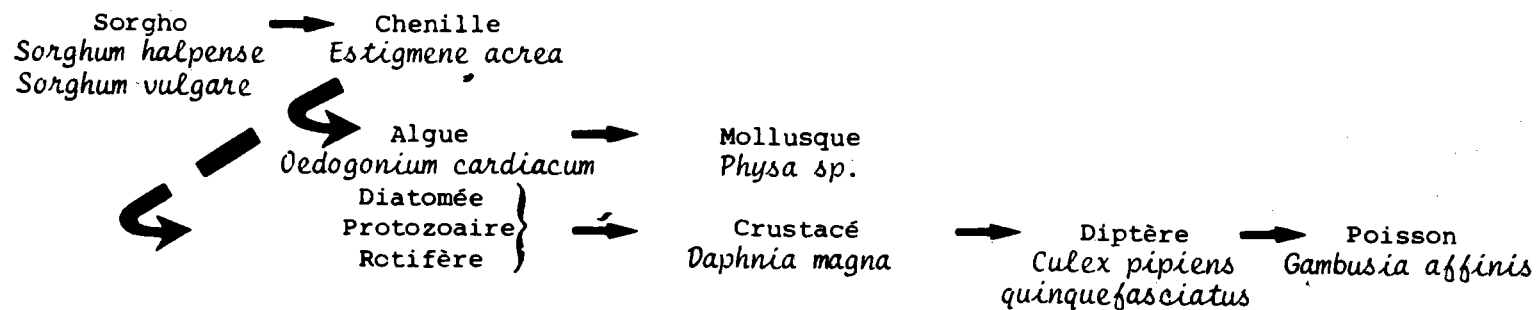


● CHAINE BENTHIQUE A POISSONS



● METCALF et coll. (1971,1975)

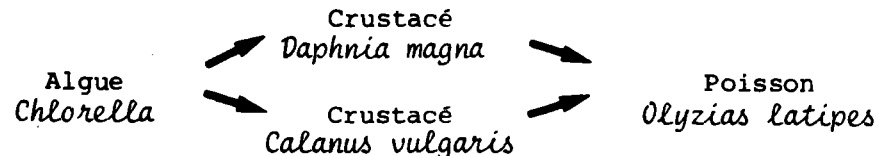
LU et coll. (1975)



● LOWE et coll. (1972)



● MASHIKO et coll. (1972)



### 3.4. Discussion

L'étude de la contamination des chaînes biologiques tend à mettre en évidence l'accumulation ou non d'agents chimiques les plus divers. A la différence des tests de toxicité classiques relativement courts, les tests de bioaccumulation sont généralement plus longs, ce qui nécessite de bien dominer les conditions physico-chimiques et biologiques du milieu durant les tests.

Par ailleurs, il est nécessaire d'opérer à une ou des concentrations inférieures aux seuils de toxicité déterminés préalablement sur chaque espèce séparée.

Ainsi, AUBERT et coll. (1970) choisissent, afin d'éviter une rupture de chaîne "une concentration égale à la moitié du taux de dilution ayant entraîné la mort de l'un quelconque des échelons". SAWARD et coll. (1975) utilisent des concentrations plus de 7,5 fois inférieures aux CL 50 96 heures (concentration entraînant la mortalité de 50% de la population après 96 heures de contact). METCALF et coll. (1971), simulant les traitements appliqués dans la nature (1 livre par acre), est obligé de réintroduire, dans son microécosystème, soit des chenilles, soit des daphnies, en raison de la fragilité de ces espèces ou de leur place dans la chaîne alimentaire. LU et coll. (1975), avec un modèle similaire mais avec différents types de sols additionnés de cadmium, observent des effets très nets sur la croissance des graines de sorgho ainsi que la mort des daphnies mises en expérience. Avec des boues activées mélangées au sol, il y a disparition complète des algues et, dans certains cas, des physes.

Ces quelques faits expérimentaux montrent bien la difficulté de ces études où le toxique est introduit dans le milieu. En effet, si la concentration choisie doit être assez faible pour ne pas causer la mortalité d'un niveau trophique, elle doit être également assez forte pour permettre une accumulation significative. Ces observations expliquent que la plupart des auteurs ait préféré contaminer le premier niveau trophique, pour ensuite le donner au deuxième niveau trophique sans nouvelle addition de toxique.

## CHAPITRE III : LE CADMIUM DANS L'ENVIRONNEMENT

### 1. GENERALITES

Le cadmium est l'élément chimique de numéro atomique 48 et de masse atomique 112,41. C'est un métal de transition appartenant, comme le zinc et le mercure, au groupe IIb du tableau périodique des éléments. De densité 8,645 (à 25°C), le cadmium est liquide à 320,9°C et bout à 766°C (sous 760mm de mercure) en émettant des vapeurs oranges. Sa pression de vapeur est de 1,4 mm à 400°C et de 16mm à 500°C. Elle est plus forte que celle du zinc, ce qui explique son comportement durant les processus métallurgiques. Sa densité de vapeur (à 1000°C) est égale à 3,94.

A température normale, le cadmium est un métal mou, brillant de couleur blanc argenté, légèrement teinté de bleu. Il est insoluble dans l'eau, mais se dissout dans l'acide nitrique, même dilué. Dans l'acide chlorhydrique ou sulfurique, la dissolution se fait lentement. La plupart des sels de cadmium sont très solubles dans l'eau, et en particulier ceux qu'on utilise couramment : les chlorures (1400g/l à 20°C), les nitrates (1090g/l à 0°C), les sulfates (755g/l à 0°C) ; par contre, les oxydes et les carbonates de cadmium sont insolubles (HANDBOOK of CHEMISTRY and PHYSICS, 1977-1978). Le zinc le précipite de ses solutions salines en milieu neutre, compte-tenu de sa plus grande électropositivité. Avec l'anhydride sulfureux ou le sulfure de sodium, le cadmium précipite pour donner un sulfure de cadmium insoluble, jaune. De valence +2, le cadmium a tendance à former des ponts covalents avec le soufre en produisant une réaction exothermique.

Cette facilité de réaction avec le soufre a été exploitée à des fins analytiques. Le cadmium donne, en effet, avec la dithizone ou diphénylthiocarbazone ( $\phi-N=N-CS-NH-NH-\phi$ ) en solution chloroformique, à pH alcalin, un complexe coloré en rouge extractible par le chloroforme et susceptible d'un dosage colorimétrique (SETTERLIND et coll., 1943 - CHURCH, 1947 - ELKINS, 1950 - SALTZMAN, 1953 - SMITH et coll., 1955 - GANOTES et coll., 1962). Elle est spécifique à condition d'éliminer les métaux inter-

férents lors d'étapes préalables. RODIER (1975) signale une limite de détection de 0,02mg/l. FRIBERG et coll. (1976) notent que "cette méthode est très utile pour la détermination du cadmium dans le matériel biologique". Le cadmium se combine facilement avec l'oxygène et les halogènes. Parmi les halogénures de cadmium, le chlorure de cadmium en solution donne en présence d'iodure de potassium et de sulfate de quinine ou de brucine, un précipité blanc jaunâtre d'iodocadmate de quinine ou de brucine mesurable quantitativement par néphélométrie (BOUDENE, 1955). Ce dosage peut être appliqué au matériel biologique.

Le cadmium est un élément ubiquiste, mais rare dans la lithosphère. Sa teneur dans l'écorce terrestre est de l'ordre de 1 à  $2 \cdot 10^{-5}$  %. On estime ainsi que la croûte terrestre peut contenir  $200 \cdot 10^9$  tonnes de cadmium, tandis que les océans n'en contiendraient que  $150 \cdot 10^6$  tonnes. Toutefois, seule une très faible fraction de cette quantité est susceptible d'être jamais extraite. Du point de vue minéralogique, on peut citer quelques minerais de cadmium :

- . la greenockite ou sulfure de cadmium,
- . l'octavite ou carbonate de cadmium,
- . la monteponite ou oxyde de cadmium.

Toutefois, ces minerais sont très rares, et il n'en existe pas de gisements exploités. En fait, la principale source de cadmium, exploitable industriellement, est constituée par les minerais de zinc cadmifères tels que la sphalérite (sulfure de zinc) ou l'hémimorphite (silicate de zinc). Le cadmium se rencontre aussi dans certains minerais de plomb et de cuivre, mais en plus faible quantité. Les sphalérites contiennent de 0,1 à 1% de cadmium, mais on a pu rencontrer, dans certains cas, des teneurs de 5%. Par réduction de l'oxyde de zinc résultant du grillage de ces minerais, le cadmium plus volatil et plus oxydable que le zinc est condensé. On obtient ainsi une poudre appelée cadmie qui contient environ 15% de cadmium. Sur cette poudre, une nouvelle réduction suivie d'une distillation fractionnée permet de récupérer un métal contenant 99% de cadmium que l'on purifie.

Sous-produit de la métallurgie du zinc, le cadmium a été découvert en 1817, par STROMEYER. La production industrielle commença en HAUTE-SILESIE vers 1850, pour se développer, un demi-siècle plus tard, dans

les pays producteurs de zinc. Les ETATS-UNIS sont actuellement le plus grand producteur de cadmium (22,3% en 1971, 3,34% pour la FRANCE). La production mondiale de cadmium n'a cessé d'augmenter depuis la fin de la deuxième guerre mondiale :  $5 \cdot 10^6$  tonnes en 1950 ;  $11 \cdot 10^6$  tonnes en 1960 ;  $16,5 \cdot 10^6$  tonnes en 1970. On estime généralement que la production totale sera de  $41 \cdot 10^6$  tonnes en l'an 2000. GOELLER et coll. (1973) prévoient que les réserves mondiales actuellement connues seront épuisées vers la fin du siècle. La quantité totale cumulée utilisée sera alors d'environ un milliard de tonnes de cadmium.

La courbe de production du cadmium suit, comme on pouvait le supposer, celle du zinc. En effet, pour une tonne de zinc produite, on obtient en moyenne 3,4 kg de cadmium. L'économie des 2 métaux est donc très liée. Le cadmium est principalement utilisé dans la galvanoplastie. Le cadmiage électrolytique des métaux, et surtout de l'acier, assure une bonne protection, particulièrement contre la corrosion des atmosphères salines. Il entre également dans la fabrication des pigments et des matières plastiques. Composant de batteries, il constitue avec le plomb et l'étain, des alliages à bas point de fusion, et avec le nickel ou le cuivre des alliages pour coussinet. Plus récemment, le cadmium a été utilisé pour la fabrication de caoutchouc, de pneumatique, d'huile pour moteurs, voire même dans la réalisation de réacteur nucléaire. Il faut souligner enfin qu'à de faibles quantités, le cadmium est utilisé pour la fabrication de lampe à vapeur de mercure, de cellule photo-électrique, d'écran de télévision, de tube à rayons X, de cadran luminescent ainsi que pour certains travaux photographiques. L'utilisation de charbons et d'engrais phosphatés, dont la teneur en cadmium n'est pas négligeable est également à signaler. Il apparaît ainsi que la majorité des emplois du cadmium sont des emplois dispersifs. Il en résulte que la récupération est difficile, et donc faible aux ETATS-UNIS, 3% de la production totale sont récupérés. Ainsi, une grande partie du cadmium utilisé se retrouve à plus ou moins long terme dans l'environnement.

## 2. EMISSIONS ET PRESENCE DANS L'ENVIRONNEMENT

Résultat du développement industriel aux XIX<sup>e</sup> et XX<sup>e</sup> siècles, l'utilisation du cadmium a augmenté au cours des 100 dernières années et provoqué un fort accroissement de sa présence dans l'environnement. Mais cette dissémination a débuté, en fait, dès que l'homme a commencé à travailler les métaux et en particulier le cuivre, le plomb et le zinc. Emis dans l'air et dans les eaux, le cadmium est vraisemblablement présent dans tous les milieux, qu'ils soient biotiques ou abiotiques.

(1) Dans l'air, il existe de nombreuses données relatives aux concentrations de cadmium retrouvées à différents endroits. Aux ETATS-UNIS, le National Air Sampling Network a procédé, en 1969, à des analyses dans 20 grandes villes. Les moyennes annuelles relevées allaient de 6ng/m<sup>3</sup> (SAN-FRANCISCO) à 36ng/m<sup>3</sup> (SAINT-LOUIS). Les concentrations dans les zones habitées sont généralement plus élevées que les concentrations dans les zones rurales (KNEIP et coll., 1970). La proximité d'autoroutes n'est pas un facteur significatif selon CREASON et coll. (1972). La présence d'industries polluantes est déterminante : à 300 mètres d'une usine suédoise, on retrouve 300ng/m<sup>3</sup>, tandis qu'à 100 mètres, on en retrouve deux fois plus. La concentration maximum retrouvée en 24 heures est de 5400ng/m<sup>3</sup> (FRIBERG et coll., 1976). HUEY (1972) signale qu'à 1300 et 800 mètres d'une source, les concentrations moyennes sont respectivement de 60 et 290ng/m<sup>3</sup>. D'après FRIBERG et coll. (1976), les concentrations sont plus de 100 fois plus grandes dans les endroits situés à proximité d'industries polluantes que dans les endroits non pollués. En conséquence, le cadmium présent dans l'air est, sans aucun doute, lié aux activités humaines. En ce qui concerne les concentrations retrouvées dans différents lieux de travail, il existe peu de données chiffrées. La Conférence Américaine des Hygiénistes industriels gouvernementaux a fixé la dose journalière sans effet à 50 µg/m<sup>3</sup>. Les travaux de DAVIS et coll. (1970) mettent en évidence que les pertes par émission dans l'air représentent aux ETATS-UNIS 20% de la production totale et se répartissent par activités de la façon suivante :

Extraction et traitement industriel

. Extractions	0,01%
. Raffinages du minerai	45,43%
. Transformations	0,73%
. Pigments	0,45%
. Plastiques	0,13%
. Alliages	0,11%
. Accumulateurs	0,01%
. Divers	0,02%

Utilisation

. Pneus automobiles	0,25%
. Huiles pour moteurs	0,04%
. Fongicides	0,01%
. Engrais phosphatés	0,02%
. Retraitements de déchets ferreux	43,27%
. Incinérations de plastiques et pigments	4,11%

Le cadmium émis dans l'air peut être évidemment inhalé par les êtres vivants, mais la majeure partie se disperse sur les sols ou dans les eaux.

(2) Dans les eaux, il convient de distinguer le cas des eaux marines, des eaux douces, et des eaux de boissons.

● Dans l'eau de mer, les concentrations moyennes de cadmium sont relativement faibles et se situent généralement entre 0,05 et 0,20  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Toutefois, JAAKOLA et coll. (1971) trouvent, près d'une usine de raffinage, des concentrations allant jusqu'à 10,2  $\mu\text{g}/\text{l}$ . KRAUSKOPF (1956) a calculé que l'eau de mer contient moins de 0,1% du cadmium apporté par les eaux de surface. Il semble qu'il y ait coprécipitation avec des oxydes de manganèse ou absorption sur des argiles ou des phosphorites.

● Dans les eaux douces, supposées non polluées, les concentrations sont généralement inférieures à  $1 \mu\text{g}/\text{l}$  (ELDERFIELD et coll., 1971). Les concentrations habituellement retrouvées dans les eaux moins pures sont comprises entre 1 et  $10 \mu\text{g}/\text{l}$  (BOUQUIAUX, 1973 - DURUM et coll., 1970), mais des valeurs supérieures peuvent se rencontrer dans certaines eaux. MINK et coll. (1971) signalent dans la rivière Coeur d'Alène (IDAHO) des concentrations atteignant  $450 \mu\text{g}/\text{l}$ . En fait, la présence de cadmium au-dessus de quelques  $\mu\text{g}/\text{l}$  est toujours due à des activités humaines. Or, il arrive que dans certains cas, on ne retrouve que des traces de cadmium, alors qu'on s'attendait à en trouver beaucoup plus. YAMAGATA et SHIGEMATSU (1970) ont signalé qu'à pH neutre ou alcalin, le cadmium est souvent indétectable dans la phase aqueuse, alors que les matières en suspension et les sédiments en contiennent une grande quantité. PISCATOR (1971) trouve ainsi, en aval d'une usine,  $4 \mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium dans l'eau et  $80 \mu\text{g}/\text{g}$  (en poids de matière sèche) dans les sédiments. Des différences du même ordre de grandeur sont relevées par BOUQUIAUX (1973). Dans la MOSELLE, où le groupe de recherches hydrobiologiques de l'Institut Européen d'Ecologie (communication personnelle) assure des prélèvements saisonniers, on retrouve dans les secteurs industrialisés, en aval de THIONVILLE, de 0,7 à  $5,4 \mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium dans l'eau. Dans les matières en suspension les valeurs varient de 0,6 à  $1,7 \text{ mg}/\text{kg}$  de matière sèche, et dans la vase les concentrations de cadmium retrouvées oscillent entre 0,48 et  $2,96 \text{ mg}/\text{kg}$  de matière sèche.

● Dans les eaux de boisson, les concentrations relevées sont généralement comprises entre 0 et  $10 \mu\text{g}/\text{l}$  (MAC CABE et coll., 1970).

Le Ministère de la Santé américain a fixé la limite supérieure acceptable de cadmium à  $10 \mu\text{g}/\text{l}$ , tandis que l'O.M.S. a adopté comme norme  $5 \mu\text{g}/\text{l}$ . Toutefois, ces concentrations peuvent être dépassées dans certains cas : FAURE et coll. (1975) signalent la contamination possible de l'eau par les canalisations.

(3) Dans les roches, les analyses effectuées ont permis de remarquer que le cadmium se trouvait en plus faible quantité dans les roches ignées et métamorphiques que dans les roches sédimentaires. On ren-



contre des concentrations relativement fortes dans les schistes (spécialement ceux riches en matières organiques) dans les sédiments lacustres et marins, dans les nodules polymétalliques et dans les phosphorites marines.

Dans les sols des régions où la pollution reste encore limitée, la concentration de cadmium est inférieure à  $1 \mu\text{g/g}$ . Selon les activités humaines, cette concentration varie, comme le montrent les résultats de KLEIN (1972) sur des sols du MICHIGAN. En terrains résidentiels, les sols ont une concentration moyenne de  $0,41 \mu\text{g/g}$ ,  $0,57 \mu\text{g/g}$  en terrains agricoles, et  $0,66 \mu\text{g/g}$  en terrains industriels. Au JAPON, les concentrations de cadmium dans le sol des rizières varient de 1 à  $60 \mu\text{g/g}$  en région suspectée de pollution (FRIBERG et coll., 1976). Les émissions importantes de cadmium dues aux industries métallurgiques entraînent de grandes concentrations de cadmium dans les sols, et ce jusqu'à des distances importantes de la source (20 km). Si les teneurs en surface sont les plus élevées, le cadmium se retrouve aussi en profondeur jusqu'à 30-40 cm. KOBAYASHI (1971) observe, sur des sols proches d'industries métallurgiques, au JAPON :

. à 5 cm	:	44mg/kg
. à 10 cm	:	32mg/kg
. à 20 cm	:	69mg/kg
. à 30 cm	:	1,4mg/kg
. à 40 cm	:	0,4mg/kg

Si les émissions des industries métallurgiques entraînent une importante contamination du sol par le cadmium, il ne faut pas négliger l'apport dû aux grands axes routiers et autoroutiers. En effet, un intense trafic libère du cadmium par les huiles de moteurs et par l'usure des pneumatiques. Par ailleurs, dans les terrains agricoles même éloignés d'activités industrielles on peut retrouver de grandes quantités de cadmium dues à l'utilisation d'engrais phosphatés. En effet, si dans les roches de phosphates naturels on retrouve  $100\text{mg/kg}$  de cadmium, dans les engrais phosphatés, dérivés industriellement de ces roches, la concentration de cadmium peut atteindre  $10\text{mg/kg}$ . De la même façon, l'épandage de boues d'égoûts comme fumures entraîne d'importantes contaminations du sol par des métaux, du fait qu'il n'y a ni détoxification ni autre traitement de ces déchets industriels.

et domestiques. Ainsi, on retrouve dans de telles boues des concentrations moyennes de cadmium de 15mg/kg (Anonyme, 1975).

### 3. EFFETS TOXIQUES

Dans l'état actuel des connaissances, le cadmium ne semble pas être nécessaire ni même utile aux processus physiologiques et biochimiques d'un organisme vivant quelconque. Il en résulte que sa présence dans un organisme entraîne des troubles plus ou moins graves. La toxicité serait due à l'ion  $\text{Cd}^{++}$  lui-même, car la transformation des composés du cadmium en dérivés alkyles plus toxiques et volatils n'a jamais été observée dans la nature, par opposition au mercure (Anonyme, 1975).

#### 3.1. Effets toxiques sur les mammifères et l'homme en particulier

##### 3.1.1. EFFETS CLINIQUES ET BIOLOGIQUES

Avant de décrire les effets toxiques du cadmium tels qu'ils ont pu être mis en évidence dans des cas accidentels chez l'homme, ou expérimentaux chez l'animal, il convient de mentionner les quantités auxquelles l'homme est exposé naturellement.

Une étude des produits alimentaires aux U.S.A. a montré que la concentration en cadmium dans la nourriture variait de 0,1mg/kg dans les légumes à 12mg/kg dans les rognons et le foie. La teneur moyenne dans les différentes régions, et pour les différents aliments serait de 0,05mg/kg, en matière fraîche (FLEISCHER et coll., 1974). Il en résulterait une exposition journalière de 45 à 80  $\mu\text{g}$ /jour, calculée d'après la ration alimentaire journalière ou le pourcentage de l'excrétion urinaire et fécale. Cette donnée n'a qu'une valeur théorique qui peut varier en fonction des régimes et des coutumes alimentaires, mais aussi des degrés de contamination des différentes régions géographiques. C'est pourquoi les teneurs moyennes retrouvées dans le corps humain peuvent varier de 30mg/kg en SUEDE à 50 ou 100mg/kg au JAPON.

De cette exposition journalière, en région non polluée et sans exposition professionnelle, l'homme ne retient environ que 2  $\mu\text{g}$ /jour, apporté par la nourriture, auxquels il faut ajouter 0,02  $\mu\text{g}$  et 0,1  $\mu\text{g}$  respectivement apporté par l'air et l'eau.

Mais ces valeurs sont totalement modifiées dans le cas d'un fumeur. En effet, selon SZADKOWSKI et coll. (1969), la quantité de cadmium inhalée est de 0,10 à 0,13  $\mu\text{g}$  par cigarette fumée, ce qui correspond à une absorption journalière de 4 à 6  $\mu\text{g}$  de cadmium pour deux paquets de cigarettes de jour. Cette valeur correspond à 10 ou 20 fois l'apport de cadmium dans une atmosphère polluée telle que MANHATTAN. Le calcul montre qu'il y a environ 2,5 fois plus de cadmium dans l'organisme des fumeurs que dans celui des non-fumeurs.

Il ne faut pas négliger non plus les sources potentielles de cadmium dues aux pigments utilisés dans certaines vaisselles qui peuvent libérer du cadmium au contact de certains aliments particulièrement acides (LAUGEL et coll., 1976).

A partir de ces données, le comité mixte FAO-OMS (1972) a fixé à 400-500  $\mu\text{g}$  l'exposition tolérable de cadmium par semaine, au-delà de laquelle les risques d'intoxication sont certains.

Dans le cas d'exposition nettement supérieure, les accidents professionnels sont survenus chez l'homme qui ont suscité des expérimentations animales pour préciser le mode d'action de ce toxique à différents niveaux de l'organisme.

Bien que les accidents mortels dans l'industrie soient rares, car le cadmium est peu utilisé à l'état pur, les symptômes cliniques d'une cadmiose sont nombreux et dépendent du mode d'administration, de la dose et de la durée de l'intoxication.

#### (1) INHALATION

En intoxication aiguë, de fortes proportions de composés cadmiques peuvent provoquer, dans les premières heures d'exposition, un oedème pulmonaire, puis une pneumonie réticulée hypertrophique jusque vers

le dixième jour, et des troubles permanents du type fibrose (PATERSON, 1947). Une concentration de cadmium de 5 mg/m<sup>3</sup> pendant 8 heures sous forme de fumées d'oxyde de cadmium serait probablement létale pour l'homme (FRIBERG et coll., 1976), tandis qu'une exposition à 1 mg/m<sup>3</sup> serait déjà dangereuse. La CL 50 chez le lapin serait de 15 mg/m<sup>3</sup> sous forme de poussières d'oxyde de cadmium.

En intoxication à long terme, on constate chez les ouvriers exposés à des poussières d'oxyde de cadmium, des emphysèmes pulmonaires et des incapacités respiratoires, souvent après de nombreuses années d'exposition. Après autopsie, des ouvriers souffrant d'emphysème ou de bronchite chronique ont révélé avoir des quantités de cadmium dans leur organisme supérieures à la normale. Le tabac étant une source supplémentaire d'intoxication par le cadmium, les grands fumeurs sont encore plus exposés. Selon divers auteurs, 10 à 40 % du cadmium inhalé serait absorbé et, à partir des poumons, serait susceptible de passer dans la circulation sanguine. C'est pourquoi, à long terme, les effets dus à l'inhalation se superposent aux effets dus à l'ingestion.

## (2) INGESTION ET VOIE PARENTÉRALE

Nous envisageons ici l'ingestion par voie orale, les administrations par voies sous-cutanée et intra-veineuse.

En intoxication aiguë, on observe des nécroses testiculaires et des troubles digestifs (nausées, vomissements). Une nécrose totale des testicules a été obtenue en injection sous-cutanée de 1,1 mg/kg, dose qui ne provoque pas de troubles visibles pour les autres organes (CHIQUOINE, 1964). Des doses supérieures de cadmium, 2 à 4 mg/kg, peuvent provoquer des nécroses du placenta sur des souris ou des rates gravides. Des lésions dans les ganglions sensoriels ont été aussi observées. EYBL et SYKORA (1966) ont estimé la DL 50\* chez la souris à 5 mg/kg (en cadmium).

En intoxication à long terme, les effets observés sont différents de ceux observés en intoxication aiguë. L'organe cible serait alors les reins qui contiendraient le tiers du cadmium absorbé par l'organisme entier.

\*dose entraînant la mortalité de 50% de la population testée.

● A l'aide d'observations sur des ouvriers de l'industrie du cadmium, complétées par l'expérimentation animale, on montre que pour une concentration dans le cortex rénal de cadmium de 200mg/kg ou plus, il y a dysfonction rénale. On observe alors une augmentation des protéines dans les urines (protéinurie) présentant une richesse particulière en  $\alpha_2$ -globulines. Si la durée et la concentration augmentent, la dysfonction rénale peut entraîner une augmentation du glucose dans l'urine (glucosurie) et des phosphatases alcalines dans le sang.

On observe également un taux anormalement élevé d'acides aminés dans l'urine (aminoacidurie). Mais ce serait une présence anormale de calcium dans l'urine (hypercalciurie) qui serait le symptôme le plus précoce. On peut citer aussi comme signes cliniques d'une cadmiose à long terme : une excrétion acide déficiente, une acidose hyperchlorémique, des calculs urinaires de phosphate de calcium, avec parfois apparition d'un syndrome de Fanconi (OLIVIER, 1969).

● Au niveau du foie, on peut constater une dégénérescence graisseuse avec quelques foyers de nécrose. Le métabolisme des lipides serait atteint. SCHROEDER et BALASSA (1965) observent sur des rats une altération des lipides du sang, avec une eau de boisson cadmiée à 5mg/l. Il y a diminution du cholestérol sanguin, et augmentation de la teneur en lipides dans l'aorte.

● Dans la moelle, il y aurait hyperplasie des érythroblastes, et une vacuolisation des plasmocytes et des cellules réticulocytaires ; des troubles dans l'hématopoïèse seraient dus à l'inhibition par le cadmium du transport du fer au niveau des cellules synthétisant l'hémoglobine (OLIVIER, 1969).

● Outre une certaine anémie et un amaigrissement, un autre signe important et précoce serait la bague jaune dentaire de BARTHELEMY, qui serait due à la formation de sulfure de cadmium au contact des thiocyanates de la salive (BOUDENE, 1955).

● Des carences alimentaires (manque de calcium ou de vitamines D) peuvent amplifier les effets toxiques du cadmium. Tel a été un des facteurs de l'apparition de la maladie d'Itai-Itai. Radiologiquement, cette maladie ressemble à une ostéomalacie rénale (ramollissement des os, avec possibilité de fractures spontanées et de déformations du squelette). De nombreuses études ont été faites au JAPON sur la contamination de l'environnement par le cadmium, sur l'épidémiologie et le diagnostic de la maladie Itai-Itai, et sur les concentrations en cadmium retrouvées dans les différents organes des personnes atteintes et décédées. Si cette maladie a provoqué dans cette région une centaine de morts et même davantage jusqu'à ces dernières années, malgré les dispositions prises par les autorités japonaises, ce sont cependant les seuls cas mortels d'intoxication par ce métal ; de plus, rares sont les cas d'ostéomalacie d'origine professionnelle.

● D'autres auteurs ont mentionné les effets du cadmium sur le système cardio-vasculaire. Ainsi, PERRY et coll. (1970) ont provoqué une hypertension chez des rats en leur injectant, par voie intraveineuse, du cadmium de 0,02 à 2mg/kg, et par voie intrapéritonéale de 0,2 à 2,4mg/kg. Cependant, tous les auteurs n'ont pas trouvé de relation entre les cas d'hypertension et autres accidents cardiaques (artériosclérose), et les teneurs en cadmium de l'environnement. Par ailleurs, on n'a pas retrouvé une fréquence plus grande d'hypertension chez les patients atteints de la maladie Itai-Itai. Par contre, en expérimentation animale, les accidents cardio-vasculaires ne sont pas rares après des intoxications au cadmium. SCHROEDER et coll. (1965) ont constaté une artériosclérose dans le coeur et les reins de rats intoxiqués par de l'eau de boisson cadmiée à 5mg/l, ainsi que de l'hypertension et une fréquente hypertrophie du ventricule gauche.

Cependant, l'action du cadmium sur le système cardio-vasculaire n'est pas clairement définie, ni même évidente. Il semble donc nécessaire de développer les études dans ce sens pour vérifier la relation de cause à effet (Anonyme, 1975).

● D'autres auteurs ont essayé de mettre en évidence les effets cancérigènes du cadmium. Selon GUNN et coll. (1967), le cadmium serait le métal le plus potentiellement cancérigène. Par des injections sous-cutanées ou

intra-veineuses, ils ont obtenu des tumeurs de type sarcome, chez la souris et le rat, au site de l'injection. Mais il n'y aurait cancérogénèse que pour les tissus dérivés du mésoderme mésenchymateux, et non pas pour les tissus dérivés de l'ectoderme, de l'endoderme, ou du mésoderme épithélial. Chez l'homme, la relation entre l'exposition au cadmium et la fréquence des cancers a été étudiée. Ainsi, MORGAN (1971) émet certaines réserves pour associer les décès par cancers du poumon à la quantité de cadmium retrouvée dans le foie et les reins. Selon cet auteur, le tabac serait l'agent le plus responsable.

- Quant aux effets génétiques, on a pu seulement constater des aberrations chromosomiques au JAPON sur des patients atteints de la maladie Itai-Itai.

### 3.1.2. METABOLISME DU CADMIUM

Cette étude comprend le transport, la distribution et l'excrétion du cadmium dans l'organisme.

Après inhalation du cadmium, sous forme de poussières ou de fumées, 10 à 40% serait absorbé et passerait alors dans la circulation sanguine.

Après ingestion orale, le taux d'absorption se situerait entre 3 et 8% de la quantité de cadmium administrée (FLEISCHER et coll., 1974). Dans le sang, le cadmium se retrouve dans le plasma, puis dans les erythrocytes à partir desquels il peut migrer vers les organes. Dans les premières heures qui suivent l'ingestion, la distribution du cadmium dans l'organisme dépend du mode d'administration. Cependant, dans tous les cas, les organes cibles sont le foie et les reins. Après injection par voie intraveineuse, la quantité de cadmium retrouvée dans le foie est supérieure, dans un premier temps, à celle retrouvée dans les reins. Mais, progressivement, la concentration dans le foie diminue, tandis que celle des reins reste constante, ou en légère augmentation. On peut estimer alors que 50 à 75% du cadmium absorbé par l'organisme est accumulé dans ces

deux organes (NORDBERG, 1972). L'utilisation du cadmium radioactif  $^{109}\text{Cd}$  a permis de le localiser plus précisément : ainsi, dans les reins, le cadmium se retrouve au niveau des tubules proximales et dans le foie, à la périphérie des lobules. Le reste du cadmium absorbé s'accumule en moindre part dans les tissus interstitiels des testicules, le pancréas, la rate, les glandes salivaires, la moelle osseuse et le cerveau.

La période biologique du cadmium dans l'organisme semble longue : pour une injection unique chez la souris et le rat, elle serait de 20 à 50 jours. En injections répétées, elle se situe de 2 à 4 ans chez les petits mammifères, tandis que pour l'homme elle est estimée de 10 à 30 ans. L'estimation se fait essentiellement par les urines, les fèces et aussi par les phanères.

L'excrétion urinaire chez les personnes non exposées professionnellement serait de 0,4 à 4  $\mu\text{g}/24$  heures en moyenne, tandis qu'en cas d'exposition au cadmium, ce taux peut dépasser 1000  $\mu\text{g}$  par 24 heures.

Quand la protéinurie apparaît, le taux augmente encore, ce qui a été vérifié en expérimentation animale (NORDBERG et PISCATOR, 1972). Cependant, il semble difficile, d'après les différentes données, de trouver une relation directe entre la charge en cadmium dans l'organisme humain et l'excrétion urinaire ; celle-ci pourrait augmenter en fonction de l'âge, selon les auteurs japonais.

De même, l'excrétion fécale ne semble pas être corrélée à la charge de cadmium dans l'organisme. Avant la protéinurie, l'excrétion fécale apparaît supérieure à l'excrétion urinaire chez le lapin ou la souris (AXELSSON et PISCATOR, 1966).

Comme certains auteurs en avaient déjà décelé l'intérêt, il y a quelques années (TRUHAUT et BOUDENE, 1954). NORDBERG et NISIYAMA (1972) ont pu montrer qu'il y avait une relation entre la charge totale en cadmium dans l'organisme et l'excrétion par les phanères ; ainsi, sur un lot de souris, après avoir injecté par voie intraveineuse du  $^{109}\text{Cd}$ , ils



ont pu mesurer la radioactivité dans le corps entier et dans les poils pendant 15 semaines, et trouver ainsi une bonne corrélation entre ces deux facteurs ( $r = 0,99$ ). Seulement, cette voie d'excrétion est très faible : moins de 0,5% de l'élimination totale de l'organisme, et n'est applicable qu'aux animaux à fourrure, compte-tenu des problèmes analytiques résultant de la faible élimination.

### 3.1.3. ROLE DE LA METALLOTHIONEINE

La recherche du cadmium dans l'organisme a permis de montrer qu'il était d'abord localisé dans les organites cellulaires (noyau, mitochondries, microsomes), puis dans le surnageant du centrifugea cellulaire. Dans cette fraction, il se trouve associé à une protéine de faible poids moléculaire (6 à 8000), comparable à celle excrétée lors de la protéinurie. Pour de nombreux auteurs, cette protéine serait la métallothionéine dont le rôle dans le transport du cadmium dans l'organisme ne serait pas négligeable.

Le cadmium, par son affinité pour le soufre, se fixerait sur la métallothionéine riche en résidus cystéiques donc en groupements -SH. Sous cette forme, le cadmium est transporté jusqu'aux reins, où il filtre à travers le glomérule et est réabsorbé, puis fixé par les cellules du tube proximal. Mais une trop grande quantité (seuil 200mg/kg) de cadmium ainsi fixée entraîne un dérèglement du métabolisme mitochondrial et une inhibition des peptidases. On constate aussi un dérèglement du bilan calcium-phosphore. Ces troubles des cellules rénales font alors diminuer la réabsorption des protéines au niveau des glomérules ; il en résulte alors une excrétion anormale dans les urines de protéines et particulièrement de Cd-métallothionéine. Cependant, celle-ci ne semble pas être la seule protéine capable de fixer le cadmium et d'autres protéines de poids moléculaire plus élevées ont été isolées lors de la protéinurie (LUCKEY et coll., 1975).

Le rôle protecteur de la métallothionéine a été démontré en toxicologie aiguë du cadmium, tandis qu'elle serait impliquée dans

les lésions des tubules rénaux en intoxication à long terme (TERHAAR, 1965). En effet, un prétraitement par de faibles doses de cadmium ou par de la métallothionéine isolée et purifiée limite les lésions testiculaires (NORDBERG, 1972). Selon PISCATOR (1964), la métallothionéine serait synthétisée dans le foie. WISNIEWSKA-KNYPL et TABLONSKA (1970) ont démontré que le cadmium pouvait inhiber in-vitro l'activité des groupements -SH de certains enzymes, alors que in-vivo les mêmes concentrations sont sans effet ; ceci serait dû au fait que in-vivo le cadmium est fixé préférentiellement sur la métallothionéine. L'action du cadmium sur d'autres enzymes a été signalée. Ainsi l'activité d'enzymes contenant du zinc peut être inhibée par compétition du cadmium pour les sites du zinc, et par déplacement du zinc des métalloenzymes, comme les phosphatases alcalines ou l'insuline. L'inhibition de certaines ATPases a aussi été mise en évidence, par exemple dans les macrophages des alvéoles pulmonaires ou PAM (LUCKEY et coll., 1975). Sur des souris, une dose de 400mg/kg dans leur nourriture fait augmenter l'activité de la malique déshydrogénase et de la glucose-6-phosphate déshydrogénase, appartenant aux tissus cardiaques et hépatiques (WEBER et REID, 1969).

En conclusion, cette description des effets du cadmium sur les mammifères ne se veut pas complète, mais tend à montrer combien l'action du cadmium est multiple, à de nombreux niveaux du métabolisme.

### 3.2. Effets sur les autres organismes

Si de nombreuses études de laboratoire sur les mammifères ont été entreprises pour mieux connaître les effets et le mode d'action du cadmium pour les extrapoler à l'homme, la recherche des effets de ce métal sur les autres organismes est plus limitée.

Les plus nombreuses données concernent le milieu aquatique, car le cadmium semble y être un élément beaucoup plus toxique que dans le milieu terrestre. En effet, dans l'élément liquide, le toxique dispose de plusieurs voies d'accès dans l'organisme, qu'il peut emprunter simultanément : voie respiratoire, branchiale et épithéliale, voie orale

par filtration de l'eau, voie alimentaire.

### 3.2.1. EFFETS SUR LES POISSONS

Le poisson est un des organismes tests le plus souvent utilisé. Ce sont les poissons salmonidés qui présentent la plus grande sensibilité au cadmium.

En intoxication aiguë, on observe une hyperactivité due à une respiration accrue. Le cadmium est alors de plus en plus absorbé et le poisson meurt par suffocation et paralysie : l'excrétion de substances du protoplasme entraîne la formation d'un mucus coagulant provoquant la suffocation (SCHWEIGER, 1957). GARDNER et YEVICH (1970) suggèrent que la mort, chez la fondule (*Fundulus heteroclitus*), est causée par diminution des échanges respiratoires de surface et déficience rénale. Par contre, pour CEARLEY et COLEMAN (1974), ce seraient principalement les mécanismes d'osmorégulation et d'échanges d'ions qui entraîneraient la mort. Cependant, le mode d'action du cadmium n'est pas complètement connu et seuls des effets ponctuels sur certaines espèces ont été décrits.

Ainsi, à 10mg/l, une hyperplasie et une nécrose de l'épithélium des lamelles secondaires des branchies ont été obtenues sur la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). Cette espèce paraît être particulièrement sensible : une exposition de 24 h à 1,12mg/l (dans une eau à 4mg CaCO<sub>3</sub>/l) produit une importante dégénérescence des structures branchiales ; un détachement de la couche épithéliale, une hyperplasie et une hypertrophie de l'épithélium interlamellaire sont aussi observés. Pour la même espèce, la TLm 7j (median Tolerance Limit équivalant à la CL 50) est de 0,4mg/l en eau dure et calme ; par contre, en eau dure mais courante, elle est de 0,008 à 0,01mg/l (Anonyme, 1975). On constate ainsi un très net effet du faciès de l'eau.

Cependant, ces seuils ne donnent qu'une idée de la sensibilité d'un organisme pour un toxique donné, mais la mort n'est pas le seul paramètre qui peut être pris en considération. Plusieurs auteurs utilisent des critères de toxicité plus fins.

Ainsi, CHRISTENSEN (1975) remarque une augmentation de l'activité acetylcholinestérasique chez des alevins de *Salvelinus fontinalis* exposés à 0,7 et à 3,4  $\mu\text{g}/\text{l}$  (en eau douce). Il constate parallèlement une diminution du poids et une augmentation de la teneur en protéines. Le cadmium provoque des déséquilibres dans la balance ionique (augmentation dans le plasma des concentrations de  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Na}^+$  et  $\text{Mg}^{++}$  avec parallèlement une diminution des concentrations de  $\text{K}^+$  et  $\text{Ca}^{++}$ ). De ce fait il serait responsable de troubles neuromusculaires, d'hyperexcitabilité et de lésions du cordon médullaire (Anonyme, 1977).

Si les reins et le foie sont souvent cités comme organes cibles d'une intoxication au cadmium, une inflammation du pancréas a été observée sur des gardons survivant à une exposition à 9mg/l de cadmium pendant 50 jours. Les modifications du métabolisme des glucides sont attribuées à de tels troubles (Anonyme, 1977).

Au niveau histologique, GARDNER et YEVICH (1970) ont montré des modifications dans les tissus hématopoïétiques chez la truite arc-en-ciel et chez la fondule. Déjà signalé chez les mammifères, on observe des nécroses testiculaires chez le poisson, ainsi qu'une réduction de la synthèse in-vitro d'androgènes chez le saumon des fontaines (*Salvelinus fontinalis*).

En intoxication sub-létale à long terme, des effets peuvent être mis en évidence sur la descendance : de 0 à 8  $\mu\text{g}/\text{l}$  aucune modification de croissance n'est apparente, tandis que le développement des oeufs, le pourcentage d'éclosion et la survie des larves sont au contraire affectés. Par exemple, après une exposition à 8  $\mu\text{g}/\text{l}$  pendant 15 semaines, la mortalité est nulle, mais un examen histologique montre, dans les ovaires des poissons exposés, des oocytes immatures à un des premiers stades de développement (Anonyme, 1977).

Sur le méné à grosse tête (*Pimephales promelas*), on observe, à 57  $\mu\text{g}/\text{l}$ , une diminution significative de la survie des embryons : le métal aurait vraisemblablement un effet sur le système cir-

culatoire, comme en témoignent quelques arrêts cardiaques et des caillots de sang dans le système vasculaire (PICKERING et GAST, 1972).

SMITH et coll. (1976) ont étudié, plus particulièrement, les effets du cadmium sur les constituants du sang chez le poisson-chat (*Ictalurus punctatus*). Après des expositions de 0 à 800  $\mu\text{g}/\text{l}$ , les protéines et les triglycérides sériques, ainsi que l'activité de la transaminase sérique, le rapport albumines/globulines, l'hématocrite et le taux d'hémoglobine ne montrent aucune variation significative : si quelque augmentation de l'activité de la transaminase sérique a été observée pour plusieurs poissons à 100, 200 et 800  $\mu\text{g}/\text{l}$ , cela relève davantage de la variabilité individuelle que d'une différence significative due au cadmium lui-même.

Qu'il s'agisse de la détermination des seuils létaux ou des effets sur certaines fonctions physiologiques, il est nécessaire de donner les conditions extérieures de l'expérimentation. En effet, et particulièrement dans le milieu aquatique, les facteurs abiotiques ont un rôle non négligeable sur la réponse d'un organisme à un toxique donné.

● Parmi les facteurs les plus influents sur la toxicité du cadmium, on peut citer la dureté de l'eau. D'une façon générale, la toxicité du cadmium diminue quand la dureté (exprimée en  $\text{CaCO}_3$ ) augmente (SPRAGUE, 1969) ; ceci pourrait impliquer un rôle protecteur du calcium.

ZITKO et CARSON (1976) expliquent ce fait par la compétition entre le cadmium et les autres cations sur des sites actifs spécifiques, et en fonction des constantes de dissociation d'un cation pour un ligand organique (glycine, glutathion), les auteurs expliquent que le magnésium, par exemple, ne peut diminuer l'effet toxique du cadmium, car leurs constantes sont trop voisines.

● La température a également un effet sur la toxicité du cadmium, certainement par le fait même qu'elle affecte le métabolisme du poisson. Ainsi, la toxicité augmente avec la température : les CL 50-5j sur le saumon (*Salmo salar*) sont respectivement de 1000 µg/l et 50 µg/l à des températures de 4°C et 10°C, en eau douce (Anonyme, 1977).

● De la même façon, lorsque le taux d'oxygène dissous dans l'eau devient un facteur limitant, l'effet toxique est plus grandement ressenti : la fréquence des mouvements operculaires doit s'accroître pour permettre au poisson une oxygénation suffisante, mais cette hyperactivité augmente la quantité de cadmium en contact avec les branchies. Cependant, l'oxygène dissous ne semble pas influencer la toxicité du cadmium au-dessus de 4mg/l d'oxygène (VOYER, 1975).

● La salinité et le pH de l'eau ont des effets moins évidents sur la toxicité du cadmium. Il semblerait que les pH alcalins soient plus favorables aux poissons, et que les CL 50 soient plus élevées à pH8 qu'à pH7. EISLER (1971) a étudié le rôle de la salinité en fonction de la température sur la toxicité du cadmium sur la fondule : à 20°C, la CL 50-8 j est de 15mg/l à une salinité de 5‰ se situe vers 30mg/l à une salinité de 35‰. Pourtant VOYER (1975) ne trouve pas d'effet significatif de la salinité sur le même poisson entre 10 et 32‰.

Les paramètres extérieurs ainsi déterminés, il est intéressant de connaître le ou les points d'impact du cadmium dans les organismes des poissons.

Selon certains auteurs (MOUNT et STEPHAN, 1967), le cadmium se fixerait au niveau des branchies, et une accumulation anormale (130-150 µg/g de matière sèche) de ce métal traduit une intoxication aiguë. De plus, il semble qu'il y ait une corrélation positive entre la quantité de cadmium retrouvée dans les branchies et la concentration dans le milieu. Il en est de même dans le foie pour le guppy

(*Lepomis macrochirus*). Pour la fondule, l'organe d'accumulation serait davantage les viscères que les branchies (EISLER, 1971). Les muscles et le squelette ne semblent pas concentrer le cadmium de façon significative, ni en fonction de la concentration, ni en fonction de la durée d'exposition.

Sur l'anguille (*Anguilla anguilla*), PALLY et FOULQUIER (1975) ont étudié la fixation du cadmium en fonction du temps. Les organes cibles semblent être, dans l'ordre, l'ensemble rate-coeur-vessie natatoire, puis le foie, les reins et les branchies. Si la concentration en cadmium ne semble pas augmenter du 15<sup>e</sup> jour au 44<sup>e</sup> jour pour le poisson entier, celle-ci augmente pour les organes cités, sauf pour le foie. Sur le poisson-chat (*Ictalurus punctatus*), SMITH et coll. (1976) ont montré une relation linéaire entre la concentration de cadmium dans le milieu, et celle retrouvée dans les reins et dans le foie. Ils notent également que les facteurs de concentration les plus élevés sont obtenus pour les teneurs dans le milieu les plus faibles : à 50 µg/l, f = 12 dans le foie et f = 41 dans les reins, tandis qu'à 800 µg/l, f = 2 dans le foie et f = 5 dans les reins.

Toujours sur l'anguille, ROMERIL et DAVIS (1976) ont montré que la concentration de cadmium dans l'organisme entier n'augmentait pas en fonction de la température. En effet, par augmentation du taux de croissance, entre 15,5°C et 25°C, et donc formation de nouveaux tissus susceptibles d'accumuler le métal, la concentration spécifique en métal des tissus reste la même. L'organe privilégié d'accumulation serait, pour ces auteurs, le foie par rapport aux tissus musculaires.

Ce rappel de quelques données de toxicité du cadmium sur le poisson montre combien le mode d'action de ce métal est encore difficile à cerner, et combien sont importantes les variations des résultats. En effet, les conditions des tests doivent être strictement définies pour que les résultats soient comparables, puisque beaucoup de facteurs extérieurs (dureté, oxygène dissous, température...) ont un effet de synergie avec le toxique. De plus, dans le milieu aquatique, les voies d'entrée du toxique sont multiples et les mécanismes d'osmoré-

gulation sont essentiels (VOYER, 1975) ; il est ainsi difficile de les contrôler tous. Il en résulte une grande variabilité apparente interspécifique et individuelle.

### 3.2.2. EFFETS SUR LES INVERTEBRES

Il existe, pour le cadmium, un certain nombre de données de toxicité pour différents invertébrés, appartenant aux différentes biocoenoses aquatiques. THORP et LAKE (1974) ont déterminé, pour plusieurs espèces, les CL 50-96h du sulfate de cadmium en eau douce (dureté égale à 10 mg CaCO<sub>3</sub>/l).

- . 0,04mg Cd/l pour l'amphipode *Australochiltonia subteniis*
- . 0,06mg Cd/l pour la crevette *Paratya tasmaniensis*
- . 0,84mg Cd/l pour la nymphe de l'éphémère *Atalophlebia australis*
- . 250mg Cd/l pour la nymphe de zygoptère *Ischnura heterosticta*,
- . et plus de 2000mg Cd/l pour la larve de trichoptère *Leptoceridae*.

Ces résultats montrent les différences de sensibilité importantes de divers organismes en réponse à une intoxication donnée.

Lors d'intoxications à plus long terme, la mortalité provoquée par le chlorure de cadmium a lieu au bout de 7 jours à 10 µg/l pour le crustacé *Gammarus fossarum*, en eau dure (320mg CaCO<sub>3</sub>/l).

Pour le chironomide *Tanytarsus dissimilis*, la CL 50-10 est de 3,4 µg/l et pour le gastéropode *Physa integra*, la CL 50-28j est de 8,2 µg/l (Anonyme, 1977).

Les effets sur la reproduction ont été observés par BOUTET et CHAISEMARTIN (1973) sur 2 crustacés : il y a une diminution de 50% de la reproduction à partir de 40 µg/l pour *Orconectes limosus*, et à partir de 50 µg/l pour *Austropotamobius pallipes*.



La CL 50-63h du gastéropode *Biomphalaria glabrata* est de 0,1 mg/l en eau douce (25mg CaCO<sub>3</sub>/l), à pH8, et à 20°C, mais la reproduction est déjà diminuée à des concentrations de l'ordre de 0,01 mg/l (RAVERA et coll., 1974) : après éclosion, les oeufs des mollusques traités à 0,1 et 0,5 mg/l et transférés dans une eau non contaminée sont tous morts au stade morula. Parmi les adultes traités, les survivants présentent une moindre mobilité, ne se nourrissent pas et secrètent un abondant mucus. La résistance au cadmium des embryons de *Biomphalaria* paraît plus faible que celle des embryons d'huitres *Crassostrea virginica*; la CL 50-48h de ces derniers est de 3,8mg/l, tandis que celle des embryons de *Biomphalaria* est de 0,5mg/l. Comparée aux adultes (le temps de survie est de 31 heures chez les adultes traités à 0,5mg/l) la sensibilité au cadmium des embryons de *Biomphalaria* semble moins grande.

A ces doses sub-létales, les effets systématiques du cadmium sont plus rarement décrits, mais on peut citer les travaux de LAKE et THORP (1974) sur le crustacé *Paratya tasmaniensis*. Les auteurs ont mis en évidence des modifications ultrastructurales dans les branchies : après une exposition de 96 h à 0,03 et 0,05mg/l (qui correspond au dixième de la CL 50-96 h), on observe, sur des coupes histologiques une dégénérescence des mitochondries avec accumulation de granules (d'environ 470 Å de diamètre), et par endroit, une dilatation des espaces intercellulaires et des membranes du reticulum endoplasmique.

Comme dans le cas des poissons, la sensibilité au cadmium des invertébrés aquatiques peut être influencée par certaines conditions du milieu. La dureté diminue la toxicité du cadmium sur *Tubifex tubifex*. A 20°C, les CL 50-48 h sont 2,8 - 31 - 45 - 720 µg/l pour des duretés respectives de 0,1 - 34,2 (sans tampon phosphate) - 34,2 (avec tampon phosphate) - 261 mg/l exprimées en CaCO<sub>3</sub> (Anonyme, 1977).

La mortalité semble, par contre, être accentuée par des teneurs élevées en oxygène dissous (6 à 7,6mg/l) par rapport à des concentrations plus faibles (3 à 4,9mg/l). Cette augmentation de toxicité serait due à une augmentation du métabolisme pour les teneurs élevées (Anonyme, 1977). Cependant, ces résultats ne sont peut-être pas si surprenants car les besoins en oxygène des invertébrés sont certainement inférieurs à ceux des poissons, et il en résulte que de faibles teneurs ne sont pas limitantes au développement des invertébrés.

L'influence de la température et de la salinité a été étudiée par O'HARA (1973) sur le crabe *Uca pugilator*. D'une façon générale, les températures les plus élevées (30°C) et les salinités les plus basses (10‰) entraînent une plus grande toxicité. Dans ces conditions, la CL 50-48 h est de 11mg/l et la CL 50-240 h est de 2,9mg/l. Le seuil le plus élevé est obtenu à 10°C pour une salinité de 30‰ (CL 50-240 h = 47mg/l). Les relations entre ces 2 facteurs montrent que la température a moins d'effet aux salinités les plus élevées.

Cet effet de la salinité peut être dû, soit à la présence de précipités non toxiques des sels de l'eau de mer avec le métal, soit à la réduction de l'entrée du métal dans l'organisme, par la présence d'un quotient osmotique de salinité.

Les mêmes auteurs ont déterminé l'accumulation du cadmium dans les différents organes du crabe par l'intermédiaire de l'isotope radioactif  $^{109}\text{Cd}$ . C'est ainsi que le cadmium se concentre préférentiellement dans la glande antennaire ou glande verte (organe d'excrétion) où l'on retrouve des concentrations maximales de 380  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche dans les crabes exposés à 25 mg/l, et de 118  $\mu\text{g/g}$  pour une exposition à 5mg/l (à 30°C et une salinité de 20‰). L'accumulation maximale est obtenue dans les 12 premières heures, tandis qu'après 24 h, il y a une nette diminution.

Dans les branchies, la concentration de cadmium augmente en fonction du temps, pour aboutir à un maximum vers 48 h ; la concentration de cadmium retrouvée dans les branchies des crabes exposés à 25mg/l est de 110  $\mu\text{g/g}$ , tandis que dans celle des crabes exposés à 5mg/l est de 18  $\mu\text{g/g}$ . Pour les plus fortes concentrations (25 et 15mg/l), il y a diminution après 48 h de la concentration du cadmium dans les branchies ; ce fait s'explique par la destruction probable des tissus, compte-tenu de la mortalité obtenue à ces concentrations. L'évolution de la concentration en cadmium retrouvée dans l'hépatopancréas est assez comparable à celle retrouvée dans les branchies, mais à des teneurs plus faibles.

Dans les muscles, la concentration en cadmium reste constante et peu élevée : le maximum obtenu à une exposition de 25mg/l est de 29,3  $\mu\text{g/g}$ .

En accord avec MOUNT et STEPHAN (1967), O'HARA suggère qu'il existe un seuil de concentration de cadmium dans les branchies au-delà duquel il y a mort de l'organisme ; pour le crabe *Uca pugilator*, ce seuil serait de 110  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche.

Des expériences comparables ont été faites sur l'huître *Crassostrea virginica* pour déterminer l'accumulation du cadmium dans ses tissus (sauf la coquille) à des teneurs compatibles avec celles rencontrées dans le milieu naturel (ZAROOGIAN et CHEER, 1976). Ainsi, après une exposition de 5  $\mu\text{g/l}$  pendant 40 semaines, la concentration de cadmium dans l'huître est de 13,57  $\mu\text{g/g}$  de matière fraîche, soit 104,91  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche, tandis que les teneurs dans les témoins sont respectivement de 1,69 et 12,55  $\mu\text{g/g}$  en matière fraîche et en matière sèche. De plus, cette accumulation observée en fonction du temps varie en fonction des saisons : en été (juillet-août), l'accumulation est plus de 2 fois supérieure à celle que l'on note pendant le printemps ou l'hiver. C'est dire que les températures estivales entraînent une augmentation du métabolisme de telle sorte que la filtration de l'eau augmente au travers des branchies. THORP et LAKE (1974) ont également constaté des variations saisonnières de la sensibilité au cadmium : la CL50 -96 h est de 0,06mg/l sur les crustacés *Paratya tasmaniensis* récoltés début juillet, et est de 0,18mg/l pour les organismes récoltés au début de l'hiver, pour des conditions identiques d'acclimatation et de tests.

Un autre facteur modifiant la toxicité du cadmium peut être la présence ou l'absence de composés organiques complexants. GIESY et coll. (1977) ont étudié les modifications de la toxicité du cadmium en fonction de la concentration et de la taille moléculaire des fractions organiques (acides humiques ou fulviques, par exemple). Ainsi, en eau témoin, la CL 50-48 h du crustacé *Simocephalus serrulatus* est de 7,0 µg/l tandis que dans une eau de l'étang de SKINFACE (CALIFORNIE), riche en matière organique, la CL 50-48 h est de 35,0 µg/l, pour des duretés comparables et faibles. Cette diminution de la sensibilité au cadmium, en fonction de la présence de ligands organiques, est plus significative pour le zooplancton que pour le poisson (*Gambusia affinis* dans l'expérimentation considérée), certainement en raison de l'ordre de grandeur même de cette sensibilité : quelques µg/l pour le zooplancton, quelques mg/l pour le poisson.

Sur le terrain, l'étude de la dynamique des populations dulçaquicoles, avant et après un effluent industriel, montre des différences de réponse par rapport aux tests de laboratoire. Par exemple, dans une eau de pH 7 et de dureté égale à 254mg CaCO<sub>3</sub>/l et contenant de 6,8 à 9,3 µg Cd/l, la mortalité de la truite Arc-en-Ciel est de 32%, tandis que la faune des invertébrés normalement présents ne semble pas affectée (Anonyme, 1977). Ceci supposerait que les effets directs sur les poissons eux-mêmes sont vraisemblablement plus importants que les effets indirects dus à la diminution de nourriture. De plus, les effets sur les invertébrés aquatiques ne semblent pas irrémédiables par rapport à ceux sur les poissons : après un rejet industriel entraînant, dans le milieu, des concentrations de cuivre de 30 µg/l, de zinc de 150 µg/l et de cadmium de 40 µg/l ; les crustacés, les mollusques, les larves d'odonates et les plécoptères sont éliminés ; les populations d'éphémères, coléoptères et phryganes sérieusement affectées ; mais plus loin, là où la pollution a diminué de 20 à 30%, tous les groupes taxonomiques sont à nouveau représentés, les crustacés et les larves campodéiformes de phryganes ne sont même plus abondants (THORP et LAKE, 1973).

### 3.2.3. EFFETS SUR LES VEGETAUX

D'une façon générale, le cadmium semble moins toxique pour le matériel végétal que pour le matériel animal. Le cadmium agirait au niveau de la photosynthèse en réduisant la concentration totale des pigments chlorophylliens (BAZZAZ et GOVINDJEE, 1974). Il en résulte donc une diminution de la productivité primaire.

Quelques expériences ont ainsi été faites sur la réduction du rendement de certaines plantes en fonction de la quantité de cadmium introduite dans le sol. JOHN et coll. (1972) ont constaté une diminution de 14% de la production de laitues, et de 67% de celle de radis après 3 semaines de culture sur un sol intoxiqué par du cadmium à 100  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche de terre.

Ils ont ensuite déterminé par spectrophotométrie d'absorption atomique, les teneurs en cadmium dans les différents lots. Pour les feuilles de laitue, ils ont retrouvé en moyenne 138  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche dans les essais par rapport à 2,3  $\mu\text{g/g}$  dans les témoins; dans les racines de radis les concentrations sont en moyenne de 387  $\mu\text{g/g}$  et 7,4  $\mu\text{g/g}$ , dans les essais et les témoins respectivement.

Dans le cas de plantes fourragères, le tableau III représente les concentrations de cadmium obtenues dans les récoltes soumises à des concentrations de cadmium dans le sol entraînant une diminution de 25% du rendement.

La sensibilité au cadmium varie en fonction des différentes espèces cultivées ; ainsi le montrent les différentes valeurs obtenues pour une inhibition de 50% de la croissance : 0,2 mg/l pour haricot, betterave, navet ; 1,0mg/l pour maïs et laitue ; 5mg/l pour tomate et orge ; 9mg/l pour le chou. Il y aurait élimination partielle de la microflore du sol pour des teneurs en cadmium supérieures à 250mg/g en matière sèche, (Anonyme, 1975).

Plantes	Cd ajouté dans le sol $\mu\text{g/g}$ (matière sèche)	Cd retrouvé dans les plantes $\mu\text{g/g}$ (matière sèche)
Sorgho ( <i>Sorghum halepense</i> )	15	9
Luzerne ( <i>Medicago sativa</i> )	30	24
Trèfle ( <i>Trifolium repens</i> )	40	17
Festuche ( <i>Festuca elatior</i> )	95	37
Chiendent ( <i>Cynodon dactylon</i> )	145	43

Tableau III : Relation entre la concentration de cadmium dans le sol entraînant une diminution de 25% du rendement et la concentration en cadmium retrouvée dans les plantes (d'après BINGHAM et coll., 1976).

Selon le même rapport, les facteurs affectant l'absorption du cadmium du sol par les plantes seraient la quantité de matière organique dans le sol, la capacité du sol à absorber le cadmium et le poids de cadmium échangeable contenu dans la fraction du sol. Le pH du sol aurait également une influence sur la toxicité du cadmium et son absorption par les plantes. Le cadmium est très mobile dans le sol, sa disponibilité pour les plantes est grande d'autant plus que les sols sont acides. La présence ou l'apport de certains ions, tels que le calcium, le magnésium, ou le potassium permet de rétablir une croissance normale des plantes, malgré la présence de cadmium, pour 2 graminées : *Festuca ovina* et *Agrostis tenuis* (SIMON, 1977).

En pollution atmosphérique, des mousses épiphytes sont utilisées comme indicatrices de la contamination par le cadmium : en SUEDE, la teneur en cadmium en zone non polluée de *Hypnum cupressiforme* est de 0,7-1,2  $\mu\text{g/g}$  de matière sèche tandis qu'elle est de 7,5  $\mu\text{g/g}$  dans le centre de STOCKHOLM, et de 9,5  $\mu\text{g/g}$  dans une ville du PAYS de GALLE. En zone très contaminée par les métaux, cette mousse ne peut survivre. En FINLANDE, c'est le lichen *Cladonia alpestris* qui est utilisé comme indicateur de pollution, et aux U.S.A. une broméliacée, *Tillandsia usneoides*, présente une accumulation de cadmium de 20  $\mu\text{g/g}$  en zone polluée pour des teneurs de 2,0 à 3,8  $\mu\text{g/g}$  en zones rurales (FLEISCHER et coll., 1974).

Ce sont, en effet, les plantes au système végétatif simple (sans feuilles ni racines) qui sont le plus susceptibles d'être de bons indicateurs de pollution atmosphérique. Ces organismes sont directement dépendants de l'air qui leur fournit les éléments nutritifs indispensables dissous dans l'eau sous toutes ses formes (pluie, brouillard, ruissellement). Ainsi, la répartition des lichens autour d'une zone urbaine permet, par exemple, une cartographie de la pollution par l'anhydride sulfureux (SKYE, 1968).

Les effets physiologiques du cadmium sur les plantes sont mal connus ; ce seraient les mitochondries qui seraient les organites les plus concernés. Des modifications structurales dues au cadmium entraînant des perturbations dans la chaîne des phosphorylations oxydatives, ont été observées chez le maïs (MILLER et coll., 1973) ou les cellules de levure (LINDEGREN et LINDEGREN, 1973).

Pour les algues, les données sont peu nombreuses. Ce ne sont que des valeurs obtenues le plus souvent sur le terrain, à part quelques études de toxicité sur des organismes tests de laboratoire. Une concentration de 300  $\mu\text{g/l}$  est létale pour *Selenastrum capricornutum*, en eau de faible dureté (15mg  $\text{CaCO}_3/\text{l}$ ), mais il y a inhibition de croissance dès 50  $\mu\text{g/l}$ . De même, le cadmium inhibe la croissance de *Scenedesmus quadricauda* à partir de 50  $\mu\text{g/l}$ . Pour cette même algue, KLASS et coll. (1974) ne trouvent aucun effet toxique significatif sur la numération à des concentrations de cadmium inférieures à 6,1  $\mu\text{g/l}$ . Par contre, à

20  $\mu\text{g}/\text{l}$ , il y aurait diminution de 70% de la production primaire d'après BURNISON et coll. (1975).

Pour ces mêmes auteurs, le phénomène apparaîtrait à 100  $\mu\text{g}/\text{l}$  pour *Chlorella pyrenoidosa* et à 1mg/l pour *Chlorella vulgaris* et *Ankistrodesmus falcatus*. A ces concentrations, des changements morphologiques dus au cadmium sont constatés par microscopie électronique, dans la structure des membranes et dans la vacuolisation du cytoplasme. Des modifications ultrastructurales des mitochondries sont aussi observées, avec diminution de la synthèse d'ATP (SILVERBERG, 1976).

Dans les eaux naturelles, les concentrations en cadmium retrouvées dans le phytoplancton sont faibles, compte-tenu des faibles teneurs du milieu. Dans la baie de MONTEREY (U.S.A.), 4,8  $\mu\text{g}/\text{g}$  de matière sèche sont retrouvées dans des diatomées, tandis que dans la baie de CALIFORNIE, l'accumulation est supérieure à 16,5  $\mu\text{g}/\text{g}$  (MARTIN et BROENKOW, 1975).

Dans les laminaires, *Laminaria digitata*, ce serait la présence des alginates qui, par leur affinité pour les cations divalents permettrait l'accumulation du cadmium, entre autre métaux (BRYAN, 1971). Selon KINKADE et ERDMAN (1975), ce pouvoir cumulatif du cadmium dans les algues dépendrait de la dureté totale calcique et magnésienne. Ils ont ainsi montré, sur *Nitella flexilis*, que dans une eau de dureté nulle, l'accumulation du cadmium, au bout de 21 jours, est de 40% supérieure à celle obtenue dans une eau dure (150mg/l exprimée en dureté totale).

Cependant, les données sur l'accumulation du cadmium dans les algues et sa toxicité restent rares. Il semble donc nécessaire de développer les recherches dans ce domaine, puisque la biomasse, à ce niveau trophique, est la plus grande et toute modification de la quantité et de la qualité de celle-ci peut entraîner de graves perturbations dans les écosystèmes aquatiques.



### 3.3. Discussion

Ce chapitre, non exhaustif, a eu pour but de décrire la toxicité du cadmium aux différents niveaux d'organisation de la vie. Les différents effets mentionnés montrent que le cadmium est, dans l'environnement, un des métaux les plus toxiques, et que les concentrations retrouvées dans les organismes laissent supposer un pouvoir cumulatif non négligeable.

L'étude des variations de certains facteurs abiotiques de l'environnement (température, dureté de l'eau, teneur en oxygène dissous...) a montré que les stress physiologiques en résultant, diminuent la tolérance des organismes aux polluants de l'environnement. C'est pourquoi, il est nécessaire de définir strictement les conditions physico-chimiques dans lesquelles les effets toxiques sont mis en évidence. Ceux-ci peuvent paraître très diversifiés, et les doses toxiques très variables en fonction des différents organismes considérés.

Cependant, certains effets majeurs sont comparables d'une espèce à l'autre. Nous citerons quelques exemples de rapprochements possibles :

- . On peut ainsi remarquer que la fonction respiratoire est généralement perturbée, que ce soient les poumons des mammifères ou bien les branchies des organismes aquatiques.
- . En intoxication aiguë, de nombreux cas pathologiques au niveau des organes reproducteurs sont observés : nécroses testiculaires chez les mammifères, problèmes de maturité sexuelle chez certains invertébrés.
- . Lorsque l'exposition à des concentrations sub-létales est prolongée, il y a dégénérescence du foie et troubles de la fonction excrétrice :

dysfonction rénale avec protéinurie chez les mammifères, accumulation de cadmium dans la glande antennaire du crabe ainsi que dans l'hépatopancréas

La connaissance des mécanismes d'action du cadmium reste à approfondir au point de vue biochimique et physiologique. Mais les impacts de ce métal dans l'environnement doivent davantage être étudiés pour éviter tout phénomène de toxicité induit par les chaînes trophiques, et limiter ainsi toute perturbation grave et irréversible de l'écosystème.

## DEUXIÈME PARTIE : MATÉRIEL ET MÉTHODES

## CHAPITRE I : LE MATERIEL BIOLOGIQUE

Les espèces idéales entrant dans la composition d'une chaîne alimentaire expérimentale doivent satisfaire un certain nombre de conditions énumérées ci-dessous :

- . Appartenance à un écosystème naturel, et encore mieux, à un même niveau mésologique.
- . Obtention et élevage de populations homogènes et facilement disponibles tout au long de l'année à l'aide de méthodes de culture ou d'élevage suffisamment simples.
- . Courte durée des cycles biologiques.
- . Valeur nutritive suffisante des proies.
- . Tolérance des individus d'une même population les uns par rapport aux autres : absence de cannibalisme, absence de compétition chimique inter et intraspécifique.
- . Valence écologique élevée (espèces euryèces).

### 1. LES PRODUCTEURS

Le matériel que nous avons utilisé est l'algue *Chlorella vulgaris* B eucaryote unicellulaire chlorophyllien de la classe des chlorophycées, dont on peut rappeler la place dans la systématique :

E : chlorophytes - Cl : chlorophycées - s/cl : chlorophycidés -  
 O : chlorococcales - F : oocystacées - G : *Chlorella* -  
 sp : *vulgaris* B.

La souche étudiée est la souche 211/11b du centre de culture d'algues et de protozoaires de CAMBRIDGE.

L'écologie de cette algue est mal définie. On peut cependant préciser que *Chlorella vulgaris* se trouve dans de nombreux écosystèmes dulçaquicoles, que ce soient des rivières, des lacs ou des étangs. Elle est ainsi citée par FINDENEGG (1972), PLANAS (1975), MATONICKIN et PAVLETIC (1975) en différents lieux géographiques, mais elle n'y constitue pas la population dominante.

Toutefois, il est à signaler que la détermination de l'espèce, voire du genre, pose de nombreux problèmes, d'ordre biochimique principalement (PIERRE, communication personnelle), et que l'espèce *Chlorella vulgaris* utilisée isolée et sélectionnée dans les laboratoires spécialisés peut être différente de l'espèce appartenant au phytoplancton naturel, comme la notion de souche tend à le confirmer.

### 1.1. Rappels morphologiques et physiologiques

*Chlorella vulgaris* est une algue unicellulaire, solitaire, non flagellée, de forme sphérique et de rayon compris, pour la souche utilisée, entre 1 et 10  $\mu$  selon le moment du cycle cellulaire.

Une des caractéristiques de cette algue est la résistance de sa paroi cellulaire. NORTHCOTE et coll. (1958) ont décrit la composition et la structure de celle-ci chez une autre espèce de Chlorelles (*Chlorella pyrenoidosa*) et ont précisé une épaisseur de paroi cellulaire de 210 Å pour un diamètre moyen de cellule de 3-4  $\mu$ . C'est seulement ATKINSON et coll. en 1972 qui auraient isolé chez *Chlorella pyrenoidosa*, une substance constitutive de cette paroi, responsable de la résistance, la sporopolénine ; chez *Chlorella vulgaris*, ce phénomène devrait être comparable, car il s'agit de la morphologie même de l'algue et non pas de la composition physico-chimique. En effet, un des critères de différenciation de ces 2 espèces serait l'activité hydrogénasique selon KESSLER (1962) et KESSLER et SOEDER (1962). Ainsi, dans le cas d'une déficience en azote, *Chlorella pyrenoidosa* serait capable de synthétiser des caroténoïdes secondaires, tandis que *Chlorella vulgaris* ne le pourrait pas (KESSLER et coll., 1963).

PEARSALL et LOOSE (1937) ont particulièrement étudié la composition chimique de la chlorelle (concentration en protéines, glucides et lipides) tandis que SPOEHR et MILNER (1949) ont plus spécialement observé les variations

de celle-ci en fonction des conditions extérieures (lumière, température, CO<sub>2</sub>, milieu nutritif...). Cette algue est très fréquemment utilisée en laboratoire, en physiologie particulièrement depuis les travaux de WARBURG (1919).

La plupart des auteurs détermine la composition physico-chimique en pourcentage d'azote, de carbone, d'oxygène et d'hydrogène par rapport au poids de matière sèche. Ils définissent un degré de réduction ou "R-value" (SPOEHR et MILNER, 1949), qui est l'expression de la quantité d'énergie disponible contenue dans le matériel biologique analysé. Plus le matériel est riche en substances organiques, plus le R-value est grand : il est proportionnel à la chaleur de combustion, qui peut être mesurée par bombe calorimétrique par exemple.

KETCHUM et REDFIELD (1949) indiquent la composition chimique et biochimique de plusieurs algues dont *Chlorella vulgaris*, et précisent qu'en pourcentage, les proportions de carbone, d'azote et d'hydrogène restent voisines et comparables d'une espèce à l'autre, cultivées au laboratoire dans les mêmes conditions, ou même pour des communautés naturelles du phytoplancton.

La reproduction, chez la chlorelle, n'est pas sexuée ; la croissance de la population est due à une libération, de façon végétative de 2, 4, 8 à 16 autospores, à partir d'une cellule mère (BAYEN, 1975). La rapidité de ces divisions cellulaires est directement liée aux éléments nutritifs et énergétiques qui sont fournis aux organismes.

## 1.2. Conditions de culture

Le milieu de culture choisi est celui de LEFEVRE-CZARDA, modifié par incorporation d'oligo-éléments, déjà utilisé par LEPAILLEUR et coll. (1973) pour proposer une technique d'étude de la toxicité d'un polluant vis-à-vis de *Scenedesmus quadricauda*. Le tableau IV donne la composition de ce milieu qui s'avère très simple, par rapport à d'autres utilisant du glucose (HOPKINS et WANN, 1926) ou bien de l'EDTA, comme agent complexant des micro-éléments indispensables à la croissance de la chlorelle (KUHL, 1962).

<p>. <u>Solution de base</u> :</p> <p>Ca (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O</p> <p>K NO<sub>3</sub></p> <p>Mg SO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O</p> <p>K<sub>2</sub> HP<sub>4</sub>O<sub>4</sub></p> <p>H<sub>2</sub>O qsp</p>	<p>40 mg</p> <p>100 mg</p> <p>30 mg</p> <p>40 mg</p> <p>1000 ml</p>
<p>. <u>Oligo-éléments I</u> :</p> <p>Cu SO<sub>4</sub>, 5 H<sub>2</sub>O</p> <p>(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub> Mo<sub>7</sub> O<sub>24</sub></p> <p>Zn SO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O</p> <p>Co Cl<sub>2</sub>, 6H<sub>2</sub>O</p> <p>Mn (NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 4 H<sub>2</sub>O</p> <p>C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>C<sub>7</sub>, H<sub>2</sub>O</p> <p>H<sub>3</sub> BO<sub>3</sub></p> <p>H<sub>2</sub>O qsp</p>	<p>0,3 mg</p> <p>0,6 mg</p> <p>0,6 mg</p> <p>0,6 mg</p> <p>0,6 mg</p> <p>0,6 mg</p> <p>0,6 mg</p> <p>10 ml</p>
<p>. <u>Oligo-éléments II</u> :</p> <p>Citrate de Fer</p> <p>Sulfate de fer</p> <p>Perchlorure de Fer</p> <p>H<sub>2</sub>O qsp</p>	<p>16,25 mg</p> <p>6,25 mg</p> <p>6,25 mg</p> <p>10 ml</p>

Tableau IV : Composition du milieu de culture des algues.

*Milieu de LEFEVRE-CZARDA, modifié par l'incorporation de 2 solutions d'oligo-éléments (0,5ml de chaque par litre de solution de base).*

Le dosage par autoanalyseur TECHNICON des ions calcium et magnésium donne une dureté de 32mg/l, exprimée en CaCO<sub>3</sub>, tandis que par le calcul, elle est de 29mg/l.

Le développement de nos cultures est donc autotrophe puisque le milieu ne contient pas de substances organiques. C'est pourquoi la croissance cellulaire est strictement dépendante de la lumière avec une vitesse directement proportionnelle à la durée d'éclairement (SPOEHR et MILNER, 1949). La photosynthèse est assurée par un éclairage moyen de 1600 lux distribué par l'intermédiaire de tubes fluorescents GRO-LUX (Sylvania-lifeline) F40T12/GRO. Des intensités lumineuses de 6000 à 12000 lux en continu sont plus couramment utilisées car elles permettent une croissance très rapide, mais de plus faibles intensités (500-3000 lux) suffisent, selon KUHL et LORENZEN (1964), pour obtenir un développement satisfaisant. Pour nous rapprocher des conditions naturelles, nous avons choisi arbitrairement une photopériode jour-nuit de 16/8, sans pour autant souhaiter et vérifier le synchronisme obtenu. En effet, certains auteurs (PIRSON et LORENZEN, 1958 - LORENZEN, 1956, 1957 - KUHL et LORENZEN, 1964) préconisent cette méthode pour induire un synchronisme nécessaire à certaines études de physiologie : recherche de certains métabolites qui dépendent de l'âge des cellules, par exemple. Cependant, d'autres interventions (centrifugation fractionnée, longue phase d'obscurité) semblent nécessaires pour obtenir un bon synchronisme, c'est-à-dire un pourcentage élevé de cellules du même âge en même temps. C'est pourquoi, nous pensons que nos cultures ne présentent pas un synchronisme parfait, ce qui nous semble ni un avantage ni un inconvénient pour des études d'intoxication.

On peut penser que pour des conditions de culture optimales, les effets dus à un toxique sont minimisés. Nos propres conditions de culture choisies sont limitantes pour l'ensemble des facteurs (composition du milieu, lumière, température...) et ainsi, les plus faibles modifications de la croissance, dues à un agent toxique, pourront être plus facilement mises en évidence.

La culture des algues est réalisée dans des erlenmeyers de 125 à 2000 ml. Ce sont des cultures de masse, puisqu'il n'y a aucun apport nutritif durant le développement des algues. Les erlenmeyers sont bouchés par du coton cardé, et les plus petits (125 ml) sont agités en continu sur un agitateur mécanique (NBS, modèle G10), réglé à 150 agitations par minute. On réalise ainsi une bonne homogénéisation des cultures et une aération suffisante (PEARSALL et LOOSE, 1937). Ces cultures sont utilisées pour étudier la croissance des algues, dans différentes conditions d'intoxication. Une modification de ces erlenmeyers (fig.2) permet une mesure facile, par opacimétrie.



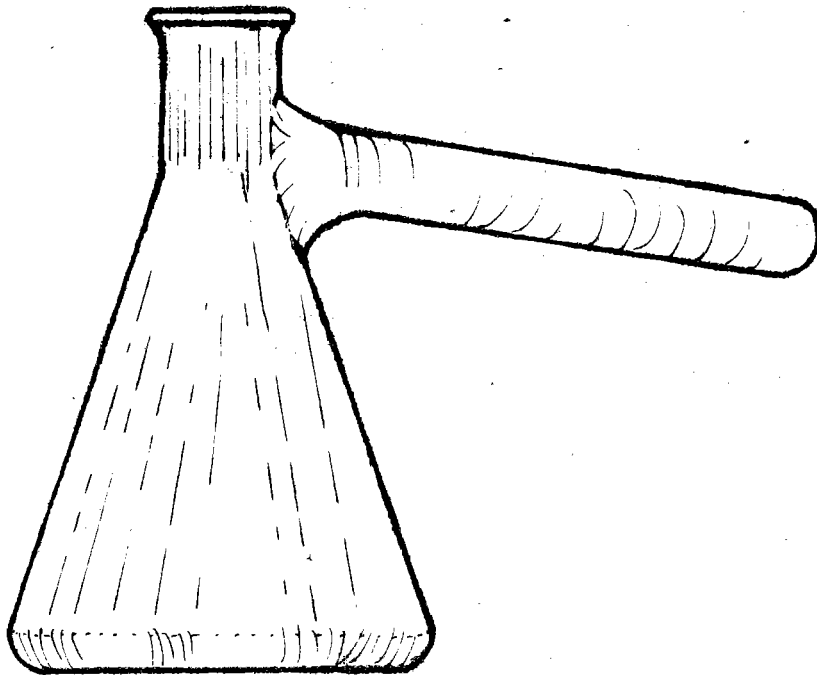


Figure 2 : Erlenmeyer de culture. Modification permettant la mesure de la D.O. par opacimétrie.

Les plus grands erlenmeyers sont utilisés pour la production d'algues nécessaire à la nutrition des daphnies. Les cultures sont aérées par un bullage d'air (aérateur RENA 301), ce qui permet également l'agitation des algues. Dans les deux cas, la pièce est thermostatée à  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Les conditions d'axénie sont respectées en stérilisant les milieux de culture à l'autoclave pendant 30 minutes. L'ensemencement doit se faire au moins 24 heures après stérilisation, sinon on constate une inhibition de la croissance (RICE, 1954).

L'axénie des cultures est vérifiée périodiquement par le laboratoire de microbiologie. Ces contrôles de stérilité sont faits par ensemencement

de la culture sur un bouillon au thioglycolate résazurine, spécialement conçu pour ces tests ; la contamination bactérienne est détectée après incubation à 37°C pendant 24 heures et plus, si nécessaire.

De plus, les cultures présentant à l'oeil nu des modifications anormales de la croissance, en l'absence de tout toxique, comme un développement irrégulier, ou un jaunissement, sont alors éliminées et recommencées. Toutefois, LEWOVA et coll. (1970) ont étudié les effets de plusieurs souches de bactéries sur la croissance de quelques souches de chlorelles et ont constaté qu'elles n'en étaient pas affectées pour la plupart.

En fonction des précautions prises, les modifications de croissance observées pour les cultures intoxiquées par le cadmium, sont bien dues au métal lui-même.

A part les culturesensemencées pour les expérimentations, l'entretien de la souche est assuré par un repiquage hebdomadaire, pour éviter l'épuisement du milieu et le vieillissement des cultures (PRATT, 1940). Celui-ci serait en relation avec un phénomène d'auto-destruction des populations par synthèse d'une toxine appelée chlorelline (PRATT, 1940 - PRATT et FONG, 1940 - RICE, 1954 - LEFEVRE et coll., 1949, 1951).

## 2. LES CONSOMMATEURS PRIMAIRES

L'espèce que nous avons choisie est la daphnie (*Daphnia magna* Str., souche 1820 fournie par l'IRCHA). C'est un arthropode appartenant à la classe des crustacés, sous-classe des branchiopodes, ordre des diplostracés, sous-ordre des cladocères.

La daphnie est largement répandue dans les eaux de la zone tempérée de la biosphère. On la rencontre, en général, dans les eaux stagnantes ou à cours lent, que ce soit dans des flaques d'eau ou des trous d'eau, dans des mares de ferme ou des abreuvoirs, dans des étangs de pisciculture ou des lacs. Elle est plus rarement présente dans les rivières.

La daphnie vit généralement sous une faible épaisseur d'eau, au milieu des végétaux : c'est dire qu'elle est essentiellement littorale (PACAUD, 1939). Elle se rencontre dans les eaux peu minéralisées, riches en matières organiques dissoutes ou en suspension et peu polluées par les micropolluants chimiques. On est ainsi amené à la classer dans la zone  $\beta$ -mésosaprob selon la classification de KOLWITZ et MARSON (1909).

La daphnie se nourrit en général de bactéries, d'algues et de divers détritiques végétaux. Les auteurs ne sont d'ailleurs pas unanimes sur la part relative de ces éléments dans le régime alimentaire de la daphnie. MAC MA et RIGLER (1963) distinguent trois sortes de comportement alimentaire correspondant à des battements différents des antennes.

La daphnie est également connue sous le nom de puce d'eau en raison de sa locomotion saccadée. C'est une nageuse relativement vigoureuse, progressant par une succession de bonds. Elle peut atteindre une vitesse de 1 mètre par minute.

Le déplacement de la daphnie est fortement influencé par la lumière. Elle est attirée par des intensités faibles ne dépassant pas 500 lux, mais ce phototropisme varie suivant l'état physiologique et les conditions du milieu (ROSE, 1929). Par ailleurs, les phénomènes de chimiotactisme n'ont pas été spécialement mis en évidence.

## 2.1. Rappels morphologiques et physiologiques (figures 3 à 7)

Cette espèce est la plus grande des daphnies puisqu'elle peut atteindre, à l'état adulte, 5 mm de longueur. L'animal est aplati latéralement et de forme ovalaire. La tête, d'aspect triangulaire, est bien séparée du reste du corps. Elle comporte un seul oeil résultant de la fusion de deux yeux latéraux réalisée pendant la vie embryonnaire. Cet oeil présente une structure complexe : il est mû par trois paires de muscles dans toutes les directions ce qui lui confère une grande mobilité. Le reste du corps, recouvert d'une carapace bivalve présente une symétrie bilatérale. Entre les valves, se trouvent les appendices thoraciques au nombre de 5 qui brassent l'eau d'un mouvement continu. Les valves sont terminées par une épine caudale plus ou moins longue. Le post-abdomen se termine par une griffe bifide, et c'est l'échancrure profonde du bord dorsal de celui-ci qui permet de distinguer facilement cette espèce des autres espèces de daphnie (figure 5a). A la jonction de la tête et des valves, s'insère la deuxième paire d'antennes : elles sont très développées et biramées. Ces rames, dont l'une est triarticulée, et l'autre quadriarticulée, servent à la locomotion (figure 5b). La première paire d'antennes est réduite à deux appendices n'intervenant pas dans la locomotion. La carapace est transparente. Le tube digestif apparaît ainsi comme un fin cordon noir parallèle à l'axe du corps. Il débouche au bout du post-abdomen. Les ovaires sont situés de chaque côté du tube digestif. Les oeufs se distinguent facilement dans la poche incubatrice située dorsalement. Cette transparence rend les différents organes facilement visibles à l'oeil nu ou à la loupe binoculaire, ce qui permet d'observer leur fonctionnement sans pour autant perturber l'animal.

La daphnie est un organisme représentatif du zooplancton filtreur. Les particules alimentaires en suspension dans le milieu sont dirigées vers la bouche grâce au courant d'eau créé par le mouvement des appendices thoraciques (WEISMANN, 1877). Elles sont filtrées et retenues par les soies filtrantes ou endopodites de ces mêmes appendices. NAUMANN (1921) et STORCH (1922, 1924, 1925) ont étudié de façon détaillée la structure et le mécanisme d'action de l'appareil filtrant des cladocères. Pour les daphnies, ce sont surtout les soies filtrantes des 3° et 4° paires d'appendices thoraciques qui jouent un rôle important dans la filtration de la nourriture.

à l'état adulte environ 60 heures.

La longévité de la daphnie dépend de la température. Elle est en moyenne de 45 jours à 18°C, et seulement de 29 jours à 28°C (MAC ARTHUR et BAILLIE, 1929). ANDERSON et JENKINS (1942) ont observé, quant à eux, une durée de vie moyenne de 40 jours, calculée sur 159 daphnies à 20°C.

La reproduction a lieu essentiellement par voie parthénogénétique. Cette caractéristique est intéressante pour l'expérimentateur, puisqu'elle permet d'obtenir des élevages de souche pure à partir d'une seule daphnie. Toutefois, il y a apparition de reproduction sexuée lorsque les conditions deviennent défavorables. Il faut noter à ce sujet que le dimorphisme sexuel est très marqué : le mâle est caractérisé par une taille beaucoup plus petite et des antennules très développées (figure 6a). La femelle parthénogénétique pond en une seule fois des oeufs qui vont séjourner et se développer dans la chambre incubatrice dorsale (figure 6b). Le nombre d'oeufs pondus peut aller de 1 à 40 selon les auteurs. Au bout de 2 à 3 jours, les jeunes daphnies vivipares sont évacuées dans le milieu ambiant quelques heures avant la mue. Lorsque les conditions deviennent défavorables (baisse de température, assèchement du milieu, confinement trop important d'animaux provoquant une accumulation des produits d'excrétion et une diminution des particules nutritives), il apparaît des femelles qui donnent naissance à des mâles et à des femelles : les femelles fécondées par des mâles donnent des "oeufs durables". Ceux-ci sont plus grands et au nombre de 2 (figure 7). La chambre incubatrice secrète une enveloppe protectrice particulière : l'éphippium (en forme de selle sur le dos de la femelle). L'éphippie ainsi constituée a une forme ovale et une couleur brun foncé. Elle se détache au moment de la mue. Les oeufs durables peuvent ainsi résister à des conditions particulièrement dures, jusqu'à ce que les conditions extérieures redeviennent favorables. C'est ainsi que, par exemple, ces oeufs sont pondus avant l'hiver pour assurer au printemps la réapparition de l'espèce. Les oeufs durables donnent naissance à des femelles parthénogénétiques qui recommencent le cycle.

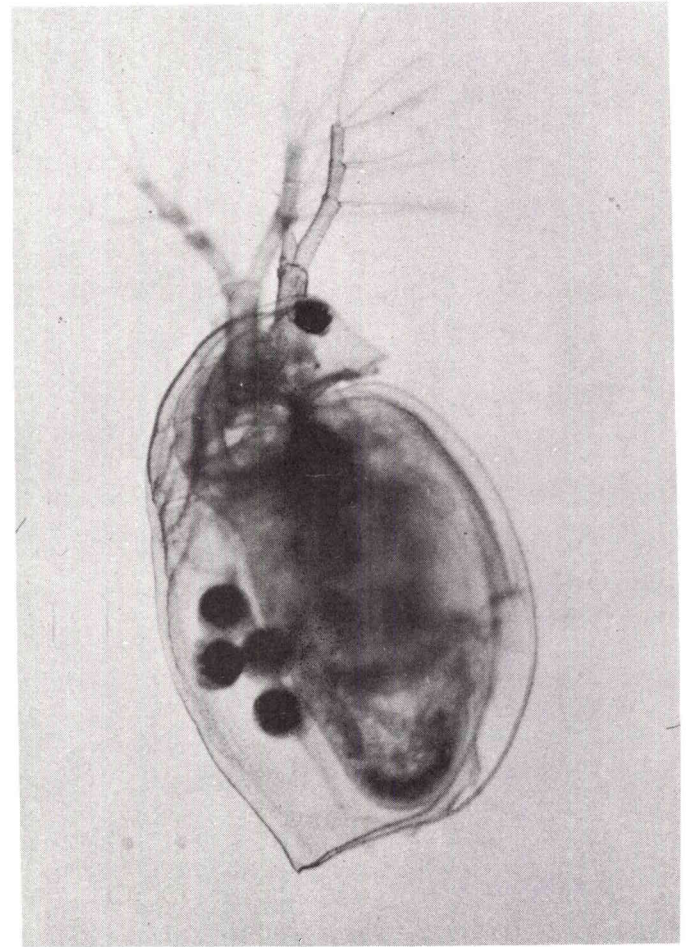
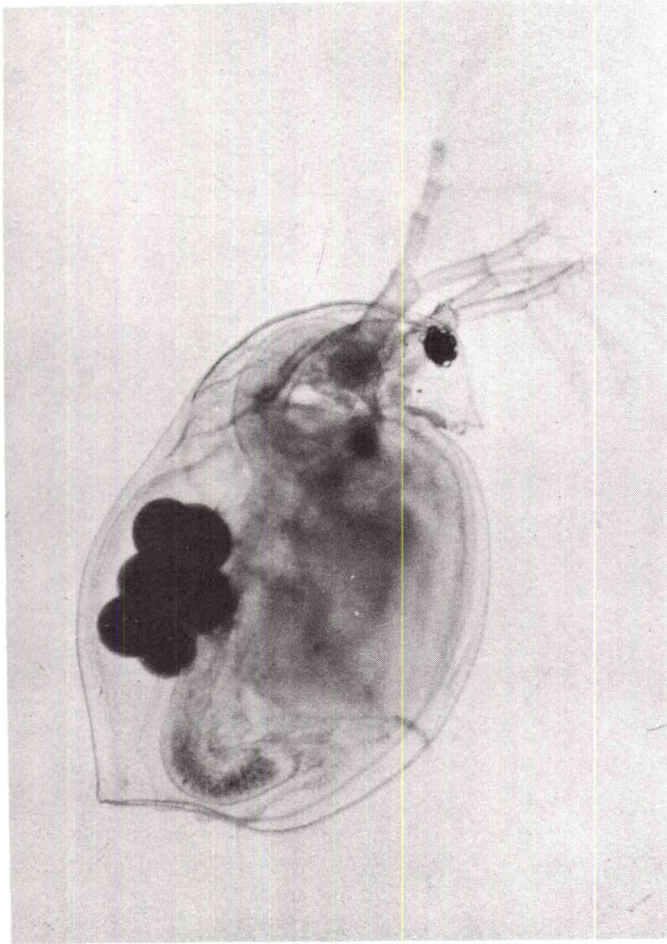


Figure 3 : Vues latérales de femelles parthénogénétiques possédant quelques oeufs dans la poche incubatrice ( grossissement 25x ).



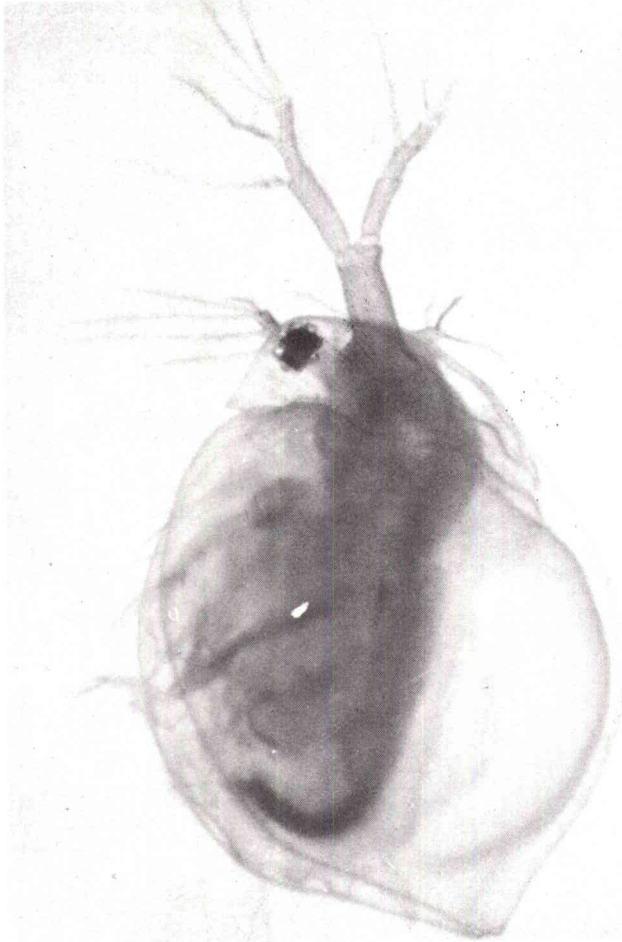


Figure 4a : Vue latérale d'une daphnie ne possédant pas d'oeufs dans la poche incubatrice ( grossissement 25x ).

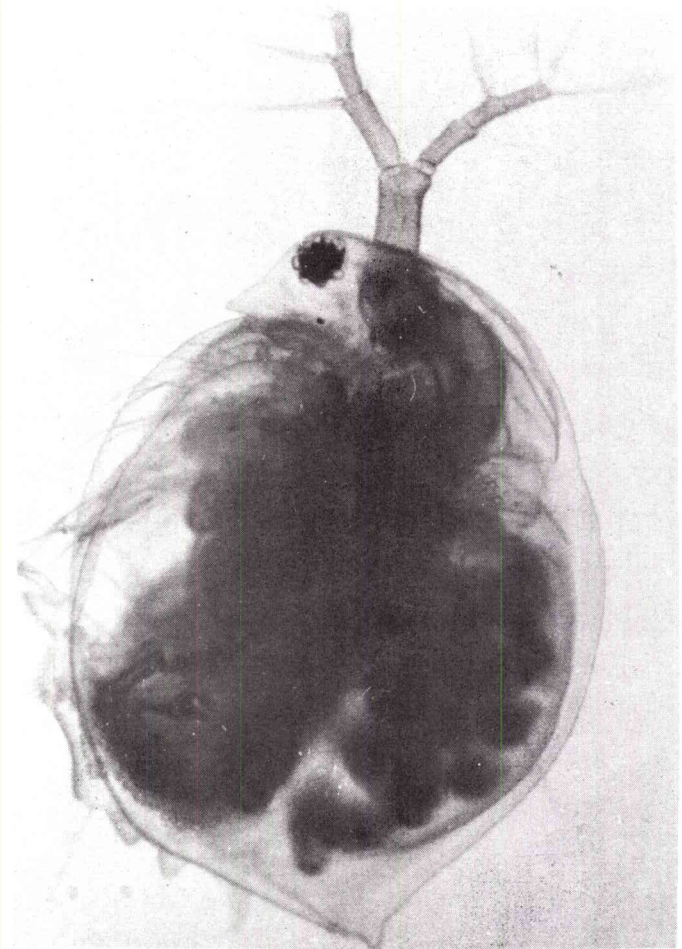


Figure 4b : Vue latérale d'une daphnie possédant de nombreux oeufs dans la poche incubatrice ( grossissement 25x ).

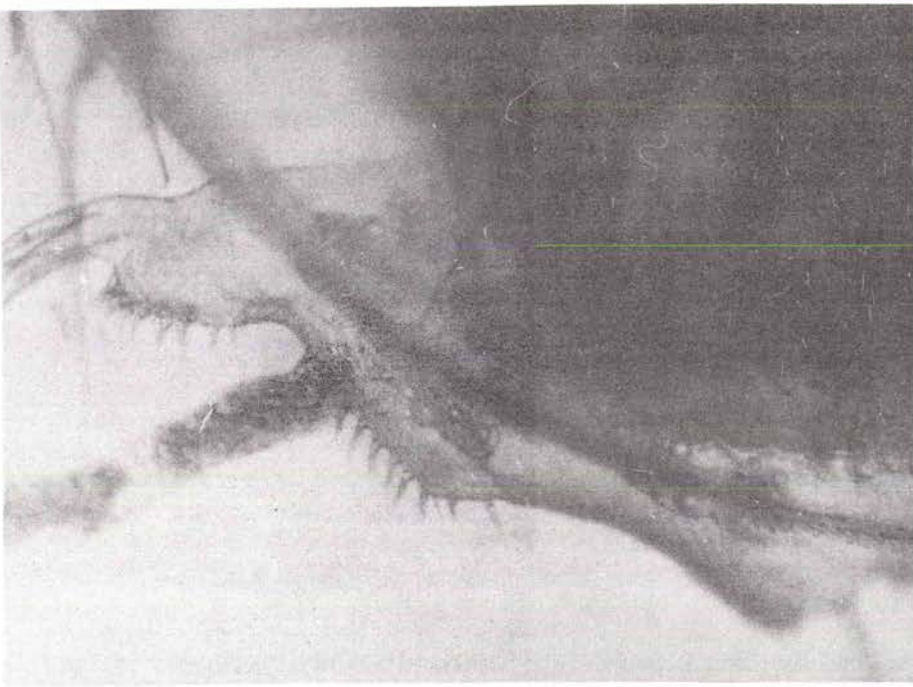


Figure 5a : Détail du postabdomen de Daphnia magna ( grossissement 250x ).

Postabdomen de Daphnia magna  
(d'après PACAUD, 1939).

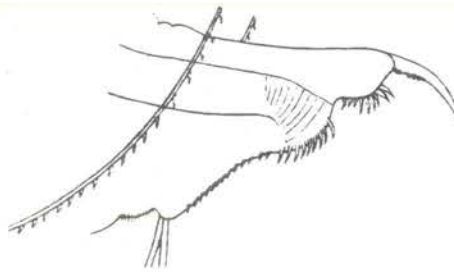
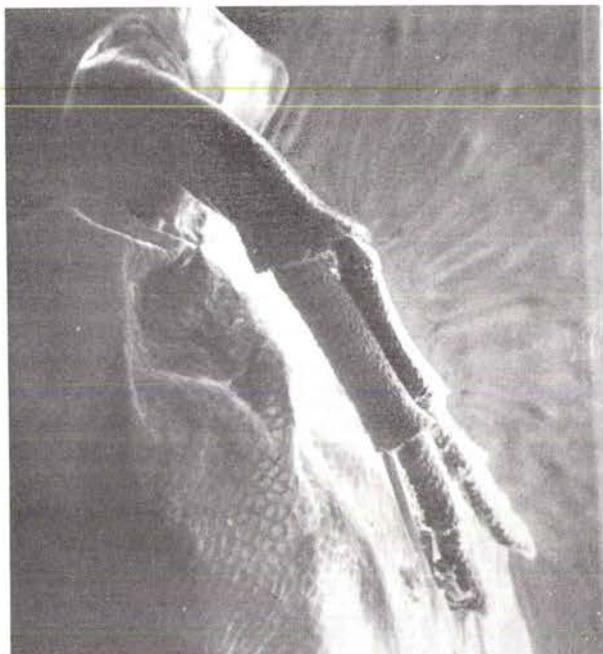
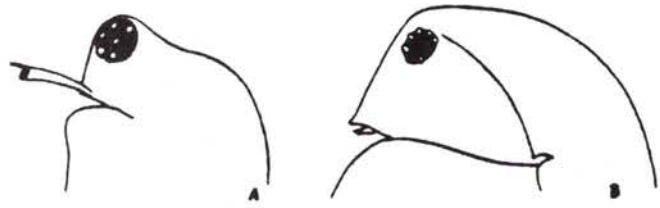
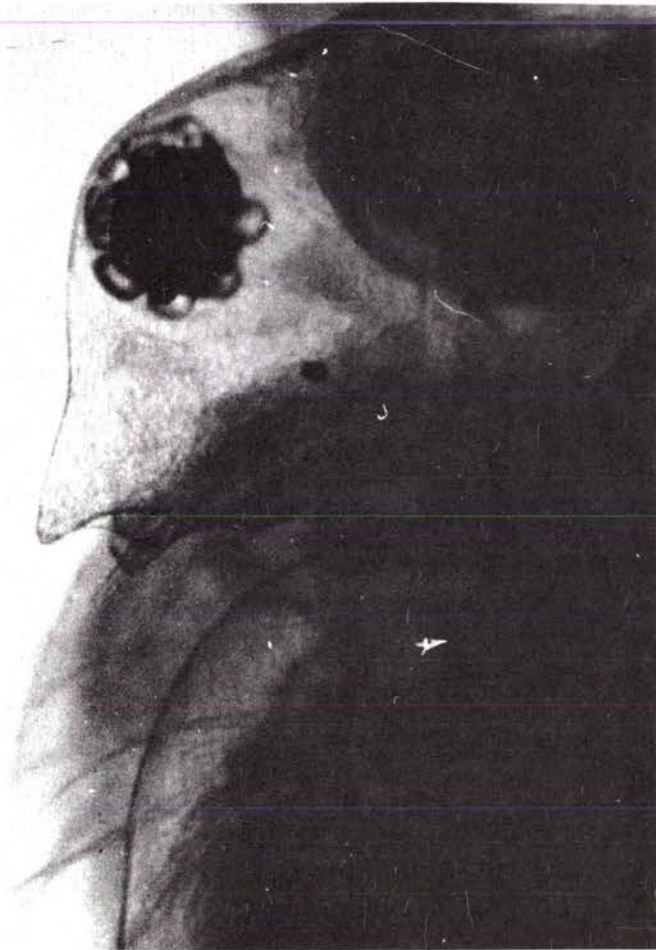


Figure 5b : Détail d'une antenne  
biramée. Mise en évidence d'une  
rame triarticulée et d'une rame  
quadriarticulée ( d'après  
BECKER, 1975, grossissement  
95x ).







Dimorphisme sexuel d'après la forme de la tête (d'après PACAUD, 1939).

A = mâle

B = femelle

Figure 6a : Détail de la tête ( grossissement 250x ).

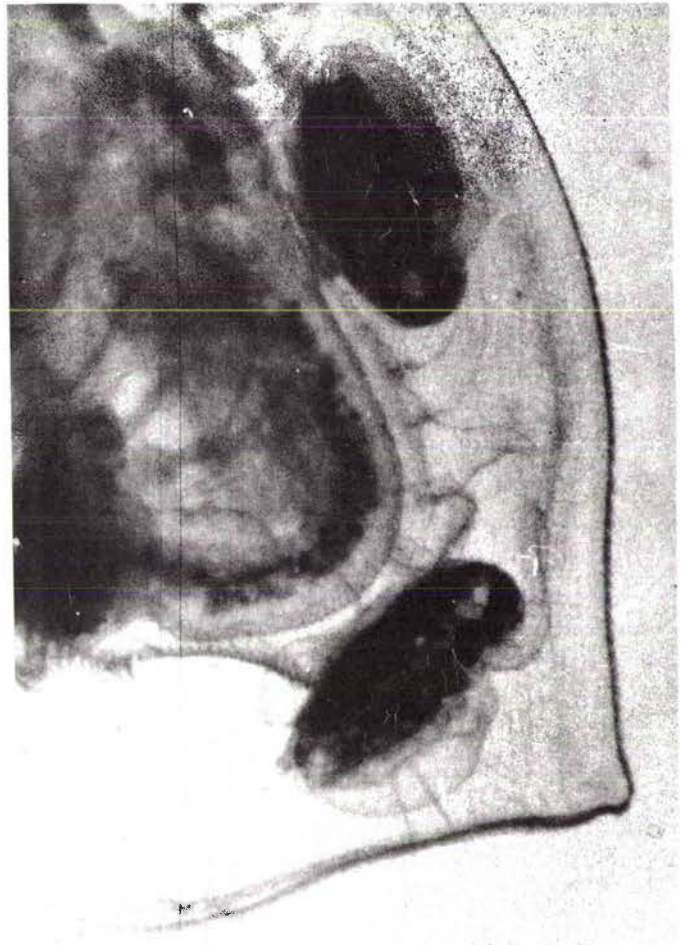


Figure 6b : Détail d'une poche incubatrice avec embryons, ( grossissement 250x ).

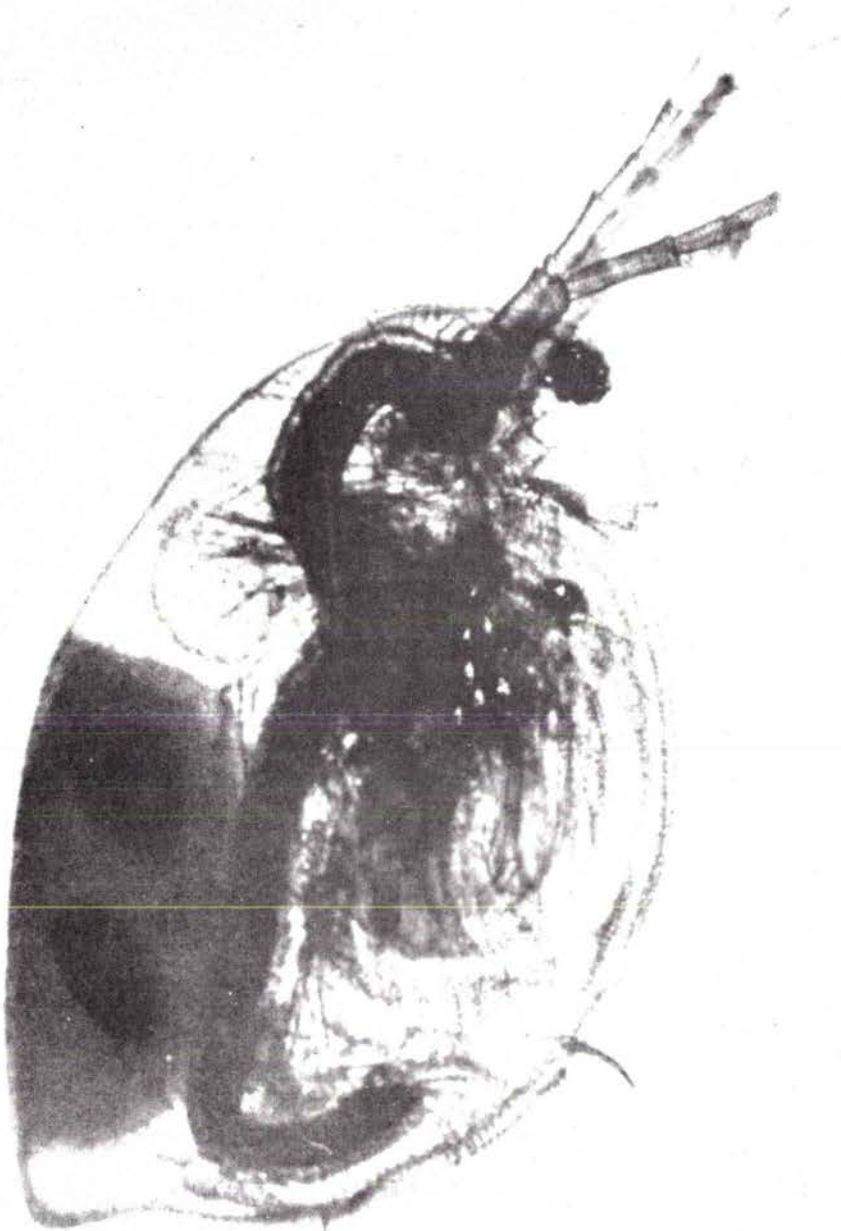


Figure 7 : Vue latérale d'une daphnie portant une éphippie ( grossissement 100x ).

Les échanges respiratoires se font surtout au niveau des épipodites des appendices thoraciques.

Les appendices assurent donc, non seulement l'apport de nourriture, mais aussi le renouvellement de l'eau au contact des épipodites branchiaux. Ceci implique que le ralentissement ou l'arrêt du mouvement des appendices thoraciques va entraîner des conséquences graves pour la nutrition et la respiration de l'animal.

La daphnie présente un cas intéressant de régulation pour un des constituants du sang, l'hémoglobine, très étudié par FOX (1957), sur diverses espèces de daphnies. Lorsque le milieu est bien oxygéné, on observe des daphnies de couleur pâle. Par contre, lorsque la teneur en oxygène diminue en-deçà d'un certain seuil, les daphnies prennent une teinte rouge. Celle-ci est due à une augmentation de la concentration d'hémoglobine dans le sang, ce qui pallie le déficit du milieu extérieur. Cette augmentation peut être de l'ordre de 20 fois la concentration de départ, ce qui est considérable si on la compare à la capacité d'adaptation des hommes aux atmosphères raréfiées d'altitude, où la concentration en hémoglobine n'augmente, au maximum, que de 1/5. Cette augmentation ne peut se faire toutefois que si les daphnies sont bien nourries, et si le milieu contient suffisamment de fer, constituant de l'hème. L'augmentation de température provoque, à un moindre degré, le même phénomène.

Comme tous les crustacés, les daphnies muent. La présence d'une carapace chitineuse rigide empêche toute augmentation de taille, si ce n'est immédiatement après la mue, lorsque la nouvelle enveloppe est encore tendre et molle. On distingue une avant-mue ou proecdysis, la mue proprement dite ou ecdysis, l'après-mue ou metecdysis, ainsi que la période inter-mue. Lors de la mue proprement dite, l'animal double pratiquement son volume pendant une minute environ. Ce gonflement est dû à une brusque entrée d'eau dans l'animal (GREEN, 1963). Toutes les étapes de la mue sont contrôlées par des hormones cérébrales, mais il n'en reste pas moins vrai que c'est un moment critique dans la vie de l'animal. Les daphnies sont alors plus sensibles vis-à-vis des facteurs du milieu : l'entrée massive d'eau à un moment donné ainsi que la formation d'une nouvelle couche de chitine, puis son durcissement progressif entraîne une modification du taux de rétention de certains composés. ANDERSON et JENKINS (1942) signalent que la première mue a lieu aux environs de la vingtième heure à 25°C ; les jeunes daphnies muent ensuite presque tous les jours. Les périodes inter-mues augmentent sensiblement en fonction de l'âge pour atteindre

## 2.2. Conditions d'élevage

### 2.2.1. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

L'élevage des daphnies au laboratoire semble apparemment poser peu de problèmes. Toutefois, la daphnie va dépendre des caractéristiques physico-chimiques qualitatives et quantitatives du milieu extérieur. VIEHOEVEF retenait déjà en 1935 quelques éléments prépondérants de la réussite d'un élevage, parmi lesquels on peut citer : l'intensité de la lumière, la température, le pH, l'oxygène dissous, la quantité et la pureté de l'eau utilisée pour le milieu de culture, ainsi que la nature et la quantité de la nourriture fournie.

D'après SCHINDLER (1968), la lumière ne joue pas un rôle significatif dans l'alimentation de la daphnie, mais HARRIS et WOLFE (1955) signalent qu'elle préfère apparemment des intensités de l'ordre de 90 à 270 lux tandis que CROSBY et TUCKER (1966) utilisent pour leurs expériences une intensité d'environ 1100 lux. D'une manière générale, l'intensité choisie par les auteurs varie en fonction de la nourriture fournie et se situe entre 10 et 1000 lux.

La daphnie est eurytherme. Les températures habituellement utilisées se situent au centre de la zone optimale de tolérance définie par KASTAL'SCHAIA-KARZINKINA (1942) allant de 17 à 23°C. Outre le rôle physiologique joué par la température, il faut remarquer qu'elle influe aussi sur la toxicité des substances testées. En conséquence, il est important de réaliser les élevages et les expériences à une température constante.

Selon ANDERSON (1946), la zone de tolérance de la daphnie vis-à-vis du pH est comprise entre 6,0 et 9,5, la zone optimale se situant entre 8,1 et 8,5 (MAC ARTHUR et BAILLIE, 1929). De nombreux auteurs se placent aux environs de  $8,0 \pm 0,2$  unités pH.

La daphnie est très tolérante vis-à-vis du manque d'oxygène dissous, la limite inférieure se situant généralement aux environs de 15% de la saturation (CABRIDENC et LUNDHAL, 1974).

La quantité d'eau utilisée pour l'élevage peut être très variable. Le minimum semble être 0,5 ml, mais MAC ARTHUR et BAILLIE (1929) ont observé que 100 à 150 ml par daphnie donnait les meilleurs résultats. Les densités généralement réalisées varient de 1 à 10 daphnies par 100 ml.

L'eau utilisée peut provenir de diverses origines : ce peut être une eau brute, filtrée ou centrifugée, provenant d'un aquarium, d'un bassin, d'une source, d'une mare, d'un étang ou d'un lac bien équilibré. Certains auteurs utilisent l'eau du robinet déchlorée par aération ou l'eau de pluie enrichie, ou même l'eau d'abreuvoir à bestiaux (NAUMANN, 1925).

De nombreuses méthodes d'élevage ont été ainsi proposées dont la plupart se déroulent dans des conditions mal définies et souvent non standardisables. La solution idéale, parce que standard, semble être une eau bidistillée additionnée judicieusement de quelques sels minéraux indispensables. D'une manière générale, les cations  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ , ainsi que les anions  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{SO}_4^{--}$  et  $\text{PO}_4^{---}$  doivent être présents. Les auteurs ne sont guère unanimes sur l'action des sels minéraux. LAGERSPETZ (1958) signale que la daphnie peut supporter une salinité de l'ordre de 5,8‰, alors que CABRIDENC et LUNDHAL (1974) notent que la  $\text{CI}_{50}^{24h}$ \* est de 4,8g/l. Ces mêmes auteurs trouvent que les sels de potassium sont plus toxiques que les sels de sodium, le potassium présentant une toxicité vraie. La sensibilité des cladocères aux concentrations élevées de calcium a également été soulignée. Par ailleurs, une concentration de 30mg/l de magnésium inhibe leur reproduction (PACAUD, 1939).

Quelle que soit la composition physico-chimique du milieu retenu, les animaux en élevage ont besoin pour leur vie, leur croissance, et leur reproduction, d'une nourriture appropriée devant obéir à des nécessités d'ordres qualitatif et quantitatif, et satisfaire également à certaines conditions d'appétence. Différentes techniques ont été proposées obéissant plus ou moins à ces trois règles et se basant sur le régime alimentaire des daphnies dans la nature, au demeurant très varié. On peut distinguer trois grands types de nourriture :

- . Les cultures mixtes d'organismes vivants obtenues par mise en suspension de feuilles, fumiers, engrais, céréales, viandes, sangs, oeufs...

\*  $\text{CI}_{50}^{24h}$  : concentration qui inhibe la mobilité de 50% de la population au bout de 24 h.

- . Les cultures pures d'organismes vivants, bactéries, champignons, protozoaires, algues, élevés sur un milieu nutritif dont la composition chimique est connue et qui doit être compatible avec les exigences de la daphnie ou sinon être facilement éliminé de la nourriture.
- . Les produits organiques de synthèse tels que les vitamines acides aminés, urée, glucose...

On constate, en fait, que les solutions nutritives utilisées sont rarement des solutions de composition chimique connue. La culture idéale à cet égard serait évidemment l'élevage d'un nombre déterminé d'animaux vivant dans une solution synthétique additionnée de nourriture adéquate, toujours disponible, et de qualité constante. La nourriture utilisée, tout en se rapprochant le plus possible de l'alimentation naturelle des daphnies, doit permettre d'obtenir un bon développement des individus et une reproduction abondante. Plusieurs auteurs ont ainsi choisi d'utiliser des algues pour nourrir les daphnies (WOLTERECK, 1928 - VIEHOEVER, 1935 - PACAUD, 1939 - LEFEVRE, 1942 - PRATT, 1943 - TURNER et LANNON, 1952 - RYTHER, 1954 - BOURNE, 1959 - BRINGMANN et KUHN, 1959, 1977 - MAC MAHON et RIGLER, 1963 - DEWEY et PARKER, 1964 - COWGILL et BURNS, 1975).

Les algues utilisées le plus souvent sont : *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlamydomonas* sp. Mais la plupart des algues d'eau douce donnent de bons élevages de daphnies (LEFEVRE, 1942). Selon WOLTERECK (1928), les daphnies prospèrent d'autant mieux qu'on leur donne des algues plus petites. Pour VIEHOEVER, 1935, elles doivent être surtout de faible dimension et de préférence unicellulaires, rondes et non filamenteuses pour ne pas interférer avec les mouvements de la daphnie. Elles doivent pouvoir facilement rester en suspension dans l'eau, et ne pas posséder de paroi cellulosique ou siliceuse afin d'être facilement digérées. LEFEVRE (1942) cite quatre espèces d'algues favorables à l'élevage des daphnies : *Phacus pyrum*, *Chlorella vulgaris*, *Gonium pectorale*, *Synura uvella*. Ces espèces sont cependant morphologiquement, cytologiquement et chimiquement différentes. Par contre, elles sont toutes quatre de petite taille et restent en suspension dans les milieux de culture.

Il faut signaler, au sujet de la chlorelle, une caractéristique particulière. PRATT et coll. (1940 a,b, 1945), puis RICE (1954) signalent que les chlorelles produisent et libèrent dans le milieu une substance thermolabile appelée chlorelline. Au vu de ces travaux, DEWEY et PARKER (1964) préfèrent utiliser une autre algue (*Scenedesmus obliquus*) parce que la "chlorelline, une toxine possible, est une source potentielle de difficulté". RYTHER (1954) observe que le taux de filtration de la daphnie (c'est-à-dire la quantité d'eau filtrée par unité de temps) est inhibé par des substances produites par les trois sortes d'algues utilisées comme nourriture : *Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* et *Navicula pelliculosa*. Plus spécialement avec les chlorelles, il montre que cette inhibition est maximum lorsque les cultures sont vieilles, tandis qu'elle est minimum lorsque les cultures sont jeunes et en phase exponentielle de croissance : dans ce dernier cas, les daphnies croissent rapidement et se maintiennent à un fort taux de reproduction. Ce faisant, RYTHER impute l'inhibition constatée avec les chlorelles à la chlorelline dont l'existence avait été signalée quelques années auparavant, sans toutefois le prouver de façon certaine. Parallèlement, il met en évidence que l'inhibition observée est due en grande partie à la chlorelline libérée lors de la dégradation des cellules dans le tube digestif de la daphnie.

Par contre, les résultats d'expériences similaires, en présence de cultures jeunes, réalisées par MAC MAHON et RIGLER (1963), ne mettent pas en évidence d'inhibition du taux d'alimentation de la daphnie (c'est-à-dire du nombre de cellules consommées par daphnie et par unité de temps). Ils expliquent les résultats obtenus par RYTHER non pas par l'effet d'une substance, mais par le fait que la daphnie peut réguler la collecte et l'ingestion de la nourriture.

Plus récemment, BRINGMANN et KUHN (1977) ont décrit un élevage de daphnies alimentées par des chlorelles âgées de 8 jours.

### 2.2.2. CONDITIONS D'ELEVAGE UTILISEES

Les élevages sont réalisés dans deux salles thermostatées à une température moyenne de 18°C. Cette température relativement basse a été choisie de façon à augmenter la longévité des daphnies et à diminuer leur consommation d'oxygène. L'éclairage est assuré par des tubes MAZDA FLUOR TF 65 (AV) produisant un éclairage moyen de 1500 lux.

Dans un premier temps, nous avons conduit notre élevage selon le protocole défini par la norme expérimentale AFNOR T. 90301 (1974). Toutefois, les conditions d'élevage de cette technique sont telles qu'elles donnent lieu à une grande variabilité et quelquefois à une mortalité importante. Le milieu de départ est composé de terre et d'eau, tous deux constituants hétérogènes. La terre apporte une certaine partie d'impuretés (matières organiques, microflore et microfaune) qui sont évidemment nécessaires à l'établissement de conditions d'équilibre, mais qui augmentent les sources de contaminations. L'eau potable du robinet est de composition physico-chimique variable, surtout en ce qui concerne la teneur en chlore. A cet égard, divers auteurs, utilisant une eau potable, prennent le soin de l'aérer pendant 24 à 48 heures avant de l'utiliser. D'autre part, la norme recommande d'utiliser, comme nourriture, une solution mixte S composée "d'extrait de viande en pâte pour bactériologie" et de glucose, qui représente une nourriture très riche, non seulement pour les daphnies, mais aussi pour d'autres organismes. Le milieu s'enrichit ainsi rapidement en algues de toutes sortes, de plus ou moins grande dimension, uni ou pluricellulaires, filamenteuses ou non. Ce faisant, elles ne sont pas toutes disponibles pour la daphnie. Elles peuvent même jouer un rôle néfaste. On a ainsi retrouvé un fort pourcentage de daphnies "engluées", dont les appendices sont pratiquement bloqués par des algues filamenteuses s'étant développées dans la cavité thoracique, empêchant, par là même, toute nourriture et toute reproduction.

Au vu de ces premiers résultats, nous avons préféré utiliser un milieu de qualité constante et connue, contenant une nourriture qui soit quantifiable et d'origine biologique, de telle manière que l'ensemble soit favorable à l'élevage des daphnies.



Les daphnies en élevage sont ainsi nourries à l'aide de chlorelles. Le milieu et les conditions de culture de cette algue, ainsi que ses caractéristiques morphologiques et physiologiques ont déjà été décrites précédemment (p.58 ). Les chlorelles utilisées proviennent généralement de cultures aérées par bullage d'air et âgées de 8 à 12 jours. Les cultures plus âgées ne sont pas employées car les algues sont alors consommées beaucoup plus lentement (RYTHER, 1954 - MAC MAHON et RIGLER, 1963). Les solutions algales ne sont jamais utilisées directement ; à 2 reprises, elles sont centrifugées à 2800xg pendant 5mn (KERSTING et HOLTERMAN, 1973 - CANTON et coll., 1975), et sont remises en suspension dans du milieu Oligo-LC "frais". Cette opération permet d'éliminer le milieu de culture usagé et d'éviter ainsi un possible effet toxique de celui-ci (DEWEY et PARKER, 1964 - CANTON et coll., 1975). Ce lavage permet en outre de se mettre toujours dans les mêmes conditions, car les milieux de culture "usagés" ont, après 10 jours, des compositions variables suivant que les chlorelles ont plus ou moins bien utilisé les différents nutriments mis à leur disposition.

Les solutions algales étant ainsi préparées, les élevages de daphnies se déroulent dans les conditions suivantes :

- a) Constitution des milieux : solution algale diluée au 4/10 avec de la VOLVIC.
- b) Quantité de chlorelles fournie, calculée sur la base de  $1.10^6$  chlorelles par daphnie par heure.
- c) Changement des milieux d'élevage tous les 7 jours.

Nous allons commenter successivement chacun de ces points particuliers.

a) Constitution des milieux

Il s'est avéré que les daphnies ne pouvaient pas survivre dans le milieu oligo L.C., et cela quelle que soit la concentration d'algues présente. A cet égard, on peut citer les résultats d'une expérience typique : 2 lots de 20 daphnies pré-adultes sont placés, l'un dans 200 ml de milieu

Calcium	7,5 ± 0,4
Magnésium	5,2 ± 0,3
Sodium	9,6 ± 0,5
Potassium	7,8 ± 0,4
Chlorures	4,9 ± 0,3
Nitrites	0
Nitrates	0,40
Sulfates	4,8 ± 0,5
Bicarbonates	62,1 ± 0,9
Fluor	0,2 ± 0,04
Silice	27,8 ± 0,4
Résidu sec	130 mg/l
T.H.	4,0°F
Alumine	10 µg/l
Arsenic	5 µg/l
Bore	5 µg/l
Brome	6 µg/l
Fer	10-40 µg/l
Phosphore	20 µg/l
Strontium	15 µg/l
Vanadium	12 µg/l
Cadmium	0,1 µg/l
Zinc	0,2 µg/l
Mercure	0,5 µg/l
Examen bactériologique	50 000 germes/ml
pH	= 7

TABLEAU V : PRINCIPALES CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DE L'EAU VOLVIC (SOURCE CLAIRVIC)

oligo L.C. contenant environ 100 000 chlorelles par ml, et l'autre dans 200ml de milieu oligo L.C. sans algues. La figure 8 regroupe les courbes de mortalité des deux cas envisagés. On observe, au bout de six jours, que dans les deux cas, toutes les daphnies sont mortes. En absence d'algues, le  $TL_{50}$  (temps létal de 50% de la population) est de 24 heures, tandis qu'en présence d'algues, il est de 54 heures. On peut ainsi en conclure que le  $TL_{50}$  du milieu oligo L.C., vis-à-vis des daphnies, est compris entre 1 et 3 jours suivant les conditions.

L'examen de la composition du milieu oligo L.C. permet de mieux comprendre la toxicité observée. On y remarque, en effet, la présence en grande proportion, de nitrate de potassium. TAUB et DOLLAR (1964) notent, sur une autre espèce de daphnie (*Daphnia pulex*) que les sels de potassium sont toxiques, sauf s'ils sont combinés avec des sels de sodium en quantité égale ou inférieure. Ces mêmes auteurs notent que l'ion nitrate est également toxique, mais de manière plus variable et qu'il serait préférable de le remplacer par l'ion chlorure. Il semble donc que le milieu oligo L.C. ne soit pas assez équilibré, au point de vue  $Na^+/K^+$  et  $Cl^-/NO_3^-$ , pour permettre la survie des daphnies en élevage. Au vu de ces premiers résultats, nous avons dilué le milieu oligo L.C. contenant les chlorelles avec une eau de qualité constante. Nous avons choisi d'utiliser une eau minérale du commerce (VOLVIC, source Clairvic) disponible en bouteilles plastiques. La composition physico-chimique de cette eau est résumée dans le tableau V. Les résultats nous ont été fournis en grande partie par la Société des eaux de VOLVIC (analyses faites au C.E.N. de FONTENAY-AUX-ROSES).

Cette eau se caractérise surtout par sa très faible minéralisation, ce qui est favorable, puisque PACAUD (1939) préconise des eaux dont le résidu sec est compris entre 100 et 500mg/l. Les concentrations de calcium et de magnésium ne sont pas trop élevées, de même que les concentrations de sodium et de potassium. Pour notre part, et compte-tenu de la nature de notre étude, nous avons effectué plusieurs analyses de cadmium sur différentes bouteilles. Les résultats trouvés ont été toujours inférieurs au seuil de sensibilité de l'appareil -soit 0,1  $\mu g/l$ - ce que confirme la donnée du tableau V.

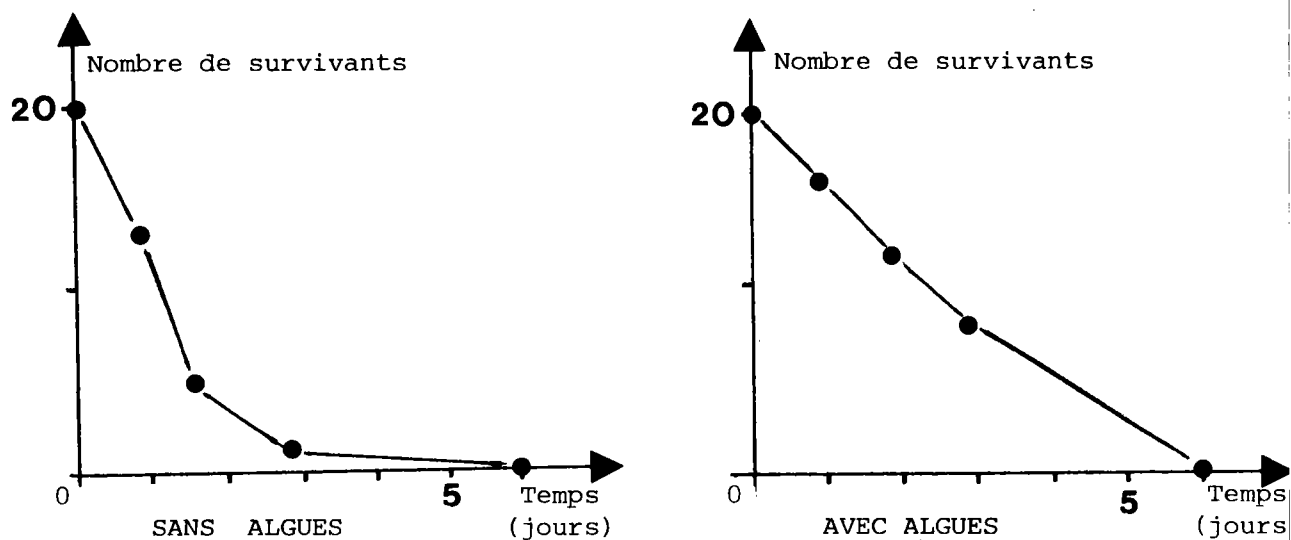


Figure 8: Toxicité du milieu Oligo LC sur les daphnies-  
courbes de mortalité des daphnies avec et sans  
algues.

La dilution du milieu oligo L.C. que nous avons utilisée est une dilution au 2/5 avec de la VOLVIC. La concentration ainsi obtenue a l'avantage d'être assez faible pour éviter la toxicité du milieu oligo L.C. vis-à-vis des daphnies, et d'être assez grande pour permettre l'introduction des quantités d'algues nécessaires à la nourriture correcte du 2<sup>o</sup> niveau. Dans ces conditions, le pH du milieu oligo L.C. plus VOLVIC est de 7,25, la conductivité de  $147 \mu\text{S. cm}^{-1}$  et la dureté de  $40 \text{ mg CaCO}_3/\text{l}$ .

#### b) Quantité d'algues nécessaire

La notion de quantité de nourriture mise à la disposition des daphnies se révèle être d'une extrême importance. Elle a une influence sur un certain nombre de paramètres essentiels tels que la croissance et le taux de reproduction. Par exemple, sous jeûne prolongé, ces deux paramètres ne varient pas (SLODOBKIN, 1962). Par contre, la longévité n'est pas beaucoup modifiée par des changements nutritionnels (FRANK, 1960).

La quantité à fournir dépend du taux d'alimentation, c'est-à-dire de la quantité de nourriture ingérée par un animal en un temps donné. Cette quantité s'exprime généralement en nombre de cellules, mais peut aussi s'exprimer en volume de nourriture.

BOURNE (1959) est le premier qui définit de façon précise un taux d'alimentation de  $0,21 \cdot 10^6$  chlorelles par daphnie par heure (avec une concentration non limitante de  $0,25 \cdot 10^6$  chlorelles/ml). Par la suite, MAC MAHON et RIGLER (1963) ont déterminé un taux d'alimentation de  $0,5 \cdot 10^6$  chlorelles par daphnie par heure (pour une concentration supérieure à  $0,18 \cdot 10^6$  chlorelles/ml). Opérant dans une concentration légèrement inférieure ( $0,17 \cdot 10^6$  chlorelles/ml), KERSTING et HOLTERMANN (1973) ont trouvé des taux d'alimentation de  $7,75 \cdot 10^6 \mu^3$  par daphnie par heure, soit  $0,3 \cdot 10^6$  chlorelles par daphnie par heure. D'autres auteurs avec des espèces d'algues et/ou de daphnies différentes arrivent à des résultats comparables : entre 0,2 et  $0,3 \cdot 10^6$  chlorelles par daphnie et par heure. (DEWEY et PARKER, 1964 - VIJVERBERG, 1976).

Ces résultats sont généralement obtenus dans des expérimentations de courte durée. Dans le cas des élevages, où les changements se font tous les 7 jours, les algues en suspension dans le milieu décantent au fur et à mesure et diminuent d'autant le nombre des cellules restant en suspension.

En fait, il est nécessaire que la quantité fournie ne soit pas limitant, c'est pourquoi nous avons choisi de fournir une "ration alimentaire" au départ de  $1 \cdot 10^6$  chlorelles par daphnie par heure.

### c) Changement des milieux

Nous n'avons pas utilisé une méthode d'apports périodiques de solution algale ajoutée au milieu de culture. Nous avons préféré pratiquer des changements réguliers des milieux tous les 7 jours, les daphnies étant transportées rapidement des anciens milieux dans ceux nouvellement préparés (VIJVERBERG, 1976). La périodicité d'une semaine permet d'éviter un séjour trop long des algues ainsi qu'une accumulation trop grande de déchets dans les bacs d'élevage, ce qui empêche, par là-même, une dégradation du milieu. L'aspect relativement limpide des cultures, ainsi que

l'absence de films bactériens représentent un intérêt supplémentaire d'une telle périodicité qui, de plus, est commode pour l'utilisateur.

Malgré le nombre de conditions relatives à la préparation, à la constitution et au changement des milieux, il n'en demeure pas moins que la méthodologie reste simple et rapide nécessitant simplement un comptage au compteur COULTER de la solution algale utilisée.

Dans la pratique, les élevages sont généralement réalisés dans des cristallisoirs de deux litres, équipés de couvercles pour éviter une évaporation trop rapide du liquide. On y introduit 1 litre de milieu pour 40 daphnies qui sont âgées, au départ, de 0 à 72 heures, et que l'on garde pendant 28 jours au minimum. Après quatre semaines, d'autres élevages sont à nouveau reconduits selon le même protocole. Afin d'assurer une production convenable de jeunes daphnies pour les expériences, on entretient un minimum de cinq cristallisoirs tout au long de l'année.

### 3. LES CONSOMMATEURS SECONDAIRES

L'able de HECKEL (*Leucaspis delineatus* H.) est l'espèce choisie comme troisième niveau trophique. C'est un poisson dont on peut rappeler la systématique :

Cl: Osteichthyens (poissons osseux) - s/c : Actinoptérygiens  
 (poissons à nageoires rayonnées) - s/o : Téléostéens -  
 O : Cyprinoïdés - F : Cyprinidés - s/F : Leuciscinés -  
 G : *Leucaspis* - sp : *delineatus* H.

L'able de HECKEL est parfois improprement appelé able de Stymphale, *Leucaspis stymphalicus* qui est en fait un Pararhodeus.

L'able de HECKEL vit principalement en EUROPE centrale et orientale. D'après SPILLMANN (1961) il est vraisemblablement autochtone dans le nord et l'est de la FRANCE où il a été rencontré dans les départements suivants SEINE-et-OISE, PAS-de-CALAIS, NORD, SOMME, MARNE. En LORRAINE, TETRY (1935) signale ce poisson dans l'étang de LINDRE, ainsi que dans les étangs voisins de LUNEVILLE et dans l'étang de BRIN. Cependant, sa présence était notée comme éphémère et son acclimatation dans les eaux lorraines semblait peu probable à l'auteur. L'espèce n'est pas signalée dans le catalogue de la zoologie lorraine de GODRON (1863).

L'able est une espèce grégaire, affectionnant les eaux calmes (mares, ballastières, marais, étangs) et peu courantes (canaux, zones calmes des rivières).

La ponte se situe au printemps, d'avril à juin. Durant cette période, le dimorphisme sexuel est très marqué. Des tubercules apparaissent chez le mâle sur différentes parties de la tête, sur les écailles, et les nageoires. Chez la femelle, l'orifice génital est entouré de deux lobes cutanés saillant de façon permanente (VLADYKOV, 1931) ; le mâle surveille les oeufs, placés en rangées circulaires autour des tiges des plantes aquatiques.

L'alimentation se compose généralement d'algues et de plancton animal. La durée de vie moyenne de l'able est d'environ 2 ans.

### 3.1. Rappels morphologiques

L'able est un poisson de petite taille : il peut atteindre de 5 à 8 cm de longueur. Le corps est allongé. Il se caractérise par une ligne latérale incomplète de 7 à 13 écailles, une carène ventrale écailleuse. La base de la nageoire anale est plus longue que celle de la dorsale. Les nageoires ne comportent pas de rayons dentelés. Les nageoires pectorales sont plus longues chez le mâle que chez la femelle. La bouche s'ouvre vers le haut. De grandes écailles argentées lui donnent une ressemblance avec l'ablette, avec laquelle il est souvent confondu. Il s'en distingue par sa ligne latérale incomplète et par sa nageoire anale dont la base est moins longue. Peu retenu par les expérimentateurs, la physiologie de ce poisson n'a été que peu étudiée.

### 3.2. Conditions d'élevage

Les ables proviennent d'un étang artificiel de 8,4 hectares, situé à 80 km au nord de METZ, dans une région agricole que l'on suppose indemne de toute pollution.

Les principales caractéristiques physico-chimiques de l'eau de cet étang sont fournies par le tableau ci-dessous.

L'able y vit en bandes importantes. Il sert de poisson fourrage et est très apprécié comme vif pour la pêche à la truite. Il a été sans doute importé d'ALLEMAGNE vers 1970, en même temps qu'un lot de gardons.

Calcium	65 mg/l	Phosphates	0,03mg/l
Magnésium	2 mg/l	Silice	4,8 mg/l
Sodium	3 mg/l	Cadmium	0,1 µg/l
Potassium	1,6mg/l	Fer	0,5 mg/l
Ammoniaque	0,4mg/l	Azote total	1,4 mg/l
Chlorures	15 mg/l	Carbone total	50 mg/l
Nitrites	0 mg/l	Rapport C/N	36 mg/l
Nitrates	0,1mg/l	M.E.S.	4,97mg/l
Sulfates	0 à 5 mg/l		



Dès leur arrivée, les poissons sont acclimatés aux conditions du laboratoire : température, eau, nourriture. Les élevages sont réalisés dans une pièce prévue à cet effet, thermostatée à 13°C. Les poissons sont placés dans des aquariums (50 x 50 x 15), équipés d'oxygénateurs et contenant 25 litres d'eau de ville préalablement brassée et stabilisée à la température de 13°C. Ils sont généralement nourris de daphnies provenant des élevages, ou de daphnies séchées, achetées dans le commerce.

La mortalité est généralement faible une fois passés les quelques jours qui suivent le transport.

## CHAPITRE II : CRITÈRES D'ÉTUDE

### 1. LES CRITERES BIOLOGIQUES

L'étude d'une chaîne alimentaire impose de suivre certains paramètres de l'évolution de chacune des populations. Il est donc tout d'abord nécessaire de déterminer les paramètres permettant d'évaluer la dynamique des populations en milieu normal ou contaminé. La difficulté réside dans le choix de paramètres significatifs, fiables, reproductibles et faciles à mettre en oeuvre dans un délai restreint.

Des observations générales peuvent être envisagées en premier lieu : morphologie externe, nombre, taille et poids de matière sèche ; puis à chaque niveau, il convient de considérer des paramètres plus spécifiques.

#### 1.1. Les producteurs

Ces critères doivent permettre de suivre la dynamique de la population que constitue la culture d'algues. Ils sont soit d'ordre externe, c'est-à-dire que leur étude ne détruit pas la population, soit d'ordre interne ou physiologique et leur étude implique la lyse des cellules, donc l'arrêt à un temps donné de la croissance de la culture. Nous avons essentiellement étudié les critères externes de croissance et nous ne ferons que citer quelques paramètres physiologiques, choisis par le fait qu'ils permettent de mieux aborder le mode d'action du toxique considéré.

##### 1.1.1. NUMERATION

En démoécologie, la dynamique d'une population, quelle qu'elle soit, est estimée par l'augmentation du nombre d'individus en fonction du temps (LAMOTTE et BOURLIERE, 1971-RAMADE, 1974). Cela est également valable pour des microorganismes du phytoplancton in situ, ou de cultures expérimentales ; la croissance est alors mesurée par la numération des cellules.

Au début de cette étude, nous avons utilisé une cellule de THOMA, permettant la numération des algues au microscope. Cette méthode a l'avantage de montrer l'aspect extérieur des cellules, pour constater ainsi leur état. Mais elle est longue et fastidieuse, ce qui entraîne une précision médiocre. Le tableau VI présente les coefficients de variation obtenus sur plusieurs comptages de plusieurs cultures (SCHWARTZ, 1963).

Les différents essais correspondent à des calculs de variation sur une même préparation (essai 1), sur plusieurs préparations d'une même culture (essais 2 à 7), et sur plusieurs préparations nécessitant au préalable une dilution (essai 8, dilution au 1/5è).

Essai	$\bar{x}$ x10 <sup>4</sup> /ml	sx écart type	$\bar{s}_x$ erreur moyenne	n	coefficient de variation %
1	1106	15,6	6,9	5	1,75
2	1220	65,05	26,9	6	5,59
3	1296	71,25	6,8	5	6,82
4	1683	112,6	50,4	5	8,31
5	1785	74,6	33,4	5	5,19
6	2692	93,5	38	6	3,63
7	3832	27,9	113,9	6	7,64
8	5132	363,6	115	10	5,07

Tableau VI : Moyennes et coefficients de variation obtenus sur différentes cultures de chlorelles, à différents âges

Numération par cellule de Thoma

$$\text{Coefficient de variation} \quad \% = \frac{\bar{s}_x \cdot t \cdot 100}{\bar{x}}$$

$\bar{x}$  = moyenne

$$\bar{s}_x = \text{erreur moyenne} = \frac{\text{écart-type}}{\sqrt{n}}$$

t = valeur donnée par le test de Student-Fischer, en fonction du nombre de degrés de liberté (n-1), pour une probabilité de 95 %.

n = nombre d'échantillons

La variabilité des résultats est donc assez élevée puisque les coefficients de variation, tels que nous les avons calculés, dépassent souvent 5 %, surtout pour les plus fortes concentrations cellulaires.

Le nombre croissant de comptages à réaliser pour les études de toxicité, nous a conduit à utiliser un appareil plus performant, le compteur Coulter. Le principal avantage de cet appareil est la rapidité du comptage ; on peut ainsi multiplier les essais pour un même échantillon, et augmenter alors la précision de la mesure.

#### 1.1.1.1. Description et principe du compteur Coulter

L'appareil utilisé est un compteur Coulter, modèle ZB (Coultronics). Une première partie, appelée verrerie, permet l'aspiration d'un volume connu de la solution particulière, grâce à une pompe à vide et un manomètre à mercure ; la deuxième partie est constituée par l'électronique de l'appareil, dont les éléments visibles sont l'oscilloscope, le cadran digital et les différents boutons de réglage.

Le principe de l'appareil repose sur la modification, lors du passage d'une particule au niveau d'un microorifice, de la résistance électrique ; celle-ci est mesurée par la variation de la différence de potentiel entre 2 électrodes de platine plongées dans un électrolyte utilisé comme diluant, et entre lesquelles passe un courant continu. Le système électronique transforme les variations de la résistance en un signal sur un oscilloscope. Le nombre de signaux est proportionnel au nombre de particules traversant l'orifice, et l'amplitude des signaux est proportionnelle au volume d'électrolyte déplacé, donc au volume des particules elles-mêmes.

Pour une utilisation optimale de cet appareil, il faut que la suspension algale soit très homogène, que les algues ne soient pas en amas, enfin que la forme de l'algue soit simple, c'est-à-dire qu'une forme sphérique est préférable à de longs batonnets.

La chlorelle est donc une algue idéale pour la numération au compteur Coulter. Sa faible taille nous a conduit à utiliser un orifice de 100  $\mu$  et nous avons réalisé nos dilutions dans un électrolyte standard et dépoussiéré, préconisé par Coultronics (Isoton II).

La dilution la plus couramment utilisée est de 1/500, soit une prise d'essai de 50  $\mu$ l de culture dans 25 ml d'électrolyte. Le volume de culture aspiré par la pompe à vide est déterminé par le manomètre à mercure : plusieurs électrodes placées sur le trajet du mercure permettant d'effectuer le comptage sur un volume strictement défini (0,05 - 0,5 - 2 ml)

On peut ainsi faire varier volume ou dilution de la culture pour un comptage optimum qui est de 10 000 à 40 000, en affichage numérique sur l'appareil. Nous avons essentiellement travaillé sur un volume de 0,5 ml. Les réglages choisis sont 1/8 pour l'atténuateur (= A), 1/4 pour le courant d'ouverture (= I) et 15 pour le seuil inférieur (= t) ; le seuil supérieur n'est pas pris en considération et ce sont toutes les cellules dont le volume est supérieur à celui correspondant au seuil inférieur t, qui sont prises en compte.

Pour déterminer à quel volume minimum de particule correspond ce seuil, il est nécessaire d'étalonner l'appareil ; pour ce faire, on utilise une solution de spores strictement calibrées, qui permet d'associer le seuil obtenu pour la population moyenne au volume connu, V, des particules utilisées pour l'étalonnage. La formule  $V = k_v AIt$ , où  $k_v$  est le coefficient d'étalonnage (en volume), permet de faire correspondre à chaque seuil un volume de particules. Le coefficient ainsi déterminé, pour des particules de 2,01  $\mu$  de diamètre, est de 9,72 (en volume), pour les réglages choisis. Ainsi, pour un seuil inférieur de 15, le volume minimum pris en compte est :

$$\begin{aligned} V_m &= k_v AIt \\ &= 9,72 \times \frac{1}{4} \times \frac{1}{8} \times 15 \\ &= 4,55 \\ \text{où } V_m &= \frac{4}{3} \pi r_m^3 \end{aligned}$$

ce qui donne un rayon minimum,  $r_m$  :

$$\begin{aligned} r_m &= \frac{3 \times 4,55}{4 \cdot \pi} \\ r_m &= 1,03 \mu \end{aligned}$$

Ce sont donc les cellules dont le rayon est supérieur à 1,03  $\mu$  qui sont comptées par le compteur Coulter, avec les réglages choisis. Ceux-ci ont été fixés ainsi pour obtenir la meilleure corrélation possible avec les comptages obtenus par la cellule de Thoma, comme cela est montré plus loin.

Les conditions opératoires ainsi déterminées, nous avons d'abord voulu savoir s'il existait une relation linéaire entre la numération et différentes dilutions successives d'une même culture (Tableau VII et figure 9). Pour 3 cultures, à des concentrations initiales faibles ou plus fortes, on constate que l'ajustement linéaire, par la méthode des moindres carrés, donne des coefficients de corrélation,  $r$ , supérieurs à 0,975. D'après la table du  $r$  en fonction du nombre de degrés de liberté (SCHWARTZ, 1963), la régression linéaire est hautement significative, à une probabilité supérieure à 99,9 %.

Culture	Concentration cellulaire ·10 <sup>3</sup> cellules/ml	$r$
A initiale finale	10 023 839	0,979
B initiale finale	21 246 2 685	0,986
C initiale finale	36 086 1 886	0,999

Tableau VII : Compteur Coulter

Vérification de la relation linéaire entre la numération et différentes dilutions d'une même culture

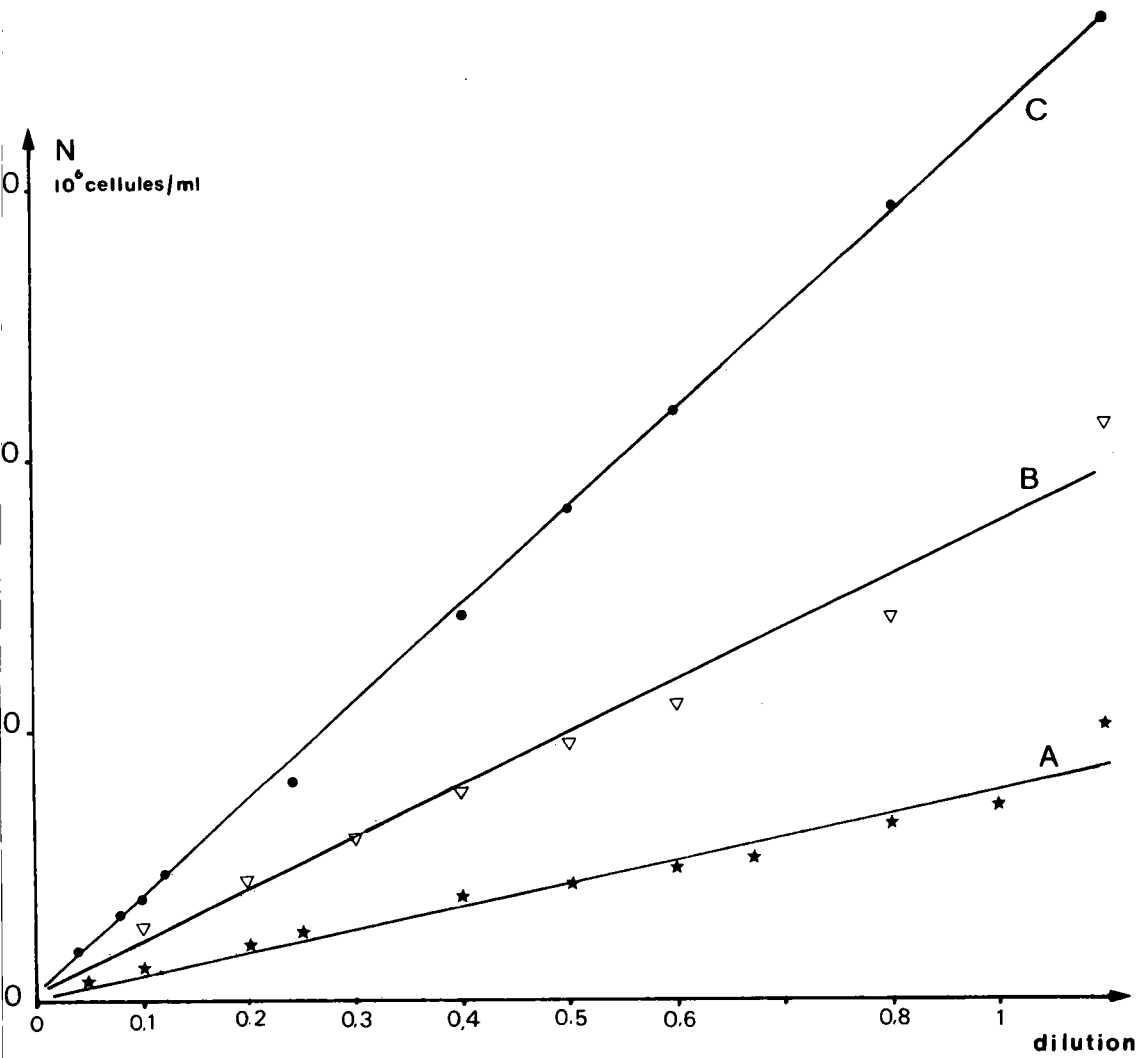


Figure 9: Relation entre différentes dilutions d'une même culture de *Chlorella vulgaris* et la numération au compteur Coulter.

### 1.1.1.2. Précision

Après l'étalonnage de l'appareil, nous avons procédé au calcul de la précision de la numération au compteur Coulter. Les sources d'erreur sont liées d'une part à la préparation de chaque échantillon, et d'autre part, au comptage lui-même sur une même préparation.

Le tableau VIII présente les résultats obtenus : les essais 1 à 5 montrent la reproductibilité de plusieurs mesures de la même préparation d'un échantillon, tandis que les essais 6 à 8 donnent la précision de la numération elle-même sur plusieurs préparations d'un même échantillon. Dans les deux cas, on constate que les coefficients de variation sont nettement inférieurs à ceux calculés dans les comptages à la cellule de Thoma.

Nous avons déjà indiqué que le comptage maximum doit être 40 000 sur l'affichage numérique de l'appareil. Pour des cultures supérieures à  $40 \times 10^6$   $\phi$ /ml, une solution peut être de faire une dilution au préalable de la culture, puis de faire le comptage sur une préparation à partir de cette dilution. Ainsi, l'essai 9 montre que sur 5 dilutions du 1/5 d'une culture à plus de  $70 \times 10^6$   $\phi$  / ml, on obtient un coefficient de variation de 1,48 %.

Essai	$\bar{x}$ . $10^4$ /ml	sx écart type	$\bar{sx}$ erreur moyenne	n	coefficient de variation %
1	1132	23,8	7,5	10	1,51
2	1204	97,6	30,9	10	5,8
3	1099	31,6	10	10	2,06
4	1882	15	5	9	0,62
5	2006	5,5	3	4	0,44
6	1117	55,5	17,5	10	3,55
7	1212	15	6,3	6	1,34
8	1990	41	16,5	6	2,15
9	7104	85	37,9	5	1,48

Tableau VIII : Moyennes et coefficients de variation obtenus sur différentes cultures de chlorelles. Numération par le Compteur Coulter



Ce qui signifie que la reproductibilité de cette technique de numération est très bonne ; cependant, nous comparerons, à la fin de ce chapitre, toutes les méthodes utilisées, pour savoir si, malgré les différences de précision, il y a correspondance entre les divers critères utilisés.

#### 1.1.1.3. Etude de la croissance

Disposant d'une technique de numération aussi rapide que précise, nous avons pu multiplier les cultures, et renouveler les comptages dans le temps. C'est ainsi que nous avons pu déterminer les courbes de croissance caractéristiques des organismes considérés et des conditions de leur culture.

Les courbes obtenues (figure 10, culture 1) sont comparables à celles de toutes cultures de micro-organismes, qui ne sont pas en continu ; ce sont les courbes en S, où plusieurs phases sont distinguées (SENEZ, 1968).

- phase de latence (I) plus ou moins courte, dépendant de la taille et de l'âge de l'inoculum, et du volume de la culture. Dans nos expériences, elle n'a pas dépassé 2 jours

- phase de croissance rapide (II)

- phase de croissance lente (III)

- phase stationnaire (IV) suivie d'une décroissance (V) à partir du moment où il n'y a plus d'éléments nutritifs disponibles.

La croissance d'une population donnée peut être traduite par la relation :

$$\frac{dN}{dt} = f(N) \quad (1)$$

où N est la concentration cellulaire (nombre de cellules par ml) (MYERS, 1953), et pour des conditions extérieures constantes, on a :

$$\frac{dN}{dt} = KN \quad (2)$$

où K est une constante appelée taux de croissance, qui est en fait le nombre de divisions par unité de temps.

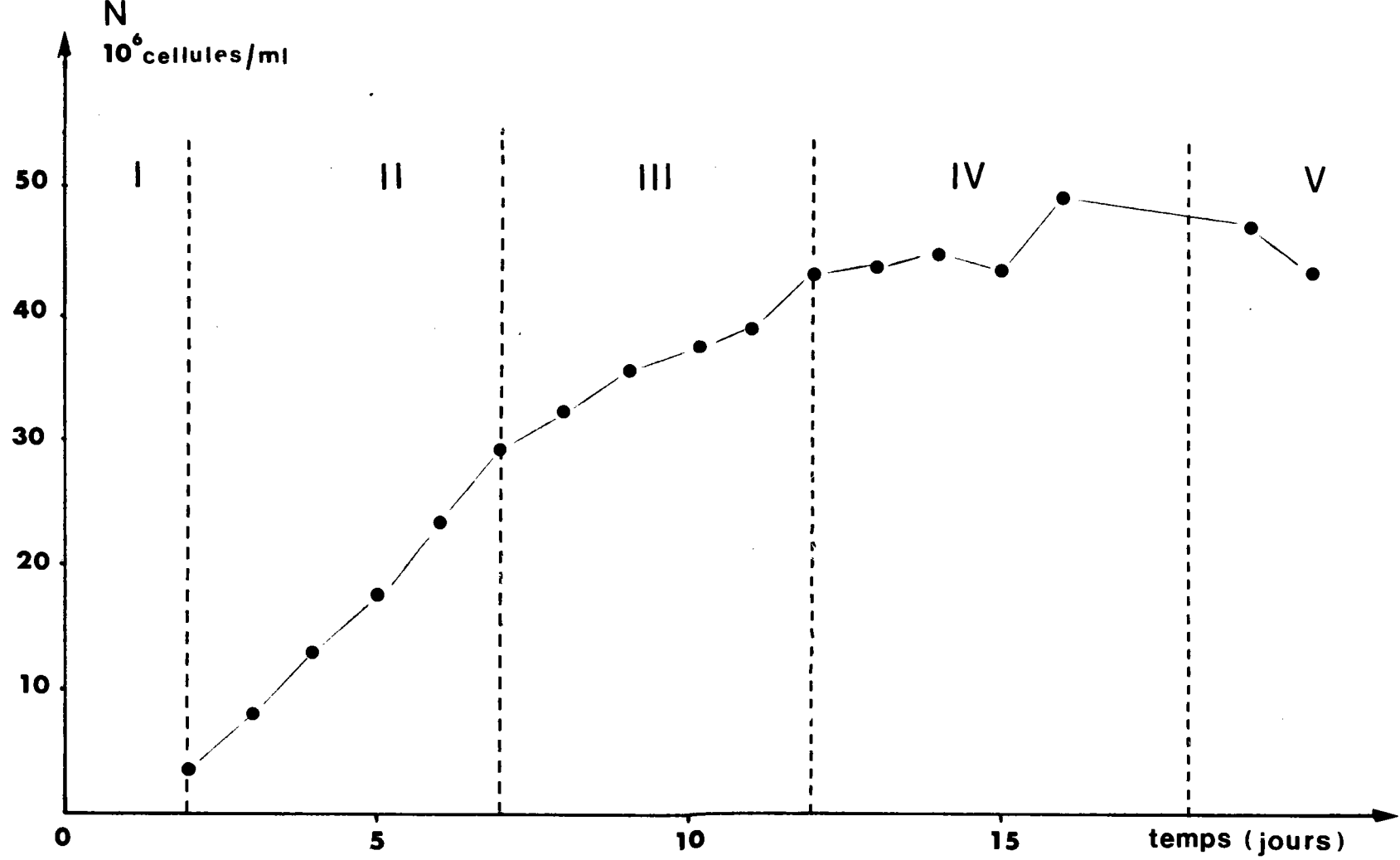


Figure 10: Courbe de croissance de *Chlorella vulgaris* (culture 1) -  
numération au compteur Coulter.

En intégrant l'équation (2), et en exprimant en  $\log_{10}$ , on a :

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = kt \quad (3)$$

qui permet de calculer  $k$ , par intervalle de temps strictement défini ; le taux de croissance est alors exprimé en termes de  $\log_{10}$  par jour ; il est une caractéristique intrinsèque d'un organisme donné dans des conditions d'environnement strictement définies (MYERS, 1953).

Chaque phase, précédemment décrite, est donc caractérisée par ce taux de croissance, qui est grand, faible puis nul.

Ainsi, nous avons cherché à déterminer  $k$  pour la phase de croissance rapide, qui nous semble la plus intéressante, puisque l'activité physiologique des cellules  $y$  est la plus importante ; les effets d'un toxique  $y$  seront alors plus perceptibles.

En utilisant des coordonnées semi-logarithmiques, on obtient pour différentes cultures témoins considérées, différentes droites pendant l'intervalle de temps que dure cette phase ; il s'agit donc d'une croissance exponentielle, et  $k$  est alors la pente des droites obtenues (figure 11).

Le calcul des équations de ces droites :

$$\log \frac{N}{N_0} = kt$$

permet non seulement d'obtenir  $k$  (tableau IX), mais aussi le coefficient de corrélation  $r$  de l'ajustement linéaire effectué. A partir de celui-ci, on peut calculer  $t$  selon SCHWARTZ (1963) :

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2}$$

qui permet d'apprécier la qualité de l'ajustement linéaire.

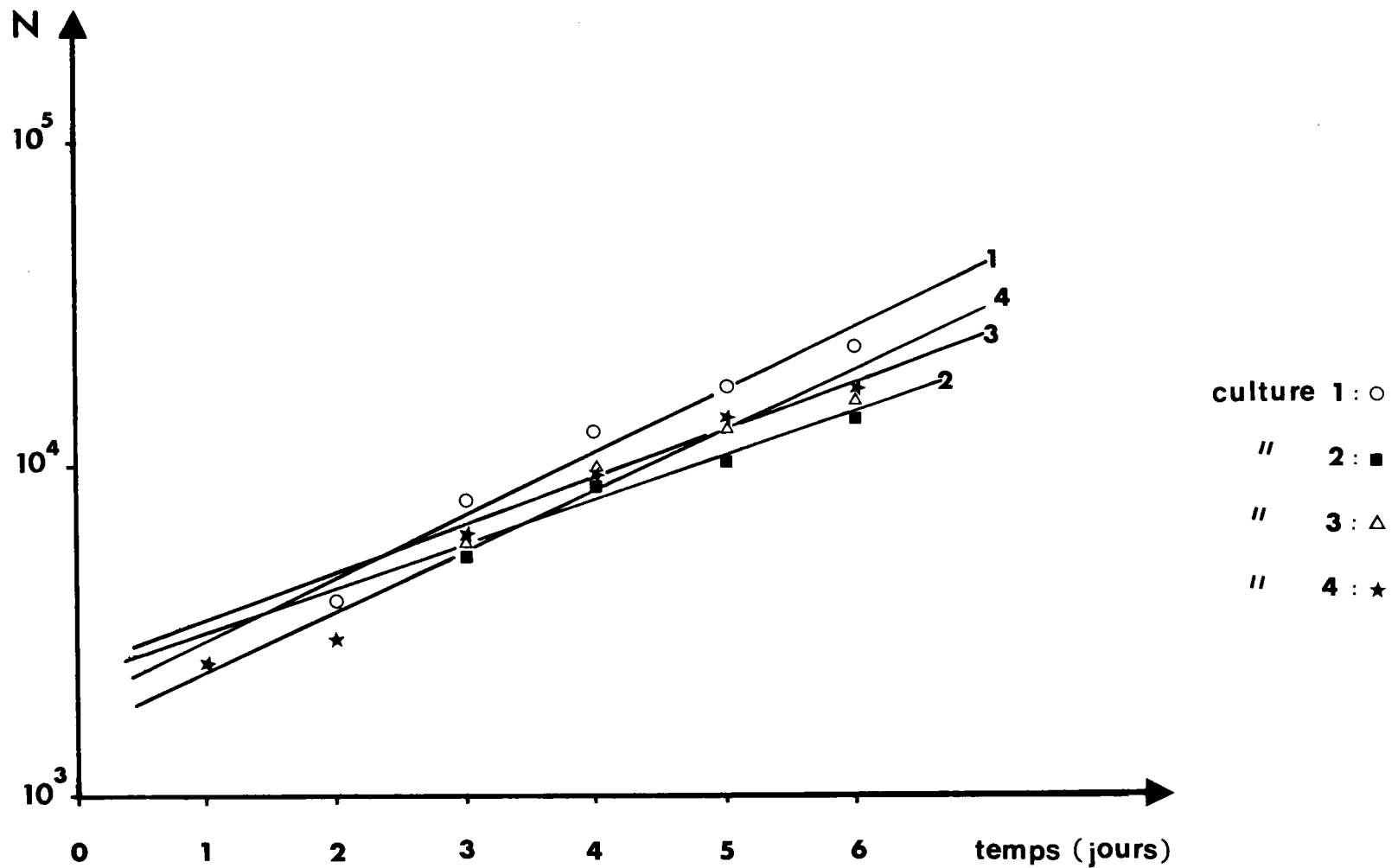


Figure 11: Courbes de croissance de *Chlorella vulgaris*, en coordonnées semi-logarithmiques- phase de croissance exponentielle- numération au compteur Coulter.

temps en jours	Culture 1				Culture 2				Culture 3				Culture 4			
	nombre de cellules au mm <sup>3</sup>	k	G		nombre de cellules au mm <sup>3</sup>	k	G		nombre de cellules au mm <sup>3</sup>	k	G		nombre de cellules au mm <sup>3</sup>	k	G	
			$\Delta t=1j$	$>1j$			$\Delta t=1j$	$>1j$			$\Delta t=1j$	$>1j$			$\Delta t=1j$	$>1j$
J0																
J1												2503			3,92	
J2	3865		0,93									2987		0,95		
J3	8168		1,51		5322		1,32		5888		1,27	6193		1,64		
J4	12936		2,22		9010		3,01		10147		2,84	9454		1,67		
J5	17672	0,22	2,43		11345	0,16	1,83		12951	0,17	1,76	14320	0,20	1,59		
J6	23516	0,19			14224	0,14	2,12		16207	0,14	2,05	17410	0,18	1,79		

TABEAU IX : PARAMETRES DE CROISSANCE DE CULTURES DE *Chlorella vulgaris* DURANT LA PHASE EXPONENTIELLE

Ainsi le tableau X montre que dans les 4 cas proposés, l'ajustement linéaire est correct avec une probabilité supérieure à 95 %.

Cultures	k	r	t	n	P
1	0,19	0,978	8,07	5	99 %
2	0,14	0,975	6,16	4	95 %
3	0,14	0,974	6,04	4	95 %
4	0,18	0,986	11,78	6	99,9%

Tableau X : Taux de croissance

Paramètres vérifiant la qualité de l'ajustement linéaire de  $\log N = f(t)$  durant la phase exponentielle de croissance de *Chlorella vulgaris*.

k = taux de croissance

r = coefficient de corrélation

n = nombre d'essais

$$t \text{ calculé} = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2}$$

P = probabilité de l'ajustement

Les différentes valeurs de  $k$  obtenues pour les cultures considérées, peuvent paraître faibles par rapport à celles citées par d'autres auteurs ( $k = 0,50$  pour *C. vulgaris* pour PEARSALL et LOOSE, 1937, par exemple), mais il faut tenir compte des conditions de culture particulièrement restrictives,

Le taux de croissance varie également en fonction de la taille de l'inoculum (PRATT, 1940) : plus la concentration cellulaire est faible, plus grande est la vitesse de croissance, tandis que la densité finale est indépendante de l'inoculum. Autrement dit, la hauteur du palier sera toujours la même, dans des conditions de cultures constantes mais ce palier sera atteint plus ou moins rapidement. Ce phénomène serait en relation avec une substance inhibitrice contenue dans les cellules (cf ch.I § 1.2.) ; plus l'apport initial est grand, plus grande est l'inhibition et plus lente est la croissance. C'est pourquoi, les ensemencements se font avec des cultures en phase exponentielle de croissance, et l'inoculum ne dépasse pas 5 ml, compte tenu du volume des erlens de culture, c'est-à-dire que la concentration initiale est d'environ  $10^6$  cellules/ml.

Si nous avons choisi le taux de croissance pour exprimer la vitesse du développement des cultures de *C. vulgaris* c'est parce qu'il est très utilisé, mais nous avons aussi mentionné (Tableau IX) le temps de génération,  $G$ , ou temps de doublement : c'est le temps nécessaire pour que la concentration cellulaire double. C'est-à-dire que l'équation (3) :

$$\log \frac{N}{N_0} = kt \text{ devient } \log \frac{2N_0}{N_0} = k \Delta t \text{ puisque par définition, } N = 2 N_0 \text{ pour l'intervalle } \Delta t, \text{ d'où } \log 2 = k \Delta t.$$

Cet intervalle de temps est alors appelé temps de génération ( $G$ ). Il est en fait l'inverse du taux de croissance, si celui-ci est exprimé en termes de  $\log$  en base 2.

Les autres phases de la croissance peuvent être déterminées de la même manière, mais elles présentent moins d'intérêt puisque les variations sont alors moins importantes, compte tenu de la vitesse de croissance faible puis nulle. La concentration cellulaire maximale atteinte en fin de croissance pourrait être à considérer pour les études d'intoxication.

Cependant, si le nombre de cellules renseigne directement sur la croissance de la culture, il n'exprime que la concentration cellulaire. Or, les cellules ont des tailles variables, dans la mesure où le synchronisme des divisions n'est pas atteint. C'est pourquoi, certains auteurs considèrent aussi la notion de densité cellulaire, c'est-à-dire qu'ils prennent en compte la taille, c'est-à-dire le volume de chaque cellule. On peut compliquer et enrichir davantage cette notion en y incluant le poids de matière sèche de la culture et le volume cellulaire le plus fréquent (SHOAF et LIUM, 1976), ou bien le diamètre moyen des cellules et le volume total de la culture (PEARSALL et LOOSE, 1937). L'estimation de la production algale est alors plus complète.

Mais sans vouloir trop compliquer l'étude à ce premier niveau de la chaîne alimentaire, nous avons estimé la densité cellulaire des cultures d'algues par l'intermédiaire d'un autre paramètre, l'opacimétrie méthode simple et rapide que nous avons ensuite comparée à la numération cellulaire.

### 1.1.2. OPACIMETRIE

#### 1.1.2.1. Principe

C'est une méthode d'estimation de la densité algale ou masse cellulaire (SENEZ, 1968). Son utilisation n'est pas récente puisque dès le début du siècle, la croissance bactérienne était ainsi déterminée (DREYER et GARDNER, 1916). Plusieurs techniques et appareillages ont été proposés et décrits (MESTRE, 1935), mais reposent sur le même principe dont le terme général est la spectrophotométrie. Un faisceau de lumière de longueur d'onde donnée traverse la solution à analyser ; dans le cas de suspensions de particules, une partie du flux incident est transmise directement car le milieu est supposé non absorbant, l'autre partie subit des phénomènes de diffraction en rencontrant les particules (effet Tyndall). On peut alors soit mesurer l'intensité de la lumière transmise à travers la suspension dans la même direction que la lumière incidente : il s'agit d'opacimétrie ; soit on mesure l'intensité de la lumière diffusée par les particules en suspension : l'observation se fait alors perpendiculairement au faisceau incident ; il s'agit de néphélémétrie (METAIS et coll., 1977).



Dans cette étude, nous avons disposé d'un spectrophotomètre PERKIN-ELMER modèle COLEMAN 295-E qui permet de mesurer l'intensité du faisceau lumineux transmis pour appliquer la loi de Beer-Lambert :

$$I = I_0 \exp - \epsilon c l$$

$I_0$  intensité du rayonnement incident  
 $I$  intensité du rayonnement transmis  
 $c$  concentration de la substance ou des particules de la solution considérée  
 $l$  distance parcourue par la lumière à travers la solution  
 $\epsilon$  coefficient d'absorption molaire, dépendant de la nature de la substance ou des particules absorbantes et de la longueur d'onde du rayonnement incident (et de la température)

A partir de cette loi, on définit deux grandeurs : la transmission  $T$  et la densité optique  $DO$  (ou absorbance) telles que :

$$T = \frac{I}{I_0} = e^{-\epsilon c l}$$

$$DO = \text{Log} \frac{I_0}{I} = \epsilon c l$$

Si on exprime la transmission en pourcentage ( $I_0 = 100$ ), on peut convertir une grandeur par rapport à l'autre par la relation :

$$DO = 2 - \log_{10} T (\%)$$

La transformation en logarithmes décimaux ne change que la constante  $\epsilon$  et permet de simplifier les calculs puisque  $\log_{10} 100 = 2$ .

Pour étudier la croissance des populations d'algues, on utilise l'opacimétrie parce qu'il existe dans certaines conditions une relation linéaire entre la  $DO$  et la concentration en algues. C'est pourquoi il convient de déterminer les conditions pour lesquelles on reste dans le domaine de linéarité de cette relation. Celle-ci dépend :

- de la longueur d'onde du rayonnement
- de la taille des particules en suspension
- de la concentration des particules dans la suspension.

		Culture A			Culture B			Culture C		
		T %	DO x10 <sup>3</sup>	r	T %	DO x10 <sup>3</sup>	r	T %	DO x10 <sup>3</sup>	r
OPACIMETRIE	initiale	45	347	0,992	13	886	1,000	1,5	1824	0,998
	430 nm finale	84	76		75	125		77	114	
	initiale	68	167	0,996	37	432	0,999	16	796	0,997
	610 nm finale	88,5	53		84	76		85	71	
	initiale	56	252	0,997	26	585	0,999	75	1125	0,998
	665 nm finale	88	56		82	86		83	81	
NUMERATION COMPTEUR COULTER (x10 <sup>6</sup> cellules/ml)	initiale		10,02			21,25			36,09	
	finale		0,84			2,68			1,89	

TABLEAU XI : OPACIMETRIE. VERIFICATION DE LA LOI DE BEER-LAMBERT SUR LES CULTURES DE CHLORELLES

		Moyennes des r
Cultures	A	0,995
	B	0,999
	C	0,998
Longueur d'onde (nm)	430	0,997
	610	0,997
	665	0,998

TABLEAU XII : OPACIMETRIE. VERIFICATION DE LA LOI DE BEER-LAMBERT. MOYENNES DES COEFFICIENTS DE CORRELATION OBTENUS PAR L'AJUSTEMENT LINEAIRE

Plus la longueur d'onde utilisée est voisine du rayon des particules, meilleure sera la mesure. Les chlorelles ayant un rayon de 1 à 10  $\mu$ , nous avons choisi des longueurs d'onde dans le rouge. D'autre part, dans le cas de fortes concentrations, la technique est limitée en raison de l'importance des phénomènes de diffusion de la lumière sur les particules ; il est à signaler qu'alors l'opacimétrie est moins sensible que la néphélémétrie.

Dans un premier temps, nous avons donc vérifié la loi de Beer-Lambert pour différentes concentrations algales et pour différentes longueurs d'onde.

#### 1.1.2.2. Vérification de la loi de Beer-Lambert

Sur trois cultures de concentration initiale différente, nous avons fait plusieurs dilutions dont nous avons mesuré la densité optique, à trois longueurs d'onde :

- 665 nm, correspondant au maximum d'absorption des chlorophylles a et appartenant au rouge ;
- 610 nm, appartenant au rouge ;
- 430 nm, correspondant à un autre maximum d'absorption des pigments chlorophylliens et de leurs dérivés (phéophytines, caroténoïdes..)

Pour chaque série de dilutions, nous avons tracé les courbes de la DO en fonction des dilutions (figure 12) en pourcentage de la culture initiale (en abscisse,  $x = 1$  pour la culture initiale à partir de laquelle les dilutions ont été faites). Sur les valeurs obtenues, nous avons fait un ajustement linéaire sur la relation  $DO = f(\text{dilution } \%)$ , et calculé les coefficients de corrélation,  $r$ , correspondants.

Ceux-ci dépendent de la DO de la culture initiale et de la longueur d'onde utilisée (Tableau XI) ; sur les moyennes des  $r$  (Tableau XII), on constate que les variations sont plus grandes en fonction des différentes cultures, qu'en fonction de la longueur d'onde. C'est-à-dire que les erreurs de dilution importent plus que la longueur d'onde choisie. Cependant, pour le choix de celle-ci, ce serait à 665 nm que l'ajustement serait le meilleur, mais la différence ne nous paraît pas significative.

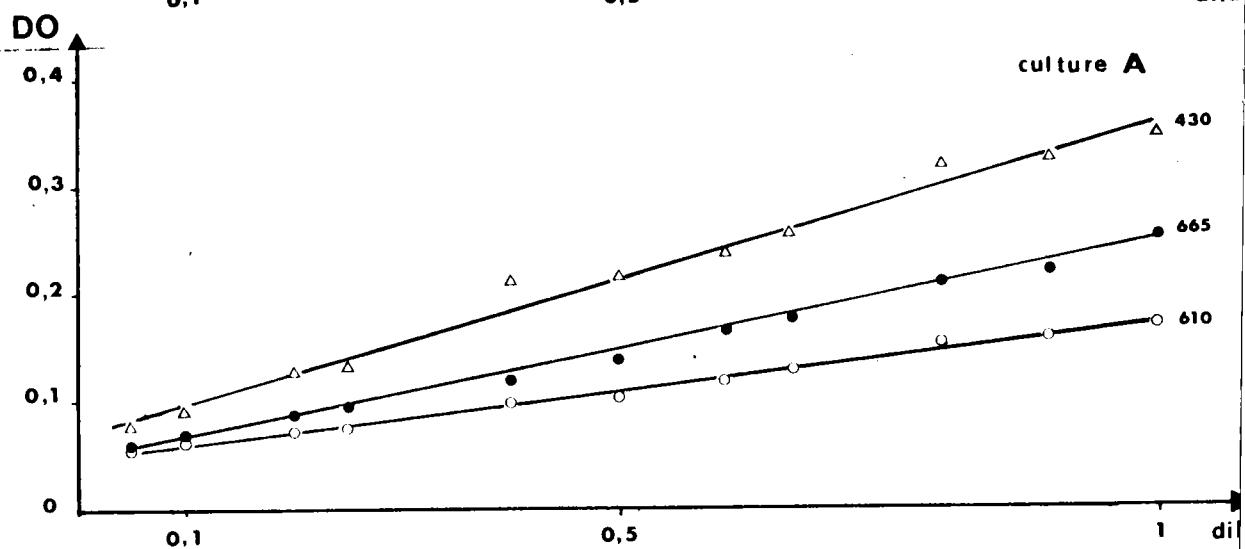
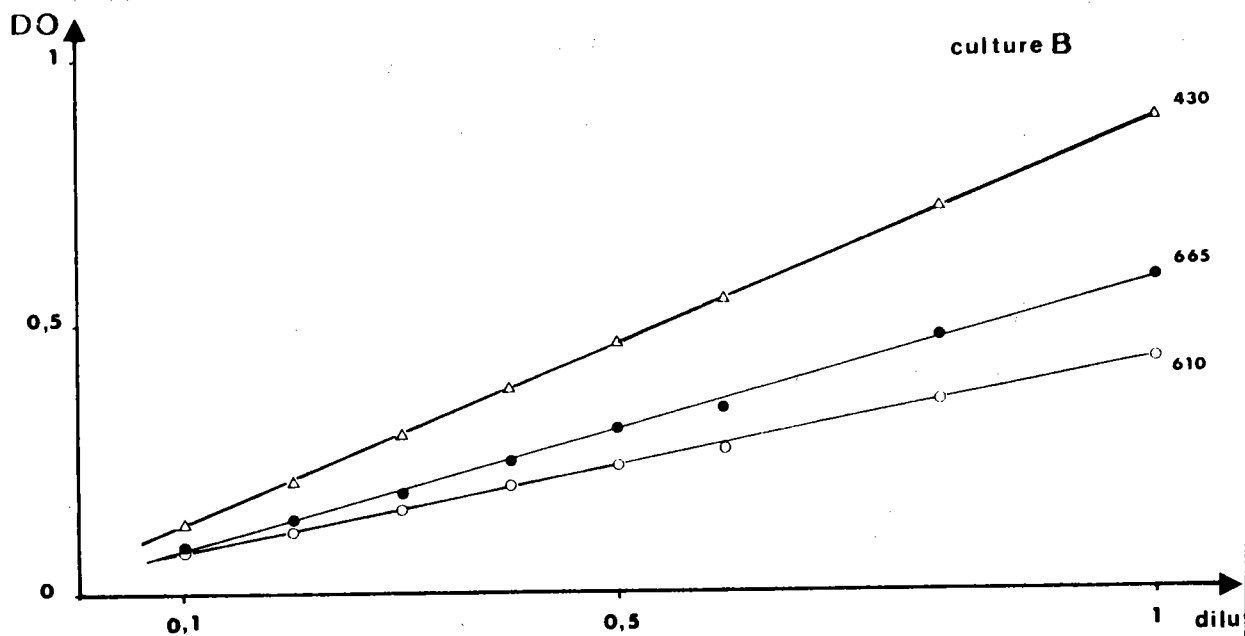
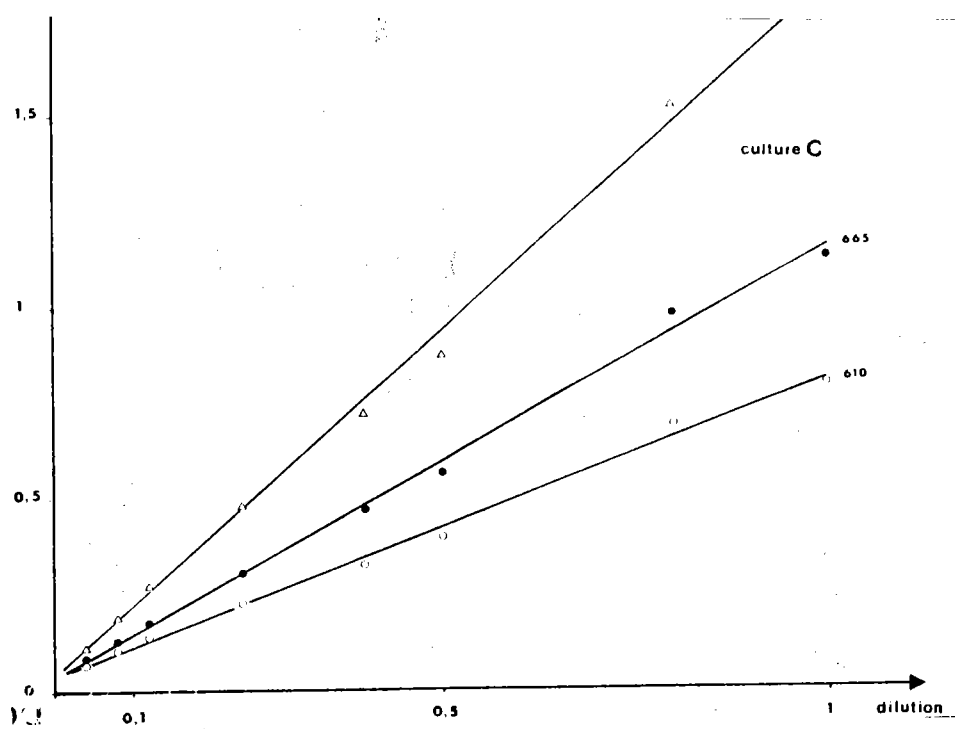


Figure 12: Vérification de la loi de Beer-Lambert sur 3 cultures de *Chlorella vulgaris*. à différentes densités algales- opacimétrie.

Bien que travaillant sur des solutions troubles de particules de dimension non négligeables, et de forte concentration, nous avons vérifié la loi de Beer-Lambert ; nous pouvons donc utiliser l'opacimétrie comme méthode rapide d'estimation de la croissance des cultures de chlorelles.

### 1.1.2.3. Etude de la croissance

C'est à partir des cultures en erlens de 125 ml, que nous avons pu suivre au jour le jour l'évolution de la transmission optique (ou de la DO). La modification de ces erlens (cf figure 2) nous a en effet permis de conserver l'intégrité et l'axénie des cultures, et de garder ainsi les mêmes cultures pour suivre leur croissance dans le temps.

De la même façon qu'avec la numération (cf figure 10), nous avons pu construire les courbes de croissance et montrer que l'on y distingue les mêmes phases de croissance (figure 13). Pour choisir la longueur d'onde de mesure, nous en avons testé plusieurs : 430, 580, 610, 665 et 700 nm (figures 13 et 14), et nous avons constaté que les courbes obtenues étaient équivalentes et que seule l'amplitude variait.

#### . Calcul du taux de croissance

De même que pour la numération, nous avons calculé le taux de croissance  $k$ , durant la phase exponentielle sur les cultures des figures 13 et 14.

Les valeurs de séries I et II sont des moyennes sur 5 et 12 erlens de culture respectivement, ensemencés et développés dans les mêmes conditions, mais chaque série étant ensemencée à des moments différents dans le temps.

Les différents taux de croissance obtenus en fonction des longueurs d'onde et des cultures, sont compris entre 0,120 et 0,210 ; on constate que ces valeurs sont tout à fait dans le même ordre de grandeur que celles calculées par la numération (0,16 - 0,22, tableau XIII), mais dépendent de la longueur d'onde.

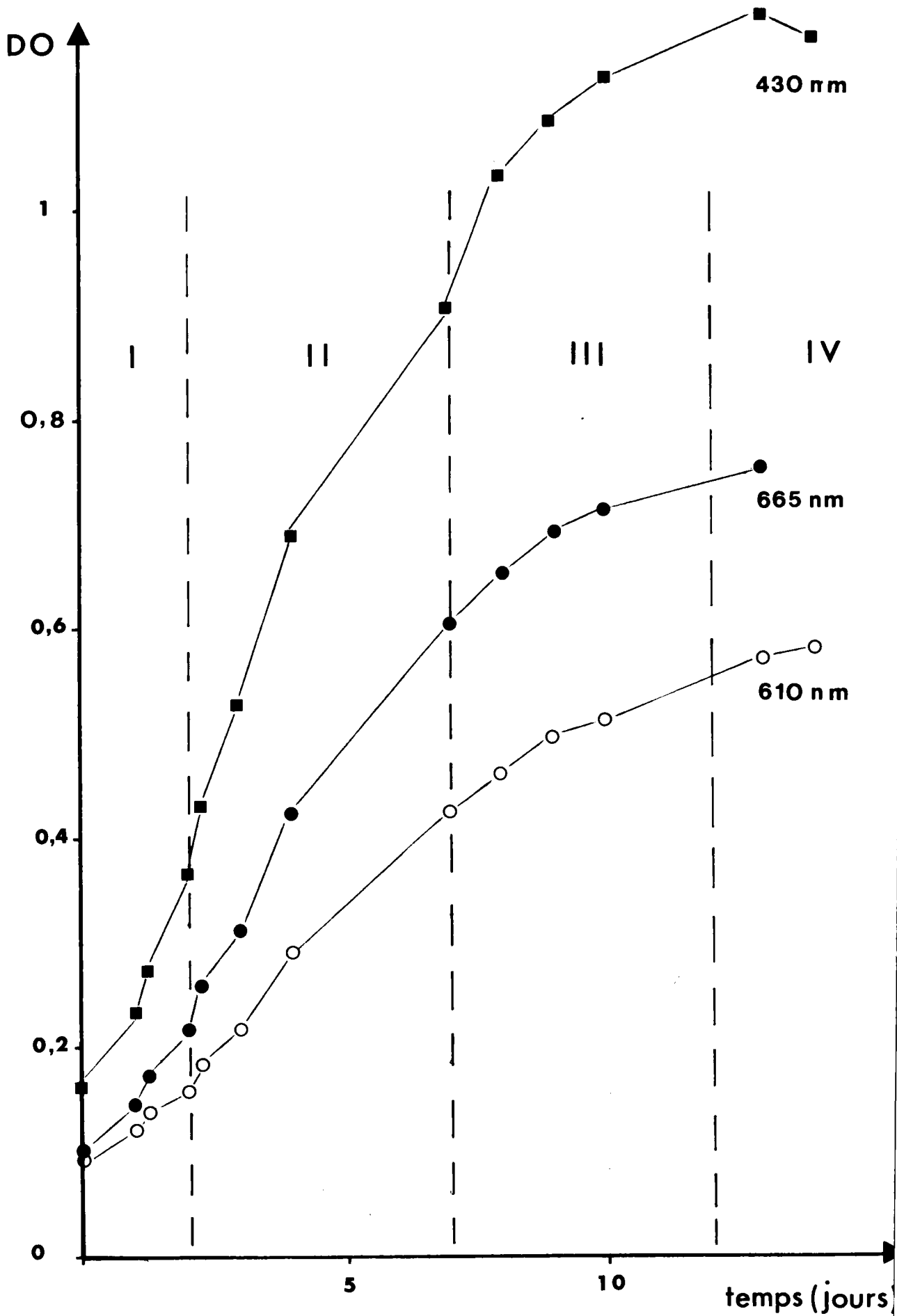


Figure 13: Courbes de croissance de *Chlorella vulgaris*- phases de croissance- opacimétrie à plusieurs longueurs d'onde (série II).

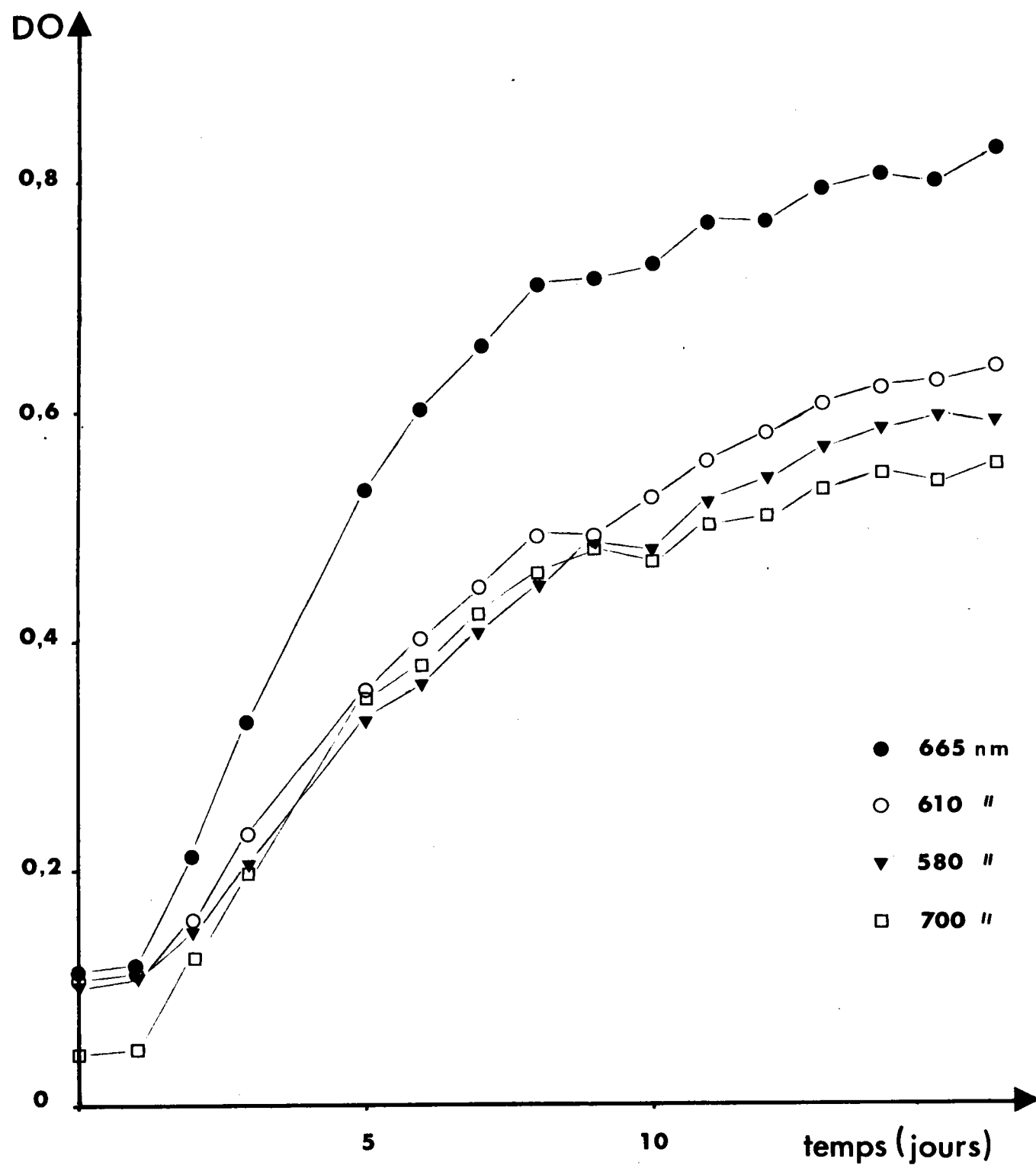


Figure 14: Courbes de croissance de *Chlorella vulgaris*-opacimétrie à différentes longueurs d'onde (série I).

	Paramètres	430 nm	580 nm	610 nm	665 nm	700 nm
Culture 1	k	0,150		0,123	0,149	
	r	0,990		0,995	0,991	
	n	6		6	6	
	t	14		21	15	
	P	>99,9 %		>99,9 %	>99,9 %	
Série I	k		0,120	0,126	0,162	0,208
	r		0,996	0,989	0,971	0,950
	n		4	4	4	4
	t		17	9	6	4
	P		> 99 %	> 98 %	> 95 %	> 90 %
Série II	k			0,153	0,188	
	r			0,996	0,995	
	n			5	5	
	t			19	18	
	P			>99,9 %	>99,9 %	

TABLEAU XIII : TAUX DE CROISSANCE, PARAMETRES VERIFIANT LA QUALITE DE L'AJUSTEMENT LINEAIRE DE  $\log DO = f(t)$ , DURANT LA PHASE EXPONENTIELLE DE CROISSANCE DE *Chlorella vulgaris* POUR DIFFERENTES LONGUEURS D'ONDE.

k = taux de croissance

r = coefficient de corrélation

n = nombre d'essais

$$t \text{ calculé} = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n-2}$$

P = probabilité de l'ajustement



C'est pourquoi par le choix de celle-ci, nous avons également considéré l'ajustement exponentiel pendant les cinq premiers jours de culture. La figure 15 représente les droites obtenues par l'ajustement linéaire,  $\log DO = kt + b$ , pour les cultures déjà considérées. Il est à noter que cet ajustement correspond à l'équation  $y = e^{kt} + b$  ou  $K = 2,3 k$ . Cependant, comme nous exprimons  $k$  en unités de logarithmes décimaux en base 10, nous avons choisi d'étudier la phase exponentielle de croissance en vérifiant la linéarité de la relation  $\log DO = kt + b$ . Dans les deux cas, les coefficients de corrélation,  $r$ , sont les mêmes, et les résultats (Tableau XIII) permettent de constater que cette relation est hautement significative, avec une probabilité supérieure à 99 %, sauf pour la série I, où le faible nombre de mesures limite la validité de l'ajustement.

Pour la suite de cette étude, nous avons choisi de faire les mesures d'opacimétrie à 665 nm. Compte tenu des résultats des tableaux XII et XIII, c'est une des longueurs d'onde pour laquelle les divers coefficients de corrélation calculés sont les plus élevés. Mais ce n'est pas un argument décisif : en effet, il n'y a guère entre les longueurs d'onde testées de différence significative, qui en fait l'une meilleure que l'autre.

Aussi, le choix de l'une parmi les autres, est arbitraire, comme tend à le montrer les différences de choix des auteurs (530 nm, UKELES, 1968 ; 578 nm, LEPAILLEUR et coll., 1973 ; 665 nm, GIPPS et LINKE, 1976). Si nous avons préféré 665 nm, c'est aussi parce que l'amplitude des mesures entre l'ensemencement et la phase stationnaire est importante et permettra de mieux mettre en évidence des modifications de la croissance dues à un agent toxique.

#### . Précision des courbes de croissance, obtenues par opacimétrie :

Il s'agit d'étudier les variations de la croissance de différentes cultures de chlorelles, dont les conditions de développement sont le plus semblable possible, et non pas de rechercher la précision de la méthode de mesure elle-même ; celle-ci dépend de l'appareil utilisé, qui, par son manque de sensibilité, n'a pas permis l'étude de la précision à ce niveau.

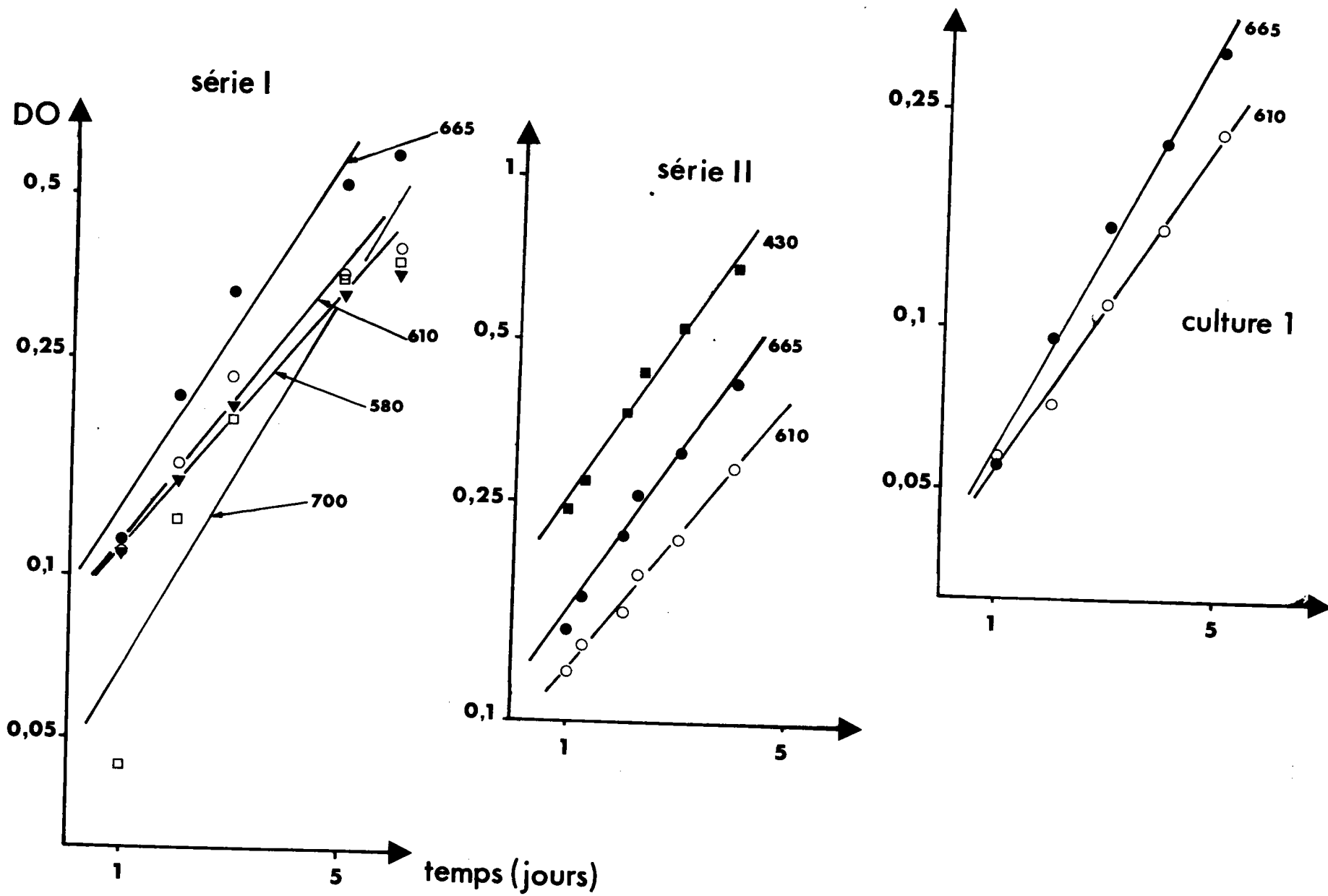


Figure 15: Courbes de croissance, par opacimétrie, de *Chlorella vulgaris*- coordonnées semi-logarithmiques- ajustement linéaire à différentes

Sur 12 cultures ensemencées à partir de la même culture mère, nous avons chaque jour fait une lecture de transmission, que nous avons transformée en DO. Nous avons ainsi pu faire une analyse de variance et calculer chaque jour le coefficient de variation de la moyenne ( $\Delta$  %). Les quatre premiers jours, les coefficients de variation calculés (Tableau XIV) sont faibles (environ 4 %), mais par la suite, ils augmentent sans toutefois dépasser 10 %. On constate alors que, durant la phase exponentielle, choisie comme référence pour les études d'intoxication, les variations de croissance de cultures témoins sont faibles (figure 16).

Cependant, pour des cultures ensemencées à des temps différents, aucune comparaison n'est possible, car les conditions d'ensemencement et de développement ne sont pas strictement identiques et leur croissance n'est alors pas toujours semblable.

temps en jour	DO moyenne x 10 <sup>3</sup>	Ecart type	Erreur moyenne	Coefficient de variation
J0	103	3,9	1,1	2,4
J1	147	4	1,1	1,6
J1'	174	7	2	2,5
J2	219	8,2	2,4	2,4
J2'	262	9,4	2,7	2,3
J3	312	11	3,2	2,3
J4	423	23	6,7	3,5
J7	605	60,6	17,5	6,4
J8	651	63	18	6,1
J9	690	65,5	19	6,1
J10	711	65	18,7	5,8
J13	752	67,5	19,5	5,7
J14	756	52	16,5	4,8

Tableau XIV : Précision des courbes de croissance par opacimétrie, sur 12 cultures de *Chlorella vulgaris*.

Coefficients de variation en fonction du temps.

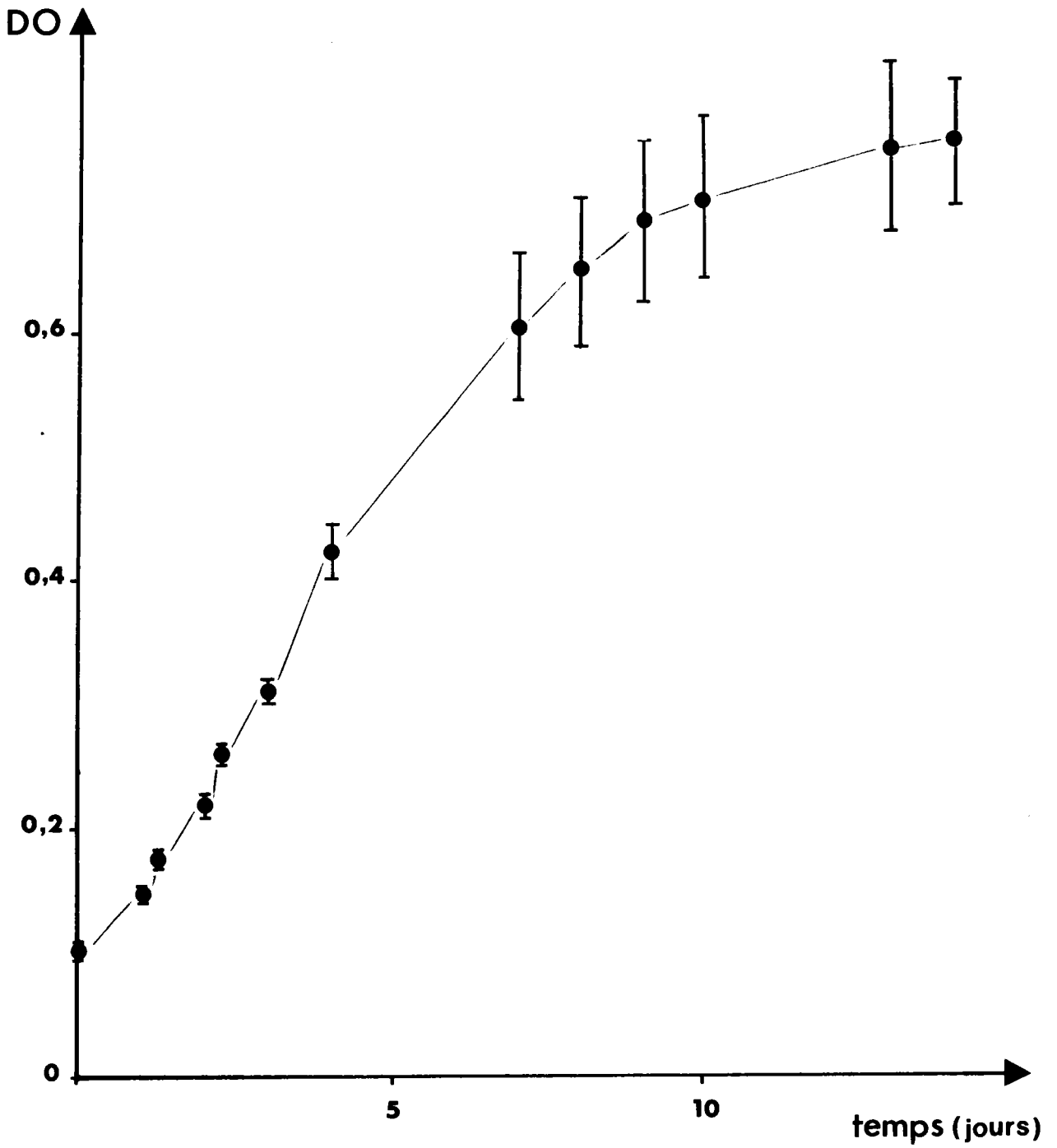


Figure 16: Courbe de croissance de *Chlorella vulgaris*-  
opacimétrie à 665 nm- précision de la courbe  
obtenue.

### 1.1.3. CORRELATION ENTRE LES QUELQUES CRITERES ETUDIES

Sur une série de quatre cultures, la croissance des populations a été suivie par quatre critères :

- T % à 610 nm transformée en DO
- T % à 665 nm transformée en DO
- Numération par la cellule de Thoma
- Numération par le Compteur Coulter

La mesure par opacimétrie est faite en transmission, car la précision est plus grande, et les valeurs sont converties en DO par la relation  $DO = 2 - \log T \%$ .

Les moyennes obtenues regroupées dans le tableau XV permettent de faire la corrélation entre les paramètres pris 2 à 2.

La matrice des coefficients de corrélation ( $r$ ) calculés (Tableau XVI) montre que pour tous les cas, l'ajustement linéaire est hautement significatif. En effet, le calcul du coefficient de Student-Fisher permet d'estimer que l'erreur commise par l'ajustement linéaire est inférieure à 0,01 %, puisque  $t$  est toujours supérieur à 15, pour  $n$  supérieur à 10.

En ce qui concerne la corrélation entre la numération par la cellule de Thoma et celle par le compteur Coulter, nos résultats sont en accord avec ceux de SAYED et BYUNG (1963) ; ces auteurs ont de la même manière fait la corrélation entre ces deux critères et ont trouvé des coefficients de corrélation,  $r$ , de 0,991 et 0,994 pour deux espèces de chlorelles. Ils en concluent que, compte tenu de la rapidité et de la précision du compteur Coulter, cet appareil est d'une grande utilité pour déterminer la concentration cellulaire de cultures algales et faire ainsi les courbes de croissance correspondantes.

Si la meilleure corrélation semble être entre la numération à la cellule de Thoma et la densité optique à 665 nm, les différences entre les quelques coefficients de corrélation obtenus ne sont pas significatives pour affirmer que ces deux paramètres sont les meilleurs.

C'est pourquoi, compte tenu de ces résultats de corrélation et des différents avantages de chaque paramètre précédemment exposés, nous avons retenu la densité optique à 665 nm et la numération au compteur Coulter pour étudier l'influence du cadmium sur la croissance de cultures de chlorelles.

temps en jours	D.O. à 610 nm (x 10 <sup>3</sup> )	D.O. à 665 nm (x 10 <sup>3</sup> )	Numération (Thoma)	Numération (Compteur Coulter)
J1	575	55,5		
J2	721	96,4	4487	3865
J3	111	154	-	8168
J4	154	219	14075	12936
J5	229	320	19287	17672
J6	260	383	24062	23516
J7	314	460	28667	29084
J8	334	513	34050	32319
J9	417	616	39950	35631
J10	-	-	-	-
J11	466	714	46150	38648
J12	538	762	50400	43325
J13	550	770	53833	43633
J14	580	801	-	44097
J15	597	824	54167	43290
J16	623	832	-	49563

Tableau XV : Moyennes des résultats obtenus en opacimétrie et numération (nombre de cellules x 10<sup>3</sup> / ml)

Comparaison des quatre critères.

r	t	DO <sub>610</sub>	DO <sub>665</sub>	N THOMA	N COMPTEUR COULTER
DO <sub>610</sub>			37,8	29,8	19,7
DO <sub>665</sub>		0,995		47,3	26,3
N THOMA		0,995	0,998		20,0
N COMPTEUR COULTER		0,985	0,991	0,991	

TABLEAU XVI : MATRICE DE CORRELATION DES QUATRE PARAMETRES  
D'ESTIMATION DE LA CROISSANCE DE *Chlorella vulgaris*

- coefficient de corrélation  $r^2$

$$- t = \frac{r \sqrt{n - 2}}{\sqrt{1 - r^2}}$$

#### 1.1.4. ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DE TAILLE DES POPULATIONS ALGALES

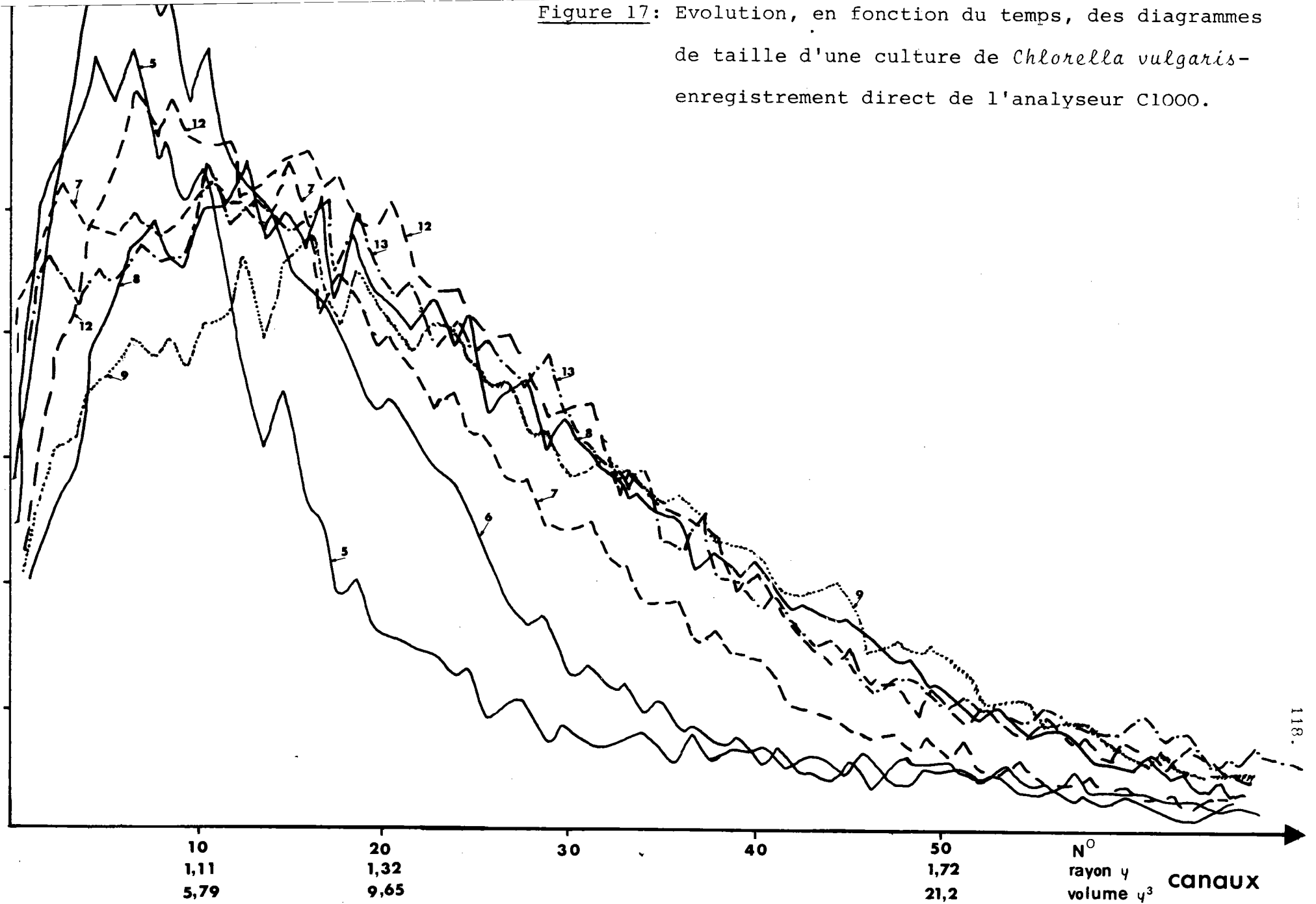
Ce dispositif, complémentaire du compteur Coulter, permet l'analyse en 100 canaux différents de la distribution de la taille des particules considérées. Chaque impulsion provenant du modèle ZB est transmise électroniquement au modèle C 1000 et est classée par canal en fonction de son amplitude. A chaque canal correspond ainsi un intervalle de taille, de quelques centièmes de microns. Le diagramme de distribution des tailles des particules est visualisé sur un oscilloscope, et reproduit sur une table traçante X-Y. De même que pour le modèle ZB, il faut tout d'abord étalonner l'appareil, pour connaître le volume de particule correspondant à chaque canal. La formule  $V = (N^{\circ} \text{ canal} \times \frac{WW}{100} + BCT) \times K_v$  permet de calculer le coefficient d'étalonnage  $K_v$ , par l'intermédiaire de la solution de particules déjà utilisée, de 2,01  $\mu$  de diamètre. Après tout réglage électronique de l'appareil,  $K_v$  est égal à 0,386.

Compte tenu des seuils inférieur (BCT = 5) et supérieur (WW = 100) choisis pour tous les comptages, le C 1000 répartit en 100 classes différentes les particules dont le rayon est compris entre 0,97 et 2,13  $\mu$ , c'est-à-dire dont le volume est compris entre 3,9 et 40,5  $\mu^3$ . C'est-à-dire que le C 1000 intègre en 1 mesure le résultat de 100 comptages faits au ZB, à des seuils différents. On peut ainsi visualiser en quelques secondes la distribution des particules selon leur taille et savoir alors très rapidement si la population est monodimensionnelle ou non. Dans ce cas, il est intéressant de suivre l'évolution de cette distribution en fonction du temps. La figure 17 présente les différentes courbes obtenues, telles que la table traçante les donne. On constate, malgré l'irrégularité de ces courbes brutes, que les populations présentent toutes un maximum, et tendent donc à être monodimensionnelles autour d'un certain intervalle de taille. Le nombre de cellules appartenant à ce maximum augmente jusque vers les 5-6èmes jours, tout en restant situé dans les plus faibles tailles. Puis ce pic de petites cellules diminue et les cellules de plus grande taille sont alors plus fréquentes. Cette évolution en fonction du temps peut être obtenue plus schématiquement sur les courbes simplifiées de la figure 18. La population de cellules est totalisée par intervalle de 10 canaux ; les courbes ne sont alors plus construites point par point comme avec la table traçante, mais en 10 points seulement. On peut déterminer alors le pourcentage de la population totale appartenant à chaque classe de taille et construire ensuite la courbe des pourcentages les plus élevés en fonction du temps.



Figure 17: Evolution, en fonction du temps, des diagrammes de taille d'une culture de *Chlorella vulgaris* - enregistrement direct de l'analyseur C1000.

nombre de cellules



nombre de cellules

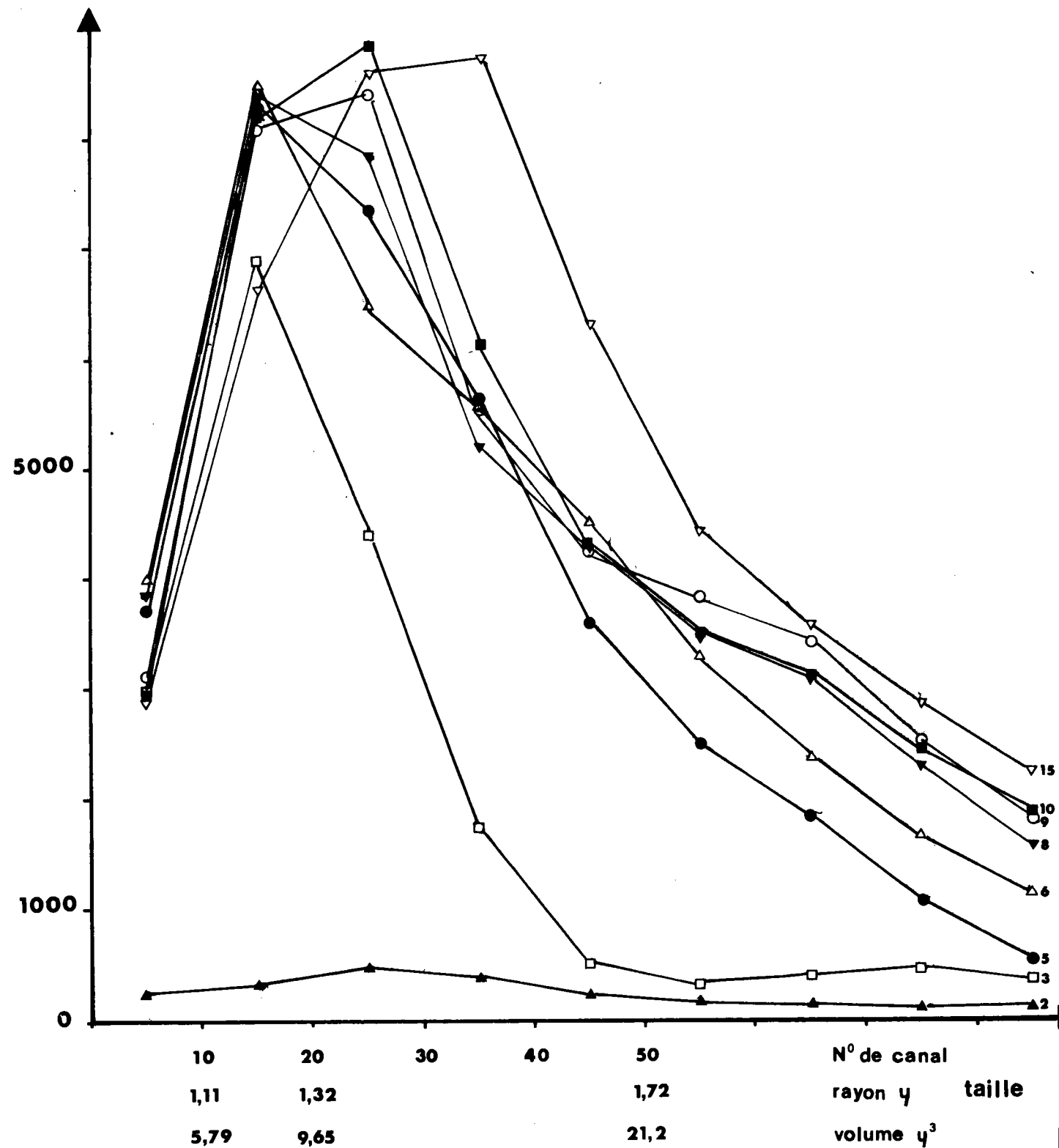


Figure 18: Evolution, en fonction du temps, des diagrammes de taille d'une culture de *Chlorella vulgaris* - enregistrement simplifié de l'analyseur C1000.

C'est ce que représente la figure 19 pour 3 cultures témoins ; jusque vers le 5ème jour, environ 40 % de la population totale appartient à la même classe, tandis que plus tard, la population est davantage hétérogène quant à la taille de ses particules.

L'évolution théorique d'une culture témoin de chlorelles serait donc un nombre de plus en plus élevé de petites cellules, dû à la division cellulaire active par autosporelation. Puis, pendant la phase de croissance lente, au-delà du 6ème jour, la taille des cellules augmente et le pic maximum correspondant tend à se déplacer vers les plus grandes tailles et à s'élargir. Le milieu nutritif n'étant pas renouvelé, la division cellulaire est limitée et le nombre de petites cellules diminue.

L'utilisation complémentaire du compteur Coulter et de l'analyseur à 100 canaux devrait permettre de comparer les cultures expérimentales aux cultures témoins, non seulement sur le plan quantitatif que représente la concentration cellulaire, mais aussi sur le plan qualitatif représenté par la distribution des tailles des particules de la population considérée.

#### 1.1.5. CRITERES INTERNES

##### 1.1.5.1. Estimation des teneurs en pigments chlorophylliens

La détection, l'estimation et l'identification des chlorophylles sont d'un grand intérêt pour la connaissance du matériel végétal, que ce soit en agronomie, en industrie alimentaire ou en écologie et en hydro-biologie (STRAIN et SVEC, 1966).

En effet, si la biomasse quantifie la production d'une population donnée, les chlorophylles tout comme d'autres constituants cellulaires, apportent un aspect qualitatif, très utile surtout dans les cas de perturbation de la croissance de la population considérée.

La technique d'extraction des chlorophylles du phyto-plancton est connue (RICHARDS et THOMPSON, 1952 ; CREITZ et RICHARDS, 1955 ; YENTSCH et RYTHER, 1957 ; BRUINSMA, 1961 ; PARSONS, 1963 ; PARSONS et STRICKLAND, 1963 ; LORENZEN, 1967 ; MOSS, 1967 ...) car elle est à la base de la connaissance de la production primaire des écosystèmes aquatiques.

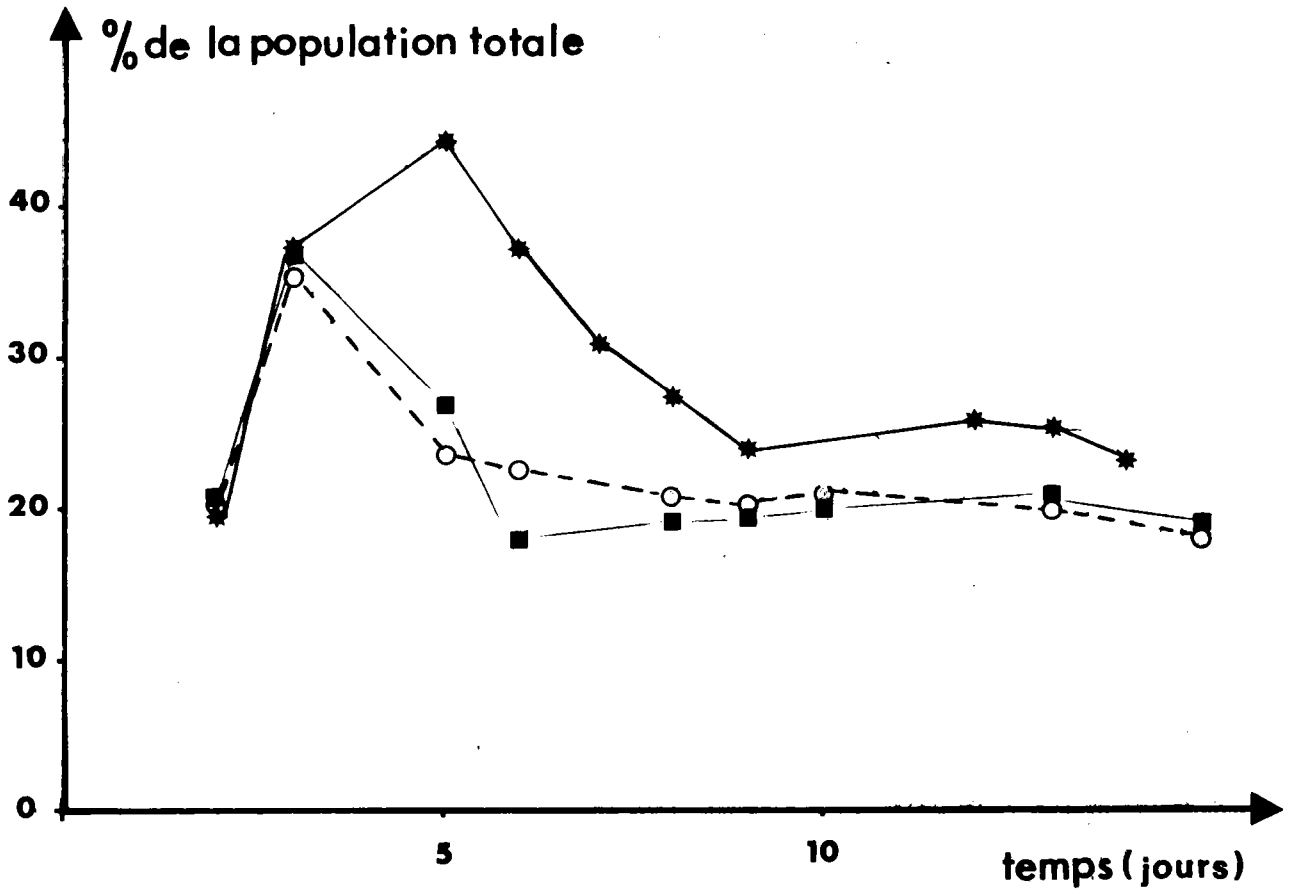


Figure 19: Evolution, en fonction du temps, des pourcentages de la classe de taille la plus abondante de 3 cultures témoins de *Chlorella vulgaris*.

Le solvant classique est l'acétone à 80, 90 ou 100 % selon les auteurs, et d'après les coefficients d'absorption de MACKINNEY (1940, 1941) des équations ont été proposées (ARNON, 1948 ; RICHARDS et THOMPSON, 1952 ; VERNON, 1960 ; PARSONS et STRICKLAND, 1963), pour déterminer quantitativement les teneurs en chlorophylles a, b et c.

Nous avons donc essayé la méthode la plus commune ("Standard Methods" 1971) pour estimer la teneur en chlorophylles totales, mais nous avons constaté une extraction insuffisante et ce, malgré des concentrations algales nettement supérieures à celles du phytoplancton des eaux naturelles.

Ainsi que le constate STEEMAN-NIELSEN (1961), sur *Chlorella vulgaris*, il n'y a pas une complète destruction des cellules, par l'acétone 90 % ; l'auteur fait alors une ébullition du matériel pendant une minute.

Pour ne pas risquer de détruire thermiquement les pigments chlorophylliens, nous avons préféré essayer des moyens mécaniques (potter et mixer) pour faire éclater les cellules, mais sans résultat.

Ne pouvant adapter le solvant usuel aux cultures de chlorelles, nous avons recherché un solvant plus efficace et nous avons retenu le méthanol, souvent cité pour permettre une meilleure extraction, principalement dans le cas de cultures de laboratoire. (STEEMAN-NIELSEN, 1961 ; BÖGER, 1964 ; CROUZET, 1972 ; TETT et al., 1975 ; GEIKE et PARASHER, 1976).

En travaillant dans des conditions identiques (prise 10 ml, extraction 24 heures à l'obscurité et à + 4° C), il est possible de comparer les cultures entre elles, par les spectres obtenus (figure 20) et par la mesure de la DO au maximum d'absorption de la chlorophylle (665 nm).

Ainsi, sur une série de cultures, nous avons fait chaque jour une extraction, sur deux prises d'essai, dans le but de suivre l'évolution des chlorophylles en fonction du temps. Les résultats obtenus présentés sur la figure 21 montrent que la concentration en chlorophylles augmente jusqu'à un maximum entre le 8ème et le 12ème jour de culture.

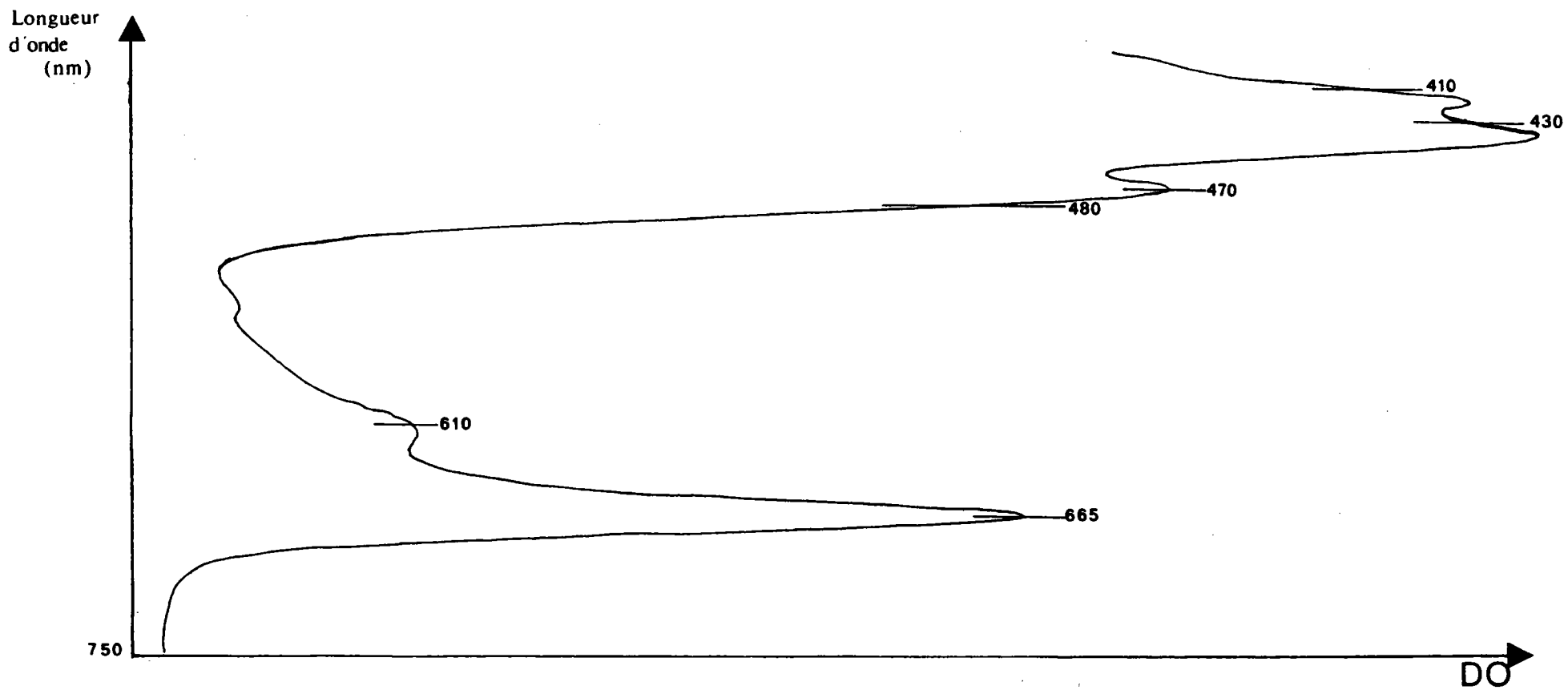


Figure 20: Extraction des chorophylles de cultures de *Chlorella vulgaris*-  
Spectre dans le méthanol- Enregistrement 20 mm/mm 20 mV.

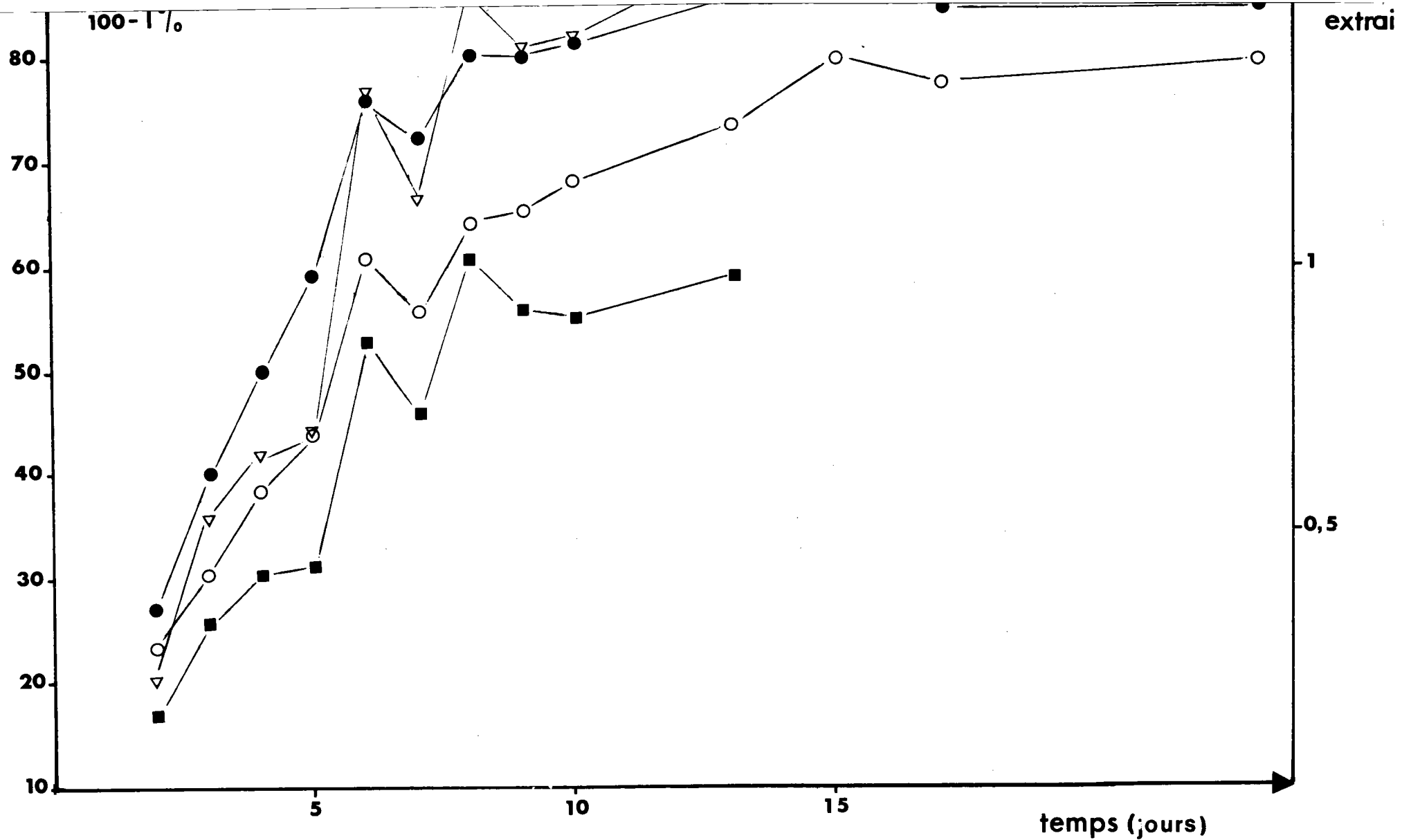


Figure 21: Evolution des pigments chlorophylliens, en fonction du temps-  
DO des extraits méthanoliques à 665 et 430 nm- opacimétrie à 665 et 610 nm.

Puis, il y a diminution des valeurs, car l'extraction n'est pas complète, même après une durée supérieure à 48 h. Une seule possibilité de pallier cet inconvénient serait de procéder à la sonication des cultures pour permettre la lyse totale des cellules, même après une semaine, moment où la paroi cellulaire semble devenir plus résistante. Les cellules âgées contiendraient en effet davantage de substances assurant la rigidité de la membrane (cellulose, chitine, composés pectiques) que les plus jeunes cellules (LEFEVRE, 1942).

Par ailleurs, cette technique d'extraction ne nous permet pas d'apprécier l'état des pigments chlorophylliens. L'estimation des teneurs en chlorophylle demande donc un matériel particulier pour permettre une étude plus complète et nous ne nous limiterons, pour les études d'intoxication, qu'à des cultures âgées d'une semaine.

D'autres auteurs (YENTSCH et MENZEL, 1963 ; HOLM HANSEN et coll., 1965 ; LORENZEN, 1966-1968 ; WHITE et coll., 1972 ; TITMAN, 1975) ont préféré suivre l'évolution de la concentration en chlorophylles par fluorescence in-vivo. Cette technique, bien que précise et plus rapide, nécessite un appareillage particulier et n'a pu être utilisée dans le cadre de cette étude.\*

#### 1.1.5.2. Autres critères

La numération ou l'opacimétrie ne donnent qu'un aspect global de la culture et ne permettent pas d'affirmer si les algues sont vivantes ou mortes au moment de la mesure. Tandis que l'adénosine triphosphate (ou ATP) représente la réserve calorifique immédiatement disponible par l'organisme et disparaît rapidement et totalement à la mort de celui-ci (DAUMAS et FIALA, 1969).

C'est pourquoi sa recherche et la détermination de sa concentration dans une population peuvent en refléter son état. Car la moindre modification de croissance de la population considérée, due à la présence d'un toxique par exemple, se traduira par une diminution de la concentration en ATP.

\* En fin de recherche, un sonicateur a été obtenu ; il permettra dans l'avenir une extraction normale à l'acétone.



La détermination de cette molécule se fait par une réaction photochimique du système enzymatique luciférine-luciférase, en réponse à la présence d'ATP (STREHLER et TOTTER, 1952).

Dans nos expériences, nous avons pu déterminer au 5ème jour, sur des cultures témoins, une concentration en ATP de  $2,86 \cdot 10^{-1} \mu\text{g/ml}$  de culture, soit  $15,5 \mu\text{g}/10^9$  cellules, compte tenu de la concentration cellulaire des cultures considérées.

Cependant, ce n'est pas le seul paramètre connu des études de production primaire, et dans le cas des producteurs, il peut être nécessaire de quantifier la photosynthèse, qui seule assure, dans des conditions autotrophes, leur croissance.

On peut mesurer soit l'oxygène produit (GAARDER et GRAN, 1927), soit le carbone assimilé (STEEMAN-NIELSEN, 1952).

La première technique, la plus ancienne, permet de mesurer le volume d'oxygène produit selon la méthode manométrique de WARBURG (1919), ou bien l'oxygène dissous (méthode iodométrique de Winckler, 1888) méthode électrométrique basée sur le taux de diffusion de  $\text{O}_2$  à travers une membrane, pendant les phases claires et obscures, pour tenir compte de la respiration.

Une méthode plus moderne par électrode spécifique ou polarographie (Yellow Springs Instrument Co) permet une mesure plus rapide (DAS, 1973 ; EWALD et coll., 1976).

La deuxième technique consiste à mesurer la quantité de carbone assimilé, par l'intermédiaire d'une solution de carbonate radioactif ( $^{14}\text{CO}_3^{--}$ ) utilisée comme substrat de la réaction photosynthétique. Bien que nécessitant un appareillage particulier et la manipulation d'éléments marqués, cette méthode est de plus en plus utilisée car elle est rapide et précise, et très représentative de la photosynthèse nette (STEEMAN-NIELSEN, 1961 ; BERMAN, 1973 ; EPPLEY et SHARP, 1975).

La variation d'autres composés cellulaires (acides nucléiques, protéines, hydrates de carbone ...), en fonction du temps peut aussi compléter utilement des données en hydrobiologie ou en écotoxicologie mais sans être spécifique aux producteurs.

Si tous ces paramètres externes ou physiologiques ont été étudiés séparément, il convient de les associer dans l'étude d'un organisme donné, soit en physiologie (DAS, 1968 ; DAS et RONECKLES, 1975), soit en écotoxicologie (HASSAL, 1961 ; DAS et RONECKLES, 1974 ; GEIKE et PARASHER, 1976 ; EWALD et coll., 1976). C'est pourquoi BERLAND et coll. (1972) ont étudié la corrélation entre différents paramètres de croissance (numération, ATP, carbone, azote, volume cellulaire), sur différentes espèces d'algues planctoniques.

Les résultats exprimés sous forme matricielle, montrent une faible variabilité intraspécifique ; en effet, la corrélation est très significative  $\gg 99\%$  dans  $74\%$  des couples de paramètres, et les auteurs considèrent même négligeables ces variations au cours de la phase exponentielle de croissance, surtout par rapport aux variations interspécifiques. Ce serait les paramètres exprimés en fonction du volume cellulaire qui présenteraient la moins bonne corrélation.

## 1.2. Les consommateurs primaires

Nous avons retenu comme paramètres biologiques d'étude d'une population de daphnies, l'immobilité, le taux de reproduction et le poids de matière sèche, qui représentent respectivement les effets biologiques d'un facteur toxique sur la mortalité, la natalité et la croissance pondérale. Nous envisagerons d'abord leur signification et leur évaluation puis nous donnerons quelques résultats d'expérimentations faites sur des témoins afin d'estimer leur fiabilité.

### 1.2.1. L'IMMOBILITE

#### 1.2.1.1. Signification et évaluation

La mort d'une daphnie est une réponse en "tout ou rien", sans autres variations possibles que le temps au bout duquel celle-ci intervient. Le TL 50 est souvent utilisé par les expérimentateurs. Pour un temps déterminé, on s'exprimera en pourcentage de daphnies mortes par rapport à l'effectif de départ. Paramètre représentatif de la mortalité, l'immobilité a été retenue comme critère au bout de 24 heures dans le test-daphnie (norme AFNOR, T-90301, 1974). On parle alors de  $CI_{50}$  24 heures. La  $CI_{50}$  48 heures a été par contre retenue par BRINGMANN et MEINCK (1964).

Nous avons utilisé dans nos expérimentations le critère d'immobilité de l'individu tel qu'il est défini dans la norme AFNOR T-90301 : "les daphnies qui sont incapables de se déplacer dans les 15 secondes qui suivent une légère agitation du tube sont considérées comme étant immobilisées, même si elles agitent leurs antennes".

#### 1.2.1.2. Variabilité du matériel biologique et reproductibilité des résultats

Nous avons étudié l'évolution de la mortalité sur 9 expériences réalisées dans les mêmes conditions à des temps différents, et suivies pendant 28 jours, durée qui est celle des élevages et des expériences. Les conditions opératoires sont identiques à celles déjà utilisées pour les élevages, à savoir :

- lavage des algues avec du milieu oligo L.C. frais
- milieu constitué de milieu oligo L.C. et de volvic à raison de 4 volumes de milieu oligo L.C. pour 6 volumes de volvic
- ration alimentaire égale à  $1.10^6$  chlorelles par daphnie par heure
- changement des milieux tous les 7 jours.

La seule modification apportée par rapport aux élevages est que l'on utilise seulement 500 ml de milieu pour 20 daphnies âgées de 0 à 24 heures au début de l'expérience. Les daphnies vivantes sont comptées tous les jours. Le tableau XVII détaille les résultats obtenus. On observe que dans ces conditions, la mortalité est toujours comprise entre 0 et 10 %, ce qui est une valeur très acceptable pour ces animaux placés pendant 28 jours en laboratoire, dans des conditions artificielles. La mortalité moyenne, dans ces conditions, est de 4,44 %. D'après MAC ARTHUR et BAILLIE (1929), "l'âge de la mort est très fortement influencé par les conditions extérieures, par la température, par la densité de population ..." ARNOLD (1971) précise sur une autre espèce de daphnies, *Daphnia pulex*, que la longévité dépend également de la nature et de la quantité de nourriture. Elle est par ailleurs, fonction de l'âge des daphnies mises en expérimentation : jeunes, pré-adultes, adultes reproducteurs.

JOURS	EXPERIMENTATIONS								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
J0	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J1	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J2	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J3	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J4	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J5	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J6	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J7	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J8	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J9	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J10	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J11	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J12	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J13	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J14	20	20	20	20	20	20	20	20	20
J15	20	20	20	19	20	20	20	20	20
J16	20	20	20	19	20	20	20	20	20
J17	20	20	20	19	20	20	20	20	20
J18	20	20	20	19	20	20	20	20	20
J19	20	20	20	19	20	20	19	20	20
J20	20	20	20	19	20	20	19	20	20
J21	20	19	20	19	20	20	19	20	20
J22	20	19	20	19	20	20	19	20	20
J23	20	19	20	19	20	20	19	20	20
J24	20	19	20	19	20	20	19	20	20
J25	20	19	20	19	19	20	19	20	20
J26	19	18	20	19	19	20	19	20	20
J27	19	18	20	19	19	20	19	20	20
J28	19	18	20	18	19	19	19	20	20
Pourcentage de mortalité après 28 jours	5	10	0	10	5	5	5	0	0

TABLEAU XVII : EVOLUTION DE LA MORTALITE DE 9 LOTS DE 20 DAPHNIES,  
DURANT 28 JOURS.

## 1.2.2. LE TAUX DE REPRODUCTION

### 1.2.2.1. Signification et évaluation

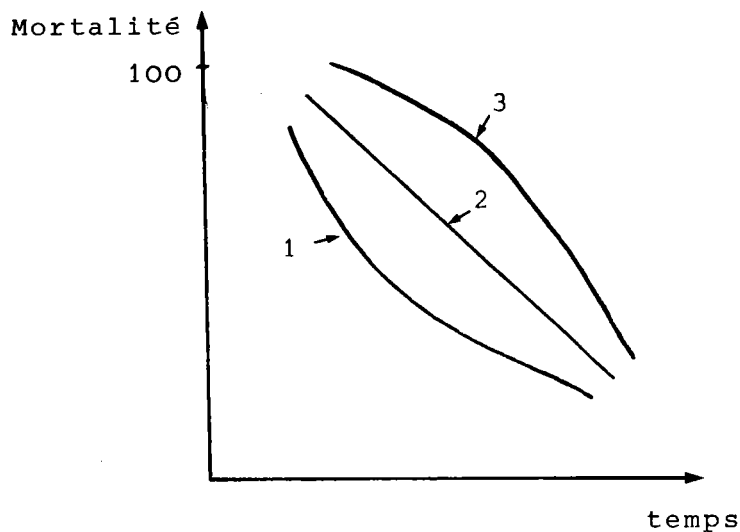
Le taux de reproduction ne peut évidemment être pris en considération que lorsque la daphnie arrive à maturité sexuelle. C'est donc un critère intéressant pour les expériences à long terme. Il est exprimé par le nombre de naissances par daphnie par jour, c'est-à-dire qu'il va traduire de façon plus ou moins fidèle le nombre d'oeufs contenus dans la poche incubatrice (il arrive, en effet, qu'une partie des oeufs n'arrive pas à éclosion et avorte). Caractérisé par sa multiplicité de réponses possibles, il s'avère être un bon indice de l'état métabolique général (ANDERSON et JENKINS, 1942). Il a été préconisé par CANTON et coll. (1975) dans les études de toxicité de l'hexachlorocyclohexane. Le calcul de ce taux peut être effectué de différentes façons que nous allons successivement envisager.

#### Méthode 1

Il est possible, tout d'abord, de rapporter le nombre de petits nés pendant une certaine période de temps au nombre de daphnies mises en expérience, ce qui a l'inconvénient de ne pas tenir compte de la mortalité éventuelle d'une partie de la population de daphnies mise en expérience. On peut en effet obtenir pour deux essais distincts, le même nombre de petits alors que le nombre de morts est différent.

#### Méthode 2

Il est également possible de calculer le taux de reproduction en fonction du nombre de daphnies vivantes à la fin de l'expérience, ce qui a l'avantage de faire intervenir la mortalité à la fin de la période de temps considérée, mais a l'inconvénient de ne pas prendre en compte la mortalité au jour le jour. Celle-ci peut en effet être variable en fonction du temps : très forte au départ (courbe 1), continuellement constante (courbe 2), très forte à la fin (courbe 3).



### Méthode 3

Il s'avère donc préférable de calculer le taux de reproduction en fonction du nombre de daphnies vivant dans le milieu au moment du comptage des petits. Ce calcul est alors valable dans l'exemple suivant où l'on effectue des comptages très espacés.

Jour	Daphnies vivantes	Petits	Petits par daphnie pour cinq jours	Petits par daphnie par jour
Jj-10	y	y'	y''	y'''
Jj-5	12	150	12,5	2,5
Jj-0	10	170	17	3,4
Jj+5	9	144	16	3,2

Par contre, lorsque les comptages sont plus rapprochés et effectués tous les jours, il convient d'y apporter une correction qui tient compte de la réalité biologique. Les petits sont libérés de la poche incubatrice quelques heures avant la mue (GREEN, 1963) et c'est au moment de la mue que la daphnie est la plus vulnérable. Dans certaines expérimentations, nous avons ainsi constaté que d'un jour à l'autre, les daphnies sont retrouvées mortes, mais que les embryons portés par celles-ci, sont vivants dans le milieu. Il apparaît donc normal de rapporter le nombre de petits nés au jour J au nombre de daphnies trouvées au jour J-1.

Le taux de reproduction corrigé semble ainsi mieux refléter le phénomène biologique. Ce mode de calcul peut se résumer par la formule suivante :

$$\frac{P_t}{D_{t-1} \cdot \frac{(t_0 - (t - 1))}{24}}$$

$P_t$  : nombre de petits obtenus à l'instant  $t$

$D_{t-1}$  : nombre de mères vivantes à l'instant  $t - 1$

$t_0$  : heure à laquelle se fait le comptage

$t - 1$  : heure à laquelle s'est fait le comptage précédent

Ce qui donne pour l'exemple suivant, où les comptages sont effectués tous les jours à 24 heures d'intervalle :

Jours	Daphnies vivantes	Petits	Petits par daphnie par jour non corrigé	Petits par daphnie par jour corrigé
Jj-1	12	n	-	-
Jj0	10	42	4,2	3,5
Jj+1	8	52	6,5	5,2
Jj+2	x	n'	-	-

#### 1.2.2.2. Variabilité du matériel biologique et reproductibilité des résultats

Au cours des mêmes expériences et parallèlement à l'immobilité, l'évolution du taux de reproduction a été envisagée. Les naissances sont comptées généralement tous les jours. Le tableau XVIII rassemble les résultats obtenus et fournit le taux de reproduction moyen pour chaque cas. Celui-ci varie de 4,99 à 6,35. La moyenne calculée est de  $5,63 \pm 0,49$  (médiane 5,67). La reproductibilité de ce paramètre peut être estimée par le calcul du coefficient de variation qui est de 6,66 %. Il n'en demeure pas moins que le taux de reproduction est très variable en soi.

JOURS	EXP. N° 1		EXP. N° 2		EXP. N° 3		EXP. N° 4		EXP. N° 5		EXP. N° 6		EXP. N° 7		EXP. N° 8		EXP. N° 9	
	P/J	Tx/J	P/J	Tx/J	P/J	Tx/J	P/J	Tx/J	P/J	Tx/J	P/J	Tx/J	P/J	Tx/J	P/J	Tx/J	P/J	Tx/J
J0	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J1	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J2	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J3	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J4	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J5	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J6	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J7	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J8	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J9	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-
J10	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	68	3,40	41	2,05	71	3,5
J11	0	-	0	-	55	2,75	7	0,35	0	-	10	0,50	272	13,60	281	14,05	168	8,4
J12	0	-	143	7,15	9	0,45	40	2,00	121	6,05	3	0,15	9	0,45	1	0,05	45	2,2
J13	144	7,20	32	1,60	44	2,20	47	2,35	14	0,70	4	0,20	101	5,05	79	3,95	225	11,2
J14	29	1,45	41	2,05	19	0,95	0	0	96	4,80	308	15,40	129	6,45	167	8,35	84	4,2
J15	6	3,00	54	2,70	31	1,55	16	0,80	0	0	52	2,60	20	1,00	30	1,50	100	5,0
J16	0	0	196	9,80	208	10,40	219	11,53	170	8,90	23	1,15	31	1,55	32	1,60	349	17,4
J17	168	8,40	17	0,85	183	9,15	132	6,95	37	1,85	140	7,00	110	5,50	135	6,75	71	3,5
J18	113	5,65	107	5,35	61	3,05	24	1,26	202	10,10	276	13,80	98	4,90	43	2,15	64	3,2
J19	23	1,15	21	1,05	42	2,10	5	0,26	0	0	21	1,05	0	0	51	2,55	137	6,8
J20	35	1,75	423	21,15	78	3,90	214	11,26	79	3,95	198	0,90	78	4,11	46	2,30	106	5,3
J21	357	17,85	183	9,15	446	22,30	180	9,47	219	10,95	34	1,70	135	7,11	153	7,65	38	1,9
J22	172	8,60	31	1,63	77	3,85	25	1,32	243	12,15	479	23,95	117	6,16	231	11,55	66	3,3
J23	0	0	51	2,68	154	7,70	118	6,21	18	0,90	28	1,40	108	5,68	15	0,75	398	19,9
J24	341	17,05	316	16,63	141	7,05	324	17,05	332	16,60	5	0,25	112	5,89	138	6,90	0	0
J25	266	13,30	147	7,74	16	0,80	107	5,63	65	3,25	283	14,15	135	7,11	270	13,50	238	11,9
J26	32	1,60	55	2,89	226	11,30	41	2,16	23	1,21	192	9,60	121	6,37	101	5,05	152	7,6
J27	0	0	84	4,67	92	4,60	69	3,63	304	16,00	79	3,95	162	8,53	86	4,30	89	4,4
J28	45	2,37	185	10,28	43	2,15	144	7,58	1	0,05	3	0,15	111	5,84	158	7,90	13	0,6
Total	1731	86,67	2086	107,37	1925	96,25	1712	89,81	2024	102,06	2138	106,90	1917	98,70	2058	102,90	2414	120,9
Nombre de jours de ponte		16		17		18		18		17		19		19		19		1
Taux de reproduction		5,42		6,32		5,35		4,99		6,00		5,63		5,19		5,42		6,0

TABLEAU XVIII : EVOLUTION DU TAUX DE REPRODUCTION DE 9 LOTS DE 20 DAPHNIES, DURANT 28 JOURS.



Nous avons pu observer dans nos expériences, qu'une daphnie pouvait donner naissance de 1 à 46 petits en un seul jour, signe de la présence d'au moins autant d'oeufs dans la poche incubatrice.

Ce nombre d'oeufs dépend selon les auteurs, de la nature et de la quantité de nourriture (LEFEVRE, 1942 ; RYTHÉ, 1954) et de la taille de la mère (ANDERSON et JENKINS, 1942). Il est également fonction de la température (MAC ARTHUR et BAILLIE, 1929). D'autres auteurs indiquent l'influence de la composition physico-chimique du milieu et du pourcentage de saturation en oxygène.

### 1.2.3. LE POIDS MOYEN DE MATIÈRE SÈCHE

#### 1.2.3.1. Signification et évaluation

Le poids moyen de matière sèche traduit la croissance pondérale des daphnies : celle-ci est importante lorsque les individus sont jeunes, elle diminue avec l'âge, mais continue jusqu'à la mort (RICHMAN, 1958). Toutefois ce paramètre n'a guère été utilisé par les auteurs. COWGILL et BURNS (1975) signalent toutefois un rapport poids de matière fraîche/poids de matière sèche égal à 60,1 pour des daphnies adultes.

En raison de la méthode analytique utilisée, sa détermination est commode et facile. Après avoir lavé les daphnies à doser dans deux bains de Volvic d'une demi-heure chacun, celles-ci sont mises à sec dans un récipient préalablement taré, qui est placé à l'étuve à 105 °C pendant 12 heures, et ensuite au dessiccateur pendant un minimum de 12 heures. Après pesée, le poids de matière sèche qu'il contient est déterminé, permettant d'obtenir ainsi le poids moyen d'une daphnie. Il faut évidemment un nombre suffisant de daphnies pour obtenir un poids significatif. Ce nombre dépend du stade auquel appartiennent les daphnies. En général, 10 daphnies adultes suffisent alors qu'il faut généralement une centaine de jeunes daphnies.

### 1.2.3.2. Variabilité du matériel biologique et reproductibilité des résultats

Le poids moyen de matière sèche d'une daphnie a été envisagé parallèlement à l'immobilité et au taux de reproduction sur les mêmes expériences. Après 28 jours d'expérimentation, les daphnies sont caractérisées par un poids moyen de  $560,5 \pm 43,0 \mu\text{g}$  (médiane 572,3 ; coefficient de variation 5,9 %).

Reflet de la croissance, le poids moyen de matière sèche est, à ce titre, fonction des facteurs agissant déjà sur la mortalité et la natalité. Nous avons également pu suivre l'évolution de ce paramètre en fonction du temps entre 0 et 28 jours (figure 22). On obtient ainsi une courbe de type sigmoïde avec un point d'inflexion se situant entre 6 et 7 jours, c'est-à-dire au moment où l'on peut constater à l'oeil nu, l'apparition d'ovaires chez la daphnie. Toutefois, la courbe obtenue a une allure différente de celle obtenue par certains auteurs utilisant la longueur comme critère représentatif de la croissance (MAC ARTHUR et BAILLIE, 1929 ; ANDERSON, 1932 ; VIJVERBERG, 1976).

### 1.2.4. DISCUSSION

Les résultats obtenus ne semblent pas à première vue refléter des conditions d'élevage défavorables. VIJVERBERG (1976) avec *Daphnia hyalina*, observe un maximum de 32 petits produits par femelle et par semaine, soit 4,57 petits par daphnie par jour. CANTON et coll. (1975) arrivent à obtenir 8 petits produits par daphnie par jour avec *Daphnia magna*, utilisant la méthode d'élevage de DEWEY et PARKER (1964) qui pourtant observent un taux de reproduction maximum de 1,5 petit par daphnie par jour. ANDERSON et JENKINS (1942) trouvent un taux moyen à 3,4 petits par daphnie par jour. Se basant sur le seul point de comparaison possible, à savoir le taux de reproduction, nos conditions expérimentales apparaissent très favorables et permettent d'obtenir des résultats meilleurs que la plupart des auteurs.

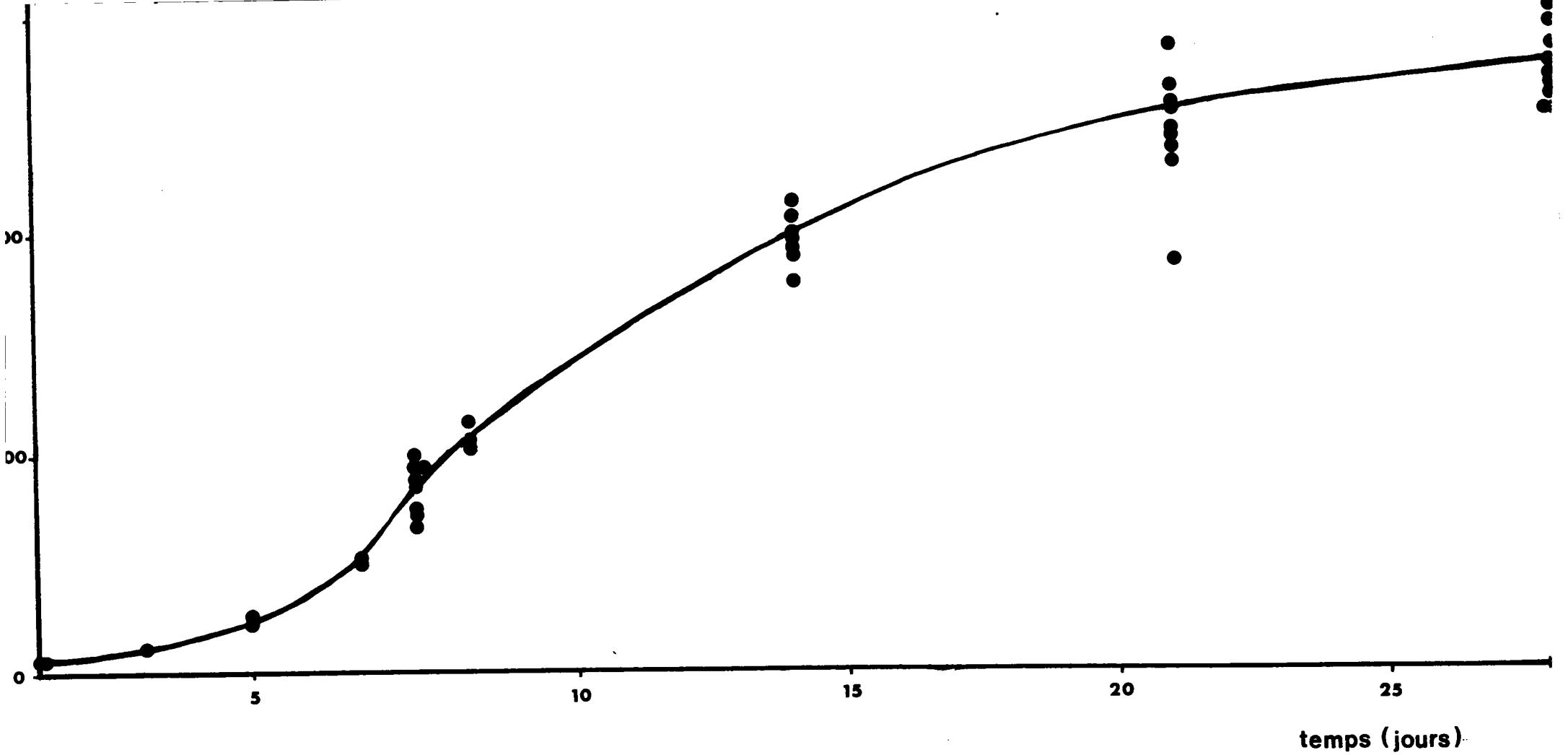


Figure 22: Evolution du poids de matière sèche de *Daphnia magna* en fonction du temps (µg).

### 1.3. Les consommateurs secondaires

Au cours des expériences de toxicité aiguë que nous avons entreprises, nous nous sommes limités au seul critère de mortalité du poisson. Ce critère simple est mieux défini dans le cas du poisson que dans celui de la daphnie, mais l'exploitation des résultats peut se faire de diverses manières :

1. en déterminant la relation pourcentage de mortalité - concentration pour un temps d'exposition déterminé
2. en déterminant la relation pourcentage de mortalité - temps d'exposition par une concentration déterminée.

De ce fait, les expérimentateurs expriment la toxicité d'une substance envers un être vivant, soit en terme de concentration entraînant la mortalité de 50 % de la population pour un temps donné ( $CL_{50}$ ), soit en terme de durée correspondant à la mortalité de 50 % de la population pour une concentration donnée ( $TL_{50}$ ).

Comme le propose SPRAGUE (1969), nous avons préféré utiliser la seconde méthode permettant d'obtenir les  $TL_{50}$  correspondant aux différentes doses. Ces données permettent ensuite de construire la courbe de toxicité  $TL_{50}$  - concentrations. On peut ainsi observer sur une même courbe les  $CL_{50}$  correspondant à différents temps d'exposition. Ainsi la  $CL_{50}$  24 heures, fort utilisée, il y a quelques années, est recommandée par FREEMANN (1953). Actuellement, les auteurs préfèrent des temps d'exposition plus longs :  $CL_{50}$  48 heures (MANN, 1975) et surtout la  $CL_{50}$  96 heures. Cette dernière est d'ailleurs recommandée par la méthode dite : "standard" utilisée aux ETATS-UNIS (Standard Methods, 1971). D'autres auteurs proposent des durées plus longues, de 7 à 12 jours (PICKERING et VIGOR, 1965), ou même 30 jours (PICKERING et coll., 1962).

## 2. LE CRITERE ANALYTIQUE

### 2.1. Préparation de l'échantillon

#### 2.1.1. MILIEU DE CULTURE

Les milieux de culture et d'élevage, témoins et contaminés par le cadmium, sont contrôlés tout au long des expérimentations. Sur une partie aliquote, des filtrations peuvent être nécessaires si le milieu est trop chargé en matières en suspension, ou en algues (pour un dosage en cours de culture, par exemple). En fait, nous avons filtré systématiquement sur filtre Millipore 0,45  $\mu$ . Lorsqu'aucun matériel biologique n'a été introduit dans les milieux, la minéralisation n'est pas nécessaire. Par ailleurs, des dilutions du milieu s'imposent pour des concentrations en cadmium supérieures à 10  $\mu$ g/l, afin d'éviter la saturation.

#### 2.1.2. MATERIEL BIOLOGIQUE

##### Chlorelles

Après filtration de la culture sur membrane d'acétate de cellulose Millipore 0,45  $\mu$ , et rinçages successifs à l'eau bidistillée, les algues sont prélevées du filtre par grattage, pour les expérimentations au seul niveau des algues. Pour celles utilisant les 2 ou 3 espèces associées, filtre et algues sont dosés en même temps, pour permettre de faire, en fin d'expérience, un bilan du cadmium retrouvé par rapport à celui introduit. Nous verrons plus loin que le filtre ne modifie pas, de façon significative, le résultat du dosage.

##### Daphnies

Après filtration sur un fin grillage de plastique (maille de 360  $\mu$ ), les daphnies sont rincées dans 2 bains successifs de volvic pour chaque fois 30 mn. Cette durée correspond à celle du transit intestinal du crustacé (BOURNE, 1959). Elles sont ensuite mises dans un minimum d'eau, dans des capsules préalablement tarées.

### Ables

Le chloroforme a d'abord été utilisé pour tuer les poissons mais la technique par choc électrique s'est révélée plus efficace et plus rapide. Les poissons sont ensuite également rincés 2 fois 30 mn dans deux bains successifs de volvic. Le matériel est alors mis à l'étuve à 105°C pendant une nuit, puis au dessiccateur pendant au moins 4 heures. La pesée des échantillons secs obtenus se fait directement dans les tubes de polystyrène cristal de 10, 20 ou 40 ml qui sont utilisés ensuite pour la minéralisation, selon la technique préconisée par BOUDENE et coll. (1976) dans le cas du dosage du plomb dans le sang. L'originalité de cette technique, qui est utilisée depuis de nombreuses années au laboratoire de toxicologie de la faculté de pharmacie de Paris-sud, réside dans l'emploi de tubes gradués à usage unique, en polystyrène transparent, pouvant être obturés de manière étanche par un bouchon de polyéthylène. L'absence de cadmium dans ces matériaux a été préalablement vérifiée sur chaque lot, par contact de tubes échantillonnés au hasard, avec de l'acide nitrique concentré pendant 24 heures. La technique elle-même est la suivante :

l'échantillon, préalablement desséché, est mis dans le tube au contact d'un volume suffisant d'acide nitrique concentré (MERCK, SUPRAPUR). Le tube bouché est alors placé dans un portoir spécial (figure 2) permettant d'éviter le départ du bouchon, à l'étuve à une température comprise entre 65 et 70°C, pendant une nuit. Il est conseillé de ne pas atteindre la température de 80°C, qui entraînerait un ramollissement puis une déformation de ces tubes, nuisant à leur étanchéité. Après ce délai, le résidu de minéralisation est complété à un volume donné avec de l'eau bidistillée dans le tube même, à l'aide de sa graduation. Bien que l'action oxydante de l'acide nitrique, agissant sur un matériel déjà déshydraté, soit efficace, il ne s'agit néanmoins que d'une minéralisation partielle. Pour des tissus riches en lipides, on peut apercevoir en surface, après refroidissement, quelques gouttelettes de graisse qu'il est possible d'éliminer, lors du pipetage, et qui ne gênent pas le dosage. L'avantage d'une telle méthode est de permettre la réalisation de dosages en série, sans craindre les contaminations habituelles, particulièrement à redouter dans le cas du cadmium, liées à l'utilisation de tubes en verre. De plus, l'erreur éventuelle due à l'imprécision du volume indiqué par le trait de jauge est très inférieure à celles qui seraient entraînées par les différentes manipulations réalisées dans une minéralisation classique.

## 2.2. Description de la technique de dosage

Le dosage utilisé est la spectrophotométrie d'absorption atomique. Son grand développement depuis ces dernières années a permis d'en faire une technique fiable et rapide pour le dosage de la plupart des éléments et des métaux lourds, en particulier sous forme de traces, grâce au tube de graphite remplaçant la flamme (ROSS et GONZALES, 1974 ; WRIGHT et RINER, 1975). Le principe de cette technique ne sera pas rappelé car d'autres études spécialisées y sont entièrement consacrées (CAILLOT, 1974) et ne peuvent que mieux décrire les processus de l'atomisation, leurs perturbations et leurs applications.

L'appareil utilisé est un spectrophotomètre PERKIN-ELMER modèle 305 B, équipé d'un four HGA-75 qui permet l'adaptation d'un système d'injection automatique (AS1, PERKIN-ELMER). L'utilisation du correcteur d'absorption non spécifique à arc deutérium est indispensable pour le dosage de milieux complexes tels que les minéralisats.

Les différents réglages de l'appareil sont résumés dans le tableau XIX, ainsi que la température et la durée des 3 phases du dosage. La température d'atomisation ne crée pas l'unanimité chez tous les utilisateurs de la spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme ; cette température peut être soit élevée (2 000°C) pour obtenir une volatilisation complète de l'élément (PAUS, 1971 ; WRIGHT et RINER, 1975), impliquant des effets de diffusion de la lumière émise par le tube lui-même, soit plus basse (1 500°C) pour éviter ces interférences (BARNARD et FISHMAN, 1973 ; ROSS et GONZALES, 1974) ; dans ce cas, la sensibilité et la reproductibilité sont plus mauvaises.

C'est pourquoi nous avons choisi une température intermédiaire (1 800°C), indiquée par PERKIN-ELMER et que recommandent également PINTA et RIANDEY (1975).

Longueur d'onde (nm)	228,8 (U.V.)	
Ouverture de fente (nm)	1	
Pression argon (bars)	3	
Phases	Température (Degrés Celsius)	Durée (secondes)
1. Séchage de l'échantillon	100	30
2. Destruction thermique de la matrice	350	20-30
3. Atomisation	1800	15-20

TABLEAU XIX : CONDITIONS OPERATOIRES DU DOSAGE DU CADMIUM PAR  
SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE AVEC FOUR



### 2.3. Sensibilité et reproductibilité

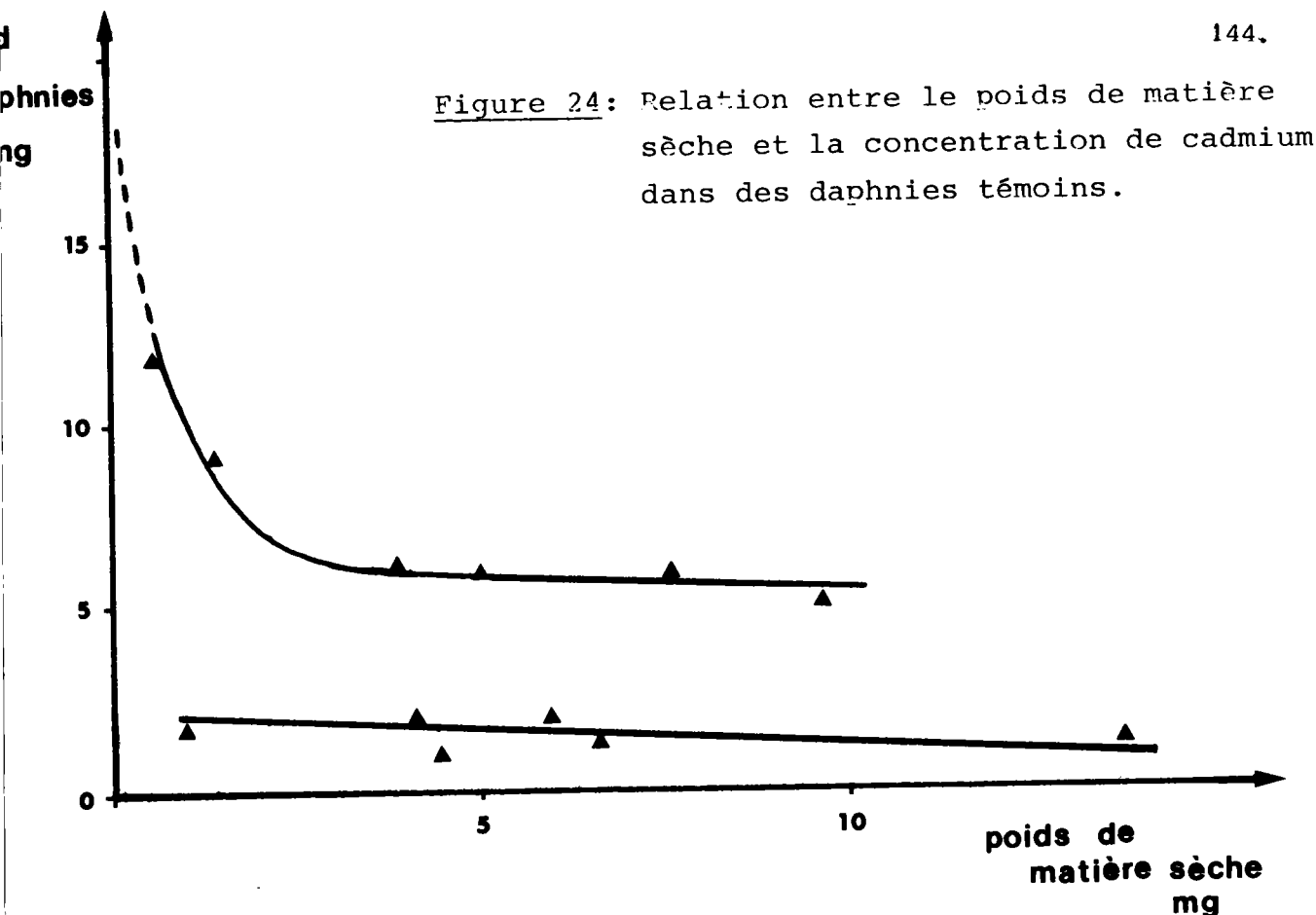
La spectrophotométrie d'absorption atomique avec four permet d'obtenir une grande sensibilité, principal avantage de cette méthode. En effet, pour le cadmium, la limite de détection est 0,1 ng/ml, (PERRY et coll., 1975), compte tenu de l'injection automatique de 20 µl d'échantillon. Mais on peut encore augmenter cette limite de détection en injectant manuellement jusqu'à 100 µl de l'échantillon, pourvu que la viscosité de celui-ci le permette (FERNANDEZ et MANNING, 1971). Des valeurs aussi basses sont obtenues en utilisant l'opération GAZ-STOP : pendant les quelques secondes de la phase d'atomisation, le courant d'argon est arrêté, ce qui favorise la stabilisation de la vapeur atomique dans le faisceau lumineux, en augmentant le nombre d'atomes susceptibles d'être excités ; l'absorbance mesurée est donc plus grande et la sensibilité meilleure. Cependant la qualité d'un dosage dépend essentiellement de la précision que l'on peut apprécier par des essais de reproductibilité.

Nous avons alors cherché à déterminer les conditions permettant de diminuer le plus possible les erreurs, à toutes les étapes du dosage et à établir ainsi la précision des résultats obtenus. Les principales sources d'erreur peuvent être distinguées ainsi, au niveau :

- de la préparation de l'échantillon
  - . pesée
  - . ajustement à un volume donné du minéralisat
- de la gamme d'étalonnage
- des dilutions éventuelles
- de la reproductibilité même de l'appareil, selon les différents ordres de passage dans le temps.

C'est pourquoi nous avons calculé les différents coefficients de variation pour nous permettre d'évaluer l'importance de ces erreurs.

La pesée à poids constant et l'utilisation de la même qualité de tubes de minéralisation permettent de négliger par rapport aux autres, les erreurs liées à la préparation de l'échantillon. Cependant, une trop faible quantité de matériel biologique entraînant une trop grande variation de poids, entre le début et la fin de la pesée, nous avons éliminé les échantillons dont le poids était inférieur à 0,5 mg. Au-delà de 1-2 mg, on remarque sur la figure 24 un net palier qui indique que la concentration en cadmium retrouvée n'est plus dépendante du poids.



La gamme d'étalonnage est préparée, toujours dans les mêmes conditions, à partir d'une solution mère à  $20 \mu\text{g Cd/l}$ , conservée au froid et renouvelée tous les 2 mois environ. Les dilutions de la gamme et des essais sont réalisées avec des micropipettes à embout jetable en polypropylène (Gilson, réf. C20), dans des microtubes de polystyrène (Polylabo, réf. 96 305) ; ce matériel a donné les meilleurs résultats de reproductibilité en éliminant les contaminations ou pertes éventuelles de cadmium par l'intermédiaire de la verrerie (KING et coll., 1974). Le nettoyage de celle-ci, utilisée obligatoirement pour les élevages et les expérimentations, se fait par le mélange sulfochromique et les contrôles à la dithizone se sont toujours révélés négatifs.

Le système d'injection automatique, AS 1, a permis d'obtenir une reproductibilité très satisfaisante des pics d'absorption. La figure 25 présente les différents pics d'un enregistrement direct de différentes solutions étalons à  $20 \mu\text{g Cd/l}$ . A partir de celles-ci, la gamme étalon réalisée est obtenue directement sur le papier d'enregistrement (figure 26) et construite ensuite sur un graphe (figure 27). Pour chaque série de dosages, une gamme étalon est ainsi obtenue et permet la lecture des concentrations en cadmium de chaque essai.

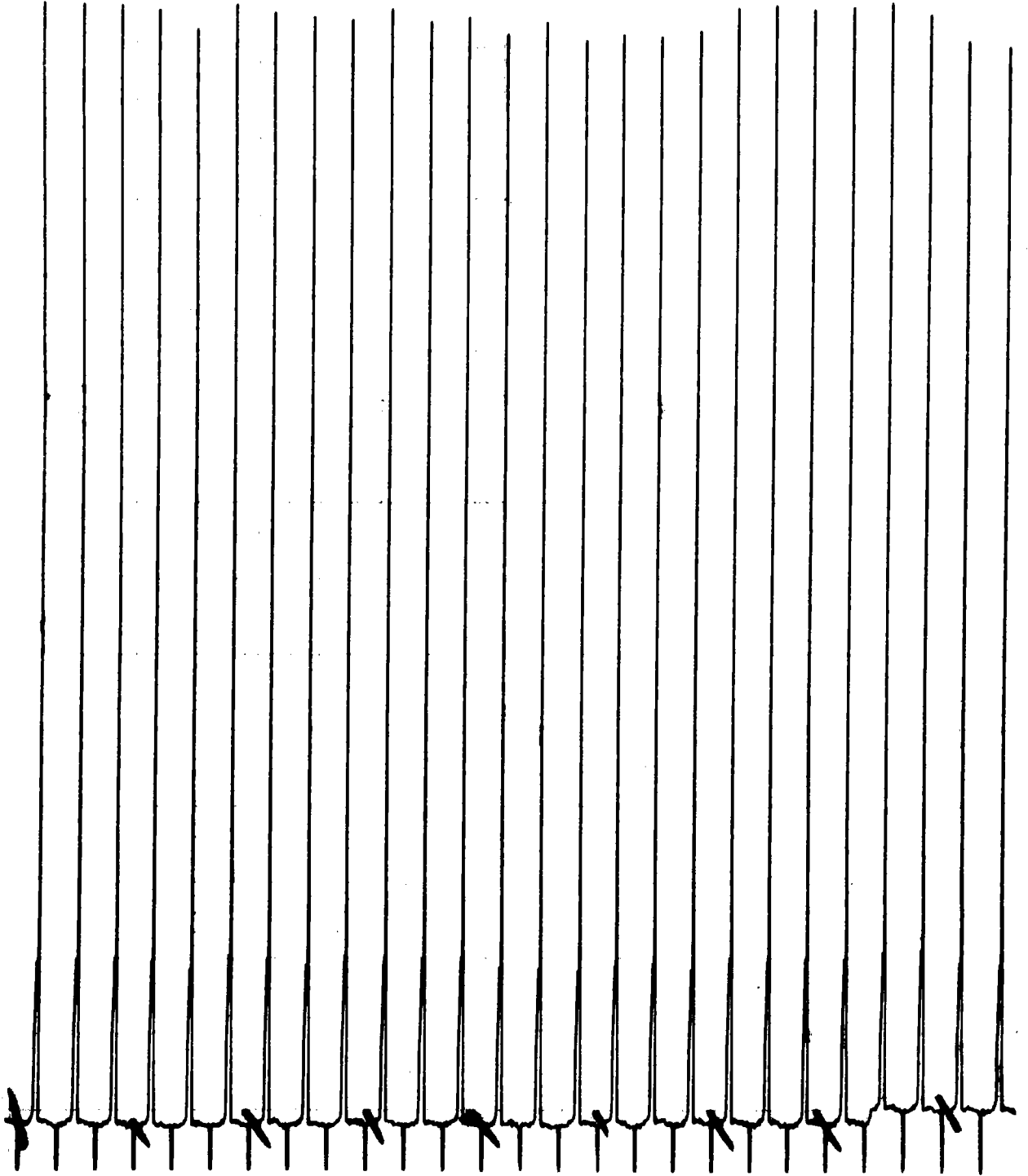


Figure 25: Reproductibilité de l'injection automatique (ASI) sur différentes solutions étalons de cadmium à 20  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

← Sens de déroulement du papier

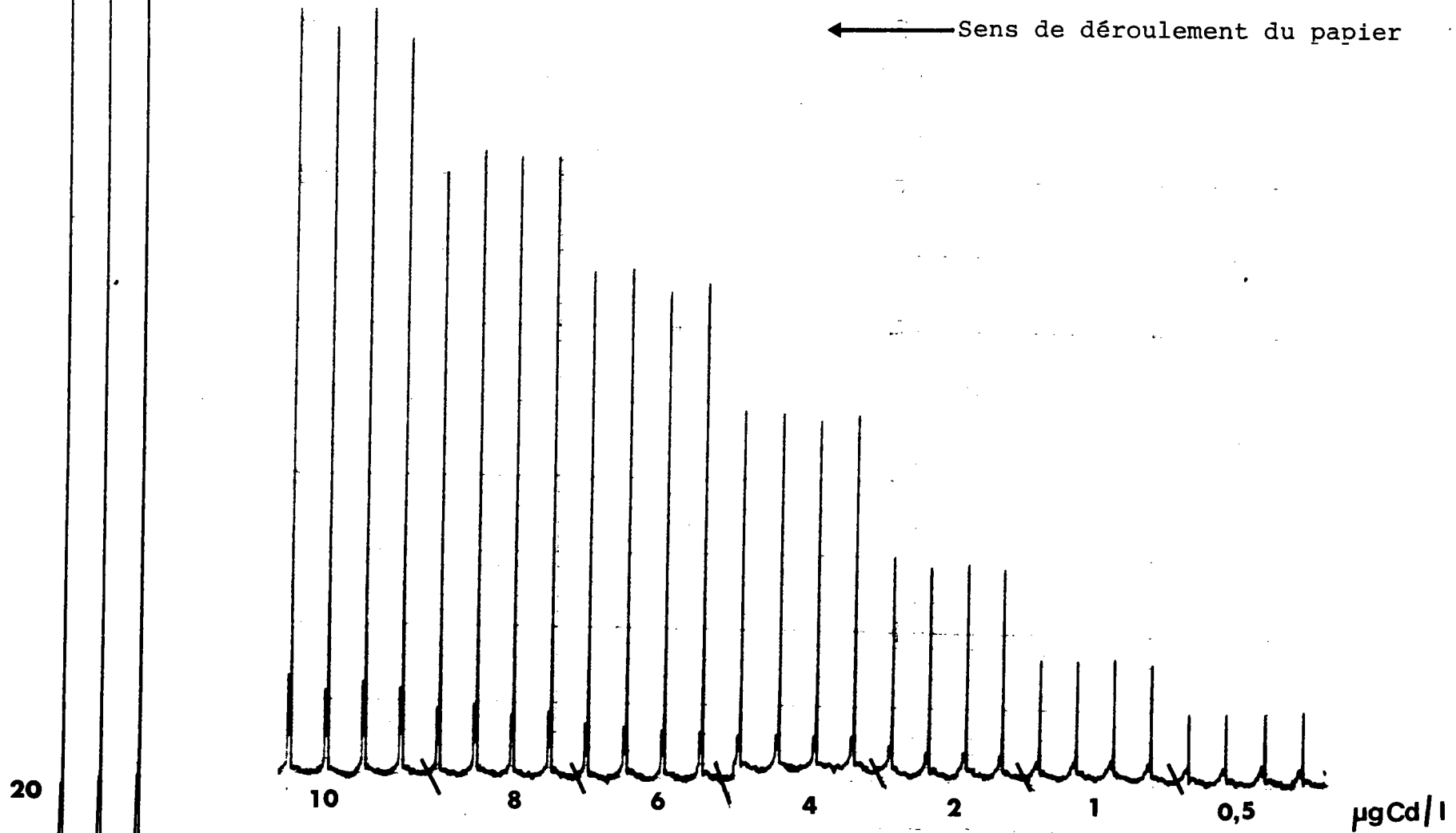
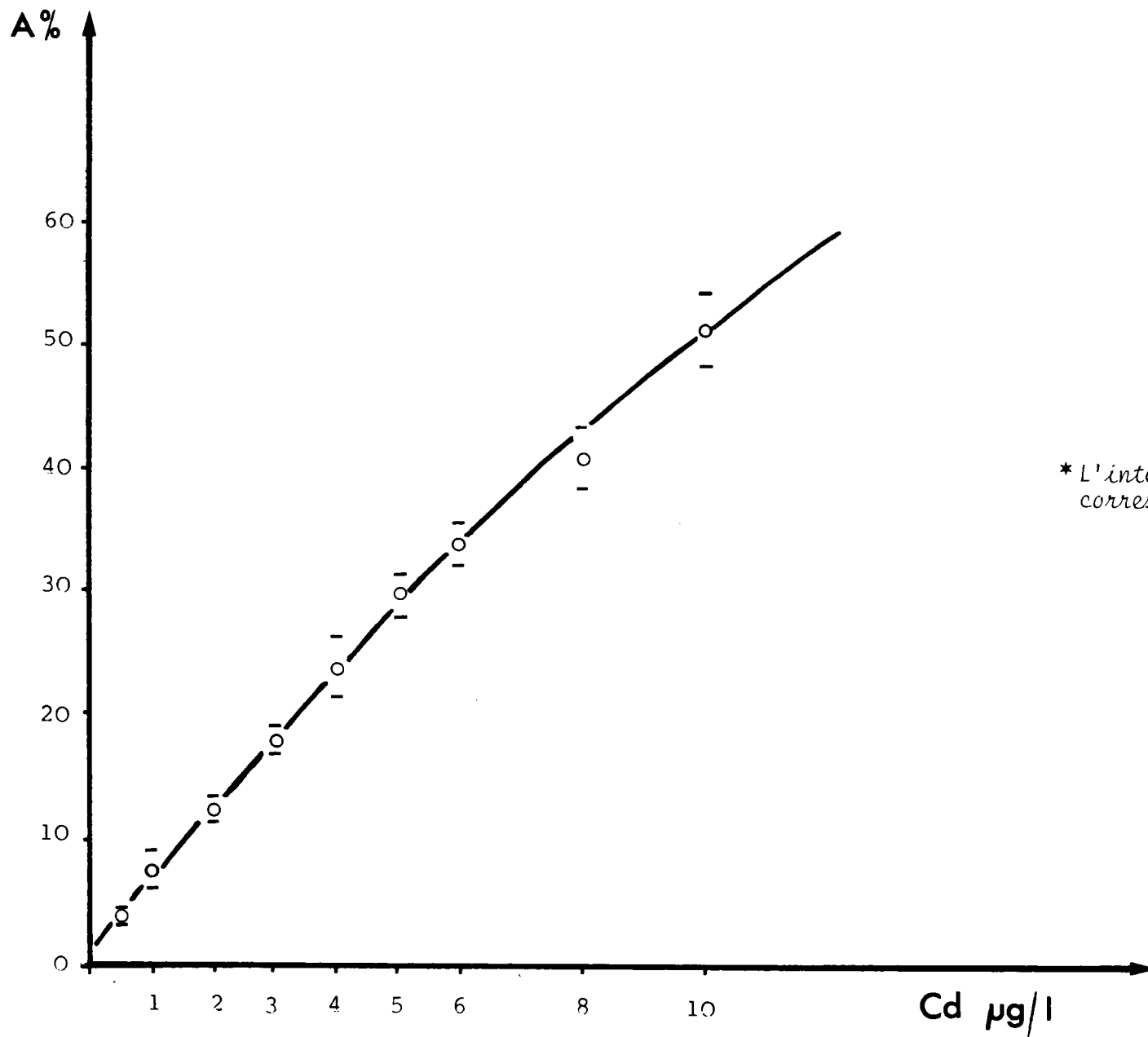


Figure 26: Enregistrement direct d'une gamme étalon, par spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme, munis du système automatique d'injection.



\* L'intervalle figuré autour de chaque point correspond à  $\pm S_x$

Figure 27: Gamme étalon moyenne de cadmium (AAS sans flamme)\*

La reproductibilité obtenue sur les essais a également été déterminée et le tableau XX présente les différents coefficients de variation calculés soit sur les hauteurs de pics obtenus, soit sur le résultat final. La partie supérieure du tableau montre la précision obtenue sur plusieurs dilutions identiques d'un même échantillon, faites et dosées successivement : les coefficients de variation ne dépassant pas 5 %, tandis que les résultats de la partie inférieure du tableau montrent une moins bonne reproductibilité. Ce sont des dosages faits sur différentes dilutions d'un même essai, dosées à des temps différents. Ainsi, il y a variation des résultats dans le temps, c'est pourquoi chaque série de minéralisats est dosée le jour même, à raison d'au moins deux dilutions par essai.

Ces résultats sont en accord avec ceux présentés par les auteurs déjà cités et les coefficients de corrélation sont très voisins de ceux calculés par PERRY et coll (1975), sur des échantillons de sang et d'urine, sans minéralisation (7 % pour 2,8  $\mu\text{g}$  Cd/l et 14 % pour 0,18  $\mu\text{g}$  Cd/l).

Outre cette reproductibilité satisfaisante, la spectrophotométrie d'absorption atomique est l'une des techniques d'analyse présentant le moins d'interférences, lorsqu'il s'agit de la méthode sans flamme.

En effet, BARNARD et FISHMAN (1973) ont étudié quelques interférences sur le dosage de traces métalliques dans l'eau. Ce sont seulement de fortes concentrations en sels (10 000 mg/l pour  $\text{Na}^{++}$  et  $\text{K}^+$ ) qui entraînent une inhibition du signal d'absorption. Une autre cause d'interférences serait, selon de nombreux auteurs, l'acidité des échantillons.

Cependant, nous n'avons pas observé d'effets inhibiteurs : des étalons réalisés dans les mêmes conditions d'acidité que les minéralisats (2 à 10 %  $\text{HNO}_3$ , concentré) n'ont pas montré de différence significative, de même que des étalons minéralisés dans les mêmes conditions que les échantillons biologiques, par rapport à une gamme non minéralisée (figure 28).

Les conditions de température pour les phases de destruction thermique et d'atomisation sont donc optimales pour supprimer l'action des acides, comme l'indiquent PINTA et RIANDEY (1975) et la figure 29.

Echantillon	Concentration moyenne (ng/mg)	Ecart type	Coefficient de variation
Poisson 50 ppb (n = 10)	1,62	0,048	2,13
Poisson 10 ppb (n = 10)	10,24	0,17	1,21
Poisson 3 ppm (n = 10)	4,23	0,23	5,07
Daphnie 10 ppb (n = 5)	136,2	15,9	14,5
Daphnie 15 ppb (n = 5)	155,8	20,8	16,6
Chlorelle 10 ppb (n = 6)	17,6	4,2	24,8
Chlorelle 50 ppb (n = 5)	136,4	26,5	24,1

TABLEAU XX : REPRODUCTIBILITE DES DOSAGES (FAITS A DIFFERENTS TEMPS ET POUR PLUSIEURS DILUTIONS), APRES MINERALISATION, PAR SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE SANS FLAMME. COEFFICIENTS DE VARIATION

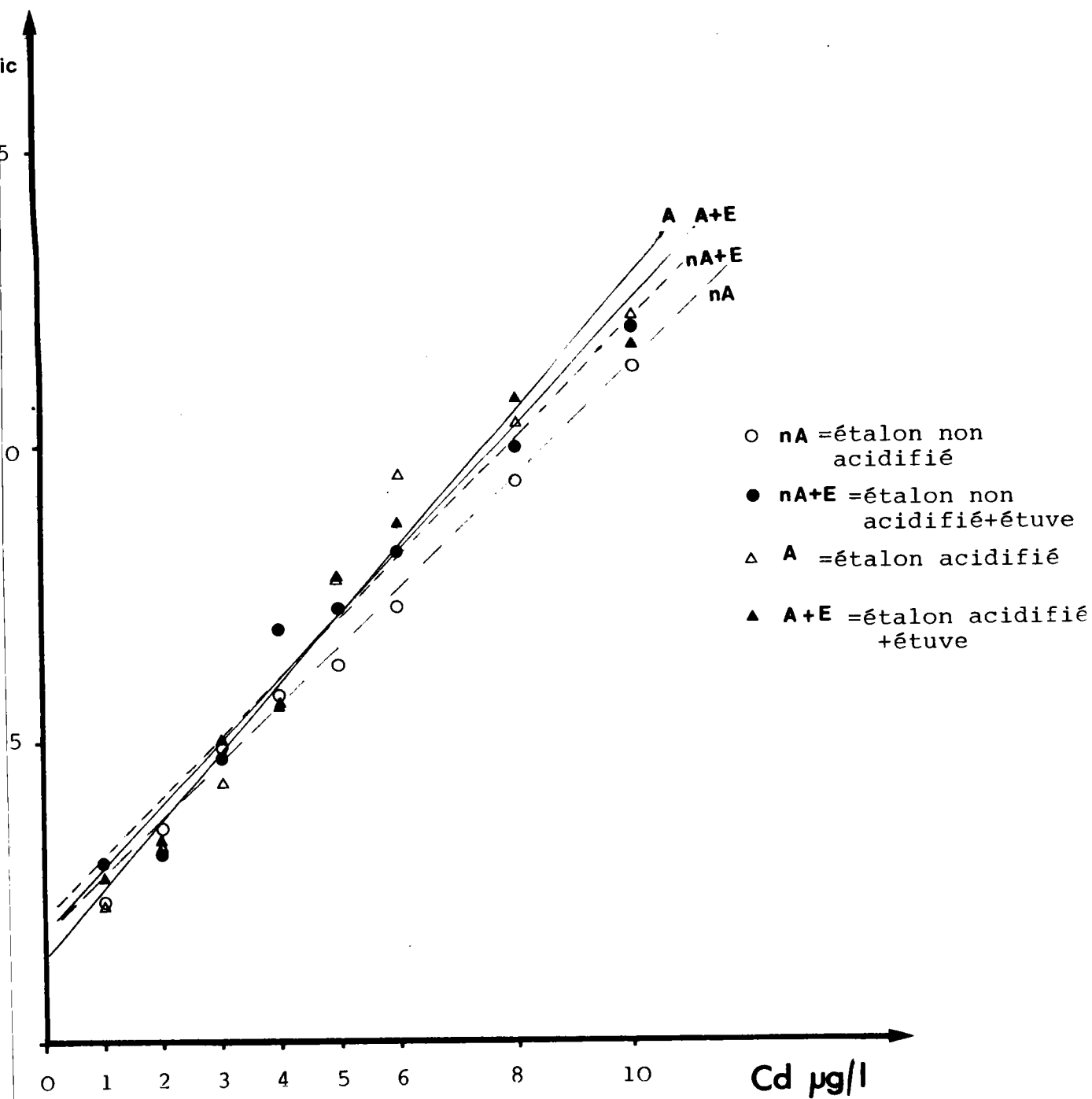


Figure 28: Comparaison entre étalons de cadmium acidifiés ou non, passés une nuit à l'étuve ou non.



Ces faibles interférences sont d'ailleurs confirmées par des dosages selon la méthode des ajouts. La figure 30 présente les résultats obtenus : les courbes des ajouts de 3 échantillons différents sont parallèles à la courbe standard ; c'est dire que l'on n'a pas mis en évidence d'interférences dues à des effets de matrice. De plus la précision n'est pas meilleure, compte tenu des manipulations supplémentaires ; c'est pourquoi, après cette nécessaire vérification, nous avons abandonné cette méthode au profit de la rapidité et de la simplicité.

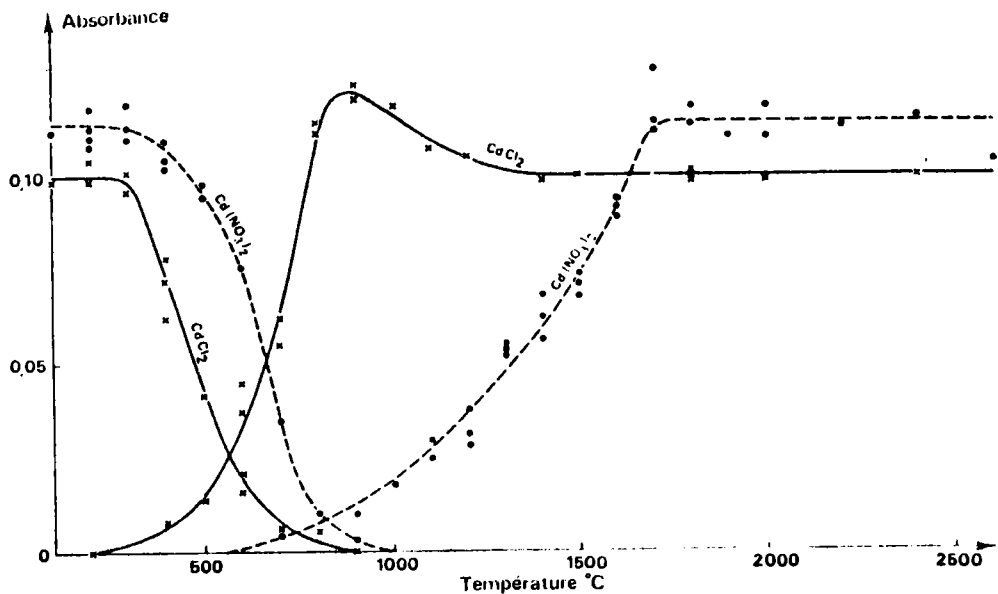
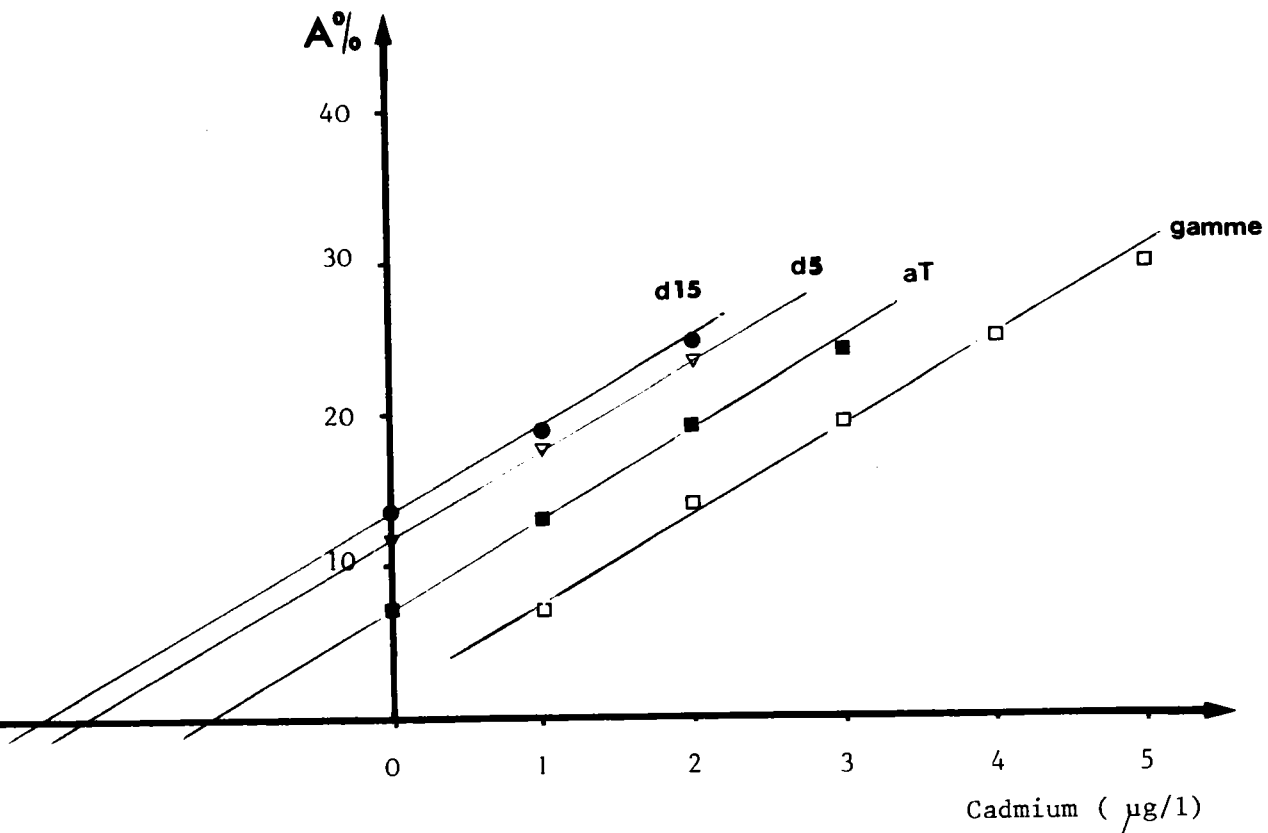


Figure 29: Dosage du cadmium par AAS sans flamme-  
Effet de la forme anionique sur les  
températures critiques (d'après PINTA et  
RIANDEY, 1975).



essai	algues T 1/2	daphnies 5µg/l 1/5	daphnies 15µg/l 1/5
+ 0	7	11,8	13,75
+ 1	13	17,6	19
+ 2	19,5	23,5	24,8
+ 3	24	/	/

Figure 30: Dosages du cadmium dans algues témoins et daphnies intoxiquées à 5 et 15 µg/l, par AAS sans flamme et la méthode des ajouts dosés.

#### 2.4. Concentrations moyennes retrouvées dans les organismes considérés

Avant toute expérience d'intoxication, il convient de connaître les teneurs en cadmium dans les organismes utilisés (tableau XXI). Ces valeurs sont calculées à partir des dosages effectués sur différents lots du matériel étudié, après avoir déduit un blanc de minéralisation, évalué à  $0,3 \pm 0,09 \mu\text{g}/\text{l}$ . Ce calcul sera le même pour tous les résultats rapportés dans les chapitres ultérieurs.

Nous devons signaler que les dosages des algues avec filtre ne sont pas différenciés des autres, car il a été montré que les filtres n'apportaient pas de cadmium en quantité significative ; en effet, les valeurs obtenues sur plusieurs minéralisations de filtres sont toujours inférieures ou égales aux blancs, soit  $0,29 \pm 0,12 \mu\text{g}$  par litre de minéralisat.

Pour les daphnies, la concentration moyenne peut être estimée à celle trouvée par COWGILL et BURNS (1975) qui est légèrement plus faible, à savoir  $1,30 \text{ ng}/\text{mg}$ .

Blanc	$0,3 \pm 0,09$
Milieu Oligo LC	$1,13 \pm 0,38$
Chlorelles	$3,04 \pm 1,74$
Volvic	$< 0,10$
Daphnies	$3,19 \pm 1,58$
Ables	$0,16 \pm 0,13$

Tableau XXI : Concentration en cadmium dans les milieux d'élevage, et les organismes étudiés ( $\mu\text{g}/\text{l}$  ou  $\text{ng}/\text{mg}$  de matière sèche)

TROISIÈME PARTIE : RÉSULTATS

## CHAPITRE I : ETUDES DE TOXICITE DU CADMIUM SUR LES CHLORELLES

### 1. MODE OPERATOIRE D'INTOXICATION DES CULTURES

Une solution mère est titrée à 1g de cadmium par litre ; le métal a été introduit sous forme de 3 sels différents : nitrate, chlorure ou sulfate.

La dernière dilution, issue en une ou plusieurs fois de la solution mère, est faite dans le milieu nutritif, Oligo LC, de telle sorte que 5 ml de cette solution dans 50 ml donnent la concentration de cadmium désirée pour l'essai considéré.

Dans des erlenmeyers de 125 ml, 5 ml de solution de cadmium sont d'abord ajoutés à 40 ml de milieu nutritif Oligo LC. Ces milieux de culture sont ensuite stérilisés à l'autoclave, puisensemencés par 5 ml d'inoculum algal, et mis à développer, dans les conditions définies dans la partie II. Chaque concentration est préparée en 2, 3 ou 5 essais selon les différentes expériences. Les témoins, également stérilisés, sont constitués de 45 ml de milieu nutritif et de 5 ml d'inoculum.

Sur les cultures ainsi obtenues, le comportement et les effets du cadmium ont été observés.

Si le cadmium ne forme pas, comme la plupart des métaux, de précipité avec les sulfates, il ne faut pas oublier qu'avec les carbonates, en pH alcalin, il y a précipitation d'une partie du cadmium sous forme de carbonate de cadmium.

Dans le cas des algues, le milieu Oligo LC est à un pH de 7, en début de culture, et ne contient pas, lors de sa préparation, de carbonate ni de bicarbonate.

Et la concentration de  $\text{CO}_2$  dans le milieu de culture, résultat du  $\text{CO}_2$  émis la nuit par la respiration des algues, et du  $\text{CO}_2$  en équilibre avec le  $\text{CO}_2$  atmosphérique, ne semble pas suffisante pour entraîner la précipitation du cadmium, aux concentrations de toxique utilisées. Par contre, le problème sera davantage considéré au niveau des daphnies.

## 2. RECHERCHE DES SEUILS D'INHIBITION

En fonction du critère choisi, les cultures intoxiquées sont comparées aux témoins chaque jour ou ponctuellement à des temps donnés.

### 2.1. Opacimétrie

Ce paramètre étant facile à mettre en oeuvre, nous l'avons considéré en premier lieu ; il nous a en effet permis de connaître rapidement la gamme de concentrations à laquelle le cadmium devenait toxique pour *chlorella vulgaris*, dans nos conditions définies et particulières de culture.

Une lecture de la transmission optique à 665 nm est faite en général chaque jour, mais quelquefois 3 fois par jour durant la phase de croissance exponentielle, et la figure 31 présente les courbes de croissance obtenues selon les différentes concentrations de cadmium : 0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 2 ; 5 et 10 mg Cd/l (Expérience A). Compte tenu de la mesure en transmission, pour une plus grande précision de lecture sur le spectrophotomètre utilisé, les courbes sont données en sommant les accroissements calculés entre chaque valeur de la transmission optique lue : les points obtenus sont des moyennes de 3 essais, mais, pour une meilleure visualisation, seules les courbes  $\Sigma \Delta T = f(t)$  sont figurées. Entre le 2ème et le 6ème jour de culture, c'est à dire pendant la phase de croissance rapide, les transmissions ont été converties en densité optique pour permettre le calcul du taux de croissance

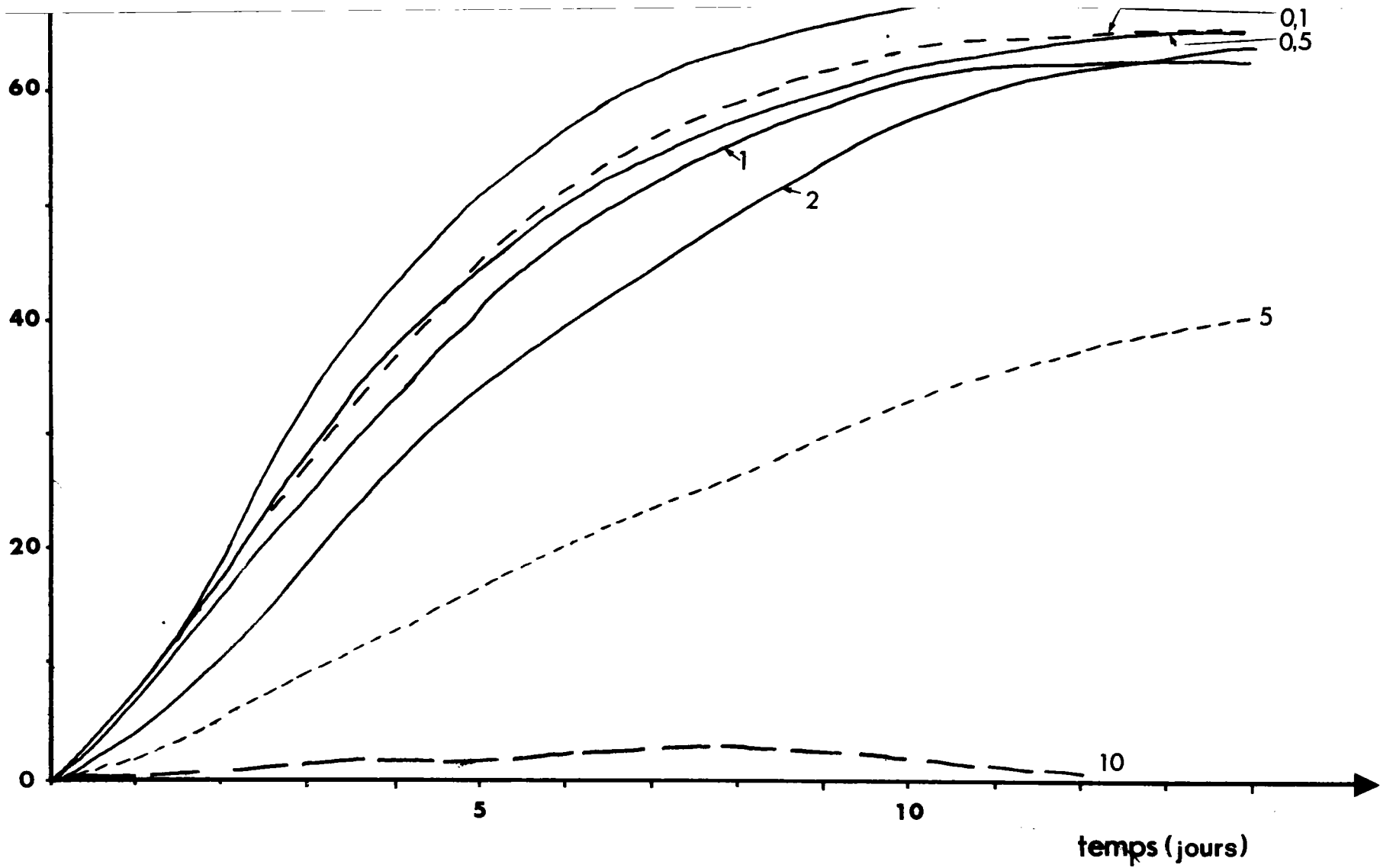


Figure 31: Courbes de croissance de Chlorelles, intoxiquées par Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> opacimétrie à 665 nm (expérience A).

On constate que celui-ci diminue quand la concentration en cadmium augmente. Il est alors possible de calculer un pourcentage d'inhibition (I), par rapport à la valeur obtenue pour le témoin, tel que :

$$I = \left( 1 - \frac{k \text{ essai}}{k \text{ témoin}} \right) \times 100$$

Les résultats obtenus dans le cas de l'expérience de la figure 31, sont rassemblés dans le tableau XXII.

(Cd) dans milieu mg/l	k	I (%)
0	0,154	
0,1	0,146	5,2
0,5	0,140	9,1
1	0,133	13,6
2	0,111	27,9
5	0,072	53,25
10	0,013	91,6

Tableau XXII : Toxicité du cadmium sur *Chlorella vulgaris*

Pourcentages d'inhibition (I) par rapport aux taux de croissance (k)

Ceux-ci permettent de calculer la concentration inhibitrice 50 (CI50) (LEPAILLEUR et coll., 1973) qui est une des façons d'exprimer la toxicité d'une substance pour un organisme donné. Puisque dans le cas des producteurs, on ne peut considérer la mort des individus mais seulement la dynamique de la population algale, on préférera s'exprimer en concentration inhibitrice plutôt qu'en dose létale.



La CI50 est obtenue sur la courbe des pourcentages d'inhibition en fonction de la concentration en toxique (figure 32). Ainsi à 50 % d'inhibition de la valeur du taux de croissance, correspond une concentration de 4,5 mg Cd/l.

Un autre moyen de calculer l'inhibition de la croissance algale due à un toxique est de se reporter aux différentes courbes de croissance obtenues à différentes concentrations du toxique (cf. figure 31). Ainsi, nous avons calculé pour chaque série d'expérimentation, les pourcentages d'inhibition par rapport à la hauteur de la courbe en ordonnée, à un temps donné ; nous avons choisi le 5ème et le 10ème jour, pour savoir si l'inhibition est la même à 2 phases différentes de la croissance de la population algale. Ainsi pour l'expérience considérée ci-dessus (expérience A), les calculs ont été faits, et les points obtenus sont reportés sur la figure 32 ; on peut y lire qu'à J5 correspond une CI50 de 2,9 mg Cd/l et qu'à J10 une CI50 de 4,65 mg Cd/l.

De ces résultats, on constate qu'il y a une variation de la concentration inhibitrice 50 selon le critère qui a permis de la déterminer. Une raison peut être que les différents paramètres utilisés ne traduisent pas tous strictement le même impact du toxique sur la population algale. De plus l'action inhibitrice du toxique semble évoluer en fonction du temps.

Dans une autre série de cultures en effet (expérience B : nitrate de cadmium), les pourcentages d'inhibition ont été calculés chaque jour d'après les courbes de croissance obtenues à différentes concentrations de cadmium 0 ; 0,5 ; 1 ; 1,5 et 2 mg Cd/l ; et chaque CI50 a alors été déterminée pour chaque jour. La figure 33 représente l'évolution dans le temps des pourcentages d'inhibition, et de la CI50.

On constate donc que dans nos conditions de cultures, en milieu non renouvelé, la CI50 augmente en fonction du temps c'est à dire que plus la culture est âgée moins les effets toxiques du cadmium semblent importants. Le cadmium diminue la vitesse de croissance en début de culture, mais plus tard, au moment où les réserves nutritives s'épuisent dans les témoins, les

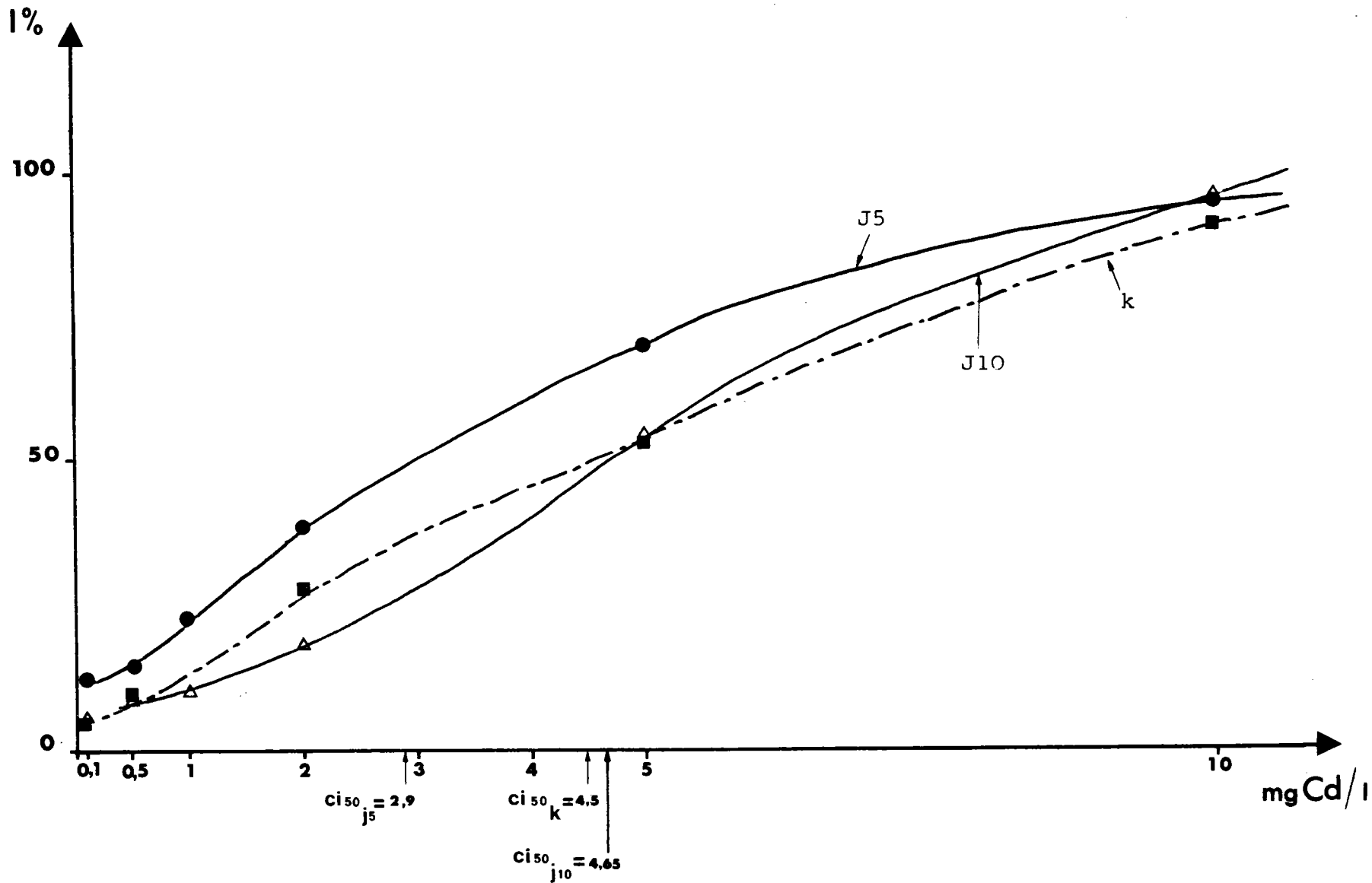


Figure 32: Calcul graphique de la  $CI_{50}$  du cadmium sur *Chlorella vulgaris*.  
(expérience A)

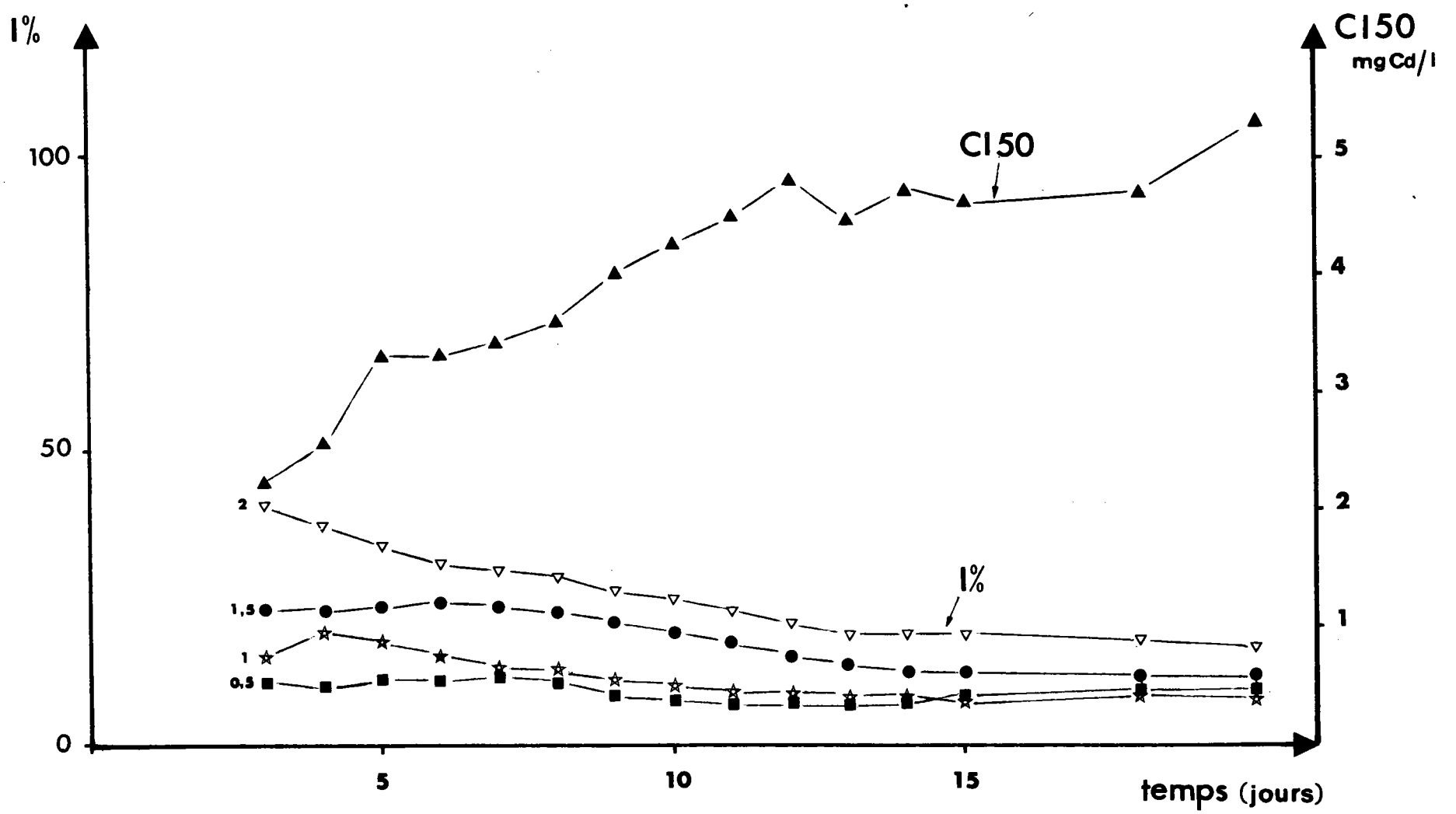


Figure 33: Evolution de I(%) et CI<sub>50</sub> en fonction du temps, sur *Chlorella vulgaris*.  
(expérience B)

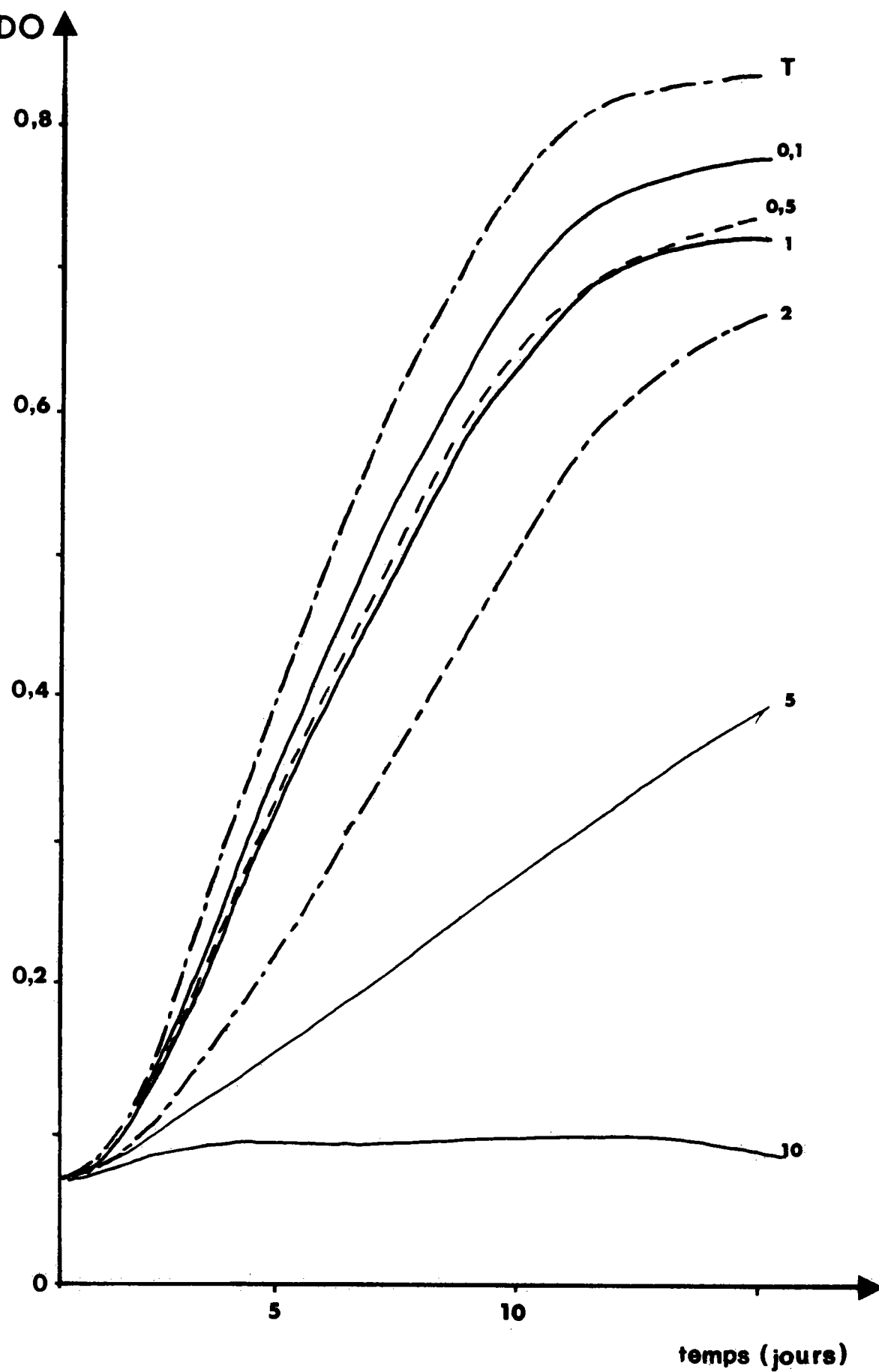
essais intoxiqués peuvent eux continuer leur croissance ; car s'étant développés moins vite, il leur reste suffisamment d'éléments nutritifs pour continuer encore leur croissance. Cependant, cette explication n'est pas unique et ne peut être envisageable que dans le cas de concentrations en cadmium compatibles avec une relative croissance des chlorelles : au delà de 5 mg Cd/l, cela ne semble plus en effet être applicable.

Pour compléter ces résultats, les données brutes de l'expérience ont été traitées par ordinateur numérique. Le programme a été conçu pour calculer chaque DO, déterminer la dérivée entre chaque point, et les valeurs obtenues ont été reportées sur un graphe en fonction du temps. La figure 34 représente la relation  $DO = f(t)$  à partir de laquelle les calculs des coefficients d'inhibition puis des CI50 ont pu être faits ; ainsi, à J5 la CI50 est de 3 mg Cd/l tandis qu'à J10 elle est de 3,6 mg Cd/l. Là encore, on constate une différence avec les résultats précédents.

Mais, malgré les variations ponctuelles des CI50 en fonction de la méthode de calcul, leurs évolutions dans le temps semblent être, quant à elles, parallèles.

En effet, la figure 35 construite à partir des pourcentages d'inhibition en fonction des valeurs de DO (figure 34) présente la même allure, que la figure 33 du moins après le 5ème jour, quand la CI50 tend à augmenter. Tandis qu'en début de croissance, les variations semblent trop importantes pour pouvoir utiliser à bon escient la CI50. De toutes façons, pour pouvoir comparer les séries d'expérimentation entre elles, il sera nécessaire de ne comparer que les CI50 obtenues en même temps, et par la même méthode de calcul.

L'exploitation des données par le ordinateur numérique nous a permis également de présenter d'une autre façon les résultats. La courbe dérivée de la courbe de croissance  $DO = f(t)$  a été obtenue par le calcul de la pente entre 2 valeurs consécutives de DO.



**Figure 34:** Courbes de croissance de *Chlorella vulgaris*; opacimétrie à 665nm;  $DO=f(t)$ .

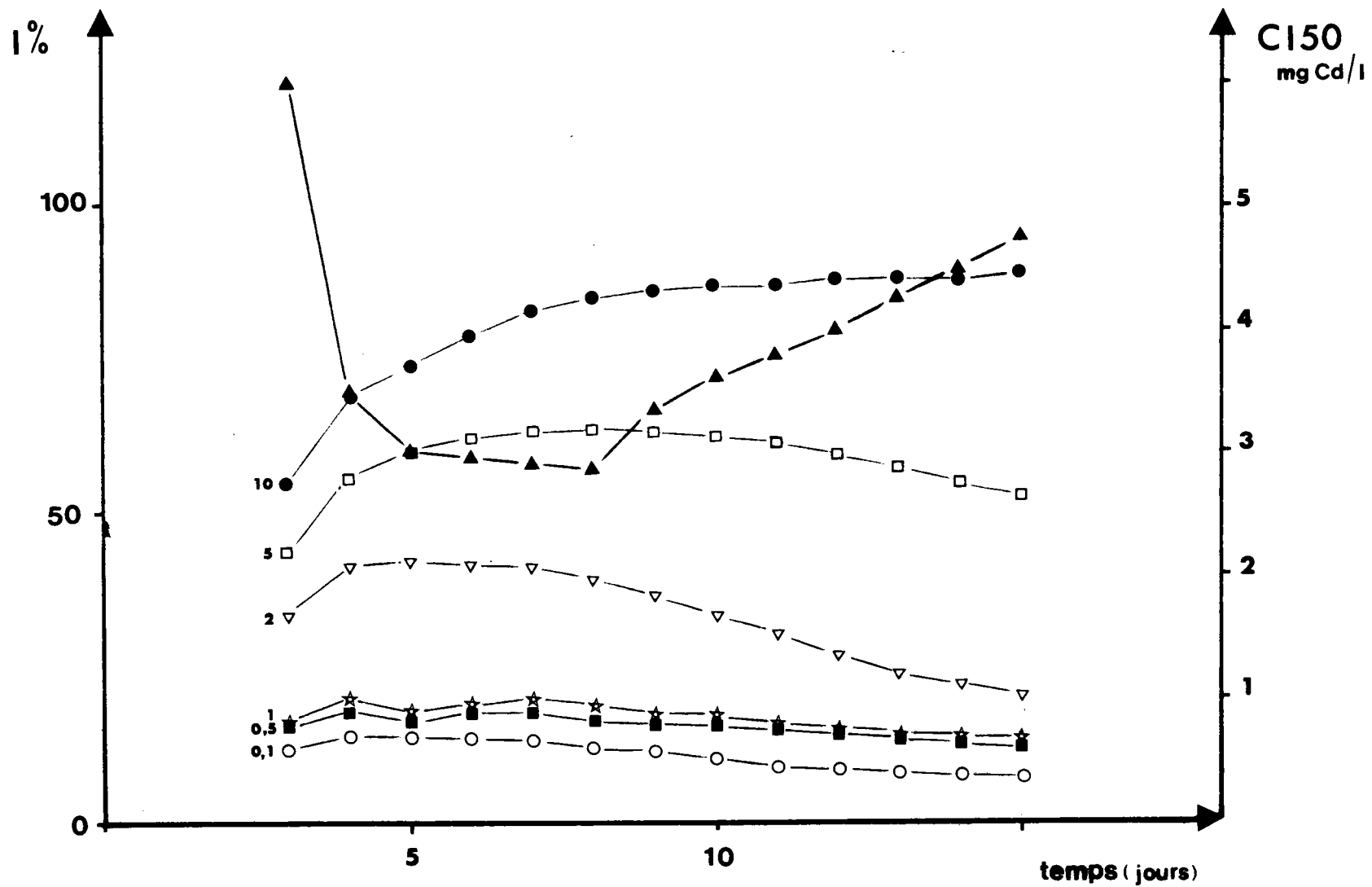


Figure 35: Evolution de I(%) et  $CI_{50}$  en fonction du temps, sur *Chlorella vulgaris*; (expérience A)

Les courbes obtenues en fonction du temps et des différentes concentrations de cadmium sont présentées figure 36 ; on constate de premier abord que ce sont des courbes en cloche et que, par ce mode d'expression, les différences entre chaque concentration sont plus marquées. En effet, plus il y a de cadmium dans le milieu, plus le mode de la courbe diminue et plus il se décale dans le temps.

Le couple des coordonnées des modes de chaque courbe est donc une expression de la toxicité du cadmium ; ce qui s'explique par le fait que le mode des courbes dérivées indique le point d'inflexion des courbes de croissance ; plus il est faible en ordonnée, plus la vitesse de croissance est faible ; plus il est élevé en abscisse plus la phase de croissance exponentielle est longue, et par conséquent, plus la croissance est ralentie. Cependant le calcul de la dérivée peut paraître aléatoire dans le cas d'erreurs de la lecture même faibles de la DO ou de la transmission optique. Il faut, de plus, que les mesures soient faites à des intervalles de temps strictement réguliers.

C'est pourquoi, nous donnons à titre d'exemple seulement les résultats obtenus en calculant les pourcentages d'inhibition en fonction de la hauteur en ordonnée de la courbe dérivée. Il faut noter qu'à 10 mg Cd/l la croissance étant stationnaire, la dérivée est nulle et n'est donc pas représentable. La détermination de la CI50 est présentée en encadré figure 36, et est égale à 2,7 mg/l. Si les pourcentages d'inhibition sont calculés en combinant les 2 coordonnées par le rapport  $\frac{y}{x}$ , la CI50 obtenue est encore plus faible, soit 1,5 mg Cd/l. Selon ces procédés de calcul, la toxicité du cadmium semble plus grande. Il peut être intéressant de disposer d'un mode de calcul de la toxicité particulièrement fin ; cela permet de mettre en évidence une certaine inhibition de la croissance à des concentrations de toxique pour lesquelles elle n'apparaît pas manifestement.

Cependant, comme le traitement des résultats par calculateur numérique a été fait seulement dans cette expérience, à titre d'essai, les autres séries d'expérimentations n'ont été interprétées que par les calculs du taux de croissance, et des pourcentages d'inhibition à J5 et J10 sur les courbes de croissance  $\Sigma \Delta T = f(t)$ . Le tableau XXIII présente les différentes séries d'intoxication par le cadmium réalisées sur des cultures de *Chlorella*

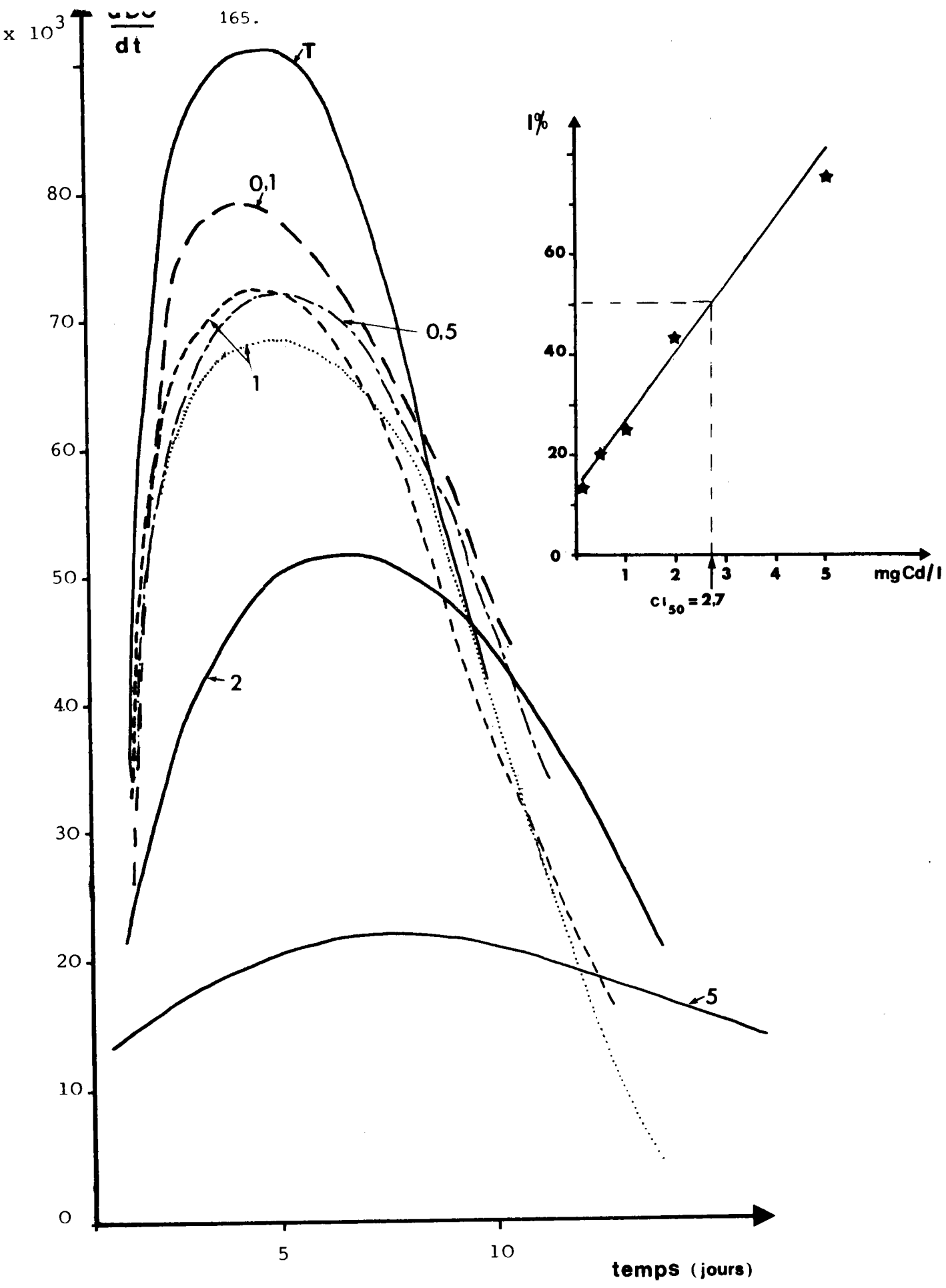


Figure 36: Courbes des dérivées des fonctions  $DO=f(t)$ , en fonction du temps, sur *Chlorella vulgaris*.  
 en haut: détermination de la  $CI_{50}$  obtenue par ce critère.



Expé- rience	sel testé	0	0,01	0,1	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1	1,2	1,4	1,5	1,6	2	3	4	5	10
A	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,154		0,146			0,140			0,133					0,111			0,072	0,013
B	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,129					0,119			0,114			0,110		0,102				
C	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,170					0,158			0,145	0,149	0,138		0,126					
D	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0,161					0,175			0,157			0,133		0,134	0,095		0,062	
E	Cl <sup>-</sup>	0,161					0,154			0,132			0,121		0,120	0,099		0,074	
F	SO <sub>4</sub> <sup>--</sup>	0,213	0,201	0,229			0,201			0,137								0,016	
G	SO <sub>4</sub> <sup>--</sup>	0,150								0,077	0,064	0,062		0,034					
H	SO <sub>4</sub> <sup>--</sup>	0,203			0,162	0,150		0,136	0,113										

TABLEAU XXIII : PRESENTATION DES DIFFERENTES SERIES D'INTOXICATION DE *Chlorella vulgaris* PAR LE CADMIUM

RESULTATS DES TAUX DE CROISSANCE K OBTENUS PAR OPACIMETRIE

*vulgaris*, en fonction des concentrations de cadmium initiales, et du sel de cadmium utilisé. Les différents taux de croissance calculés dans chaque cas y sont présentés. A partir de ces valeurs, et de celles obtenues par les courbes de croissance construites pour chaque essai, les concentrations inhibitrices 50 ont été calculées graphiquement pour chaque série. Les résultats obtenus sont donnés dans le tableau XXIV ainsi que leurs moyennes. On peut remarquer que la toxicité des différents sels de cadmium ne se situe pas tout à fait au même degré : le sulfate semble le plus toxique pour *Chlorella vulgaris*, dans nos conditions d'expérience, avec une CI50 d'environ 1 mg Cd/l ; tandis que l'inhibition de 50 % de la croissance due au chlorure n'apparaît qu'à environ 4 mg Cd/l.

Ces résultats confirment les figures 33 et 35 : pour ce critère d'observation, la toxicité du cadmium diminuerait en fonction du temps, quelque soient le sel et l'essai considérés.

Ces deux constatations sont faites à partir des résultats obtenus par opacimétrie, mais nous allons maintenant considérer la numération pour savoir si les constatations sont comparables, ou bien si ce critère apporte une autre dimension à cette étude de toxicité sur les producteurs.

Expérience	Sel	CI50 <sub>(k)</sub>	CI50 <sub>(J5)</sub>	CI50 <sub>(J10)</sub>
A	Nitrate	4,5	2,95	4,65
B	Nitrate	3,75	3,1	3,5
C	Nitrate	3,2	2,5	2,7
D	Nitrate	3,7	3,05	3,1
	moyenne	3,8	2,9	3,5
E	Chlorure	4,4	3,6	4,0
F	Sulfate	1,65	0,85	1,6
G	Sulfate	1	0,76	1,4
H	Sulfate	1,05	0,7	1,5
	moyenne	1,2	0,8	1,5

TABLEAU XXIV : CI50 OBTENUES PAR OPACIMETRIE SUR DIFFERENTES SERIES  
DE CULTURES DE *Chlorella vulgaris* INTOXIQUEES PAR  
DIFFERENTS SELS DE CADMIUM

## 2.2. Numération

Comme dans le cas de l'opacimétrie, les cultures sont observées chaque jour. Cependant, pour permettre la numération, la culture doit être ouverte pour le prélèvement, et, malgré les précautions de stérilité, cela induit des modifications du développement, ce qui se traduit sur les courbes de croissance par des irrégularités nettement plus importantes que pour l'opacimétrie. Malgré cet inconvénient, les courbes de croissance ont pu être construites, et en fonction des différentes concentrations de cadmium, nous avons pu procéder aux mêmes calculs que sur les courbes obtenues par opacimétrie : calculs de  $k$ , de la hauteur en ordonnée à J5 et J10, et calculs des pourcentages d'inhibition respectifs. La première expérimentation  $N_1$ , représentée figure 37, confirme que la concentration de 10 mg Cd/l sous forme de nitrate inhibe totalement la croissance de *Chlorella vulgaris*. Par les pourcentages d'inhibition calculés à J5 et J10, nous avons trouvé graphiquement des CI50 de 1,8 mg Cd/l et de 1,5 mg Cd/l, respectivement à J5 et à J10. Tandis que la CI50, obtenue à partir des taux de croissance calculés entre le 2ème et le 6ème jour, est de 3,4 mg Cd/l.

Pour compléter ces résultats, d'autres expérimentations ont été entreprises à des concentrations intermédiaires entre 1 et 10 mg Cd/l. Les courbes de croissance obtenues pour la 2ème série, ( $N_2$ ), sont présentées figure 38 ; il est à noter la décroissance à partir du 13ème jour, est sans doute liée à l'ouverture journalière des cultures. La figure 39 montre comment les CI50 sont obtenues graphiquement, en portant les différents pourcentages d'inhibition calculés en fonction des concentrations en cadmium : par rapport aux taux de croissance, la CI50 est égale à 4,75 mg Cd/l ; à J5 et J10, les CI50 sont respectivement 2,1 et 2,15 mg Cd/l. Comme dans le cas de l'opacimétrie, il y a variation des CI50 obtenues, et la CI50 serait plus élevée que les autres, bien que le calcul se rapporte à la phase de croissance exponentielle, moment où la toxicité devrait être le mieux mise en évidence.

Nombre de cellules  
par ml,  $\times 10^6$

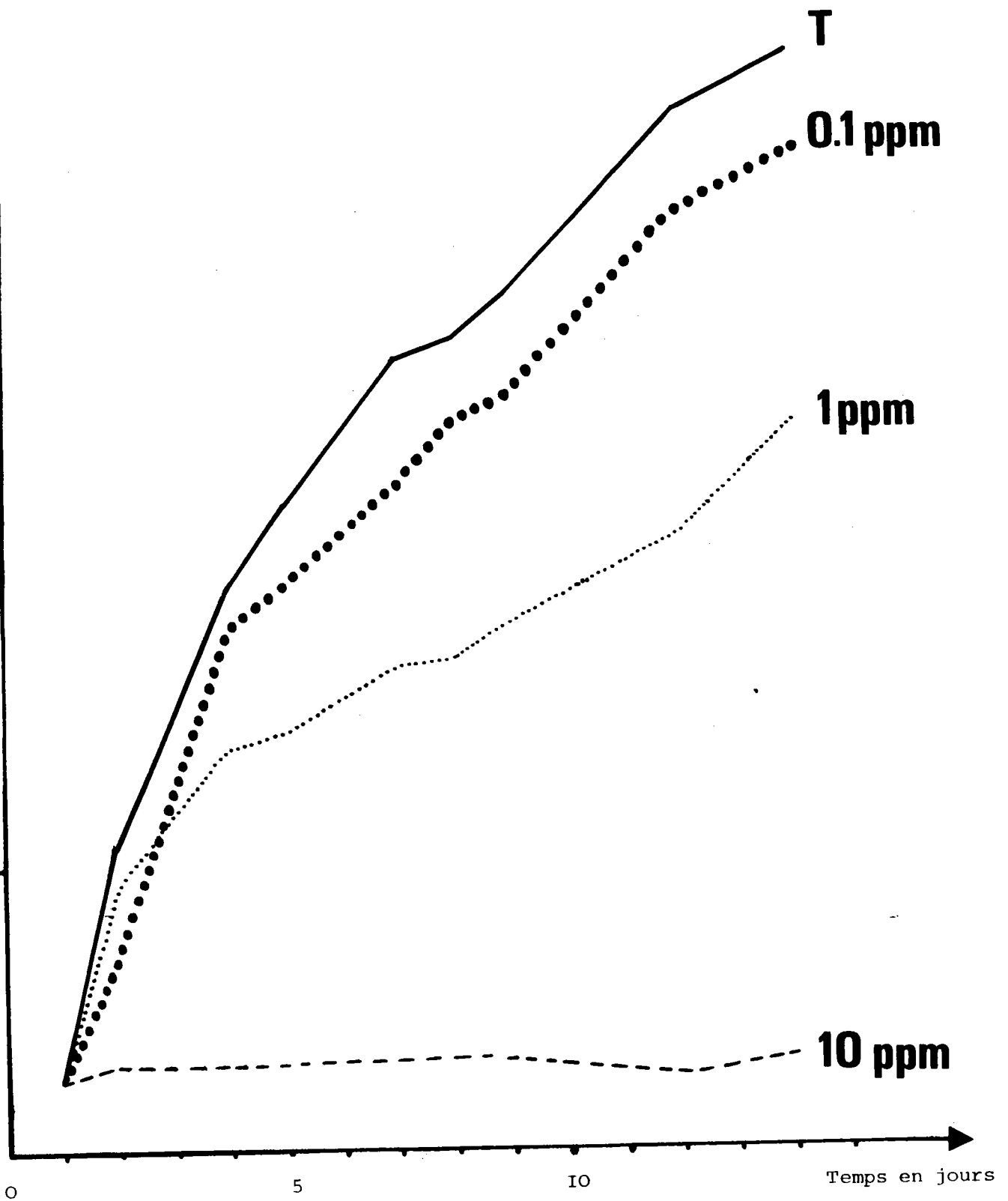


Figure 37: Courbes de croissance des Chlorelles intoxiquées par le cadmium- numération au compteur Coulter.

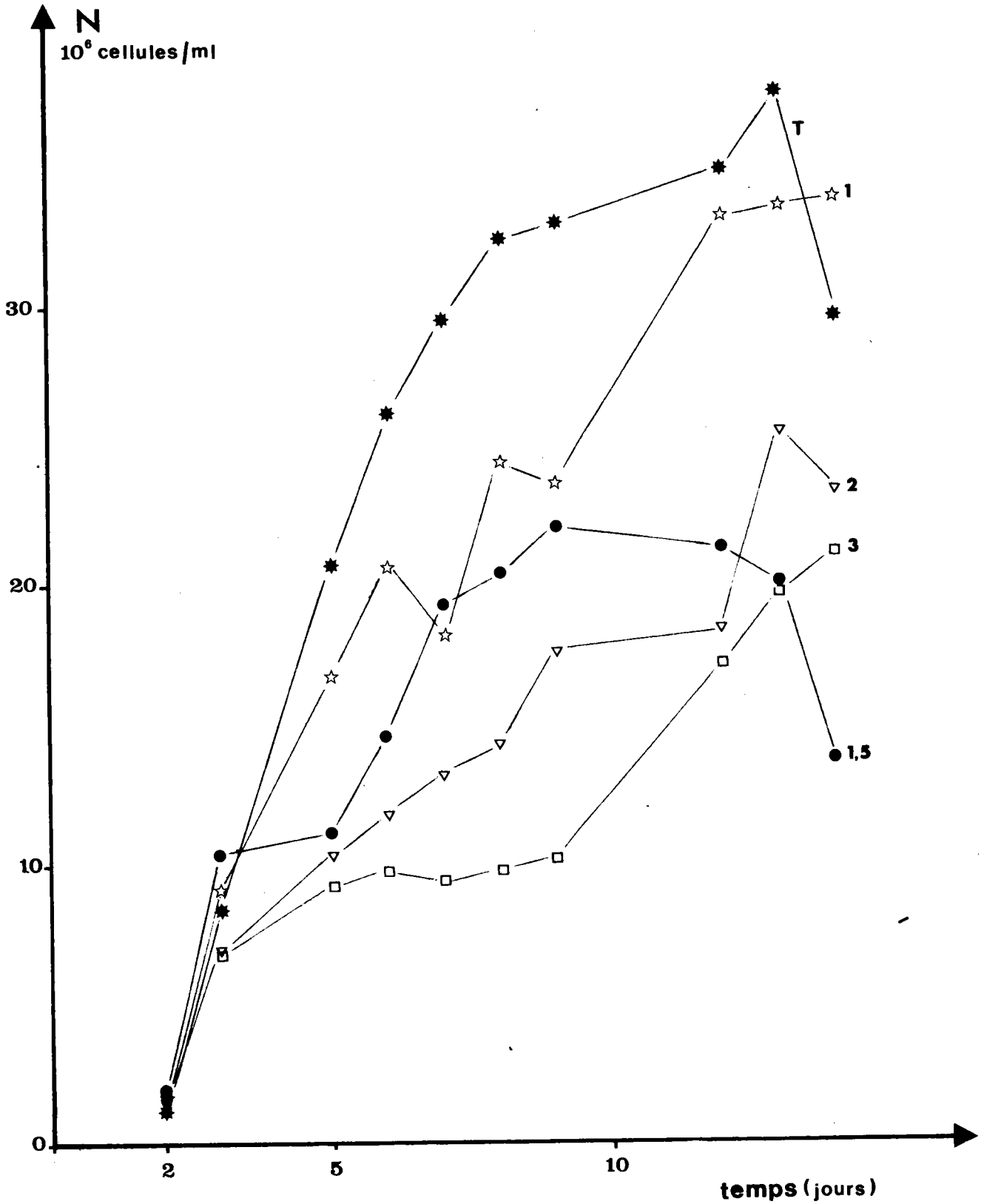


Figure 38: courbes de croissance de *Chlorella vulgaris*; numération au compteur Coulter.

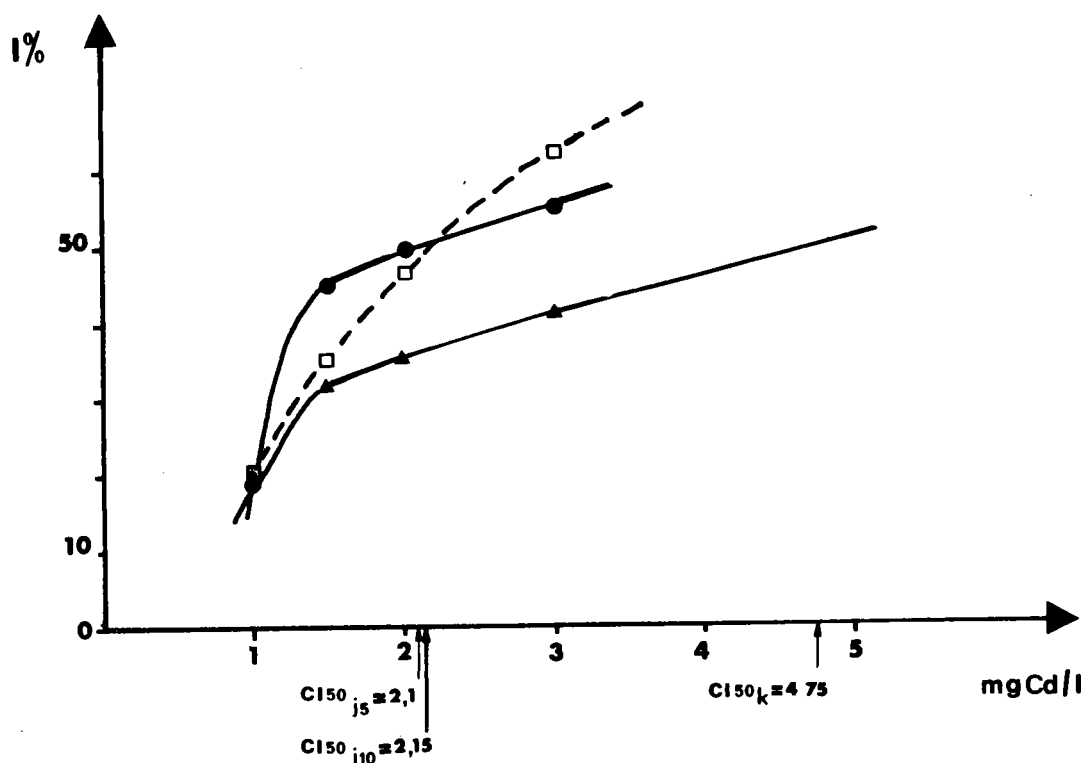


Figure 39: Détermination des  $CI_{50}$  du cadmium sur *Chlorella vulgaris*; numération (nitrate).

Puis nous avons étudié l'évolution de la  $CI_{50}$  en fonction du temps et des différentes phases de croissance, par l'intermédiaire des données brutes de la numération chaque jour.

Les pourcentages d'inhibition n'ont pu être calculés qu'au-delà du 4ème jour, car les différences entre essais et témoins n'étaient pas suffisamment significatives en deçà.

C'est pourquoi les courbes de la figure 40 ne commencent qu'à J4, mais présentent cependant une grande similitude avec celles obtenues par opacimétrie (figures 33 et 35). Il semble donc que les effets toxiques du cadmium ne soient mis en évidence par ces 2 critères que quelques jours après l'ensemencement. Puis après une apparente stabilité de la toxicité pendant 3-4 jours, celle-ci semble ensuite diminuer, ce que traduit la progressive augmentation de la  $CI_{50}$  au delà du 8ème jour. Cette évolution observée dans le cas du nitrate de cadmium est comparable à celle déterminée avec le chlorure, comme en témoigne la figure 41.

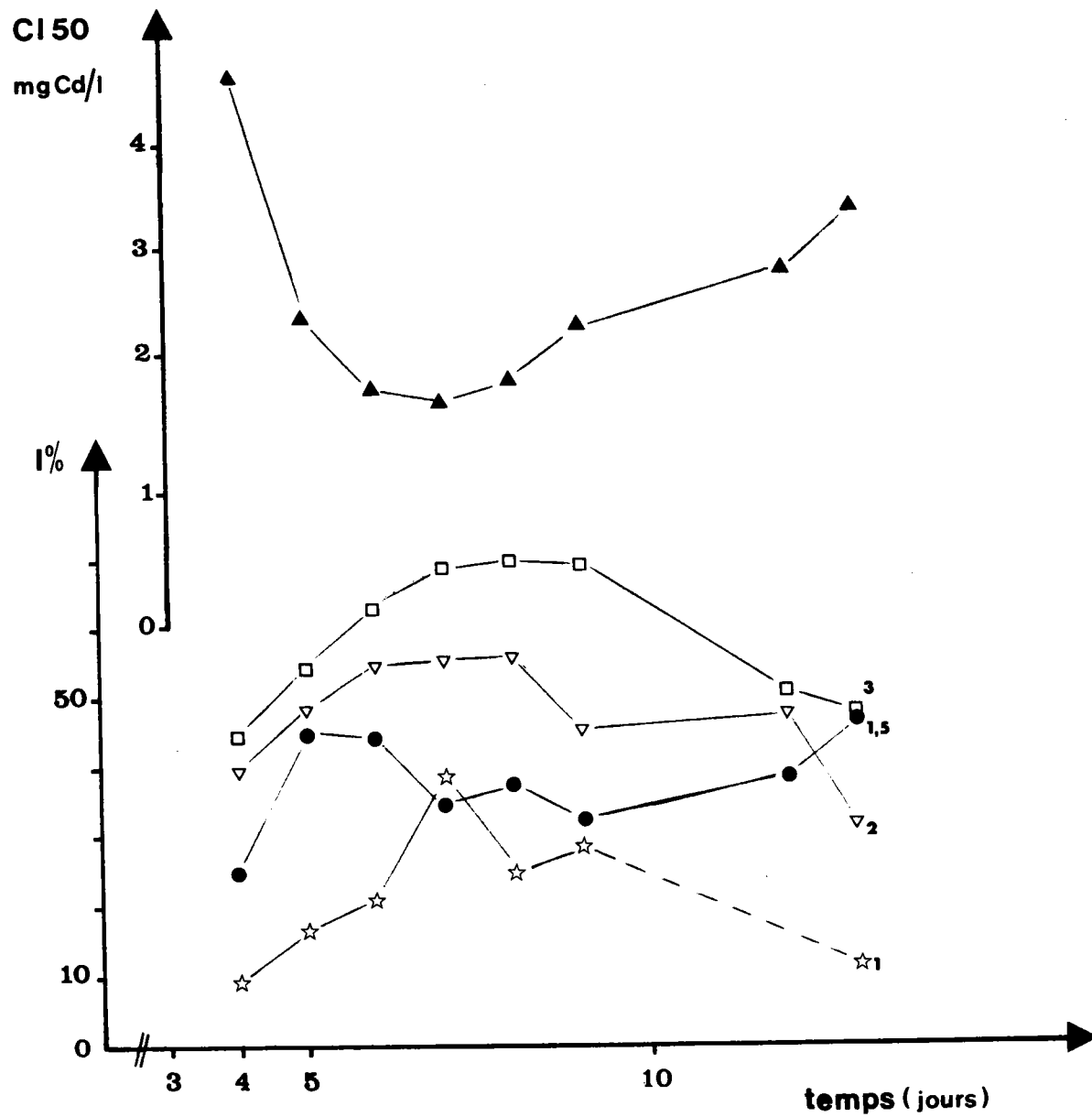


Figure 40: Evolution de I (%) et CI<sub>50</sub> en fonction du temps, sur *Chlorella vulgaris*; numération. (nitrate)



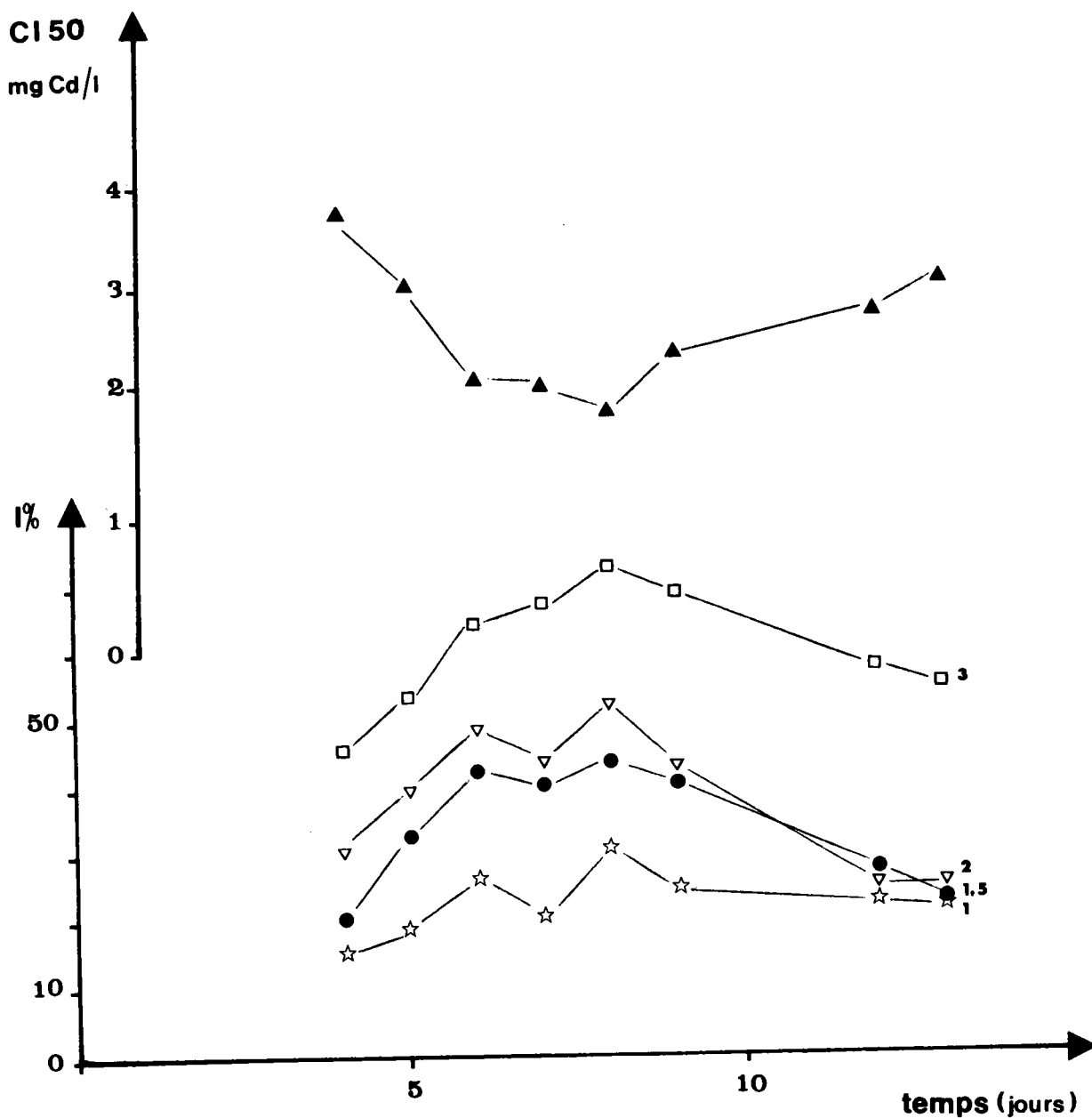


Figure 41: Evolution de I(%) et  $CI_{50}$  du chlorure de cadmium sur *Chlorella vulgaris*, en fonction du temps (numération).

Sur le plan qualitatif, l'utilisation du C-1000 a permis de constater que la présence du cadmium dans les cultures de chlorelles faisait diminuer les petites cellules au profit des plus grosses. La figure 42 est un exemple des courbes simplifiées obtenues : elle représente les diagrammes de taille des populations de chlorelles pour les différentes concentrations de cadmium, à J8. Malgré la schématisation de ces courbes, on peut remarquer que le nombre de cellules dans la classe de taille dominante diminue en fonction de la concentration de cadmium. De plus, à 3 mg Cd/l alors que la numération totale est d'environ  $10^6$  cellules/ml et par conséquent non négligeable, aucune classe de taille ne semble dominante c'est à dire qu'aucun maximum n'est apparent sur la courbe.

L'évolution des diagrammes de taille en fonction de la concentration en cadmium et en fonction du temps est présentée par les figures 43 et 44. Il s'agit de l'expérience N1, où la gamme de concentrations mises en jeu est large pour permettre d'apprécier globalement mais distinctement les effets du cadmium. Ainsi, on peut voir que, parallèlement à une diminution du nombre de cellules en fonction de la concentration en cadmium, il y a déplacement de la classe de taille dominante vers les volumes plus grands. Le phénomène est accentué en fonction du temps. Tout semble se passer comme si la présence de cadmium entraînait un vieillissement prématuré des cultures. Il y a inhibition plus ou moins forte de la multiplication cellulaire selon la concentration du toxique, et les cellules de petite taille, que l'on peut considérer comme jeunes, se développent au lieu de se diviser. La population n'est alors plus mono dimensionnelle, comme elle a tendance à l'être dans le cas des cultures témoins avant la phase stationnaire.

Cette hypothèse d'action du cadmium sur les mécanismes de multiplication cellulaire, demanderait à être vérifiée par voie biochimique et/ou physiologique, ce qui dépasse le cadre de cette étude.

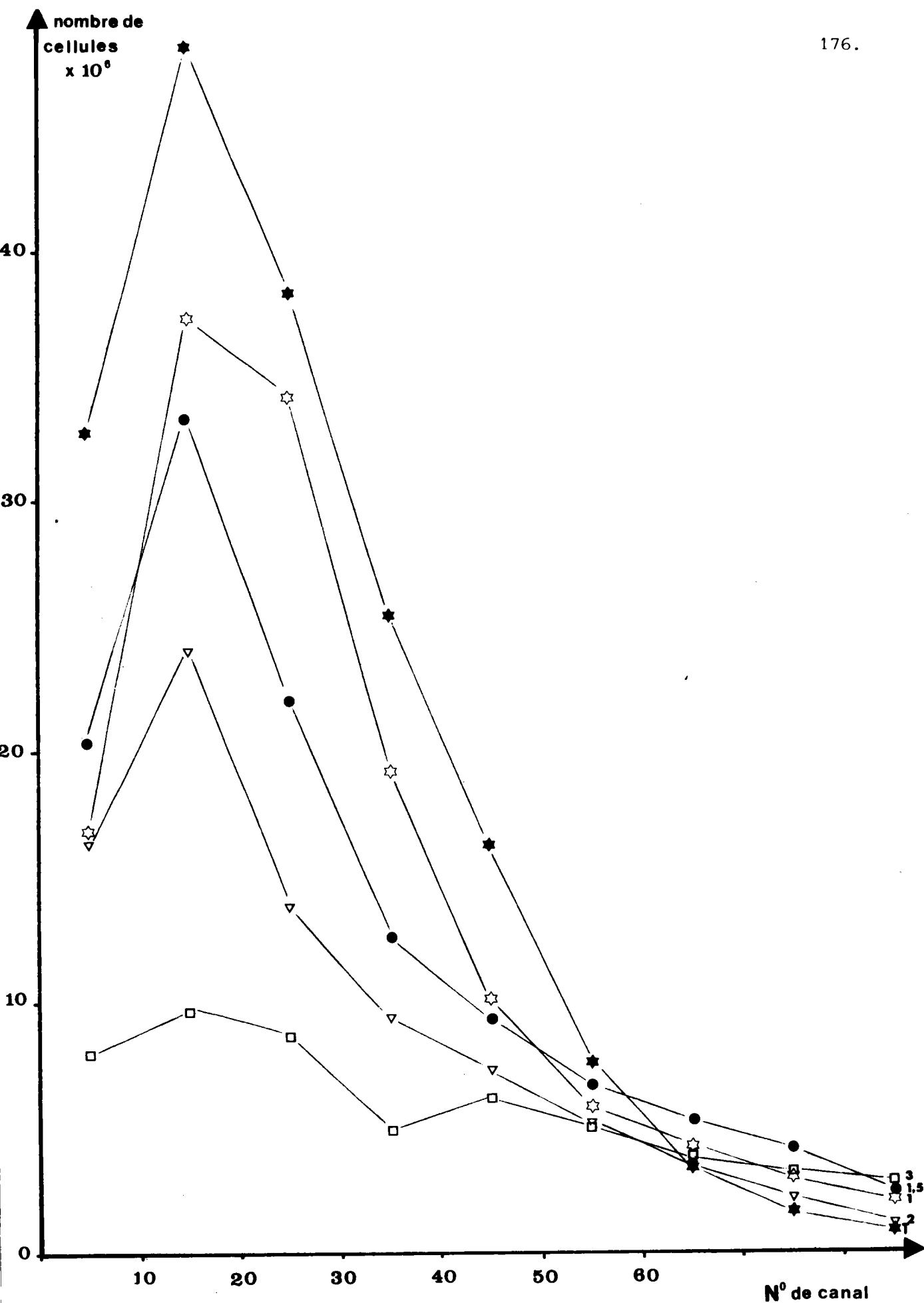


Figure 42: Distribution de tailles des cellules d'une population de *Chlorella vulgaris*, intoxiquée par du nitrate de cadmium (analyseur C1000) - JR

FIGURE 43 : COURBE SIMPLIFIEE DE DISTRIBUTION DES CELLULES

PAR INTERVALLES DE 10 CANAUX, APRES 7 JOURS. (ANALYSEUR C 1000)

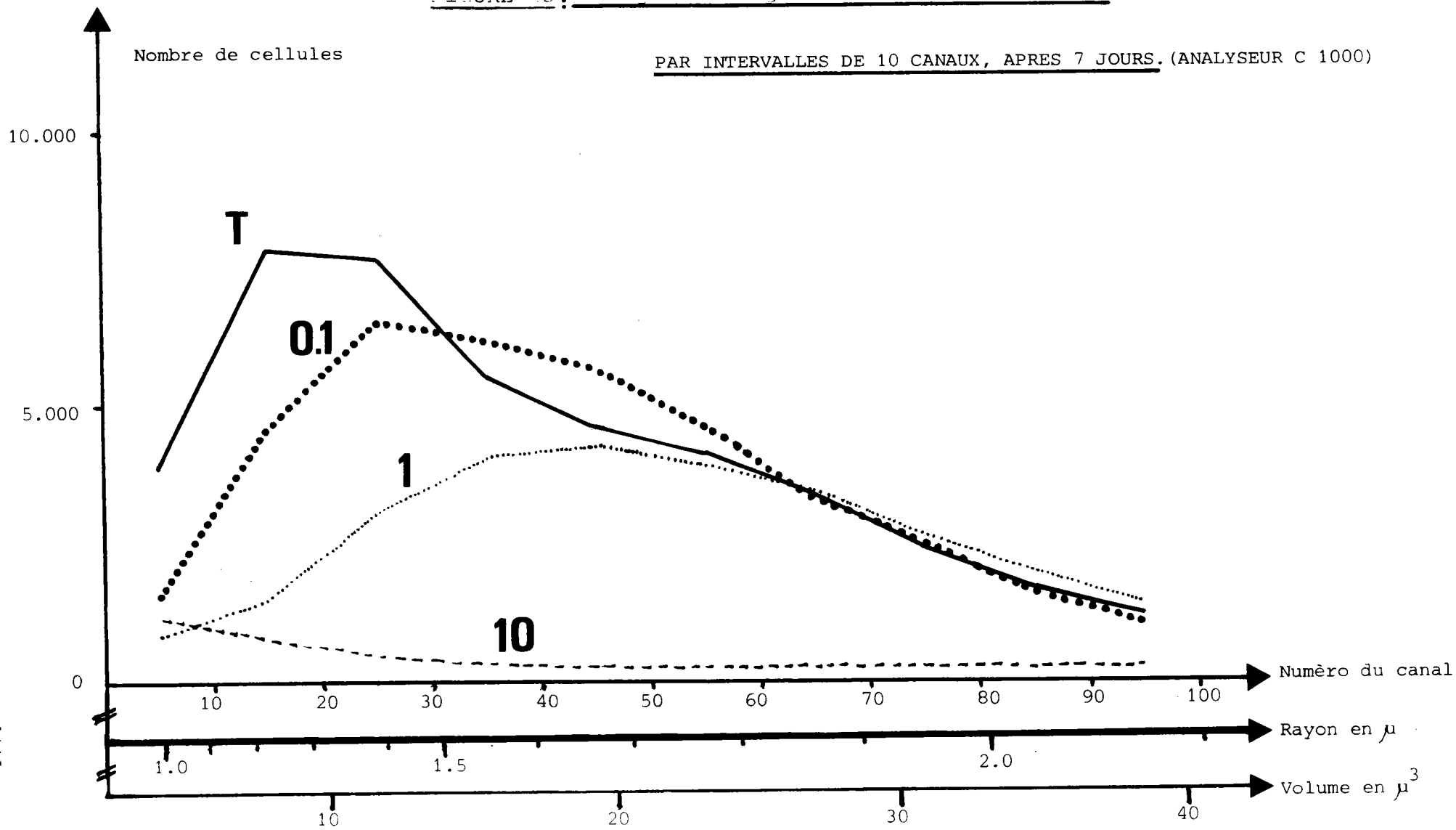
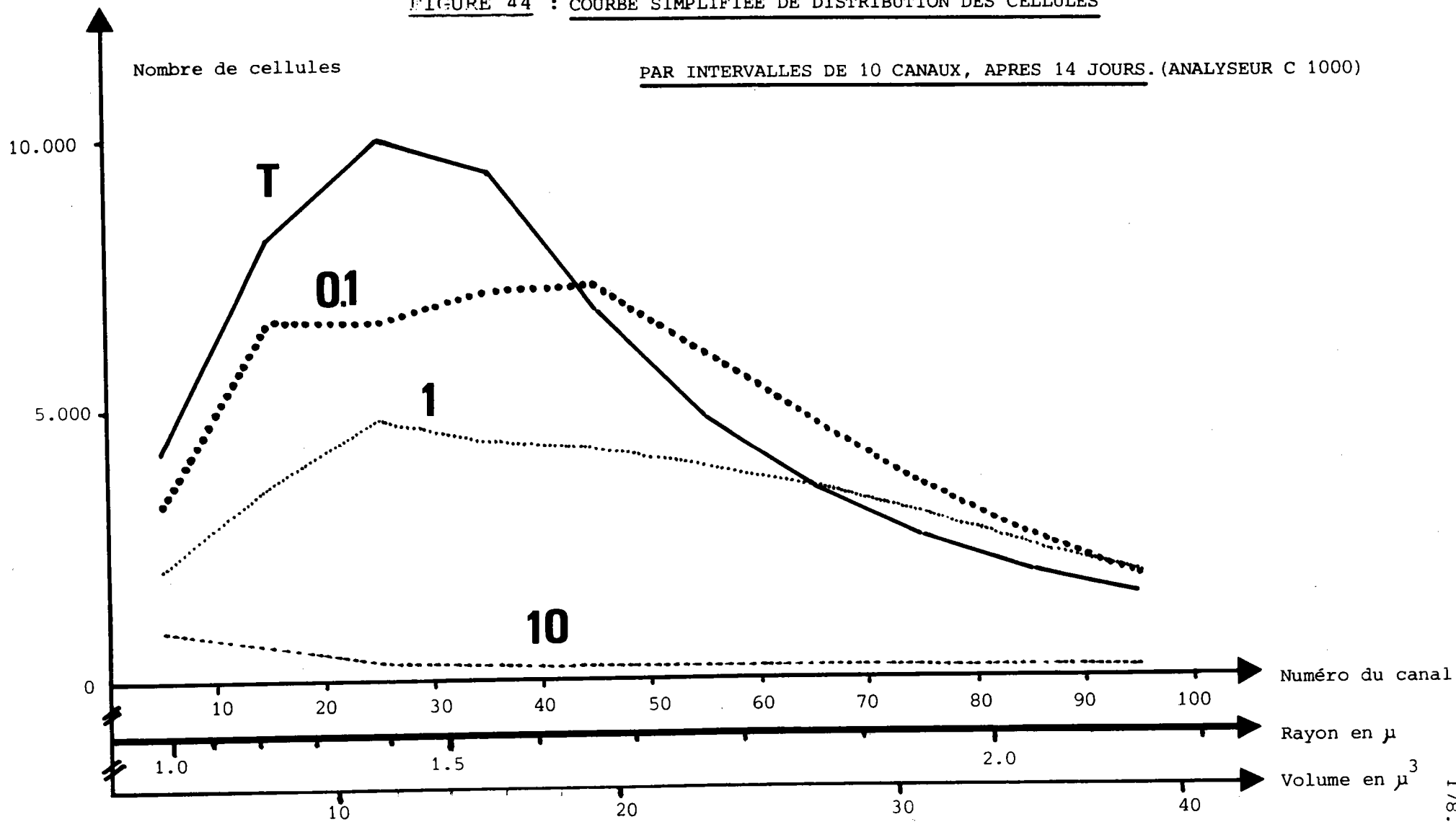


FIGURE 44 : COURBE SIMPLIFIEE DE DISTRIBUTION DES CELLULES



D'autres séries d'expérimentations ont été faites et les résultats sont rassemblés dans le tableau XXV. On remarque par la numération, que le nitrate semble plus toxique que le chlorure, de même que par opacimétrie les CI50 pour le nitrate sont en moyenne inférieures à celles obtenues par le chlorure. L'action du sulfate n'a pu être testé par la numération et il est alors difficile de le classer par rapport aux 2 autres sels. On peut noter également que les valeurs de CI50 obtenues par numération sont plus faibles que celles données par opacimétrie. Cela montre que le calcul de la CI50 est arbitraire, c'est à dire qu'il ne peut exister une seule et unique valeur de CI50 car celle-ci dépend du critère d'étude et du mode de calcul.

Néanmoins, les résultats obtenus par différentes séries d'expériences sont assez voisins, pour le même paramètre et le même mode de calcul. Il convient donc d'accompagner la CI50 des conditions de son calcul pour lui conserver toute sa signification et pour pouvoir comparer ultérieurement plusieurs toxiques entre eux.

Expérience	Sel	Concentration (Cd) (mg/l)									CI 50 (mg Cd/l)			
		0	0,1	0,5	1	1,5	2	3	5	10	%. k	%. J5	%. J10	
N <sub>1</sub>	Nitrate	0,238	0,228		0,192						0,013	3,4	1,8	1,5
N <sub>2</sub>	Nitrate	0,346			0,281	0,236	0,226	0,304				4,75	2,1	2,15
N <sub>3</sub>	Nitrate	0,209		0,190	0,152	0,141	0,128					3,5	3,1	2,6
		moyenne										3,9	2,3	2,1
N <sub>4</sub>	Chlorure	0,168		0,179	0,171	0,161	0,145	0,106	0,077			3,8	4,5	2,4
N <sub>5</sub>	Chlorure	0,346			0,329	0,266	0,263	0,207				3,9	4,15	2,1
		moyenne										3,85	4,3	2,25

TABEAU XXV : PRESENTATION DES DIFFERENTES SERIES D'INTOXICATION DE *Chlorella vulgaris* PAR LE CADMIUM  
 RESULTATS DES TAUX DE CROISSANCE ET CI50 OBTENUS PAR NUMERATION

## 2.3. Autres paramètres

Comme nous l'avons déjà signalé dans la première partie, nous avons voulu nous intéresser à d'autres paramètres, plus physiologiques. Ils ne sont cités qu'à titre d'exemple, et les expérimentations n'ont pas été assez nombreuses pour que les résultats soient pris en compte avec la même importance que les précédents.

### 2.3.1. ESTIMATION DES PIGMENTS CHLOROPHYLLIENS

Les cultures témoins et intoxiquées par du nitrate de cadmium sont préparées et mises à développer dans les conditions déjà définies. Elles sont ensuite toutes arrêtées à un temps donné, car le prélèvement d'un volume important par rapport au volume total, modifie totalement la croissance de la culture. Il en résulte un problème matériel si l'on veut disposer en même temps de plusieurs essais à différentes concentrations de toxique et de plusieurs essais semblables pour suivre l'évolution dans le temps. C'est pourquoi nous ne disposons de résultats que pour 2 jours, J6 et J8 ; les difficultés d'extraction déjà signalées nous ont conduit également à éliminer certaines expérimentations dont les résultats nous semblaient par trop erronés.

Avant prélèvement, la transmission optique est mesurée et une numération au compteur Coulter est faite. Après 24 heures d'extraction à l'obscurité et au froid, et après centrifugation, les surnageants sont ajustés au volume initial de la prise d'essai et la densité optique est alors mesurée à 665 nm. Les pourcentages d'inhibition sont calculés en fonction de la DO moyenne des témoins, et la CI50 est obtenue graphiquement (figure 45). A J6, celle-ci est de 1,9 mg/l, pour le cadmium sous forme de nitrate. Les autres CI50 sont calculées de la même manière et sont respectivement de 1,5 et 1,1 mg Cd/l par opacimétrie et par numération.



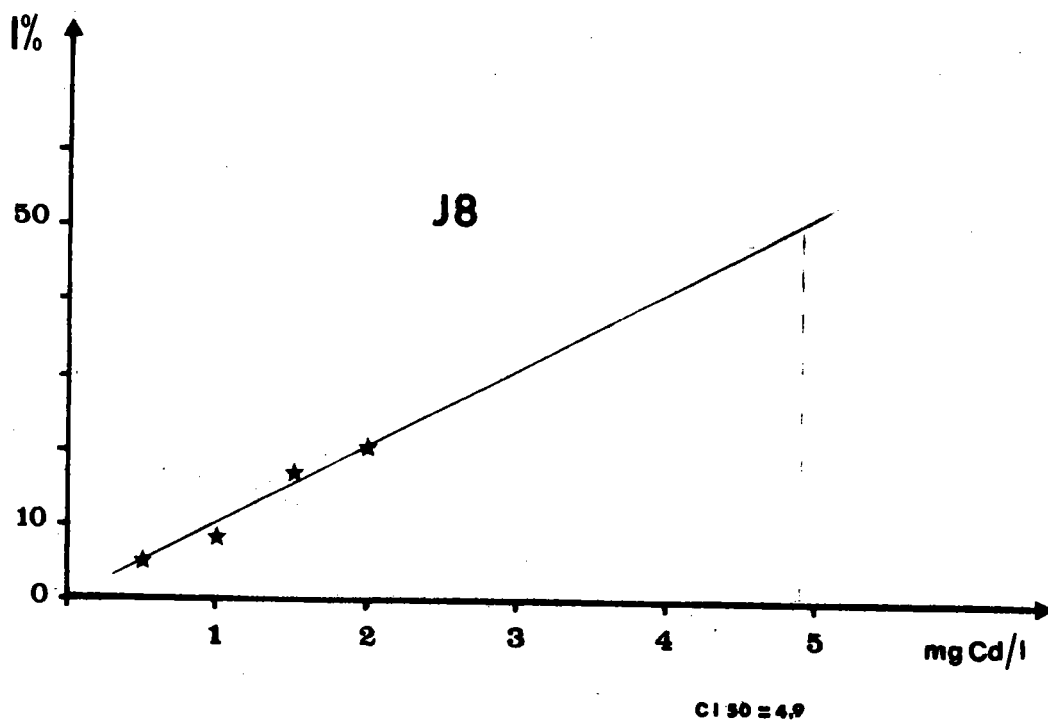
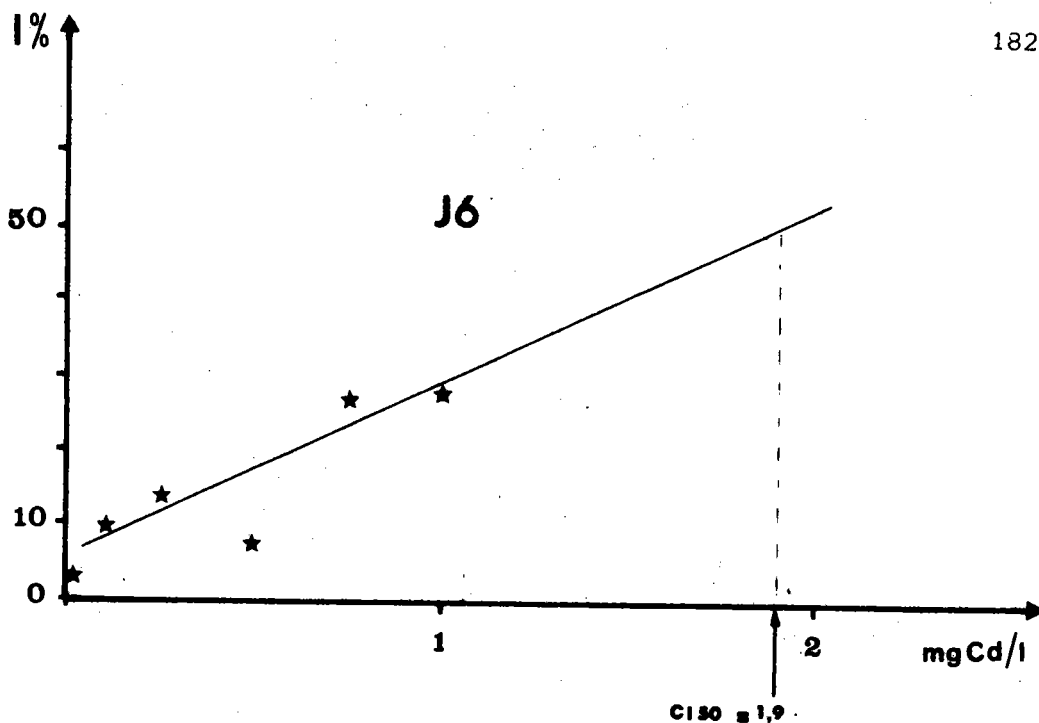


Figure 45: Détermination des CI<sub>50</sub> de cadmium (nitrate) sur *Chlorella vulgaris*, par estimation des teneurs en pigments chlorophylliens.

Par contre à J8, les valeurs sont nettement plus élevées et paraissent vraisemblablement trop fortes eu égard à celles déjà obtenues par numération et opacimétrie.

On remarque que de J8 à J6, la différence entre les CI50 obtenues par la DO des extraits chlorophylliens est très voisine de celle entre les CI50 obtenus par opacimétrie. Bien que l'estimation des teneurs en chlorophylles donne les CI50 les plus élevées, on peut dire que ce critère est comparable à l'opacimétrie, qui en est en fait une expression simple et rapide.

Il paraît cependant nécessaire de quantifier la recherche des chlorophylles dans les cultures de chlorelles par l'emploi de solutions étalons, après une extraction complète au sonicateur, pour que l'estimation devienne un dosage, et pour pouvoir aussi utiliser ce paramètre de façon plus approfondie. Pourtant, compte tenu des résultats obtenus, par rapport aux difficultés rencontrées pour parfaire la technique, le dosage des chlorophylles ne nous semble pas être un paramètre primordial pour les études d'intoxication envisagées.

### 2.3.2. MESURE DE LA CONCENTRATION EN ATP

Nous avons voulu examiner ce critère pour savoir si les résultats obtenus étaient cohérents avec ceux obtenus par les autres paramètres. Nous n'avons fait qu'une série de cultures, et cette étude ne prétend pas être complète : elle n'a pour but que de montrer de façon préliminaire l'intérêt du dosage d'ATP à mettre en oeuvre ultérieurement pour des études d'intoxication plus élaborées.

Les cultures sont préparées dans les conditions décrites ci-dessus, aux concentrations de 0 - 0,01 - 0,5 - 1 - 1,5 - 2 et 3 mg Cd/l sous forme de nitrate, à raison de 2 essais par dose.

Après 5 jours de développement, la numération de chaque culture est faite au compteur Coulter, ainsi que la mesure de la transmission optique à 665 nm.

Le dosage d'ATP se fait en 2 étapes : l'extraction puis le dosage *sensu stricto*. Le mode opératoire est le suivant :

La prise d'essai de la culture d'algues est de 1 ml additionnée de 9 ml de DMSO (diméthyl sulfoxyde) à 90 % dans du tampon MOPS (acide morpholino propane sulfonique) 0,01 M.

Après une agitation de 30 secondes, puis un repos de 2 minutes on ajoute 40 ml de tampon MOPS 0,01 M, à pH = 7,4.

Chaque essai est congelé immédiatement après sa préparation et toutes les mesures sont ensuite faites en même temps.

Au moment de la lecture, un kit de réactif contenant le complexe enzymatique luciférine-luciférase ainsi que des ions  $Mg^{++}$  comme catalyseur, est dilué dans de l'eau de telle sorte que 0,1 ml de ce mélange soit en contact avec l'extrait, dans l'appareil. Celui-ci est un Luminescence Biometer 760 (Dupont instruments), qui permet de transformer électroniquement la production de photons émis par la luciférine en un signal proportionnel à la quantité de lumière ; celle-ci est elle-même proportionnelle à la quantité

d'ATP mise en contact avec le système enzymatique, ce qui permet l'évaluation quantitative de l'ATP contenu dans le matériel biologique considéré. Après 3 injections du même essai, la moyenne des valeurs obtenues est faite, et compte tenu de la dilution au 1/50e, le résultat est donné en  $\mu\text{g ATP/ml}$  de culture d'algue.

Par rapport aux valeurs obtenues pour les témoins, les pourcentages d'inhibition ont été calculés selon la formule suivante :

$$\% I = 1 - \frac{\text{essai}}{\text{témoin}} \times 100$$

Les courbes de la relation dose/effet ( $I(\%) = f(\text{concentration de cadmium})$ ) ont été ainsi construites (figure 46). La CI50, déterminée par les 3 méthodes, donne les valeurs suivantes sur une même série :

- . 1,5 mg Cd/l par le dosage d'ATP
- . 1,9 mg Cd/l par opacimétrie
- . 0,60 mg Cd/l par numération

On remarque que dans cette expérience, la CI50 obtenue par la numération est là encore la plus faible, tandis que le dosage d'ATP donne des résultats intermédiaires ; c'est pourquoi, il nous paraît intéressant d'utiliser à l'avenir ce critère dans les études d'intoxication.

Le dosage d'ATP peut en effet être le reflet du nombre d'algues encore vivantes dans la culture totale, et être une façon d'estimer la mortalité de la population, due au toxique. Ce seul exemple ne traduit malheureusement pas ce phénomène, puisque la CI50 obtenue est supérieure à celle obtenue par numération, alors que ce dernier critère prend en considération toutes les algues, quelque soit leur état physiologique. Mais nous espérons que dans l'avenir, d'autres expérimentations confirmeront l'intérêt de l'ATP dans les études d'intoxication, autant que dans celles de productivité primaire.

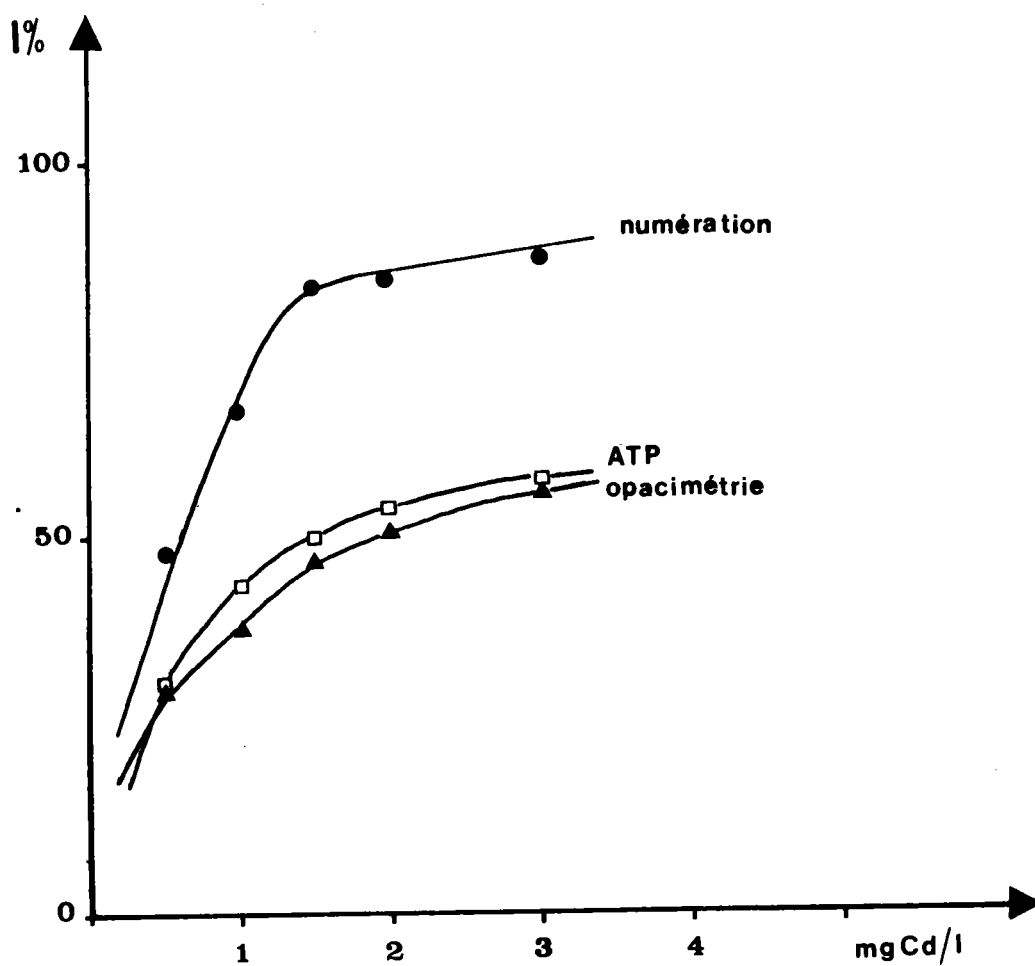


Figure 46: Pourcentages d'inhibition du cadmium (nitrate), en fonction de la concentration de toxique dans le milieu, et de plusieurs critères d'étude (concentration en ATP, numération et opacimétrie).

En conclusion de ce chapitre, nous pensons que la toxicité d'une substance sur une population algale est difficilement quantifiable de façon unique, en fonction de seuls critères biologiques. La CI50 semble être une donnée intéressante car elle indique le degré de toxicité de la substance mais elle est différente selon les conditions de son calcul et par conséquent limitée dans ses applications, pour la fixation de normes par exemple. D'autre part, le renouvellement dans le temps de séries d'expérimentations a montré la variabilité biologique des résultats, et l'importance des conditions de culture. En effet une faible variation de celles-ci perturbe la croissance des algues et entraîne alors une modification dans l'estimation de la toxicité.

### 3. RECHERCHE DU POUVOIR CUMULATIF

C'est par le degré d'accumulation d'un toxique dans un organisme, vérifié par l'analytique qu'existent des risques de contamination des chaînes alimentaires. Ceux-ci varient en fonction de la quantité du toxique présent dans l'environnement et du temps pendant lequel l'organisme est en contact avec lui.

C'est pourquoi, nous allons envisager l'accumulation du cadmium à la fois en fonction de sa concentration dans le milieu de culture d'algues, et en fonction de la durée de l'exposition.

Mais avant toute expérimentation, il est nécessaire de connaître le comportement du biotope en l'absence de tout organisme, pour que les variations de la concentration en cadmium observées ultérieurement soient attribuées à juste titre aux organismes eux-mêmes.

#### 3.1. Evolution du cadmium dans le biotope seul

Les erlenmeyers de culture sont préparés comme pour les études d'intoxication et autoclavés ; on ajoute ensuite, de façon stérile, un volume de milieu Oligo LC, dépourvu d'algues et stérile, égal à celui utilisé pour l'ensemencement des cultures.

Nous avons voulu tout d'abord voulu nous assurer que l'autoclave n'avait qu'un effet négligeable sur le comportement du métal. Le dosage de milieux, avant et après autoclave a révélé une diminution moyenne de 2,6 % de la concentration en cadmium, sur 10 essais. Cette variation ne semble pas significative d'autant plus qu'il eût été logique de croire que la concentration en cadmium pouvait augmenter en raison de l'évaporation qui paraît ainsi limitée.

Les doses choisies pour suivre l'évolution du cadmium dans le biotope ont été : 0 ; 5 ; 10 ; 100 ; 500  $\mu\text{g}/\text{l}$ , avec 2 essais par concentration. Tous les 2 jours, un prélèvement d'environ 1 ml a été fait pour le dosage, effectué directement dans le four du spectrophotomètre d'absorption atomique. Compte tenu des dilutions effectuées, le résultat de chaque dosage a été converti de telle sorte que toutes les valeurs soient rapportées à 10  $\mu\text{Cd}/\text{l}$ . La figure 47 montre l'évolution du cadmium dans le milieu, pendant 2 semaines pour tous les essais et pour le témoin (moyenne de 2 cultures). Après des valeurs assez élevées pendant les premières heures, les courbes semblent se stabiliser au bout de 48 heures environ à une valeur moyenne, quelque peu inférieure à la valeur théorique de 10  $\mu\text{g}/\text{l}$ . On peut donc considérer qu'après le temps que dure la phase stationnaire de la croissance algale, la concentration de cadmium dans les cultures est stabilisée. Les variations obtenues après ce délai seront principalement l'effet de la présence des algues.

La figure 47 indique également l'évolution de milieux témoins. La concentration en cadmium du milieu Oligo LC seul n'est pas négligeable et semble de la même façon se stabiliser après une légère augmentation. Plusieurs dosages ont été faits sur des séries de milieux oligo LC à des temps différents, et une moyenne de  $1,13 \pm 0,38 \mu/\text{l}$  a été trouvée. C'est donc sur cette base que les résultats ultérieurs ont été calculés.

### 3.2. Accumulation du cadmium dans *Chlorella vulgaris* en fonction de la concentration du cadmium dans le milieu

A l'occasion des déterminations de CI50 sur les algues seules lors des expérimentations sur les daphnies nourries par des algues intoxiquées, un nombre suffisant d'échantillons a été obtenu pour faire les dosages de cadmium, dans diverses intoxications, sur des séries de cultures ensemencées à des moments différents.



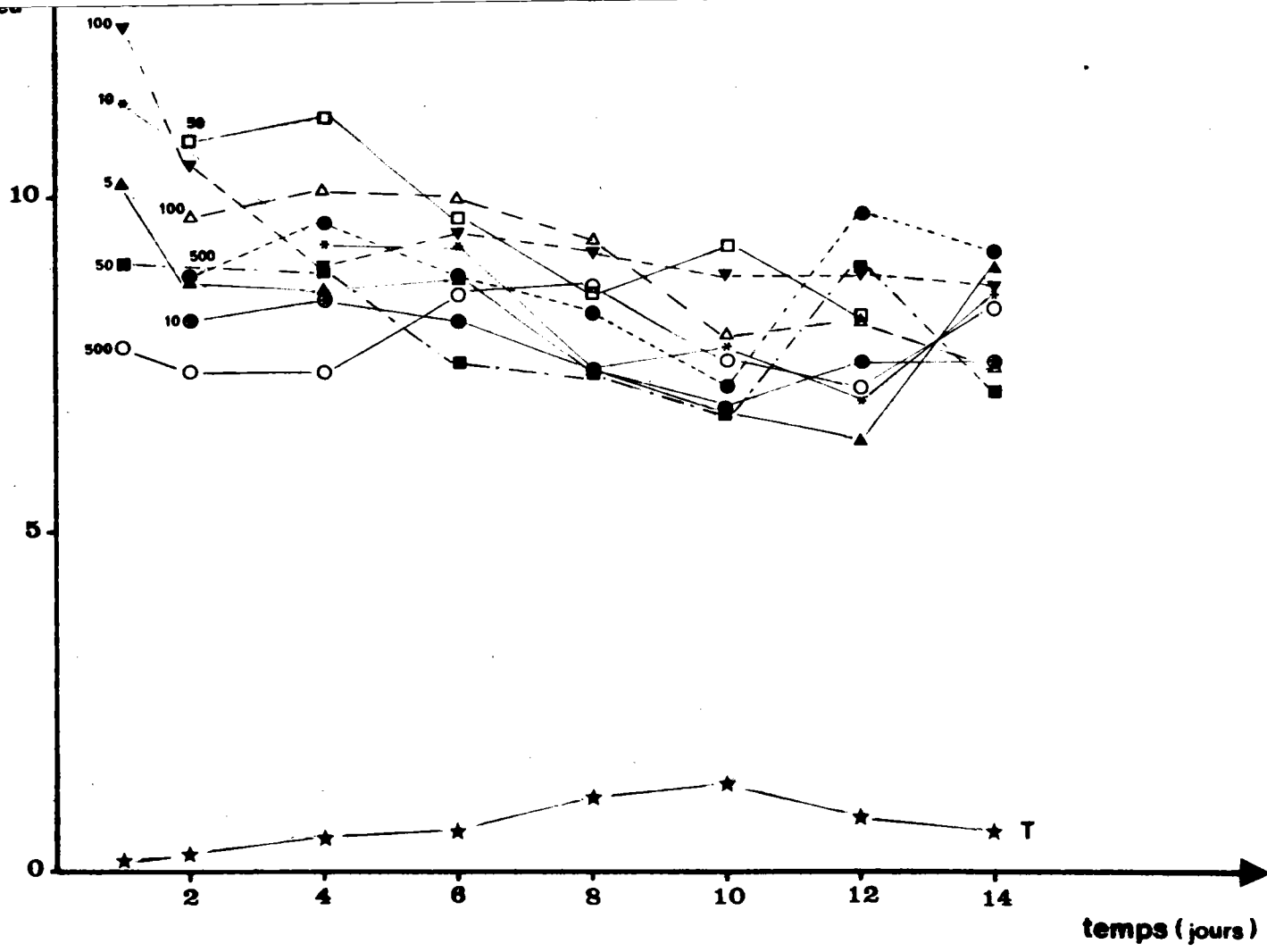


Figure 47: Evolution du cadmium dans le biotope des algues (chaque dose étant rapportée à 10  $\mu\text{gCd/l}$ ).

Nous avons ensuite rassemblé les données concernant le même jour et nous avons choisi le 10ème, puisque c'est le temps moyen à partir duquel les algues sont données aux daphnies. Les moyennes, pour chaque concentration initiale de cadmium dans le milieu ont été calculées avec au moins 5 résultats (tableau XXVI).

Pour l'expression graphique de ces résultats, nous avons utilisé des coordonnées logarithmiques. On constate que les points semblent être alignés : ce qui signifie que la relation entre la concentration dans le milieu et celle retrouvée dans les algues peut-être de la forme  $y = ax^b$ . C'est pourquoi nous avons calculé l'ajustement d'une fonction puissance, et nos résultats ont donné la relation suivante :

$$y = 3,52 \times x^{0,96}$$

avec un coefficient de corrélation  $r$  égal à 0,998.

La droite correspondant à cette fonction est représentée en coordonnées logarithmiques figure 48. Il faut signaler que cette relation n'a été calculée que de 4 à 5000  $\mu\text{g/l}$  et à 2  $\mu\text{g/l}$ , le point obtenu ne s'aligne pas du tout, soit en raison d'une erreur par excès sur les dosages, soit que plus vraisemblablement en deçà de cette concentration, il ne s'agit pas de la même fonction. Mais nous ne disposons pas d'un nombre suffisant de données pour déterminer cette autre relation.

Les facteurs de concentration,  $f$ , ont été calculés :

$$f = \frac{\text{concentration en cadmium dans les algues (ng/mg)}}{\text{concentration en cadmium dans le milieu (mg/l)}}$$

et les résultats sont présentés tableau XXVI. Leur variation semble assez aléatoire et le facteur de concentration moyen alors calculé est de 3000, sans tenir compte de la valeur de  $f$  à 2  $\mu\text{g/l}$ .

Cadmium dans milieu µg/l (x)	2	4	5	6	8	10	15	50	100	250	500	750	1000	2000	5000
Cadmium dans <i>Chlorella vulgaris</i> ng/mg (y)	12,9	14,8	19,4	20	25,4	31,2	51,5	123,2	217,5	722	1305	2333	2957	6363	12300
Facteur de concentration $f \times 10^3$	6,45	3,7	3,88	3,33	3,18	3,12	3,43	2,46	2,18	2,89	2,60	3,11	2,96	3,18	2,46

TABLEAU XXVI : ACCUMULATION DU CADMIUM DANS *Chlorella vulgaris* EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE DANS LE MILIEU

FACTEURS DE CONCENTRATION,  $f$ , À J10 ; RESULTATS PERMETTANT L'AJUSTEMENT DE FONCTION PUISSANCE DE LA FORME

$$y = 3,52 \times x^{0,96}$$

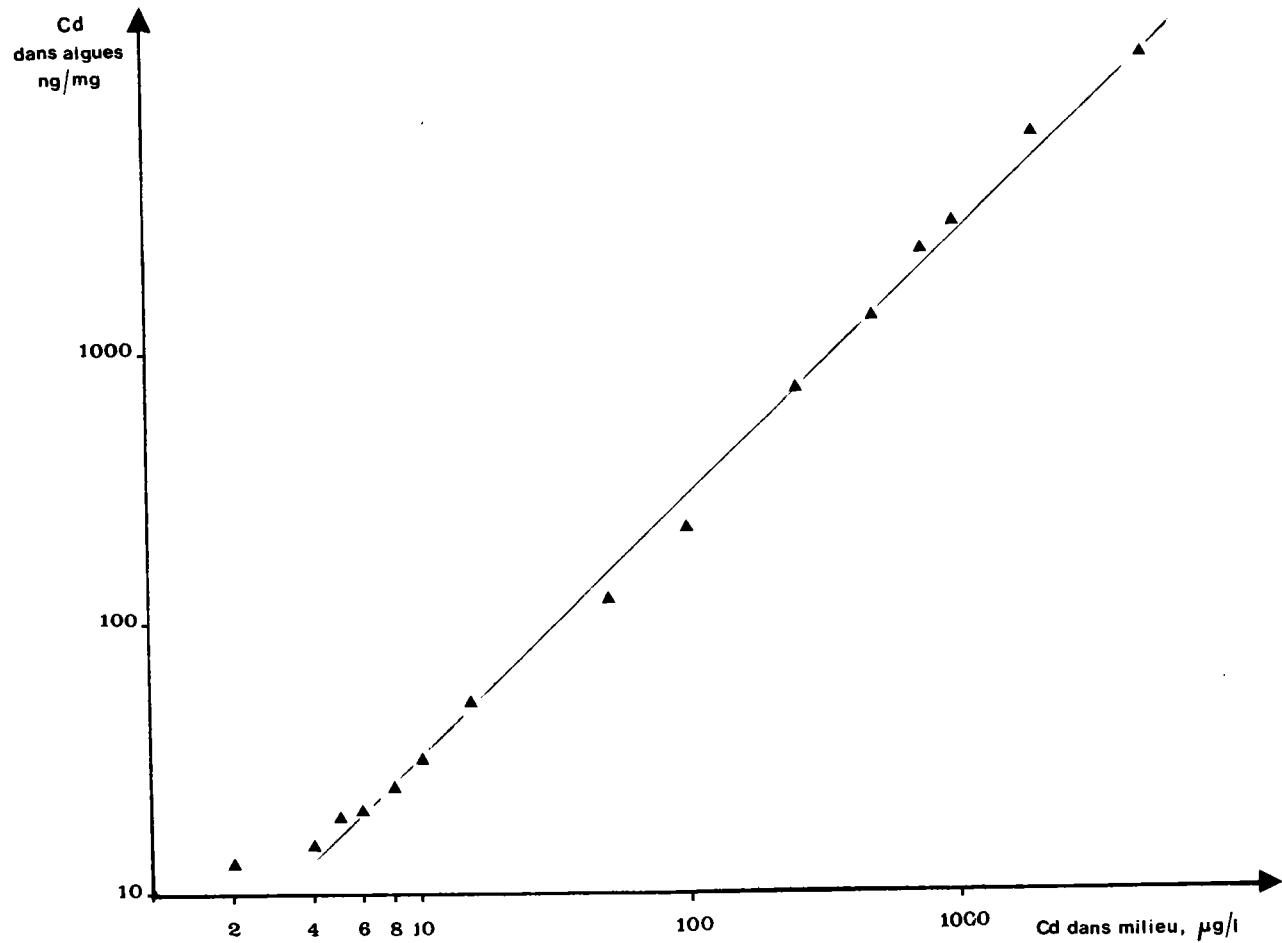


Figure 48: Accumulation du cadmium dans *Chlorella vulgaris* en fonction de la concentration du métal dans le milieu- coordonnées logarithmiques.

Les algues ont donc la potentialité de concentrer le cadmium environ 3000 fois par rapport à la teneur initiale dans leur environnement. Mais il faut rappeler que les dosages sont exprimés en ng de cadmium par mg de matière sèche, ce qui explique en partie la valeur très élevée du facteur f. Il nous a paru très aléatoire d'exprimer le poids de chlorelles en matière fraîche, car il est beaucoup plus difficile de reproduire des conditions toujours identiques de pesées dans ce cas que lors des pesées de matière sèche. C'est pourquoi, nous pensons que ce mode d'expression est préférable pour comparer les différents dosages entre eux, bien que nous en sentions les limites ; en effet, il ne reflète pas strictement la réalité, principalement dans le calcul du facteur de concentration. D'autres auteurs ont pourtant choisi ce même mode de calcul et ont obtenu des facteurs de concentration de même ordre de grandeur que ceux que nous avons mesurés :  $3,8 \cdot 10^3$  pour *Myriophyllum* et  $1,1 \cdot 10^4$  pour *Lagarosiphon* (RAVERA et coll., 1973).

Dans le cas des algues témoins, nous avons calculé également le facteur de concentration. Sur plus de 15 dosages, nous avons obtenu une concentration moyenne de cadmium dans les algues de  $3,04 \pm 1,74$  ng/mg. Si nous admettons que la concentration dans le milieu non intoxiqué est de  $1,13 \mu\text{g Cd/l}$ , le facteur de concentration f est de 2690, qui est très proche de la valeur moyenne calculée précédemment.

### 3.3. Evolution de l'accumulation du cadmium dans *Chlorella vulgaris* en fonction du temps

Nous venons de considérer la concentration de cadmium retrouvée dans les algues en fin de croissance exponentielle (J10) et l'accumulation du cadmium peut être différente en début de croissance.

C'est pourquoi, nous avonsensemencé successivement 4 séries de cultures à 3 concentrations différentes de cadmium : 0 ; 10 et 50  $\mu\text{g/l}$ . Chaque jour une culture, à chaque concentration, est prélevée du lot ; après

mesure de la transmission optique et numération, la totalité de la culture est filtrée pour mettre en oeuvre le dosage du cadmium. Les courbes de croissance obtenues par opacimétrie ne montrent pas de différence entre les 3 concentrations de cadmium choisies. Il en est de même pour la mesure des chlorophylles, dont on sait qu'elle n'est plus possible au 8ème jour.

Par numération, une inhibition certaine est remarquée après quelques jours de développement : elle est à son maximum de 18 % à 10 µg/l et de 26,5 % à 50 µg/l.

Chaque culture est ensuite filtrée, dans sa totalité, et le poids d'algues en matière sèche est mesuré après étuvage à 105°C. Ce poids reflète alors la croissance des populations algales en fonction du temps, bien qu'il y ait une certaine erreur par défaut, compte tenu du grattage des algues du filtre. Le tableau XXVII présente les différentes valeurs de poids obtenues, ainsi que les comptages et les résultats des dosages de cadmium.

Il est à remarquer tout de suite que la concentration de cadmium dans les algues n'est pas constante et qu'elle diminue quand le temps de croissance augmente (figure 49).

Les premières valeurs peuvent paraître excessives pour les 3 essais, mais il faut tenir compte du très faible poids d'échantillon qui introduit nécessairement une erreur. Cependant, même si celle-ci atteignait 50 %, les premières valeurs resteraient toujours très supérieures aux suivantes ; de plus au delà du 4ème jour les poids sont suffisamment importants pour qu'ils ne soient plus la cause des variations de la concentration de cadmium retrouvé dans les algues.

Plusieurs représentations graphiques ont été essayées dans le but de déterminer la forme de relation existant entre le temps et la concentration de cadmium dans les algues. Nous avons retenu finalement les coordonnées logarithmiques avec lesquelles nous avons obtenu le meilleur ajustement.

Temps		J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J16	J18
Numération 10 <sup>6</sup> cellules/ml	T	2,65	6,59	10,24	12,62	14,85	14,93	16,47	19,50	11,70	19,96	18,28	17,23	15,30	16,40	16,30	8,80
	10	2,13	8,09	10,42	12,78	13,37	13,57	14,62	15,97	13,10	10,06	15,88	11,13	10,70	16,24	15,05	11,33
	50	2,47	6,6	10,57	11,31	13,20	13,75	14,00	11,85	13,30	12,56	12,28	15,18	15,38	15,10	15,45	15,10
Poids de matière sèche (mg)	T	1,18	1,14	4,00	3,75	5,48	6,13	6,82	9,15	8,73	9,2	12,63	9,72	13,36	18,85	11,33	19,97
	10	1,71	1,97	0,43	3,90	5,70	5,18	6,8	8,7	8,07	9,55	12,21	11,89	14,90	17,38	20,36	21,18
	50	1,5	1,61	0,97	2,70	4,97	3,60	6,84	8,07	7,90	9,79	13,74	10,69	15,73	18,0	20,83	22,12
Quantité de cadmium dans culture algale (ng)	T	26	47	74	34	26	33	61	43	43	53	78	35	30	38	28	48
	10	718	283	36	269	479	285	347	383	298	239	354	273	238	330	416	296
	50	2025	1343	503	1199	2241	1230	1484	1557	1082	1204	1662	1389	2831	2250	2104	1946
Concentration de cadmium dans algues (ng/mg)	T	22	41	18,5	9	4,7	5,4	8,9	4,75	5	5,8	6,2	3,6	2,25	2,04	2,44	2,4
	10	420	121	84	69	84	55	51	44	37	25	29	23	16	19	20	14
	50	1350	834	519	444	451	344	217	193	137	123	121	130	180	125	101	88

TABLEAU XXVII : EVOLUTION DE LA CONCENTRATION CELLULAIRE, DU POIDS DE MATIERE SECHE, DE LA QUANTITE DE CADMIUM DANS LA TOTALITE DE LA CULTURE ET DE LA CONCENTRATION EN CADMIUM DANS *Chlorella vulgaris*, EN FONCTION DU TEMPS ET EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE DU TOXIQUE DANS LE MILIEU

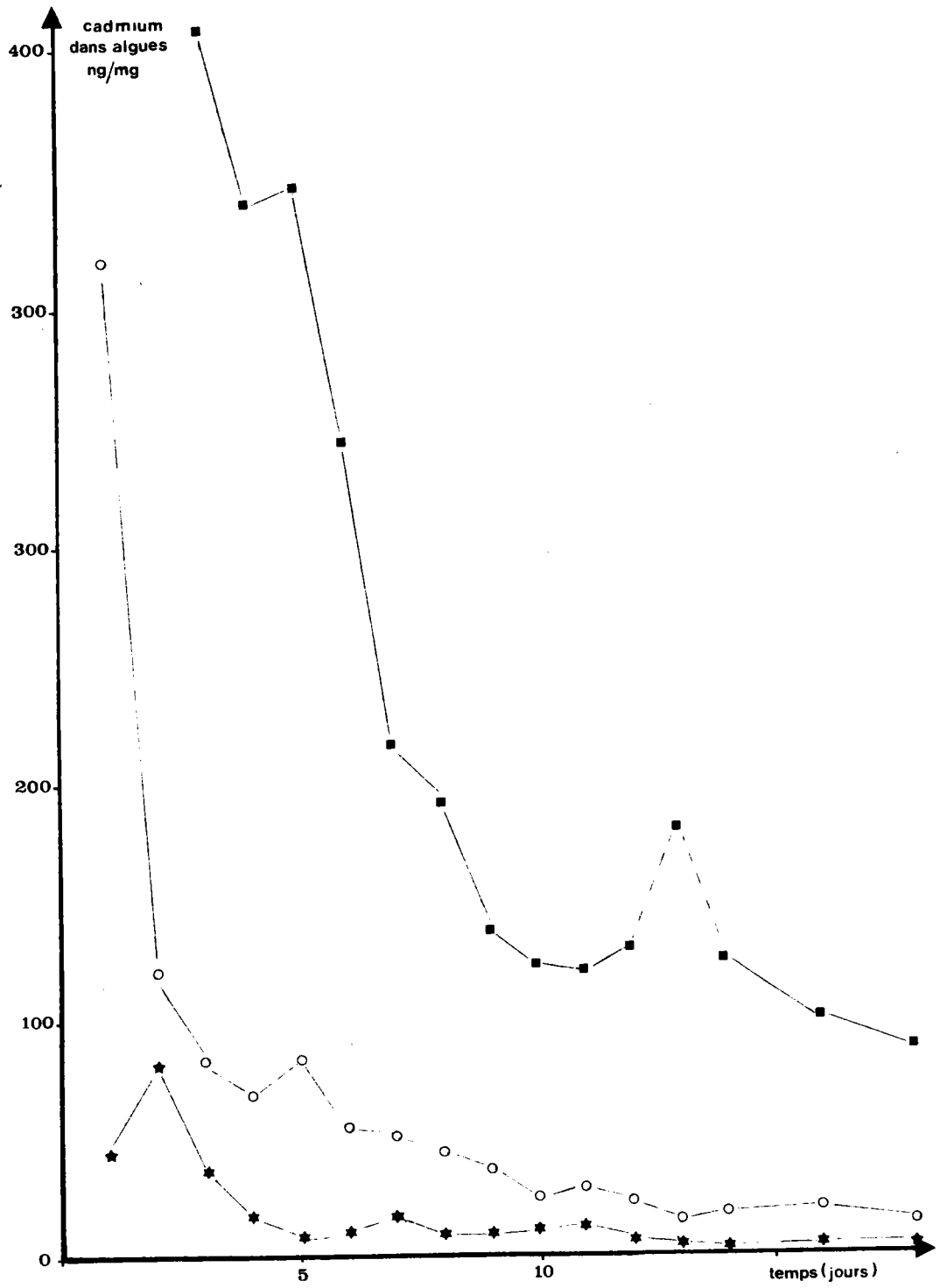


Figure 49: Accumulation du cadmium dans *Chlorella vulgaris* en fonction du temps.



Les fonctions puissance ajustées sont :

pour le témoin :  $y_T = 39 x^{-0,97}$

$$r = 0,898$$

$$t = 7,65$$

pour 10  $\mu\text{gCd/l}$  :  $y_{10} = 349 x^{-1,08}$

$$r = 0,976$$

$$t = 16,6$$

pour 50  $\mu\text{gCd/l}$  :  $y_{50} = 1579 x^{-0,99}$

$$r = 0,972$$

$$t = 15,5$$

Les droites correspondantes en coordonnées log.log sont représentées figure 50. Compte tenu du nombre de points ( $N = 16$ ), l'ajustement est significatif avec un risque inférieur à 1%, puisque les valeurs de  $t$

$$t = \frac{r}{\sqrt{1 - r^2}} \sqrt{n - 2}$$

calculées dans les 3 cas, sont toujours supérieures à 4,14 valeur théorique donnée par la table de  $t$  pour 14 degrés de liberté.

Il faut néanmoins émettre quelques réserves : si l'accumulation du cadmium dans les chlorelles semble suivre avec le temps une fonction puissance cette relation ne présente pas un caractère absolu. La variabilité biologique fait qu'un processus physiologique en relation avec un facteur de l'environnement ne pourra suivre strictement une fonction mathématique, mais ne pourra que s'en approcher.

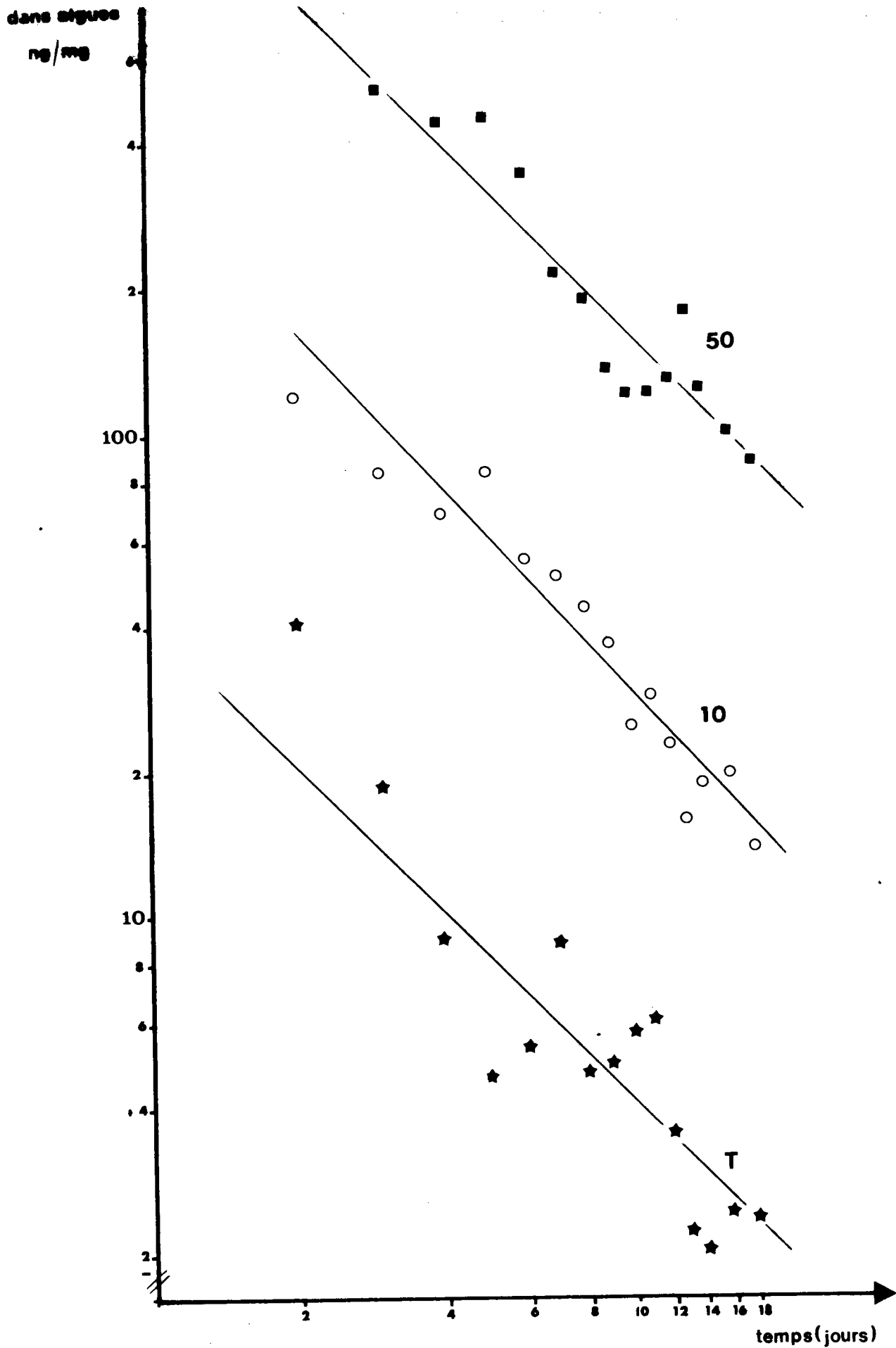


Figure 50: Accumulation du cadmium dans *Chlorella vulgaris* en fonction du temps- coordonnées logarithmiques.

De plus, la notion de concentration peut être critiquable dans le cas de ces cultures, car dans le temps, non seulement le cadmium peut varier, mais aussi la masse algale. C'est pourquoi, l'expression en quantité de l'accumulation du cadmium peut présenter quelque avantage ; la culture se développe en effet à partir de quelques cellules initiales, et c'est la population algale dans son ensemble qui est concernée. Ainsi, si nous prenons en compte les quantités totales de cadmium dans les cultures, aux différents jours, nous constatons que celles-ci semblent constantes. Il faut tenir compte des erreurs cumulables de la pesée, du dosage, et de la variabilité biologique qui peuvent expliquer les variations très aléatoires obtenues. C'est pourquoi on ne peut mettre en évidence en fonction du temps ni une augmentation ni une diminution du cadmium dans les populations algales, d'où vraisemblablement une certaine constance.

Nous avons alors fait la moyenne sur les 16 données obtenues et nous l'avons comparée aux quantités de cadmium se trouvant initialement dans le milieu (tableau XXVIII). Rappelons que le milieu témoin a été estimé en moyenne à 1,13  $\mu\text{g Cd/l}$ . On constate alors que le rendement d'accumulation du cadmium est maximum pour les témoins (96%), tandis que, à 10 ou à 50  $\mu\text{g/l}$ , il semble équivalent et égal à 65%.

concentration de Cd $\mu\text{g/l}$	Cd apporté par milieu (ng) volume de culture = 50 ml	moyenne de Cd retrouvé dans culture totale (ng)	rendement d'accumulation (%)
1,13 (=témoin)	45	43,5	96
10	500	325	65
50	2500	1628	65

Tableau XXVIII : Bilan de l'accumulation du cadmium sur *Chlorella vulgaris*

Le dosage du cadmium dans les filtrats, après passage des cultures au travers de membranes Millipore 0,45  $\mu$ , aurait permis de préciser la relation existant entre le cadmium présent dans les algues et dans le milieu en fonction du temps. La variabilité des résultats ne permet pas de mettre clairement en évidence un tel phénomène vu sa faible importance. Même au delà du 10<sup>ème</sup> jour, on ne peut pas conclure que le cadmium se relibère dans le milieu quand la culture vieillit, comme les courbes en fonction des concentrations dans les algues semblaient l'indiquer. En effet, pour les essais à 10  $\mu\text{g/l}$ , la concentration maximale de cadmium retrouvée dans les filtrats est de 1,75  $\mu\text{g/l}$ , et pour 50  $\mu\text{g/l}$ , elle est de 8  $\mu\text{g/l}$ .

En conclusion, on peut dire que c'est surtout une jeune population algale de *Chlorella vulgaris* qui a une grande capacité à accumuler le cadmium. En d'autres termes, les meilleures potentialités de fixation du cadmium par les cellules sont exploitées dès les premières heures de croissance de la population ; puis ensuite, la quantité de cadmium fixée n'augmente plus proportionnellement à la biomasse. La fine membrane des jeunes cellules doit vraisemblablement favoriser la pénétration du métal, tandis que l'épaisseur et la rigidité de la membrane des cellules plus âgées limitent, si ce n'est inhibent, ce phénomène d'absorption (LEFEVRE, 1942).

En outre, les concentrations de cadmium utilisées (10 et 50  $\mu\text{g/l}$ ) ne sont pas suffisamment élevées pour que l'inhibition en résultant diminue notablement l'accumulation du cadmium dans les algues. Selon MAC LEAN et WILLIAMSON (1977), l'entrée du cadmium dans les algues, résulterait de processus physiologiques, du type anabolisme, et non de processus physiques, tel un gradient de pH du à la photosynthèse. En effet, ces auteurs ont montré que la lumière était indispensable à l'accumulation non négligeable du cadmium dans les algues, et que l'utilisation d'inhibiteur de la synthèse protéique (cycloheximide) stoppait l'accumulation du métal. L'entrée du cadmium dans les cellules semble donc bien être un mécanisme actif. Sur l'algue rouge *Porphyra umbilicalis*, il s'ont également mis en évidence une augmentation linéaire, dans les quelques dizaines d'heures suivant le début de l'intoxication. Mais ces résultats sont obtenus par l'intermédiaire du cadmium radioactif, <sup>109</sup>Cd, et nous pensons que, sans cette technique il est difficile d'apprécier avec justesse l'entrée du cadmium au début de la croissance d'une population algale, au moment où le phénomène semble le plus important.

Une autre possibilité permettant de connaître les variations dans le temps de l'accumulation du cadmium dans les algues, serait l'utilisation de cultures en continu, pour lesquelles la notion de concentration ne serait plus critiquable. Mais nous n'avons pu aborder la mise en place de ce type de culture dans le cadre de cette étude.

C'est pourquoi, dans le cas de cultures en masse, on ne peut estimer la relation entre la concentration en cadmium retrouvée dans les algues et celle dans le milieu, que pour des populations au même stade de développement.

## CHAPITRE II : ÉTUDES DE TOXICITÉ DU CADMIUM SUR LES DAPHNIES

De nombreux auteurs ont utilisé la daphnie (*Daphnia magna* Straus) pour des études de toxicité comparative ou non (NAUMANN, 1933 - ANDERSON, 1944, 1945, 1946, 1948 - FREEMANN et FOWLER, 1953 - DAVIDOW et SABATINO, 1954 - PFAFF, 1955 - BOYD, 1957 - LAGERSPETZ, 1958 - BRINGMANN et KÜHN, 1959, 1977 - HUBSCHMANN et ENGEL, 1965 - CROSBY et TUCKER, 1966 - MALACEA, 1966 - SANDERS et COPE, 1966 - FREAR et BOYD, 1967 - APOSTOL et VASSILIU, 1968 - BIESINGER et CHRISTENSEN, 1972 - LUNDHAL, 1973). Ils ont ainsi pu mettre en évidence les effets toxiques d'eaux, d'effluents et de produits les plus divers. Parmi ceux-ci on peut citer plus particulièrement les sels de métaux lourds et les pesticides.

Plus récemment, une norme expérimentale AFNOR T-903 01 (1974) a permis de standardiser et de normaliser en FRANCE ce type de test biologique sous le nom de "test-daphnie". Nous avons d'abord cherché à déterminer la CI 50-24h du nitrate de cadmium,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck pour analyse) selon cette norme. Compte-tenu de la quantité de bicarbonates (145mg/l) présente dans l'eau de dilution requise pour ce test, et afin d'éviter la formation d'un précipité de carbonate de cadmium, nous avons préféré utiliser une solution mère à 1g/l, puis une solution fille à 10mg/l faites toutes deux dans de l'eau bidistillée. Nous avons ensuite introduit, à l'aide d'une micropipette, les quantités de cadmium désirées dans l'eau de dilution riche en bicarbonates. Dans ces conditions, nous avons testé les concentrations allant de 10 à 130  $\mu\text{g}/\text{l}$  et trouvé une CI 50-24h moyenne de 71,5  $\mu\text{g}/\text{l}$ . LUNDHAL (1973) trouve une CI 50-24h de 73  $\mu\text{g}/\text{l}$  pour le cadmium sous forme de sulfate, mais il utilise des daphnies âgées de 0 à 72h et non des daphnies classées par leur âge et par leur taille. FOULQUIER et GRAUBY (1975) mentionnent, pour le chlorure et le sulfate de cadmium, des CI 50-24h respectives de 210 et 150  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Par ailleurs, nous avons réalisé une variante du test AFNOR en utilisant, non pas l'eau de dilution conseillée, mais l'eau de VOLVIC utilisée pour les élevages. Dans ce cas, la CI 50-24h moyenne

reste voisine de celle déjà trouvée (92  $\mu\text{g}/\text{l}$ ).

Nous avons résumé les résultats obtenus par divers auteurs pour différents sels de cadmium et des conditions expérimentales différentes de celles du test AFNOR (tableau XXIX). C'est ainsi que BRINGMANN et KUHN (1977) trouvent une CI 50-24h égale à 600  $\mu\text{g}/\text{l}$  (exprimée en  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), ce qui donne 219  $\mu\text{g}/\text{l}$  (exprimée en cadmium), valeurs assez éloignées de celles précédemment citées.

## 1. METHODES EXPERIMENTALES UTILISEES

La contamination des daphnies à partir du milieu environnant, organique et/ou inorganique, est en fait un phénomène vaste et complexe, que nous avons tenté de saisir à l'aide de nombreuses expérimentations ponctuelles en déterminant successivement les effets biologiques, puis les aspects analytiques de la contamination du nitrate de cadmium.

La première étape est toujours constituée par l'étude de l'évolution de la teneur en cadmium au niveau du biotope. Différentes voies de contamination peuvent ensuite être envisagées.

(1) Comportement du cadmium au niveau du biotope. Il convient d'étudier, en premier lieu, le comportement de la substance au niveau du biotope envisagé. Le critère analytique est dans ce cas utilisé pour suivre l'évolution de la teneur en cadmium. Il est important de réaliser cette étude dans des conditions identiques à celles utilisées pour la contamination proprement dite : température, photopériode, récipient, milieu de culture.

(2) Contamination par le milieu. Le milieu aquatique est le premier vecteur auquel on songe pour engendrer une éventuelle contamination des organismes dulçaquicoles. En ce qui concerne les daphnies, la

AUTEURS	ANDERSON (1948)	BRINGMANN et KUHN (1972)	BIESINGER et CHRISTENSEN (1972)	BRINGMANN et KUHN (1977)
<i>Conditions de l'élevage dont sont issus les animaux d'expérience</i>				
• ELEVAGE • MILIEU D'ELEVAGE • NOURRITURE	individuel eau de robinet  levure	de masse eau de rivière HAVEL Scenedesmus	de masse eau du Lac SUPERIEUR herbe séchée + granulés pour alevin de truite	de masse eau de robinet  <i>Chlorella vulgaris</i>
<i>Conditions expérimentales des tests</i>				
• AGE DES DAPHNIES • NOMBRE • EAU DE DILUTION UTILISEE • DURETE CALCULEE DE L'EAU (mg/l CaCO <sub>3</sub> ) • VOLUME FINAL DES TESTS (en ml) • TEMPERATURE • CONDITIONS DE LUMINOSITE	0-8 h  10 eau du Lac ERIE centrifugée  107  100  25°	0-24h  10 eau de la ri- vière HAVEL  215  10  23°	0-24h  10 eau du Lac SUPERIEUR  45  200  photopériode 16/8	0-24h  10 eau de robinet déchlorée  285  20  20-22°  obscurité
<i>Résultats</i>				
• CRITERE RETENU • TEMPS D'EXPOSI- TION • SEL TESTE • CI 50 (µg/l) • CI 50 (µg/l) • CI 100 (µg/l) • CL 50 (µg/l) EXPRIMEE EN	immobilité  64 h  chlorure  2,6  -  -  -  Cd Cl <sub>2</sub>	immobilité  48 h  chlorure  100  -  -  -  Cd <sup>++</sup>	immobilité complète ou mort  48 h  chlorure  -  -  65  Cd <sup>++</sup>	immobilité  24 h  nitrate  600  50  1800  -  Cd (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O

TABLEAU XXIX : RÉSUMÉ DES CONCENTRATIONS INHIBITRICES DE CADMIUM VIS-A-VIS DE LA DAPHNIE, OBTENUES PAR DIFFÉRENTS AUTEURS, DANS DIFFÉRENTES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES.



contamination peut s'effectuer soit par le milieu, soit par la nourriture, soit par les deux à la fois. Concernant plus particulièrement la contamination des daphnies par le milieu, il convient d'apporter quelques précisions : mis à part les expérimentations à court terme, il est exclu de procéder à des expérimentations plus longues sans assurer aux daphnies une source de nourriture, qui est dans notre cas des chlorelles. Le fait d'apporter le cadmium par le milieu signifie par conséquent que les chlorelles utilisées dans ce cas sont cultivées sans addition de cadmium. Avant de les fournir aux daphnies, elles sont centrifugées et lavées. Les milieux de culture des daphnies sont préparés. Le cadmium est ajouté dans les milieux de culture immédiatement avant d'y plonger les daphnies expérimentées. Le cadmium est ainsi fourni à chaque renouvellement du milieu, c'est-à-dire tous les 7 jours. Néanmoins pendant 7 jours, le cadmium peut emprunter, dans ce milieu, des voies différentes (adsorption ou absorption par les chlorelles, interaction avec d'autres particules...).

(3) Contamination par la nourriture. La contamination des daphnies par la nourriture se réalise par l'intermédiaire de chlorelles cultivées en présence de cadmium ; de ce fait, elles en accumulent une certaine quantité. Elles sont ensuite centrifugées, lavées, puis distribuées aux daphnies expérimentées dans un milieu de culture n'ayant pas, quant à lui, subi d'addition de cadmium. Il convient, là aussi, de préciser que le cadmium est apporté par la nourriture à chaque renouvellement de milieu, mais que durant 7 jours le cadmium peut employer d'autres voies par suite d'interactions, de désorption ou d'élimination, et par là-même, se retrouver libre dans le milieu.

(4) Contamination par le milieu et par la nourriture. Les chlorelles, servant de nourriture, sont dans ce cas préalablement intoxiquées à la même concentration de cadmium que celle à laquelle les daphnies expérimentées vont être en contact, par suite de l'addition de cadmium dans le milieu d'élevage. Le cadmium est donc apporté à la fois par les chlorelles et par le milieu.

(5) Remarques concernant le matériel biologique utilisé.

Nous avons utilisé, pour nos études de toxicité, des daphnies âgées de 0 à 24 h comme le proposent BRINGMANN et KUHN (1959, 1977).

Pour ce faire, une journée avant chaque expérience, les élevages sont triés. Les daphnies mères porteuses d'oeufs sont sélectionnées. Au jour de l'expérience, c'est-à-dire 24 heures plus tard, toutes les jeunes daphnies récupérées sont âgées de 0 à 24 heures. Celles-ci sont ensuite placées dans l'eau de VOLVIC pour être lavées et débarrassées de tous les détritits avant leur mise en expérience.. Nous avons vérifié que les jeunes daphnies âgées de 0 à 24 heures avaient une CI 50-24h avec le bichromate de potassium comprise entre 0,9 et 1,5mg/l. Ce contrôle de la sensibilité du matériel biologique a été fait périodiquement selon le protocole de la norme AFNOR T-90301 (1974).

Par ailleurs, les conditions opératoires sont identiques à celles déjà mentionnées pour les élevages, à savoir :

- . Lavage des algues avec du milieu oligo L.C. frais.
- . Milieu constitué de milieu oligo L.C. et de VOLVIC à raison de 4 volumes de milieu oligo L.C. pour 6 volumes de VOLVIC.
- . Ration alimentaire égale à  $1.10^6$  chlorelles par daphnie par heure.
- . Changement des milieux tous les 7 jours.

La seule modification que nous avons apportée réside dans le fait que ces expériences sont réalisées avec seulement 500ml de milieu pour 20 daphnies.

(6) Remarques concernant le sel utilisé. Les études de toxicité vis-à-vis des daphnies n'ont porté que sur un sel de cadmium, à savoir le nitrate de cadmium  $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$  (MERCK pour analyse). Les dilutions nécessaires pour les expériences sont faites à partir d'une solution à 1g/l (en cadmium) conservée à 4°C en flacon de polyéthylène.

## 2. COMPORTEMENT DU CADMIUM DANS LE BIOTOPE

L'évolution de la concentration de cadmium dans le biotope a été suivie en absence et en présence de chlorelles.

### 2.1. En absence de chlorelles

Dans les conditions expérimentales précédemment définies, la concentration du cadmium a été suivie pendant 7 jours sur 2 séries de cristallisoirs pour des concentrations allant de 0 à 15  $\mu\text{g}/\text{l}$ . La durée de 7 jours correspond à l'intervalle de temps séparant deux changements consécutifs de milieu.

Les concentrations moyennes de cadmium retrouvées au début de l'étude et après 1, 2, 5 et 7 jours sont rassemblées sur la fig.51. On observe qu'il n'y a pratiquement pas de variation en fonction du temps. Dans le tableau XXX, nous pouvons comparer les concentrations moyennes retrouvées aux concentrations introduites calculées en tenant compte de la concentration apportée par le milieu oligo L.C. (200ml).

concentration de cadmium introduite en $\mu\text{g}/\text{l}$	concentration moyenne de cadmium retrouvée en $\mu\text{g}/\text{l}$
0,60	0,41
5,60	4,07
10,60	7,14
15,60	10,34

Tableau XXX : Comparaison entre les concentrations de cadmium dans le milieu calculées par les quantités de métal introduites, et celles obtenues par le dosage.

Pour les 4 doses envisagées, les concentrations de cadmium retrouvées sont toujours inférieures à celles introduites. De plus, les rapports de la concentration retrouvée à la concentration introduite diminuent lorsque les concentrations de cadmium augmentent de 0 à 15  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Ces 2 observations nous ont amenés à envisager 2 hypothèses permettant d'expliquer cette différence.

- En premier lieu, le cadmium en solution dans le milieu expérimental se trouve en présence de bicarbonates apportés par l'eau de VOLVIC (18,6mg dans 300ml). Or, compte-tenu du pH (7,25) et de l'équilibre bicarbonates-carbonates, la précipitation de cadmium sous forme de carbonate de cadmium insoluble n'est pas possible dans nos conditions expérimentales. En effet, les concentrations très faibles de cadmium dans le milieu, ainsi que les faibles concentrations de carbonates donnent un produit de concentrations toujours inférieur au produit de solubilité  $K_s$ , calculé d'après STUMM et MORGAN (1970).

- En second lieu, certains auteurs (KING et coll., 1974) estiment préférable d'employer des récipients en polyéthylène car le cadmium aurait moins tendance à s'y adsorber que sur les récipients en verre. Cette dernière possibilité semble l'explication la plus vraisemblable de la différence constatée entre la concentration de cadmium introduite et la concentration de cadmium retrouvée. BIESINGER et CHRISTENSEN (1972) constatent des faits semblables : ils retrouvent en moyenne 23 et 43  $\mu\text{g}/\text{l}$  en introduisant respectivement 25 et 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium. PALLY et FOULQUIER (1975) retrouvent 26  $\mu\text{g}/\text{l}$  en introduisant 30  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium.

## 2.2. En présence de chlorelles

L'évolution de la concentration de cadmium a été suivie sur 2 série de cristallisoirs avec 4 concentrations (0, 5, 10, 15  $\mu\text{g}/\text{l}$ ). Le tableau XXXI fournit les concentrations de cadmium introduites (calculées en tenant compte du milieu oligo L.C.) et les concentrations moyennes de cadmium retrouvées aux  $J_0$  et  $J_7$  de l'expérience.

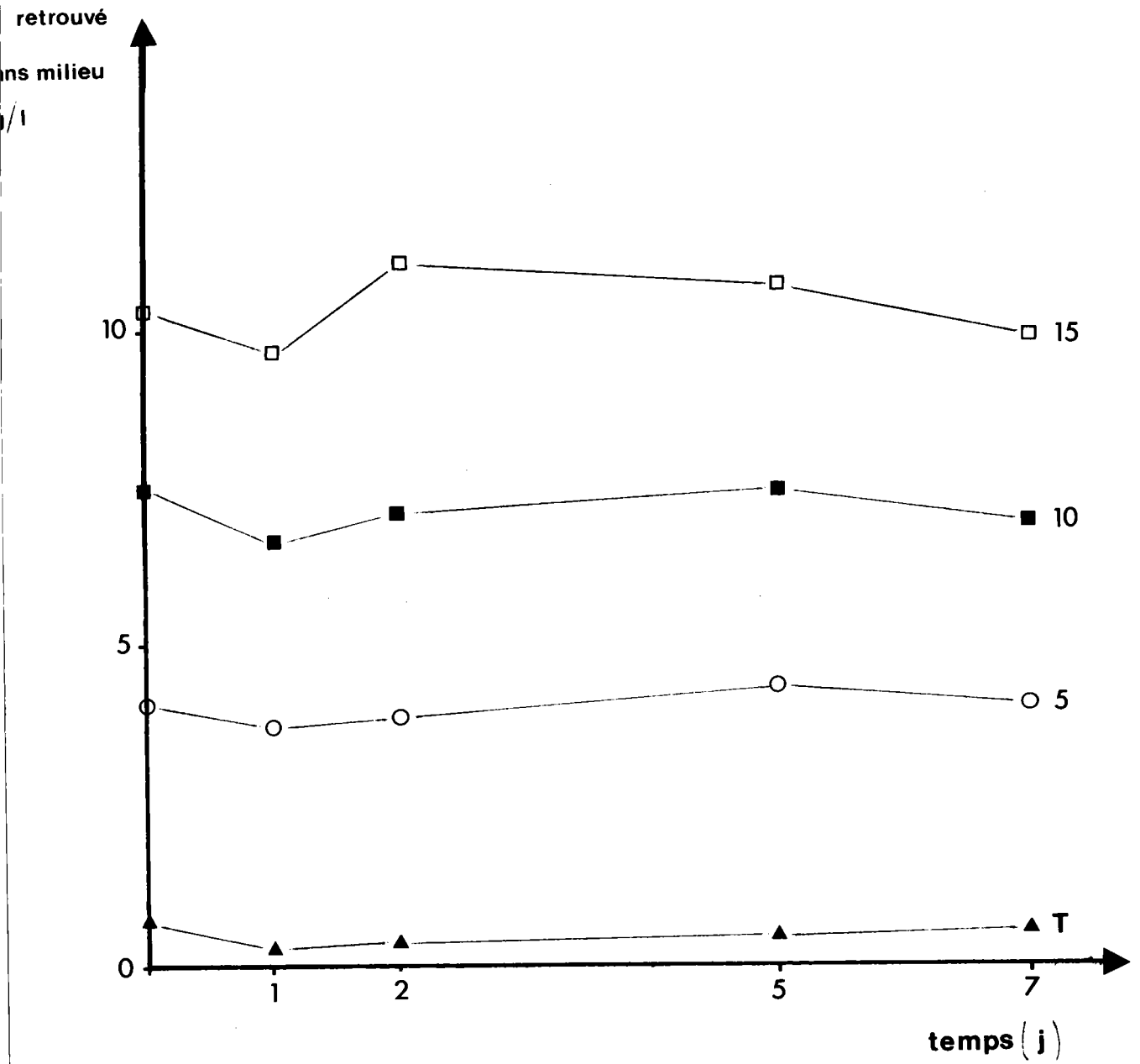


Figure 51: Evolution du cadmium dans le biotope des daphnies en fonction du temps et des concentrations étudiées.

concentration de cadmium introduite en $\mu\text{g}/\text{l}$	concentration de cadmium retrouvée	
	$J_0$	$J_7$
0,60	0,35	traces
5,60	3,95	2,40
10,60	6,85	4,00
15,60	10,05	6,20

Tableau XXXI : Comparaison entre le cadmium introduit, en tenant compte du milieu oligo-LC, et le cadmium retrouvé à  $J_0$  et  $J_7$

On observe une nette diminution de la concentration de cadmium entre  $J_0$  et  $J_7$  (d'environ 40%). Ce fait ne semble pas dû à l'action des carbonates apportés soit par le  $\text{CO}_2$  atmosphérique, soit par la respiration des algues, mais à la fixation du cadmium par les algues, comme nous l'avons étudié au chapitre précédent. Si le pourcentage de fixation n'est pas aussi élevé dans ce cas (40% au lieu de 65%), c'est sans doute par le manque d'agitation du milieu.

### 3. TESTS AIGUS

Dans l'étude d'une substance chimique sur une espèce, il est nécessaire de tester d'abord des concentrations relativement fortes susceptibles de donner des effets à court terme. Cette étude préalable permet ensuite d'envisager des concentrations plus faibles, responsables d'effets à plus long terme. Compte-tenu de son aspect préliminaire, nous n'avons envisagé, dans cette étude, que les voies de contaminations par le milieu et par la nourriture.

### 3.1. Contamination par le milieu

Ces expérimentations réalisées pour des concentrations de cadmium allant de 20 à 150  $\mu\text{g}/\text{l}$  se caractérisent par un point commun : elles ont toutes une durée inférieure à 28 jours, du fait de la mort trop rapide des daphnies en expérience. Nous n'envisagerons donc dans cette étude qu'un seul critère biologique : la mortalité, ou plutôt l'immobilité, notion fréquemment utilisée par les auteurs. A partir du nombre de morts observés chaque jour, nous avons déterminé, par la méthode des vivants et des morts cumulés, les CI 50-24, 48, 72 et 96 heures, respectivement égales à 92, 57,5, 40 et 37  $\mu\text{g}/\text{l}$  (fig. 52). Pour les deux plus faibles concentrations, 30 et 20  $\mu\text{g}/\text{l}$ , le TL 50 (temps léthal de 50% de la population) est environ de 162 et 192 heures respectivement. Pour 20  $\mu\text{g}/\text{l}$ , la durée totale de l'expérience est de 20 jours, ce qui correspond au TL 100 (temps léthal de 100% de la population) ; malgré tout, on ne constate aucune naissance de jeunes daphnies. Pour des concentrations égales ou supérieures à 20  $\mu\text{g}/\text{l}$ , les jeunes daphnies mises au départ de l'expérience n'ont donc aucun pouvoir de reproduction.

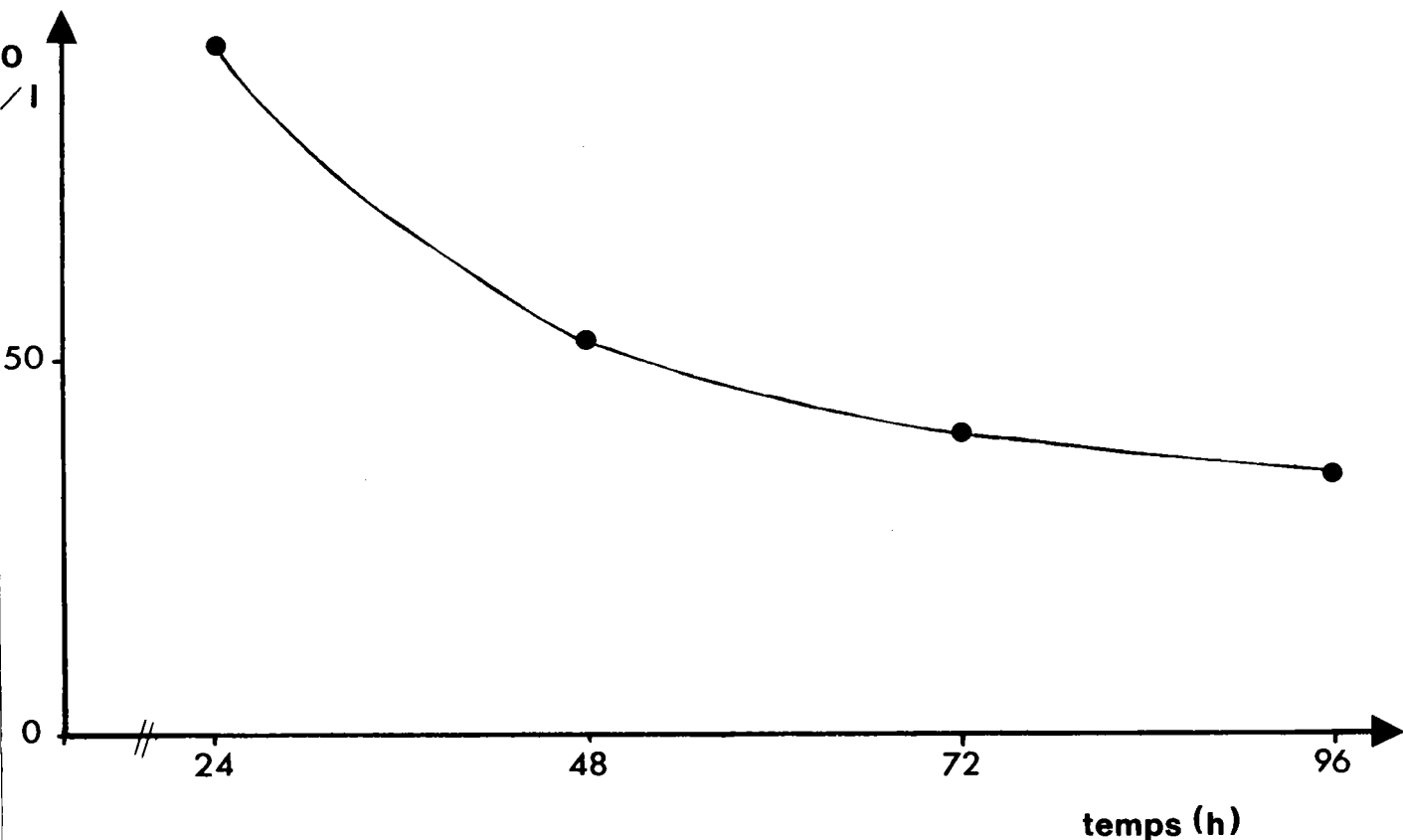


Figure 52: Evolution des CI<sub>50</sub> du cadmium sur la daphnie en fonction du temps- Test aigu- contamination par le milieu.

La CI 50-24h obtenue est ainsi comparable à celles obtenues précédemment à l'aide du test AFNOR. Le même test a été effectué pendant 48 heures pour calculer une CI 50-48h dans les conditions du test AFNOR. Nous avons trouvé une valeur comprise entre 10 et 20  $\mu\text{g}/\text{l}$  qui n'est plus comparable avec la valeur trouvée (57,5  $\mu\text{g}/\text{l}$ ).

### 3.2. Contamination par la nourriture

Du fait de la courte durée de ces expérimentations, seule la mortalité a été considérée. Les algues sont intoxiquées à 500, 1000 et 2000  $\mu\text{g Cd}/\text{l}$ .

On observe que les chlorelles cultivées à 2000  $\mu\text{g}/\text{l}$  provoquent la mort de toutes les daphnies en 3 jours. Pour les concentrations plus faibles, le TL 100 augmente. A partir de ces quelques données, nous avons tenté de déterminer par la méthode des vivants et des morts cumulés les CI 50, 24, 48, 72 et 96 heures. On observe ainsi, qu'il faut des chlorelles cultivées à plus de 2000  $\mu\text{g}/\text{l}$  pour atteindre la CI 50-24h ; les CI 50 -48, 72 et 96 heures correspondent respectivement à des concentrations de l'ordre de 1450, 1050 et 800  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

### 3.3. Discussion

Bien que sommaires et préliminaires, ces quelques expérimentations nous permettent de déterminer les domaines de concentrations intéressants pour l'étude des effets à long terme. Dans le cas de la contamination par le milieu, il faudra se placer à des concentrations inférieures à 20  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Dans le cas de la contamination par la nourriture, il faudra se placer à des concentrations inférieures à 500  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

On observe que pour des temps courts, ne dépassant pas 4 jours, et selon la voie utilisée, les domaines de concentrations toxiques sont fort différents. Ainsi, il est nécessaire de cultiver des chlorelles



à des concentrations plus de 20 fois supérieures aux concentrations introduites dans le milieu des daphnies, pour avoir le même effet.

A cet égard, il nous a semblé intéressant de faire le rapport des CI 50-48, 72 et 96 heures obtenues dans les 2 conditions étudiées (tableau XXXII).

	contamination par la nourriture	contamination par le milieu	Rapport
CI 50 48h (en $\mu\text{g}/\text{l}$ )	1450	57,5	25,22
CI 50 72h (en $\mu\text{g}/\text{l}$ )	1050	40	26,25
CI 50 96h (en $\mu\text{g}/\text{l}$ )	800	37	21,62

Tableau XXXII : Rapport entre les CI 50 calculées pour les 2 voies de contamination étudiées

Les rapport obtenus, relatifs aux temps de 48 et 72h sont du même ordre de grandeur. Tandis que pour 96h, le rapport est plus faible, ce qui semble indiquer que plus grande est la durée du test, plus faible sera la différence entre les effets du milieu seul et ceux dus à la nourriture intoxiquée.

#### 4. TEST A MOYEN TERME

Cette étude a été réalisée pour les concentrations de cadmium 5, 10 et 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  administrées selon 3 conditions différentes, à savoir par le milieu, par la nourriture et par les deux à la fois, comme nous l'avons déjà expliqué. Les concentrations envisagées dans cette étude permettent des expérimentations d'une durée de 28 jours, ce qui offre la possibilité d'envisager dans ce cas plusieurs effets biologiques parallèlement à l'effet analytique.

#### 4.1. Contamination par le milieu

##### . Effets biologiques

Les effets biologiques envisagés sont au nombre de trois : la mortalité définie par l'immobilité, la natalité exprimée par le taux de reproduction et la croissance déterminée par le poids de matière sèche. Les résultats complets relatifs aux deux premiers critères sont donnés dans le tableau XXXIII et les principaux résultats, auxquels sont ajoutés ceux concernant le poids de matière sèche, sont rassemblés dans le tableau XXXIV. Nous y avons également figuré, pour comparaison, les résultats obtenus pour les témoins. On constate, tout d'abord, que la mortalité observée après 28 jours n'est pas très élevée, étant au maximum de 20% pour la plus forte concentration utilisée. D'une concentration à l'autre, les variations sont faibles et non significatives, bien que la mortalité augmente légèrement parallèlement à la concentration. Ce paramètre ne semble pas être suffisamment sensible pour des doses aussi faibles.

Par contre, l'action des concentrations croissantes de cadmium sur la natalité semble plus nette. Lorsque la concentration de cadmium augmente, le taux de reproduction diminue. Le nombre total de petits produits, le taux de reproduction total par jour et le nombre de jours de ponte diminuent également. Les variations du taux de reproduction d'une concentration à l'autre sont relativement importantes : déjà pour 5  $\mu\text{g}/\text{l}$ , on observe une inhibition de 33%, alors que pour 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  celle-ci est de 60%.

Les poids de matière sèche obtenus traduisent également l'action inhibitrice du cadmium sur la croissance. Entre 0 et 5  $\mu\text{g}/\text{l}$ , la diminution est encore plus grande que précédemment, mais les variations entre 5, 10 et 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  sont plus faibles. La figure 53 traduit, sur un même graphique, les évolutions de ces trois paramètres biologiques pour 0, 5, et 15  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Temps en jours	5			10			15		
	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de reproduction/jour	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de reproduction/jour	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de reproduction/jour
J 0	20			20			20		
1	20			20			20		
2	20			20			20		
3	20			20			20		
4	20			19			19		
5	19			19			19		
6	19			19			19		
7	19			19			19		
8	19			19			19		
9	19			19			19		
10	19			19			19		
11	19	153	8.05	18			18		
12	19	40	2.11	18	47	2.61	18		
13	19	41	2.16	18	16	0.89	18	56	3.11
14	19	76	4.00	18	3	0.17	18	15	0.83
15	19	116	6.11	18	10	0.56	18	17	0.94
16	19	3	0.16	18	31	1.72	18	49	2.72
17	19	27	1.42	18	61	3.39	18	3	0.17
18	19	64	3.37	18	36	2.00	18	79	4.39
19	18	100	5.26	18	41	2.28	18	64	3.56
20	18	16	0.89	17	56	3.29	17	8	0.44
21	18	77	4.28	17	112	6.59	17	47	2.76
22	18	188	10.40	17	4	0.24	17	96	5.65
23	18	42	2.33	17	56	3.99	17	17	1.00
24	18	24	1.33	17	25	1.47	16	23	1.35
25	18	86	4.78	17	96	5.65	16	41	2.56
26	18	162	9.00	17	45	2.65	16	32	2.00
27	18	12	0.67	17	119	7.00	16	13	0.81
28	18	17	0.94	17	57	3.35	16	59	3.69
$\Sigma$	-	1244	67.26	-	790	47.15	-	619	35.98

**TABLEAU XXXIII : ÉVOLUTION DE LA MORTALITÉ ET DE LA NATALITÉ DES DAPHNIES PENDANT 28 JOURS AUX TROIS CONCEN-  
TRATIONS TESTÉES - CONTAMINATION PAR LE MILIEU.**

Concentrations de cadmium en $\mu\text{g}/\text{l}$	0	5	10	15
Pourcentage de mortalité	5	10	15	20
Nombre total total de petits	1997	1244	790	619
Taux de reproduction total	101,26	67,26	47,15	35,98
Nombre de jours de ponte	18	18	17	16
Taux de reproduction	5,63	3,74	2,77	2,25
Pourcentage d'inhibition du taux de reproduction par rapport au témoin	-	34	51	60
Poids moyen de matière sèche en $\mu\text{g}$	560	358	333	321
Pourcentage de diminution du poids de matière sèche par rapport au témoin	-	36	41	43

TABLEAU XXXIV : VALEURS DES DIFFÉRENTS CRITÈRES ÉTUDIÉS, APRÈS 28 JOURS D'EXPOSITION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE CADMIUM INTRODUITE DANS LE MILIEU.

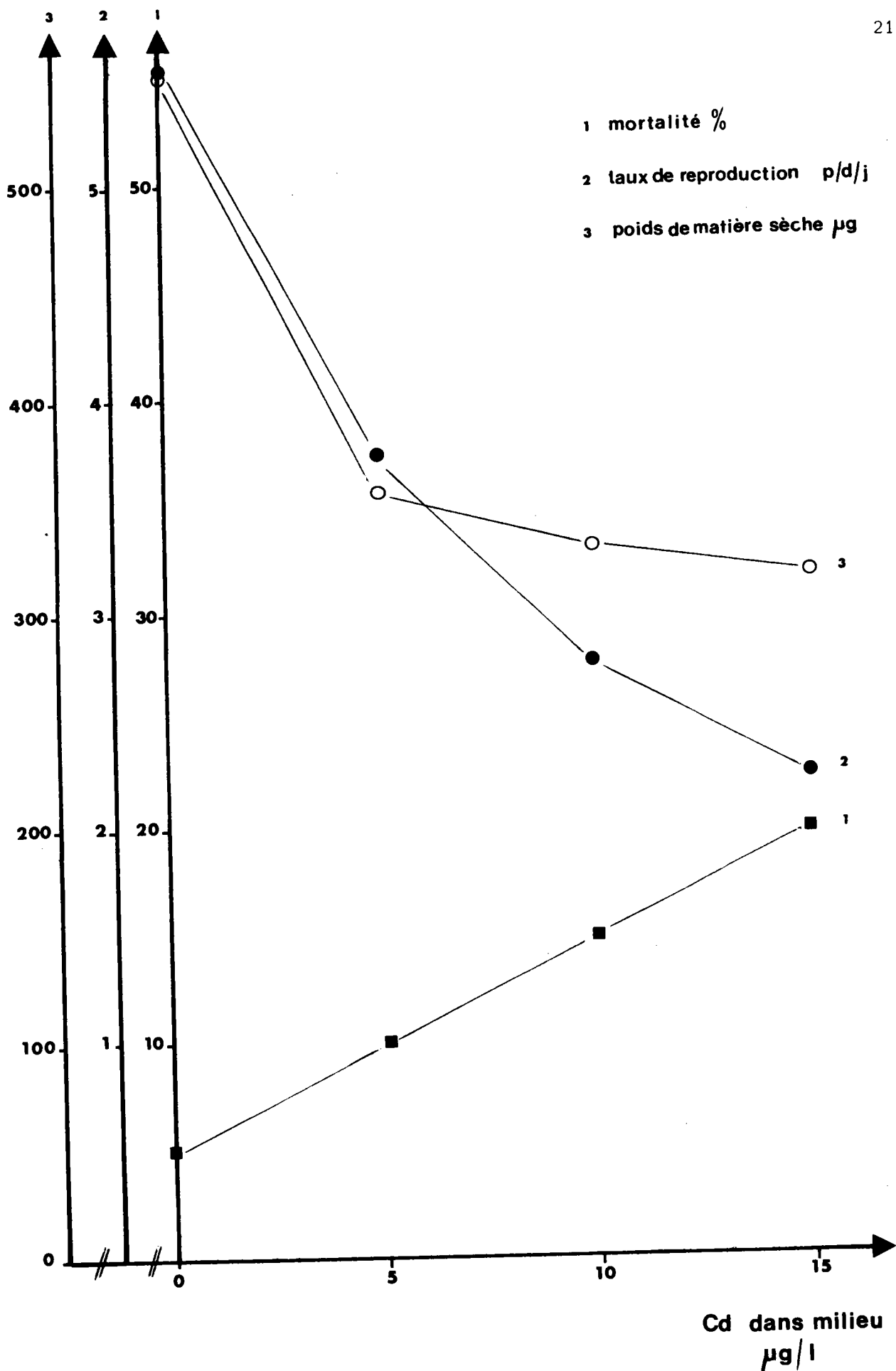


Figure 53: Evolution de la mortalité, du taux de reproduction et du poids de matière sèche sur la daphnie - Test à moyen terme - Contamination du cadmium par le

. Résultats analytiques

Après 28 jours d'expérimentation, le dosage du cadmium contenu dans les daphnies est effectué. Le tableau XXXV rassemble ces résultats, tout en rappelant la valeur obtenue pour les témoins.

Concentration en $\mu\text{g}/\text{l}$	0	5	10	15
cadmium retrouvé dans les daphnies (en $\text{ng}/\text{mg}$ de matière sèche)	3,2	21	24,7	32,7

Tableau XXXV : Concentration du cadmium retrouvé dans les daphnies en  $\text{ng}/\text{mg}$  de matière sèche, après 28 jours d'intoxication à 5, 10 et 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  introduit dans le milieu.

La quantité de cadmium retrouvée dans les organismes augmente en fonction de la concentration de cadmium introduite. Cette variation est importante entre 0 et 5  $\mu\text{g}/\text{l}$ , mais semble linéaire entre 5 et 15  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

. Conclusions

Il convient de souligner d'abord que les résultats qui viennent d'être présentés sont des moyennes provenant d'un nombre d'expérimentations trop peu nombreuses pour pouvoir satisfaire à un quelconque traitement statistique, ce qui explique l'absence de tout calcul d'écart-type ; toutefois, la variabilité a paru rester dans des limites acceptables. Le calcul statistique a, par contre, été réalisé en ce qui concerne les témoins (voir p 128 et p 132) où le nombre d'expériences était suffisant. Un certain nombre de tendances se dégagent pour les différents effets envisagés.

Alors que nous avons constaté pour 20  $\mu\text{g}/\text{l}$  une mortalité totale après 20 jours, l'introduction de 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium dans le milieu se traduit après 28 jours par une assez faible mortalité (20%). Ces deux faits expérimentaux suggèrent qu'il existe, entre 15 et 20  $\mu\text{g}/\text{l}$ , une concentration critique pour laquelle le TL 100 est de 28 jours. D'autres auteurs situent cette concentration légèrement plus bas : FOULQUIER et GRAUBY (1975) observent qu'un élevage de daphnies (conditions non précisées), contenant 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium dans le milieu, ne survit pas plus de 20 jours. BIESINGER et CHRISTENSEN (1972) notent une CL 50 3 semaines de 5  $\mu\text{g}/\text{l}$  (avec du chlorure de cadmium). LU et coll. (1975) ne réussissent pas à garder vivantes les daphnies introduites dans leur microécosystème, même pour des concentrations de 4  $\mu\text{g}/\text{l}$  dans l'eau. Néanmoins, nos résultats montrent que dès que l'on introduit 5  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium dans le milieu, la natalité et la croissance sont sévèrement affectées. La natalité paraît être un meilleur reflet de l'action du cadmium que la croissance. L'inhibition de 50% du taux de reproduction se situe aux environs de 10  $\mu\text{g}/\text{l}$ , alors que pour BIESINGER et CHRISTENSEN (1972), elle est de 0,7  $\mu\text{g}/\text{l}$  (avec du chlorure de cadmium). On constate que les concentrations trouvées pour ces derniers auteurs sont plus faibles que les nôtres, que ce soit en ce qui concerne la mortalité ou la natalité. Ces différences peuvent s'expliquer par les concentrations de cadmium effectivement retrouvées, et qui sont plus faibles que celles introduites (cf. p211). Elles peuvent aussi s'expliquer par des conditions expérimentales différentes, comme par exemple le type de nourriture employée.

Les effets biologiques constatés sont confirmés par les résultats analytiques. Plus la mortalité augmente, plus le taux de reproduction et le poids de matière sèche diminuent, et plus la quantité de cadmium retrouvée dans les organismes augmente.

La figure 54 illustre la relation effet analytique/effets biologiques. Au risque d'erreur de 1%, aucun paramètre biologique n'est significativement lié aux résultats analytiques, en raison du faible nombre de degré de liberté. Toutefois, au risque d'erreur de 2%, le taux de reproduction est corrélé aux résultats analytiques de façon significative ; c'est d'ailleurs l'ajustement linéaire qui possède le meilleur coefficient de corrélation ( $r = 0,988$ ).

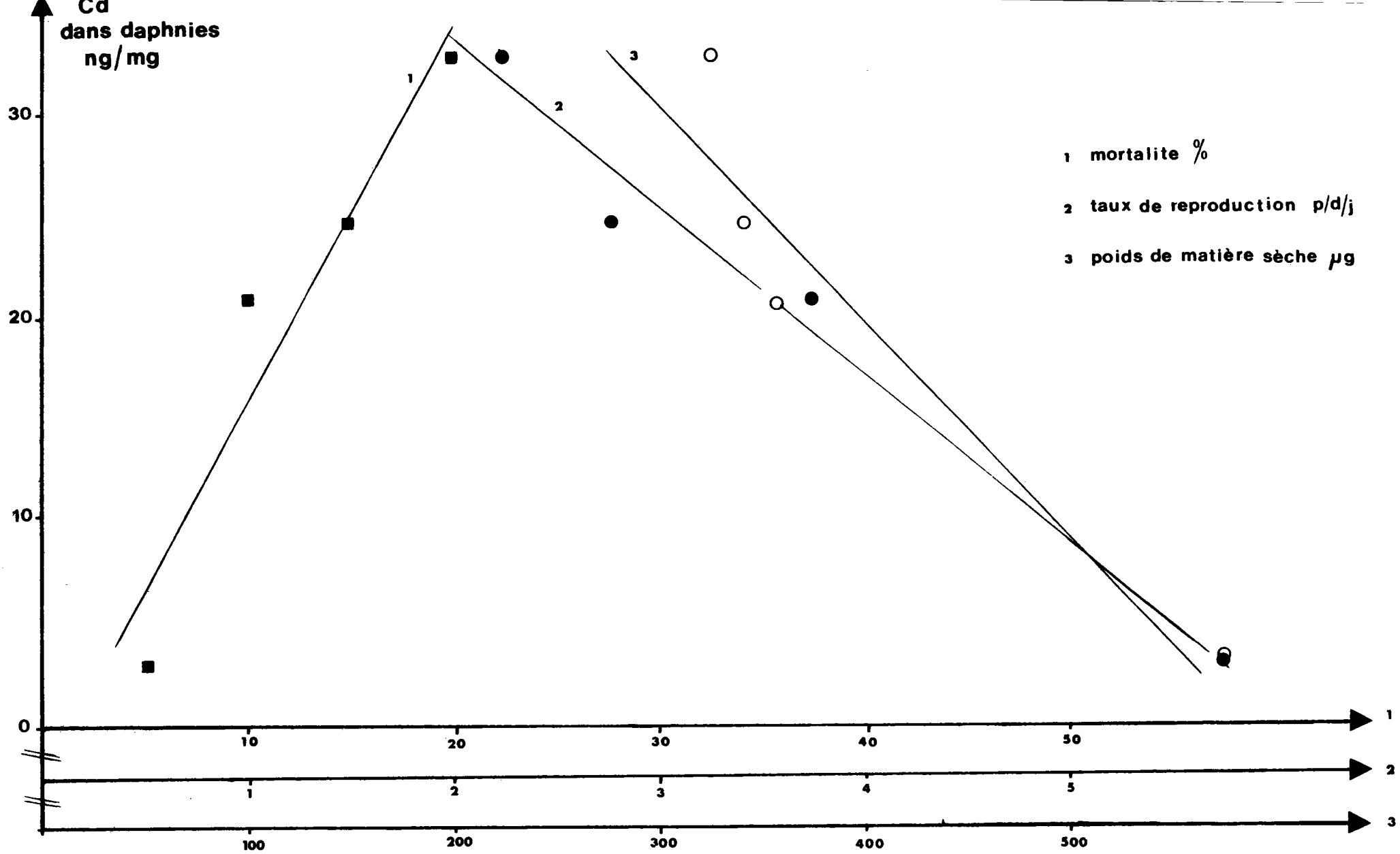


Figure 54: Relation entre effets biologiques et effet analytique sur la daphnie-  
 Test à moyen terme- contamination du cadmium par le milieu.



## 4.2. Contamination par la nourriture

Le principe de cette étude peut être ici brièvement rappelé : les chlorelles sont cultivées en présence de différentes concentrations de cadmium, de ce fait elles en accumulent une certaine quantité ; elles sont ensuite fournies aux daphnies expérimentées. Le cadmium leur est donc uniquement apporté par les chlorelles puisqu'il n'y a pas d'autre addition de cadmium dans le milieu. Dans l'exposé des résultats qui va suivre, nous nous réfèrerons aux concentrations introduites dans les cultures d'algues.

### . Effets biologiques

Le tableau XXXVI rend compte de l'évolution jour par jour de la mortalité et de la natalité, dont les principaux résultats, auxquels nous avons ajouté les résultats des témoins et du poids moyen de matière sèche, sont rassemblés dans le tableau XXXVII. La figure 55 regroupe sur un même graphique l'évolution des trois critères biologiques en fonction des concentrations de cadmium dans le milieu des algues. La mortalité est faible, égale au témoin pour  $5 \mu\text{g}/\text{l}$ , légèrement supérieure pour les deux autres concentrations. La variation du pourcentage de mortalité n'en demeure pas moins peu significative par rapport au témoin. Le taux de reproduction décroît lorsque la concentration de cadmium augmente, mais il reste malgré tout inférieur à 50%, même dans les essais à  $15 \mu\text{g}/\text{l}$ .

Le poids de matière sèche décroît également en fonction des concentrations croissantes de cadmium. Les variations paraissent toutefois moins importantes que celles du taux de reproduction, mais confirment l'action inhibitrice du cadmium sur la croissance des daphnies.

### . Résultats analytiques

Les concentrations de cadmium retrouvées dans les daphnies nourries par des chlorelles intoxiquées pendant 28 jours, sont données par le tableau XXXVIII, auquel est ajoutée la valeur du témoin

Temps en jours	5			10			15		
	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de reproduction/jour	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de reproduction/jour	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de reproduction/jour
J 0	20			20			20		
1	20			20			20		
2	20			20			20		
3	20			20			20		
4	20			20			20		
5	20			20			20		
6	20			19			20		
7	20			19			20		
8	20			19			20		
9	20			19			20		
10	20			19			20		
11	20	33	1.65	19	93	4.89	20	26	1.30
12	20	69	3.45	19	36	1.89	20	33	1.65
13	20	20	1.00	19	6	0.84	20	110	5.50
14	20	67	3.35	18	125	6.58	20	18	0.90
15	20	28	1.40	18	100	5.56	20	5	0.25
16	20	179	8.95	18	33	1.83	20	290	14.50
17	20	153	7.65	18	21	1.17	20	47	2.35
18	20	43	2.15	18	172	9.56	20	12	0.60
19	19	225	11.25	18	135	7.50	20	36	1.80
20	19	70	3.68	18	55	3.06	20	260	13.00
21	19	118	6.21	18	58	3.22	20	0	0
22	19	40	2.11	18	113	6.28	19	59	2.95
23	19	18	0.95	18	63	3.50	19	46	2.42
24	19	237	12.47	18	17	0.94	18	2	0.11
25	19	132	6.95	17	124	6.89	17	11	0.61
26	19	50	2.63	17	86	5.06	17	43	2.53
27	19	37	1.95	17	73	4.29	17	90	5.29
28	19	45	2.37	17	38	2.24	17	21	1.24
<b>Σ</b>	-	1564	80.17	-	1358	75.30	-	1109	57.00

TABLEAU XXXVI : ÉVOLUTION DE LA MORTALITÉ ET DE LA NATALITÉ DES DAPHNIES PENDANT 28 JOURS AUX TROIS CONCENTRATIONS TESTÉES - CONTAMINATION PAR LA NOURRITURE

Concentrations de cadmium en $\mu\text{g}/\text{l}$	0	5	10	15
Pourcentage de mortalité	5	5	15	15
Nombre total de petits	1997	1564	1358	1109
Taux de reproduction total	101.26	80.17	75.30	57
Nombre de jours de ponte	18	18	18	18
Taux de reproduction	5.63	4.45	4.18	3.17
Pourcentage d'inhibition du taux de reproduction par rapport au témoin	-	21	26	44
Poids moyen de matière sèche en $\mu\text{g}$	560	488	454	423
Pourcentage de diminution du poids de matière sèche par rapport au témoin	-	13	19	24

TABEAU XXXVII : VALEURS DES DIFFÉRENTS CRITÈRES ÉTUDIÉS, APRÈS 28 JOURS D'EXPOSITION, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INTRODUITE DANS LE MILIEU DE CULTURE ALGAL

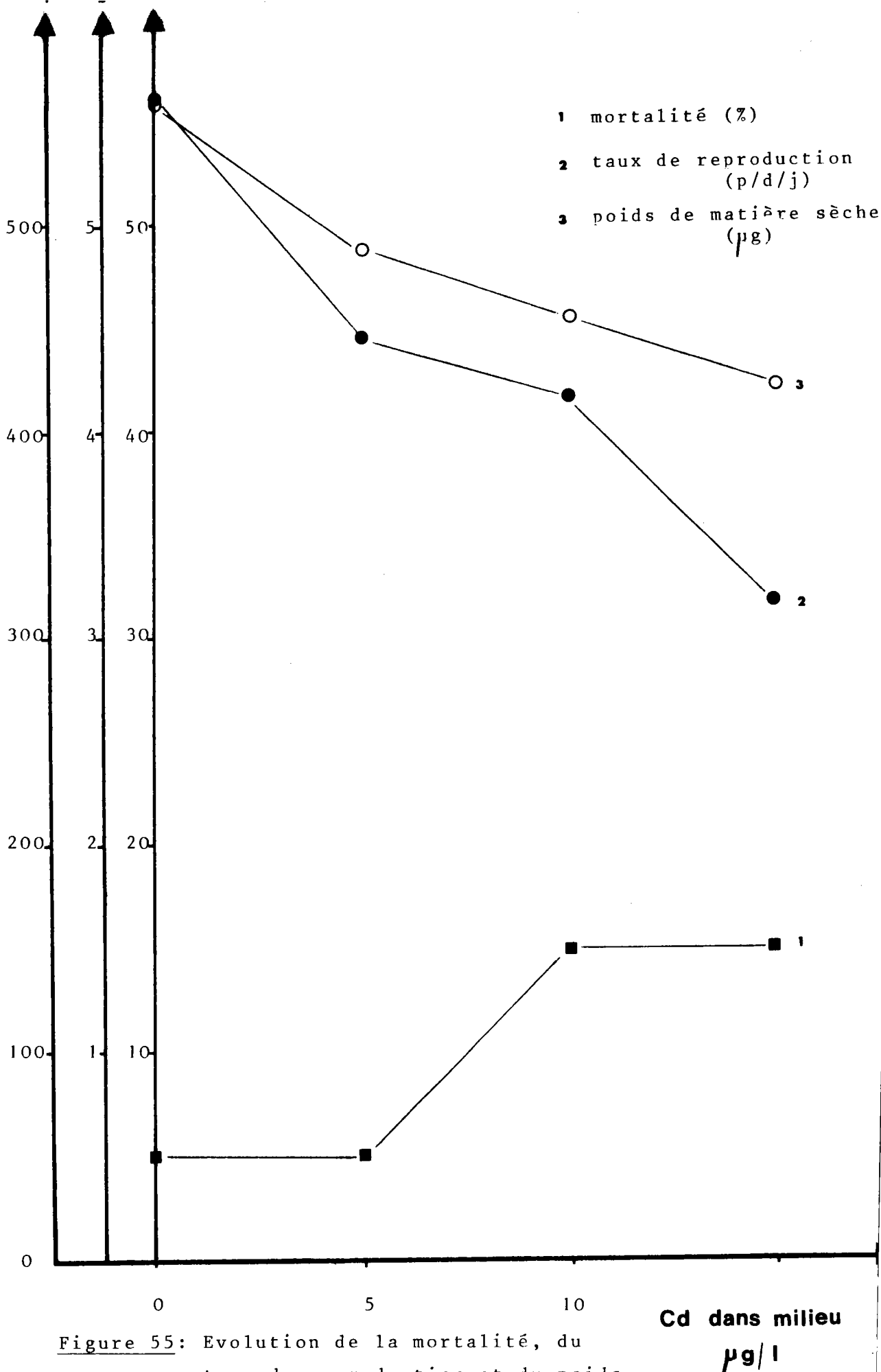


Figure 55: Evolution de la mortalité, du taux de reproduction et du poids de matière sèche, sur la daphnie-contamination du cadmium par la nourriture- test à moyen terme.

pour comparaison.

concentration dans le milieu algal ( $\mu\text{gCd}/1$ )	0	5	10	15
cadmium retrouvé dans les daphnies ( $\text{ngCd}/\text{mg}$ de matière sèche)	3,2	10,8	15	17,5

Tableau XXXVIII : Concentration de cadmium retrouvée dans les daphnies en  $\text{ng}/\text{mg}$  de matière sèche, après 28 jours d'intoxication par la nourriture, à 5, 10 et 15  $\mu\text{g}/1$  dans le milieu algal.

On observe une augmentation des concentrations de cadmium retrouvées entre 0 et 15  $\mu\text{g}/1$ . La variation paraît plus importante entre 0 et 5  $\mu\text{g}/1$  qu'entre 5 et 15  $\mu\text{g}/1$ , intervalle pour lequel la relation semble linéaire.

### Conclusions

Comme précédemment, il convient d'apporter certaines réserves à nos résultats exprimés sous forme de moyennes, sans calcul d'écart-type, en raison du nombre limité d'expérimentations.

Les critères biologiques considérés sont différemment affectés. L'inhibition du taux de reproduction est plus forte que la diminution du poids moyen de matière sèche, et ces 2 critères paraissent nettement plus significatifs que la mortalité qui reste faible. Ces effets biologiques sont confirmés par les valeurs analytiques obtenues (figure 56).

Cd  
dans daphnies  
ng/mg

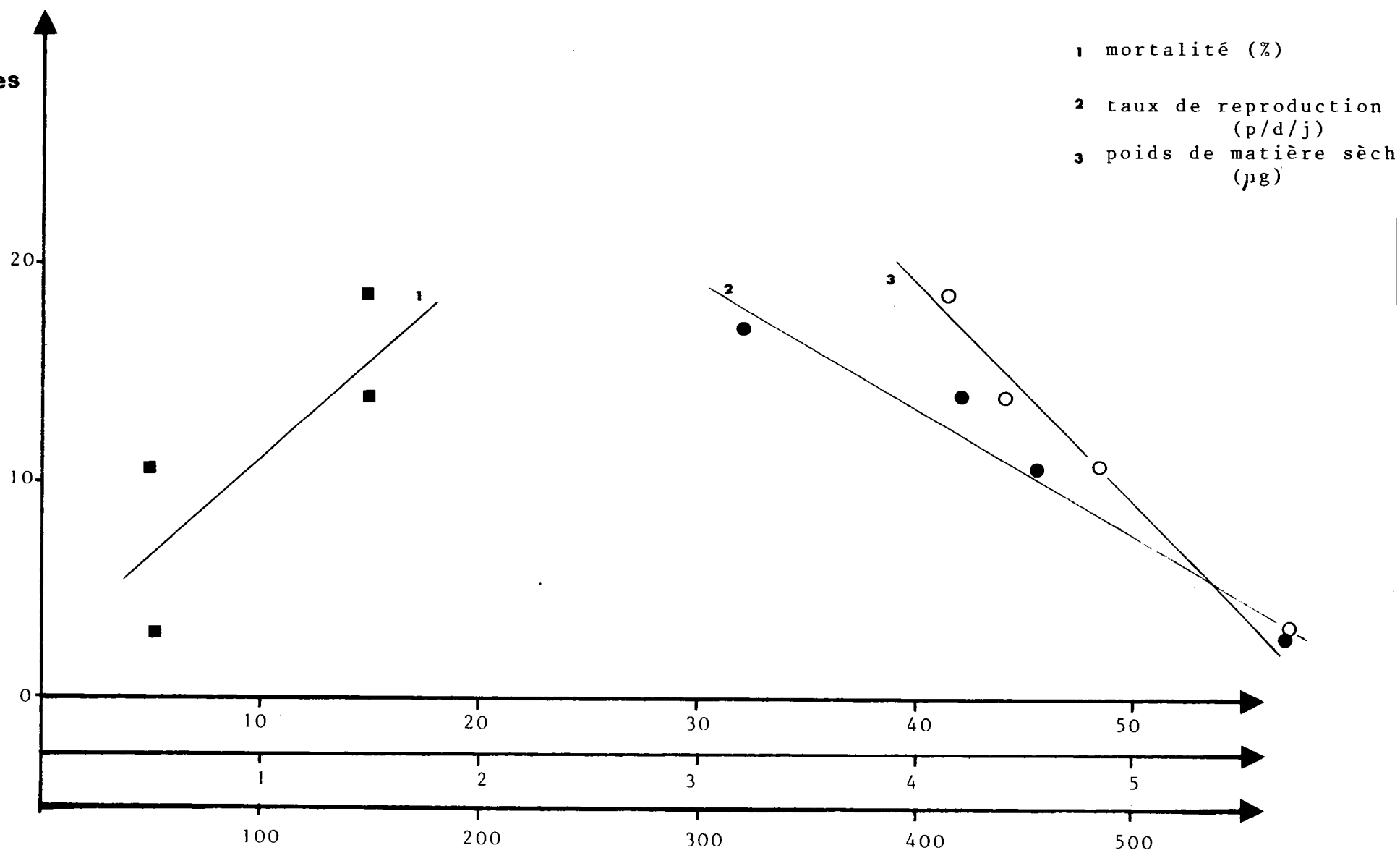


Figure 56: Relation entre effets biologiques et effet analytique sur la daphnie-  
Contamination du cadmium par la nourriture- test à moyen terme.

Au seuil d'erreur de 1%, seul le poids moyen de matière sèche est significativement lié aux résultats analytiques ( $r = 0,999$ ). Tandis qu'au seuil de 2%, le taux de reproduction l'est également.

Par ailleurs, il n'a pas été possible de comparer ces résultats avec ceux d'autres auteurs, étant donné la pauvreté de la bibliographie dans ce domaine.

#### 4.3. Contamination par le milieu et par la nourriture

Dans ce cas, les daphnies sont élevées en présence de cadmium introduit dans le milieu et en présence d'algues préalablement contaminées.

##### . Effets biologiques

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux XXXIX et XL. La mortalité n'est plus négligeable et atteint 25% pour 15  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Les variations d'une concentration à l'autre paraissent régulières bien que peu significatives, sauf entre 0 et 5  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Le taux de reproduction est fortement affecté dès 5  $\mu\text{g}/\text{l}$ . L'évolution paraît être linéaire entre 5 et 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  (fig. 57), concentration pour laquelle il est très faible (1,68). On observe une inhibition de 50% du taux de reproduction aux environs de 6  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

Le poids moyen de matière sèche semble avoir une évolution comparable à celle des 2 critères précédents, mais les variations constatées sont plus faibles. Ce n'est qu'à 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  qu'il y a une inhibition de 50% du poids de matière sèche.

emps en ours	5			10			15		
	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de repro- duction/jour	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de repro- duction/jour	Daphnies vivantes	Petits par jour	Taux de repro- duction/jour
J 0	20			20			20		
1	20			20			20		
2	20			20			20		
3	19			20			20		
4	19			20			20		
5	19			20			20		
6	18			20			19		
7	18			20			19		
8	18			20			19		
9	18			20			19		
10	18			20			20		
11	18	8	0.44	20			19		
12	18	31	1.72	20	8	0.40	18	70	3.68
13	18	21	1.17	20	17	0.85	18	1	0.06
14	18	1	0.06	20	4	0.20	18	9	0.50
15	18	12	0.67	20	22	1.10	18	27	1.50
16	18	152	8.44	19	48	2.40	18	9	0.50
17	18	58	3.22	19	56	2.95	18	15	0.83
18	18	1	0.06	19	1	0.05	18	62	3.44
19	18	137	7.61	19	125	6.58	18	28	1.56
20	18	128	7.11	19	7	0.37	18	9	0.50
21	17	115	6.39	19	174	9.16	17	22	1.29
22	17	3	0.18	17	26	1.37	17	70	4.12
23	17	56	3.29	17	9	0.53	17	59	3.47
24	17	168	9.88	17	43	2.53	17	4	0.24
25	17	27	1.59	17	57	3.35	16	17	1.06
26	17	0	0	17	15	0.88	16	50	3.13
27	17	14	0.82	16	12	0.71	15	16	1.07
28	17	42	2.47	16	93	5.19			
$\Sigma$	-	964	55.12	-	717	38.62	-	468	26.95

TABLEAU XXXIX : ÉVOLUTION DE LA NATALITÉ ET DE LA MORTALITÉ DES DAPHNIES PENDANT 28 JOURS AUX CONCENTRATIONS TESTÉES - CONTAMINATION PAR LE MILIEU ET PAR LA NOURRITURE



Concentrations de cadmium en $\mu\text{g}/\text{l}$	0	5	10	15
Pourcentage de mortalité	5	15	20	25
Nombre total de petits	1997	964	717	468
Taux de reproduction total	106.21	55.12	38.62	26.95
Nombre de jours de ponte	18	18	17	16
Taux de reproduction	5.63	3.06	2.27	1.68
Pourcentage d'inhibition du taux de reproduction par rapport au témoin	-	46	60	70
Poids moyen de matière sèche en $\mu\text{g}$	560	310	296	281
Pourcentage de diminution du poids de matière sèche par rapport au témoin	-	45	46	50

TABLEAU XL : VALEURS DES DIFFÉRENTS CRITÈRES ÉTUDIÉS, APRÈS 28 JOURS D'EXPOSITION, EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INTRODUITE DANS LE MILIEU

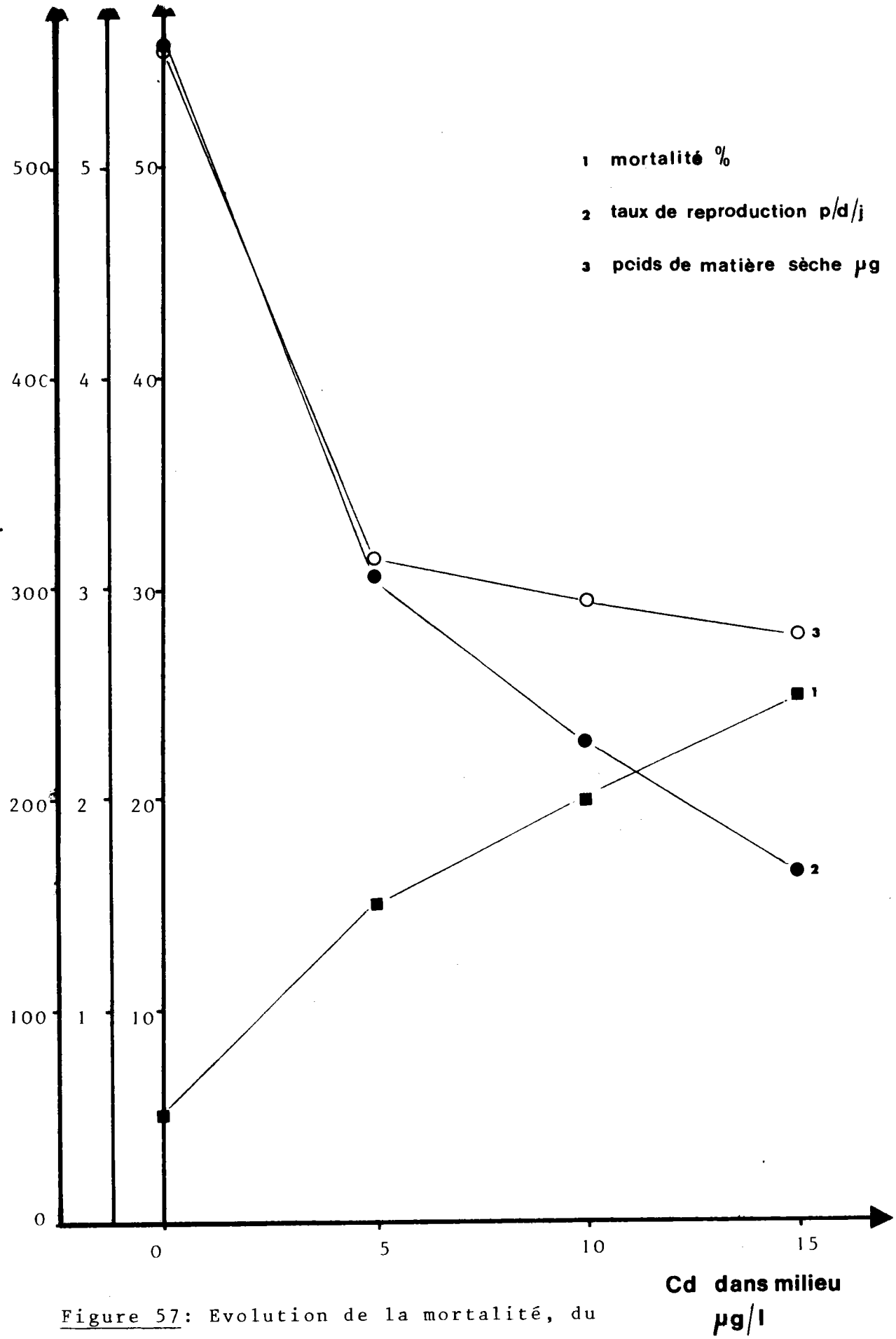


Figure 57: Evolution de la mortalité, du taux de reproduction et du poids de matière sèche, sur la daphnie- contamination du cadmium par le milieu et par la nourriture- test à moyen terme.

. Résultats analytiques

Les daphnies soumises à une contamination par le milieu et par la nourriture contiennent d'autant plus de cadmium que la concentration de celui-ci augmente dans les milieux (tableau XLI).

concentration de cadmium en $\mu\text{g/l}$	0	5	10	15
concentration de cadmium retrouvée dans les daphnies	3,2	33	37	42,9

Tableau XLI : Concentration de cadmium retrouvée dans les daphnies (en ng/mg de matière sèche) après 28 jours d'exposition au cadmium introduit dans le milieu et via des chlorelles

Il y a une forte augmentation du cadmium retrouvé entre 0 et 5  $\mu\text{g/l}$ . L'évolution paraît ensuite linéaire entre 5 et 15  $\mu\text{g/l}$ .

. Conclusions

Parmi les trois critères biologiques envisagés, ceux qui sont le plus affectés sont dans l'ordre : le taux de reproduction, le poids moyen de matière sèche, la mortalité. Le premier reste à nouveau le critère le plus significatif. De plus, une corrélation significative pour un risque inférieur à 1% existe entre ce critère et les effets analytiques observés (fig. 58).

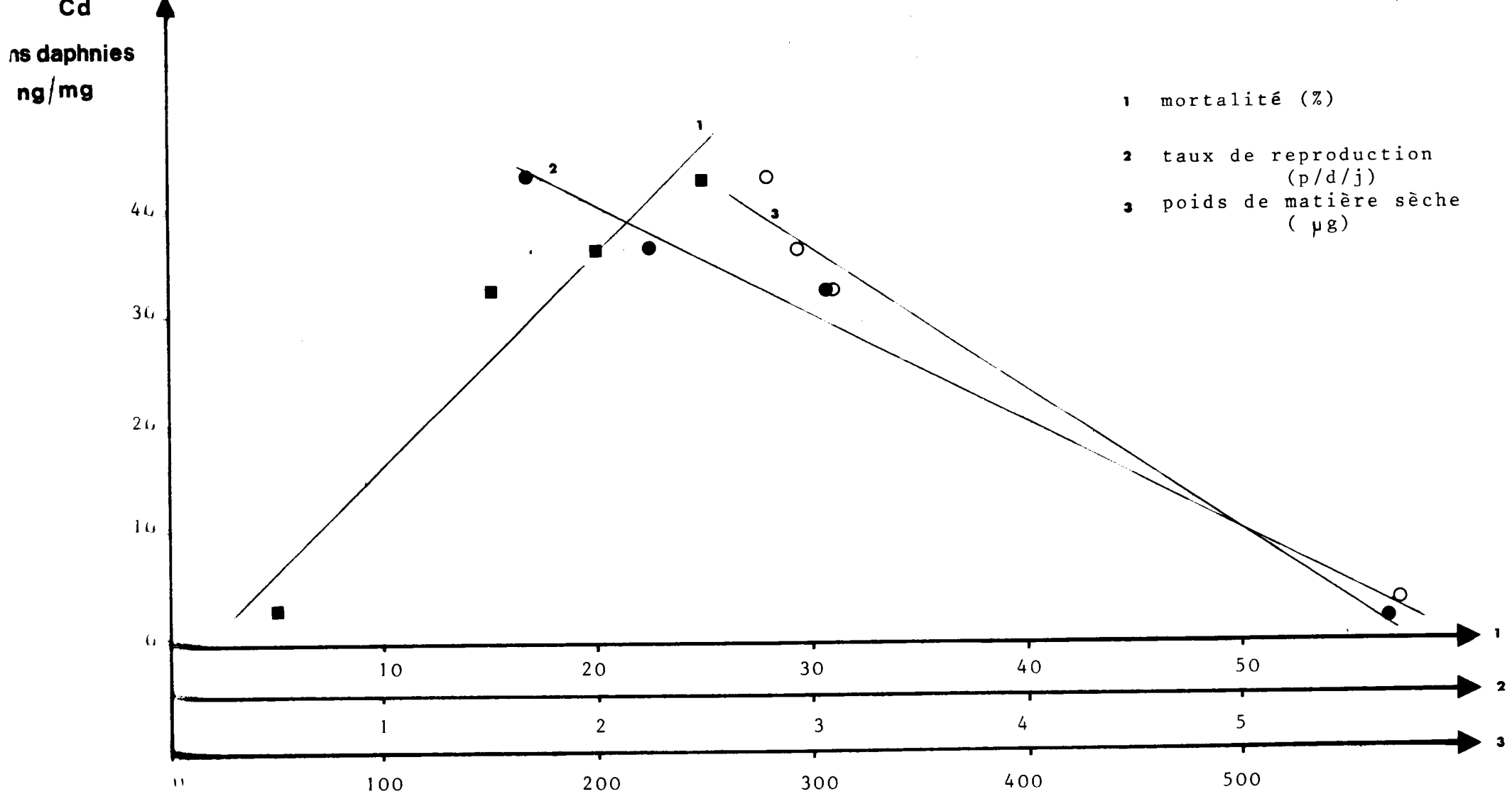


Figure 58: Relation entre effets biologiques et effet analytique, sur la daphnie- Contamination du cadmium par le milieu et par la nourriture- test à moyen terme.

## 5. DISCUSSION GENERALE

Il faut avant tout remarquer que les différentes voies de contaminations étudiées se distinguent uniquement par la manière d'apporter le cadmium aux daphnies et que cela ne préjuge pas des voies de contamination vraiment empruntées : assimilation par ingestion ; absorption directe du cadmium provenant du milieu ou rejeté par les chlorelles.

Pour les trois concentrations étudiées, l'étude des trois voies possibles de contamination des daphnies par le cadmium permet de mettre en évidence que les effets biologiques et analytiques sont maximum lorsque le cadmium est apporté par la nourriture et par le milieu. Le cadmium apporté par le milieu et celui apporté par la nourriture se caractérisent dans l'ordre par des effets de moins en moins prononcés (fig. 59).

Il semble donc y avoir aggravation du risque lorsque le cadmium est non seulement déjà absorbé directement, mais en plus transmis par la nourriture à condition que celle-ci ait eu la possibilité d'accumuler le cadmium.

Bien que produisant les plus faibles effets, le cadmium apporté par les chlorelles a tout de même un effet significatif qui s'additionne et aggrave, sans aucun doute, les effets du métal apporté par le milieu. Cela est particulièrement mis en évidence par les résultats analytiques (fig. 59d). Néanmoins, il faut remarquer qu'entre les deux conditions, milieu et nourriture, les quantités mises en présence ne sont pas les mêmes (tableau XLII). Par exemple, pour  $5 \mu\text{g}/\text{l}$ , la quantité de cadmium apportée par le milieu est d'environ  $2,8 \mu\text{g}$  (compté tenu du milieu oligo L.C.), tandis que celle apportée par les chlorelles est plus faible : en fonction d'un pourcentage d'accumulation de 65%, la quantité de cadmium apportée pour une durée de 7 jours à raison de  $1.10^6$  chlorelles par daphnie par jour est au maximum de  $0,70 \mu\text{g}$ , soit environ 4 fois moindre.

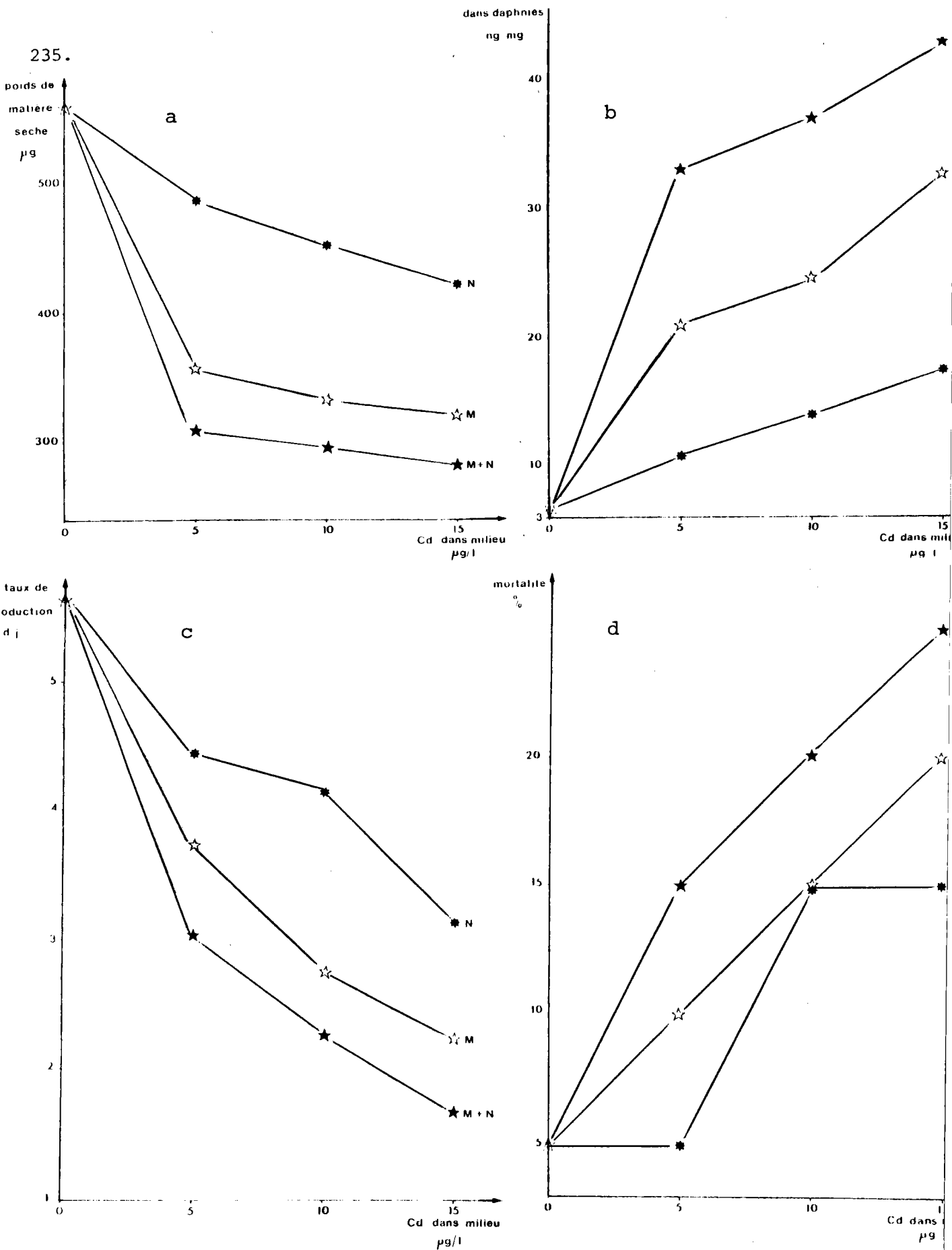


Figure 59 (a,b,c,d): Variation des paramètres biologiques et analytiques en fonction des concentrations de cadmium vis-à-vis de la daphnie, pour les 3 voies de contamination- M=contamination par le milieu- N=contamination par la nourriture- M+N=contamination par le milieu et la nourriture.

Contamination par le milieu (7 jours)		Contamination par la nourriture (7 jours)	
concentration introduite dans le milieu (en $\mu\text{g}/\text{l}$ )	quantité introduite dans le milieu en $\mu\text{g}$ (compte-tenu du milieu oligo L.C.)	concentration introduite dans le milieu algal des chlorelles	quantité introduite via les chlorelles en $\mu\text{g}$ (compte-tenu du milieu L.C.)
5	2,725	6,15	0,65
10	5,225	11,15	1,31
15	7,725	16,15	1,97

Tableau XLII : Comparaison des concentrations et des quantités introduites pour 2 voies de contamination : le milieu et la nourriture.

Or, si l'on compare les quantités produisant les mêmes effets, on constate, par exemple, pour le taux de reproduction qu'il faut introduire entre 10 et 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium dans le milieu algal des chlorelles pour obtenir le même effet sur la mortalité qu'avec 5  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium introduit dans le milieu. Cela signifie que lorsqu'on apporte entre 1,30 et 2,00  $\mu\text{g}$  de cadmium par la nourriture, il faut introduire environ 2 fois plus de cadmium (2,7  $\mu\text{g}$ ) dans le milieu pour obtenir des effets identiques.

Le même calcul n'est pas possible pour le poids sec moyen, étant donné que les effets observés ne sont pas comparables d'une série à l'autre. Toutefois, en calculant par interpolation entre 0 et 5  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium apporté par le milieu (fig. 59b), on constate que pour ce paramètre, les quantités produisant les mêmes effets sur la croissance sont à peu près comparables.

Vu sous l'angle analytique, on calcule, en raisonnant par extrapolation, qu'il faudrait cultiver des chlorelles avec environ 20  $\mu\text{g}/\text{l}$  (soit un apport pour les daphnies de 2,60  $\mu\text{g}$  de cadmium) pour retrouver une concentration de cadmium dans les daphnies de 21 ng/mg correspondant

à 2,7  $\mu\text{g}$  de cadmium ajouté dans le milieu.

En définitive on constate, à travers ces calculs choisis à titre d'exemple, que le rapport "quantité de cadmium apporté par la nourriture sur quantité de cadmium apporté par le milieu" varie de 1 à 2 selon le critère envisagé. Il semblerait que le cadmium apporté par la nourriture soit 2 fois plus nocif que le cadmium apporté par le milieu, uniquement en ce qui concerne les capacités de reproduction de la daphnie. Par contre, quelle que soit la voie de transfert envisagée, l'accumulation du métal est comparable, compte-tenu des quantités apportées. A cet égard, les auteurs ne sont pas unanimes sur la part relative de l'eau et de la nourriture dans l'assimilation des éléments métalliques. RICE (1963) - HOSS (1964) - BRYAN (1967) - HANNERTZ (1968) - PRESTON et coll. (1972) - YOUNG (1975) - JERNELOV et coll. (1975) - MERLINI et coll. (1976) - MARTY et coll. (1977) observent que l'accumulation est plus forte par la nourriture que par le milieu. Cette notion est partagée par PENTREATH (1973), et permet d'expliquer les fortes teneurs trouvées dans certaines espèces prélevées in situ, alors que les facteurs de concentration calculés expérimentalement sont toujours faibles (BAUDIN, 1977). Par contre, TOWNSLEY et coll. (1960) trouvent que l'accumulation se réalise principalement par absorption directe, opinion partagée par POLIKARPOV (1966) - BERG (1968) - MASHIKO et coll. (1972) - SAWARD et coll. (1975).

Toutefois, il apparaît quelque peu hasardeux de généraliser, à partir des résultats obtenus lors d'expérimentations, les risques respectifs dus à la nourriture et au milieu dans l'environnement naturel. En effet, l'assimilation d'un élément par une espèce donnée dépend plus du vecteur alimentaire, de l'élément considéré, de la teneur de cet élément dans le vecteur alimentaire, de l'espèce utilisée (CROSS et coll., 1967 - Anonyme, 1971). De même, BAUDIN (1977) souligne que "l'importance relative des deux vecteurs de contamination paraît délicate à évaluer, car les conclusions formulées peuvent dépendre très largement du schéma expérimental suivi et des paramètres étudiés".

En ce qui concerne les différents paramètres biologiques étudiés, il s'avère nettement que la mortalité n'est pas très significative.



que le poids moyen de matière sèche est peu affecté. Le taux de reproduction semble être le paramètre le plus sensible et se révèle avoir une bonne corrélation avec les résultats analytiques (fig. 60). En définitive, les concentrations croissantes de cadmium entre 0 et 15  $\mu\text{g}/\text{l}$  ont peu d'effets létaux mais ont une action inhibitrice sur la croissance et surtout sur la natalité de la daphnie. Cette action étant dans l'ordre de plus en plus accentué lorsqu'on apporte le cadmium par la nourriture, par le milieu, par le milieu et la nourriture. Par contre, à 20  $\mu\text{g}/\text{l}$  de cadmium dans le milieu, la mortalité est totale après 20 jours et on ne constate aucune natalité.

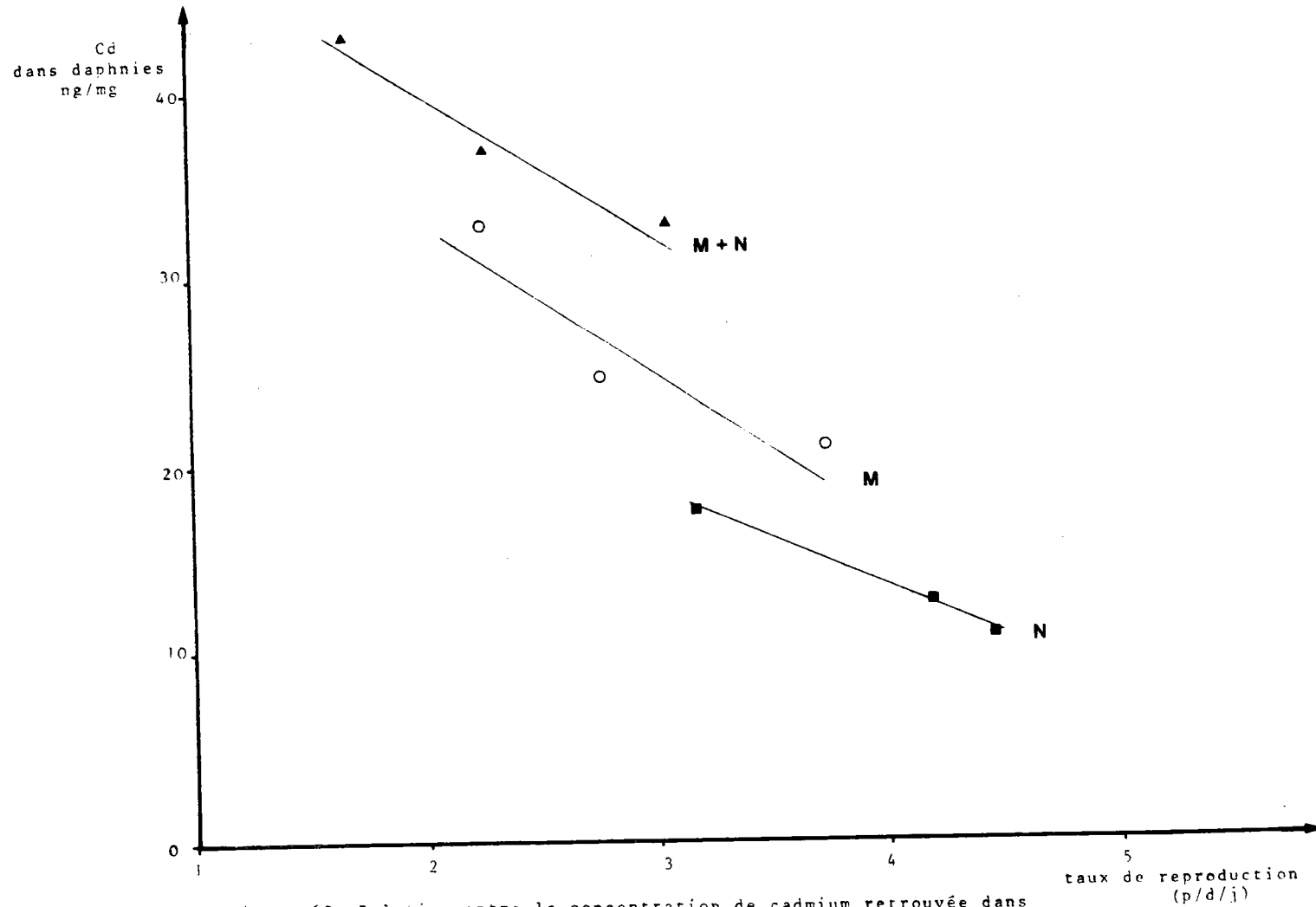


Figure 60: Relation entre la concentration de cadmium retrouvée dans les daphnies et le taux de reproduction- test à moyen terme.

## CHAPITRE III : ÉTUDES DE TOXICITÉ DU CADMIUM SUR LES ABLES

### I. MODE OPERATOIRE D'INTOXICATION DES POISSONS

Considéré dans cette étude comme maillon terminal, l'able de HECKEL a fait l'objet de quelques expérimentations. Celles-ci visent à déterminer d'abord un certain nombre de données de toxicité aiguë et ensuite les potentialités cumulatives de cette espèce à partir du milieu et à partir de la nourriture.

Ces expériences sont réalisées en tests statiques, avec remplacement des milieux tous les 4 jours. En raison de la faible durée de ces expériences (8 jours), aucune nourriture n'est ajoutée pendant les tests.

La contamination par la nourriture se réalise par l'intermédiaire de chlorelles intoxiquées, faute de mieux. En effet, l'expérience parallèle consistant à nourrir les ables avec des daphnies intoxiquées aurait nécessité des élevages de daphnies importants et par conséquent des cultures de chlorelles encore plus importantes. Par exemple, pour une expérience comprenant 5 concentrations de toxique, avec 5 poissons pour chaque concentration, il est nécessaire de concevoir un élevage produisant 5 000 daphnies par jour (!), ce qui nécessite 10 litres de culture d'algues par jour (!)

La contamination par le milieu et par la nourriture n'a pas été envisagée dans cette étude.

Les expériences sont réalisées dans les mêmes conditions de température et de lumière que pour les daphnies. Les poissons sont acclimatés à 18° C à raison d'une augmentation de 1° C par jour.

Les poissons sont maintenus à jeun pendant 72 h avant chaque expérience. Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- 5 poissons dans un litre de milieu
- milieu constitué de 3 volumes d'eau de Volvic pour 2 volumes d'Oligo L.C.
- changement du milieu après 4 jours
- bullage d'air.

Les poissons sont introduits avec précaution dans les milieux. Un seul sel de cadmium a été utilisé dans ces conditions. La solution mère de nitrate de cadmium,  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Merck pour analyse) est à 1 gCd/l ; elle est conservée à 4° C, en flacon de polyéthylène.

## 2. RECHERCHE DES SEUILS DE MORTALITE

Après les tests préliminaires permettant de déterminer le niveau de sensibilité de l'able vis-à-vis du cadmium, nous avons fait plusieurs séries d'expériences allant de 2 à 20 mg/l.

Dans nos conditions opératoires, le cadmium ne provoque pas de mortalité pour des concentrations inférieures à 2 mg/l. Pour chaque série, les pourcentages de mortalité sont calculés en fonction du temps, afin de déterminer le TL50. Par exemple, pour 6 mg/l, le TL50 obtenu est de 21 h (figure 61). De la même manière, nous avons calculé les différents TL50, correspondant aux autres concentrations. Nous avons ainsi pu construire la courbe des TL50 en fonction des différentes concentrations testées (figure 62). Celle-ci permet la détermination graphique des CL50 24- 48- 96 h, respectivement égales à 5,75- 4,5- 3,9 mg/l.

En test statique, PICKERING et HENDERSON (1966) ont réalisé de nombreuses expériences avec le chlorure de cadmium en eau douce et en eau dure sur différentes espèces de poissons. Les résultats sont exprimés en mg/l de cadmium dans le tableau ci-après.

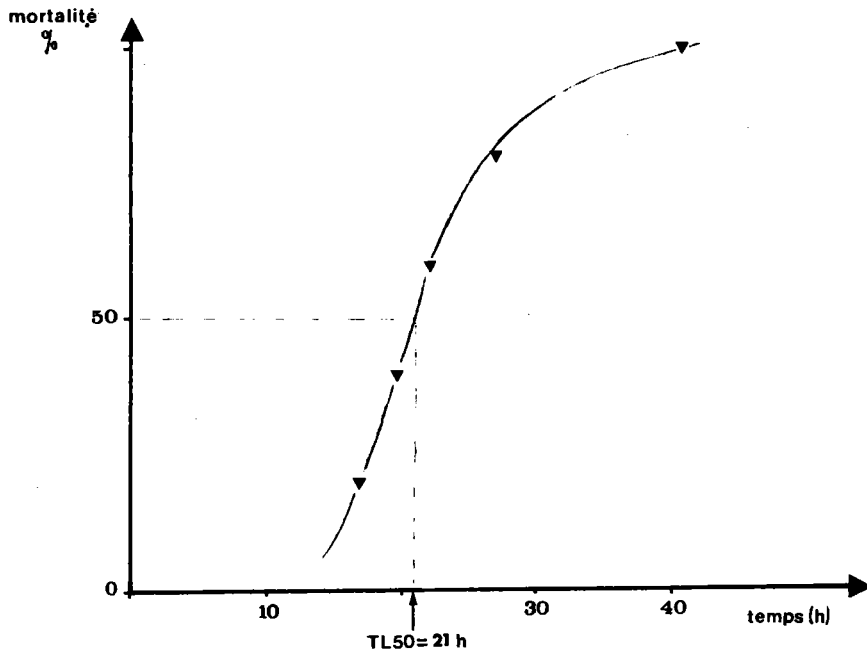


Figure 61: Détermination du TL<sub>50</sub> pour le poisson à 6 mg/l de cadmium.

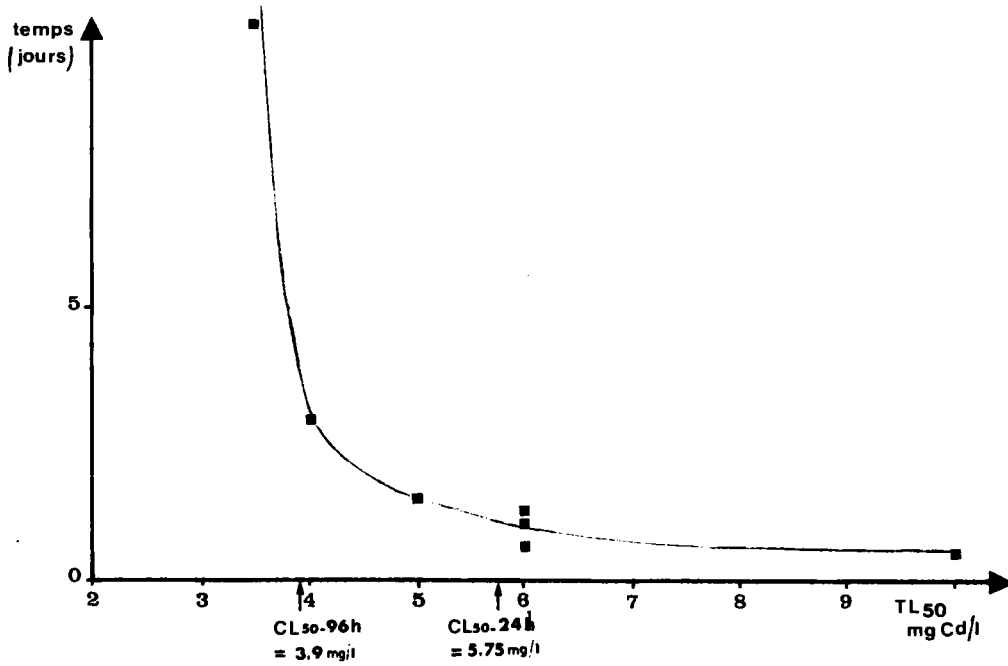


Figure 62: Détermination des CL<sub>50</sub> de cadmium pour le poisson à partir des TL<sub>50</sub>.

Type d'eau	Type d'organismes	CL50 24 h	CL50 48 h	CL50 96 h
Douce	Pimephales promelas	1.1	1.1	1.1
Douce	Pimephales promelas	0.7	0.7	0.6
Dure	Pimephales promelas	78.1	72.6	72.6
Dure	Pimephales promelas	79.3	79.3	73.5
Douce	Lepomis macrochirus	4.6	2.8	1.9
Douce	Carassius auratus	3.5	2.6	2.3
Douce	Lebistes reticulatus	3.4	2.3	1.3
Douce	Lepomis cyanellus	7.8	3.7	2.8
Dure	Lepomis cyanellus	88.6	71.3	66.0

TABLEAU XLIII : CL50 de cadmium pour différentes espèces de poissons.

Dans ce tableau où l'eau douce correspond à une dureté de 20 mg CaCO<sub>3</sub>/l et l'eau dure à 360 mg CaCO<sub>3</sub>/l, on remarque que pour certains poissons la CL50 ne varie pas en fonction du temps d'exposition.

PICKERING et GAST (1972) trouvent un CL50 96 heures allant de 30 à 32 mg/l sur le méné à grosse tête à 25° C et avec une dureté d'environ 200 mg Ca CO<sub>3</sub>/ l.

Pour des duretés comparables, la truite Arc-en-Ciel est plus sensible : SCHWEIGER (1957) trouve qu'à 3 mg/l le cadmium est sans effet, alors qu'à 4 mg/l il est létal pour ce poisson (dureté égale à 265 mg CaCO<sub>3</sub>/l). Plus récemment VOYER et coll. (1975) ont observé que la CL50 96 h est comprise entre 1,2 et 2,7 mg/l suivant la concentration en oxygène dissous (dureté égale à 58 mg CaCO<sub>3</sub>/l).

En test dynamique, PICKERING et GAST (1972) observent que les organismes sont plus sensibles et que les CL50 sont plus faibles. Cette observation est confirmée par les travaux de BALL (1967).

Il faut signaler que pour des expositions à court terme, on enregistre des variations des résultats d'une période à l'autre de l'année. Ce phénomène a été souligné par CASSIDY et LAKE (1975) qui l'attribue aux variations saisonnières de température (pour des poissons collectés dans la nature).

### 3. RECHERCHE DU POUVOIR CUMULATIF

C'est surtout le critère analytique qui a été retenu au niveau du poisson. Nous avons envisagé ce critère pour les 2 voies de contamination étudiées : le milieu et la nourriture par les chlorelles intoxiquées.

#### 3.1. Contamination par le milieu

Dans cette expérience, les poissons sont maintenus sans alimentation dans des milieux contaminés à différentes concentrations de cadmium, pendant 8 jours :

0 - 0,01 - 0,05 - 0,1 - 0,5 - 1 - 3 - 5 - 7 mg/l

Nous avons suivi l'évolution de la teneur en cadmium dans les organismes entiers, en fonction de la concentration initiale dans le milieu, et en fonction du temps. Nous avons constaté une certaine mortalité au-delà de 3 mg/l. Ainsi, nous avons différencié les résultats des dosages des poissons tués aux temps choisis, de ceux des poissons morts.

#### 3.1.1. ACCUMULATION DANS LES POISSONS TUES EN FONCTION DE LA CONCENTRATION INITIALE DANS LE MILIEU

A partir des moyennes obtenues sur chaque lot de 5 poissons (tableau XLIV), nous avons construit les courbes d'accumulation correspondantes à J2, J4, J6, J8 ; il y a augmentation du cadmium dans le poisson en fonction de la concentration initiale dans le milieu. La relation des 2 facteurs est significativement linéaire, au seuil de 1 %, comme en témoignent les coefficients de corrélation obtenus pour les équations calculées (fig. 63)

$$\begin{array}{ll}
 Y_{J2} = 7,5 x + 0,31 & r = 0,993 \\
 Y_{J4} = 9,6 x + 0,29 & r = 0,993 \\
 Y_{J6} = 10,3 x + 0,68 & r = 0,985 \\
 Y_{J8} = 17,3 x + 1,00 & r = 0,999
 \end{array}$$

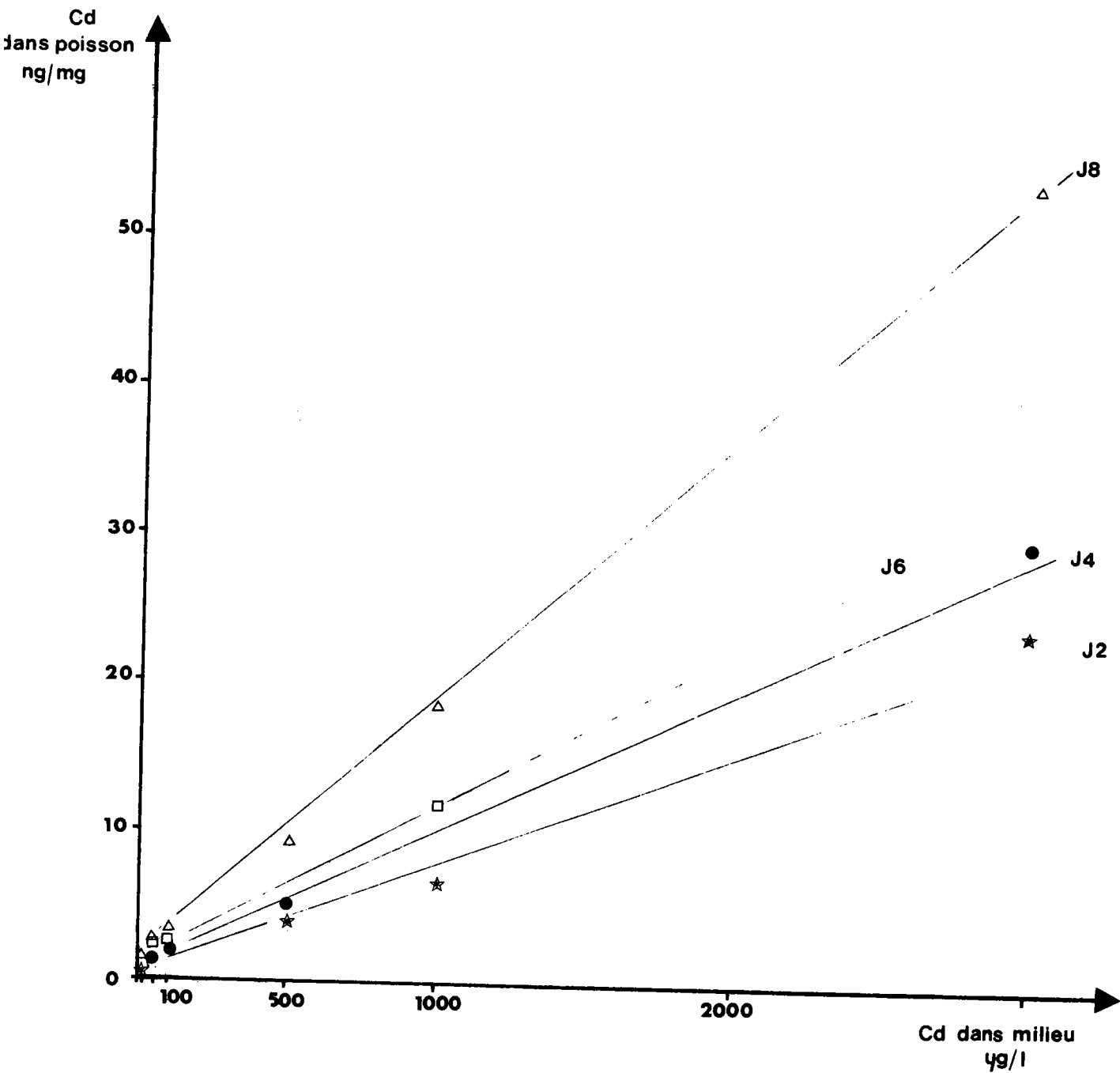


Figure 63: Accumulation du cadmium dans le poisson en fonction de différentes concentrations de cadmium dans le milieu, à différents temps:

$$Y_{J2} = 7,5x + 0,31 \quad r=0,993$$

$$Y_{J4} = 9,6x + 0,29 \quad r=0,993$$

$$Y_{J6} = 10,8x + 0,68 \quad r=0,985$$

$$Y_{J8} = 17,6x + 1,00 \quad r=0,999$$



Entre 0,01 et 3 mg/l, le poisson accumule donc le cadmium de façon linéaire ; mais il semble que pour les plus faibles concentrations, entre 0 et 50 µg/l, la fonction n'est sans doute plus linéaire ; un tel phénomène a déjà été remarqué précédemment pour les algues.

temps mg Cd/l h.	48	96	144	192
0	0,29 ± 0,22	0,21 ± 0,20	0,10 ± 0,05	0,16 ± 0,06
0,01	0,85 ± 0,45	0,54 ± 0,27	0,80 ± 0,21	1,41 ± 0,35
0,05	1,14 ± 0,30	1,55 ± 0,38	1,60 ± 0,48	2,44 ± 0,46
0,1	1,74 ± 0,72	2,48 ± 0,85	2,61 ± 0,50	3,38 ± 0,67
0,5	3,90 ± 2,15	4,77 ± 1,90	4,91 ± 1,41	9,36 ± 2,14
1	5,77 ± 4,85	7,37 ± 2,09	11,91 ± 4,79	18,40 ± 8,73
3	23,6 ± 8,84	30,06 ± 3,50	-	53,99 ± 2,09

TABLEAU XLIV : Concentrations moyennes de cadmium retrouvées dans le poisson (organisme entier) en ng par mg de matière sèche - contamination par le milieu.

Nous avons calculé les facteurs de concentration du cadmium dans le poisson (tableau XLV) et nous constatons qu'ils sont très inférieurs à ceux obtenus dans le cas des algues. Ces facteurs varient en fonction de la concentration initiale de cadmium dans le milieu : ils sont plus élevés pour les faibles concentrations de cadmium.

(Cd) mg/l \ Temps (h)	48	96	144	192
0	256	186	88	142
0,01	85	54	80	141
0,05	23	31	32	49
0,1	17	25	26	34
0,5	8	9	10	19
1	6	7	12	18
3	8	10	-	18

**TABLEAU XLV : FACTEURS DE CONCENTRATION DU CADMIUM DANS LE POISSON ENTIER**

### 3.1.2. ACCUMULATION DANS LES POISSONS TUES EN FONCTION DU TEMPS

Sur la figure 63, on peut déjà constater une augmentation de la pente des droites d'ajustement entre le deuxième et le huitième jour.

Un autre mode de représentation des résultats du tableau XLIV (figure 64) permet de montrer également qu'il y a augmentation de la teneur en cadmium dans le poisson en fonction du temps. Mais, si pour les faibles concentrations (entre 0 et 50  $\mu\text{g}/\text{l}$ ), la variation est faible, celle-ci est plus importante pour les concentrations plus élevées.

L'augmentation dans le temps de la teneur en cadmium dans le poisson semble donc d'autant plus grande que la teneur initiale en cadmium dans le milieu est grande. De même les facteurs de concentration (tableau XLV) augmentent en fonction du temps. Toutefois pour les témoins et les essais à 10  $\mu\text{g}/\text{l}$ , l'augmentation ne semble pas significative.

Il ressort de ces résultats que la quantité de cadmium accumulée dans le poisson augmente dans le temps, compte tenu du fait que le poids du poisson reste constant ou diminue légèrement. Cette augmentation peut conduire à un niveau tel qu'il peut être létal.

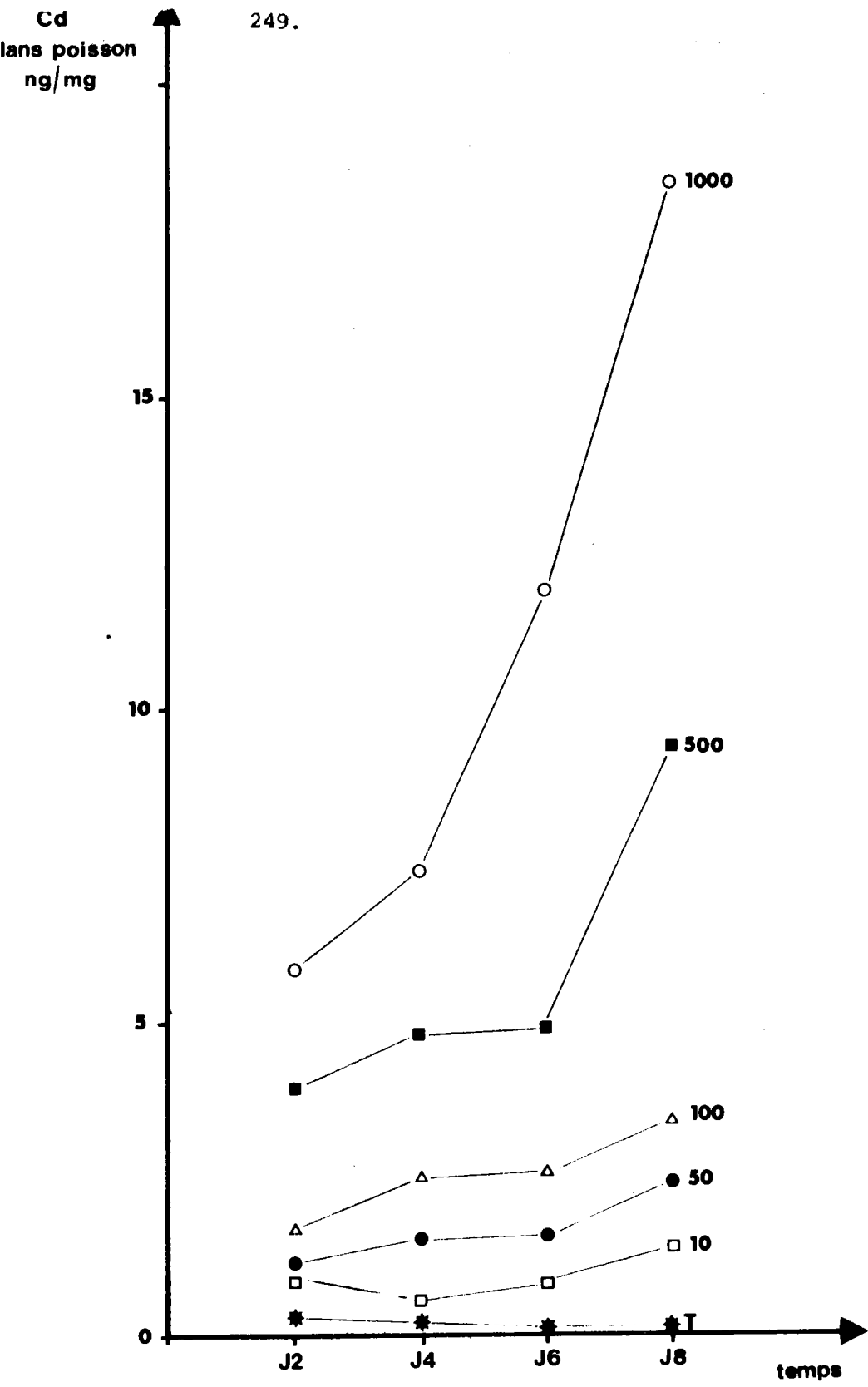


Figure 64: Accumulation du cadmium dans le poisson en fonction du temps et de différentes concentrations de cadmium dans le milieu.

### 3.1.3. ACCUMULATION DANS LES POISSONS MORTS AU COURS DE L'EXPERIENCE

Le tableau XLVI présente les valeurs des dosages faits sur des poissons morts au cours de l'expérience. On remarque que les concentrations sont toutes supérieures à celles précédemment trouvées. A l'aide des résultats obtenus à 3 mg/l et à 5 mg/l, on peut définir un seuil léthal, c'est-à-dire une teneur de cadmium dans l'organisme au-delà de laquelle l'individu meurt : dans nos conditions d'expérience, ce seuil se situerait entre 50 et 60 ng/mg de matière sèche, pour l'organisme entier.

Si l'on fait le bilan, on constate que peu de cadmium est retrouvé dans les poissons par rapport à la quantité introduite. On a ainsi calculé les pourcentages de fixation du cadmium par le poisson comme le rapport de la quantité totale de cadmium retrouvée dans les 5 poissons d'un même cristallisateur, à la quantité de cadmium apportée par le milieu. On constate que ceux-ci sont compris entre 0,15 et 10 %. Ce résultat signifie que le poisson retient une faible partie du cadmium introduit.

Temps (Cd) (h) mg/l	16	19	48
3			62 ± 32,5
5	55,6 ± 20,8	115	121,2 ± 48,3
7	104,8 ± 14,9	80,4 ± 14,2	

TABLEAU XLVI : Cadmium retrouvé dans les poissons morts durant l'expérience (ng Cd/mg de matière sèche)

### 3.2 . Contamination par les chlorelles

La chlorelle et l'able ayant une sensibilité au cadmium voisine, ceci favorise leur association. Les algues sont cultivées en ballons dans des milieux contaminés jusqu'en fin de croissance exponentielle, avant d'être données aux poissons. La quantité de nourriture est estimée par rapport aux daphnies que les poissons auraient mangées : les poissons sont nourris en excès sur la base de  $4,8 \cdot 10^9$  chlorelles par poisson pour 4 jours, ce qui correspond à environ 250 ml de solution algale lavée. Une partie aliquote de cette solution est prélevée aux fins de dosage.

Au bout de quatre jours, la moitié des poissons est tuée et dosée, tandis que l'autre moitié est changée de milieu et alimentée une deuxième fois par la même quantité d'algues pour être arrêtée au bout de 8 jours.

Le tableau XLVII présente les résultats des dosages effectués sur les poissons, à différentes concentrations initiales de cadmium dans le milieu de culture des algues, et aux jours 4 et 8 ; ce sont des moyennes de plusieurs essais dont le nombre est inférieur à 5, ce qui explique que les écarts-types ne soient pas calculés. On constate que jusqu'à  $10 \mu\text{g}/\text{l}$  il n'y a pas de différence entre les poissons témoins et les poissons intoxiqués pour les 2 temps d'exposition. Au delà de  $10 \mu\text{g}/\text{l}$ , il y a accumulation de cadmium dans l'organisme du poisson ; la concentration de cadmium retrouvée dans le poisson augmente en fonction du temps, et en fonction de la concentration introduite dans le milieu algal. Cependant les valeurs obtenues restent inférieures à celles des expériences précédentes (contamination par le milieu). Il en est de même pour les pourcentages de fixation du cadmium calculés à partir des concentrations retrouvées dans les algues. (Tableau XLVII).

(Cd) dans milieu de culture des algues mg/l	(Cd) dans algues ng/mg	96 h	192 h
0	2,8	0,10	0,10
0,01	33	0,10	0,10
0,1	390	0,83	1,01
0,5	1 684	1,57	3,45

TABLEAU XLVII : Cadmium retrouvé dans le poisson en ng/mg de matière sèche. Intoxication par la nourriture.

### 3.3. Comparaison des deux voies de contamination étudiées

L'examen des tableaux XLIV et XLVII montre que les concentrations retrouvées dans l'un et l'autre cas (mis à part 0 et 10 µg/l) diffèrent entre elles d'un facteur moyen de 3 (rapport M/N). Le tableau XLVIII regroupe les concentrations retrouvées, les quantités correspondantes introduites dans les milieux respectifs, ainsi que les rapports de ces deux facteurs entre l'une et l'autre voie de contamination.

Cd mg/l	Durée h		Contamination par le milieu	Contamination par la nour- riture	Rapport M/H
0,1	96h	Quantité apportée en $\mu\text{g}$	100	16,70	6
		Concentration retrouvée en ng/mg	2,48	0,83	3
		Rapport Q/C	40,3	20,12	
0,5	96h	Quantité apportée en $\mu\text{g}$	500	81,60	6,1
		Concentration retrouvée en ng/mg	4,77	1,57	3
		Rapport Q/C	104,8	51,97	
0,1	192h	Quantité apportée en $\mu\text{g}$	2x100	2x16,7	6
		Concentration retrouvée en ng/mg	3,38	1,01	3,3
		Rapport Q/C	59,17	33,06	
0,5	192h	Quantité apportée	2x500	2x81,6	6,1
		Concentration retrouvée en ng/mg	9,36	3,45	2,7
		Rapport Q/C	106,8	47,3	

TABLEAU XLVIII : Comparaison entre le cadmium introduit et le cadmium retrouvé dans les poissons, selon les deux voies de contamination (par le milieu et par la nourriture) à différentes durées d'exposition et pour différentes concentrations.

On constate ainsi qu'à concentration retrouvée égale, il faut apporter deux fois plus de cadmium par le milieu que par les chlorelles. Autrement dit, l'effet du cadmium apporté par la nourriture est double de celui apporté par le milieu, pour deux concentrations à deux temps différents.

Cette observation se confirme par le calcul des rapports des quantités introduites (en  $\mu\text{g}$ ) ou disponibles aux concentrations retrouvées (en ng/mg). Plus ce rapport (Q/c) est faible, plus le transfert est efficace.



Or, l'on constate que les rapports obtenus en ce qui concerne la contamination par la nourriture, sont en moyenne deux fois plus faibles que ceux obtenus pour la contamination par le milieu. De plus, le rapport trouvé après 96 h d'exposition pour les poissons nourris avec des chlorelles intoxiquées à 100 µg/l est le plus faible. Dans ce cas, le transfert est donc le plus efficace.

Par contre, pour 10 µg/l, le facteur entre les rapports M/N n'est plus de 2, mais de 1 : les rapports calculés sont respectivement de  $0,54/0,10 = 5,4$  pour les concentrations retrouvées et de  $10,5/2 = 5,1$  pour les quantités apportées.

#### 4. CONCLUSION

La toxicité du cadmium déterminée sur l'able de HECKEL, semble compatible avec les seuils de létalité trouvés dans la bibliographie. L'able n'apparaît pas très sensible ; sa CL50 96 h se situe au delà de 1 mg/l, pour une faible dureté (40 mg CaCO<sub>3</sub>/l).

Selon certains auteurs, la dureté n'affecterait pas l'entrée du cadmium dans les tissus (MOUNT et STEPHAN, 1967). On constate, en effet, que l'accumulation de ce métal dans le poisson n'est pas spectaculaire, mais qu'elle augmente malgré tout avec la concentration initiale dans le milieu et avec le temps. De plus, les pourcentages de fixation sont faibles, alors qu'ils sont calculés à partir de quantités de cadmium retrouvées et non pas à partir de concentration. La recherche des organes d'accumulation n'a pu être faite en raison de la petite taille de l'able. La dissection est rendue ainsi délicate et imprécise pour isoler les organes supposés cibles, comme les branchies, le foie ou les reins.

Quant à la contamination par la nourriture, elle ne semble se manifester qu'à des concentrations de cadmium dans l'environnement qui ne sont plus négligeables. Le poisson ne consomme pas la totalité des algues fournies en excès, ce qui peut expliquer en partie le faible pourcentage de fixation trouvé. Il en résulte que l'accumulation du cadmium dans le poisson par l'intermédiaire de la nourriture se traduit par des concentrations plus faibles que celles obtenues par le milieu.

## CHAPITRE IV : MODÈLE DE CHAÎNE ALIMENTAIRE PROPOSÉ

### 1. METHODOLOGIE

Cette expérimentation a pour but de montrer la manière dont trois niveaux trophiques peuvent être associés pour mettre en évidence des phénomènes éventuels de bioaccumulation des ions cadmium. La méthodologie complète est schématisée dans la figure 65.

La première étape est constituée par la culture des chlorelles. Ces dernières ont été réalisées dans les conditions les plus simples possibles avec du matériel courant de laboratoire. On utilise ainsi des erlenmeyers de 1 litre contenant 500ml de milieu L.C. enrichi ou non en Cd sous forme de nitrate. Les milieux sont stérilisés, etensemencés dans des conditions stériles. Les flacons de culture sont placés sous une rampe de GRO-LUX assurant un éclairage moyen de 1400 lux. Ils sont reliés par l'intermédiaire de tubes VERSILIC (8mm de diamètre) à des aérateurs (RENA 301) : ces cultures sont ainsi réalisées en milieu aéré. Malgré ce bullage, une agitation manuelle est nécessaire tous les jours pour bien maintenir la culture en suspension. Des concentrations croissantes de nitrate de cadmium dans le milieu, 0, 10, 50, 100 et 250 µg/l sont réalisées selon le tableau XLIX.

Concentration de Cd introduite	Milieu oligo L.C. en ml	µl de solution de Cd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> à 1g/l en Cd
0	500	0
10	500	5
50	500	25
100	500	50
250	500	125

Tableau XLIX : Préparation des solutions témoin et intoxiquées des expérimentations du modèle.

DUREEMANIPULATIONSPRELEVEMENTS

J0

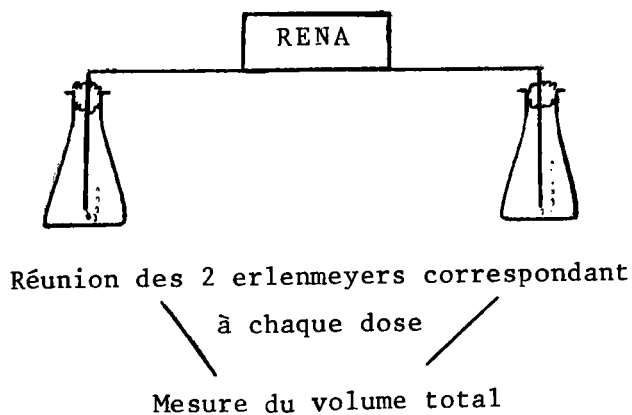
Inoculum des cultures

Agitation manuelle

+

Bullage

J0 → J10



Mesure de la concentration algale

1ère centrifugation de la culture algale

→ Surnageant filtré et dosé

Lavages de la culture algale (2x)

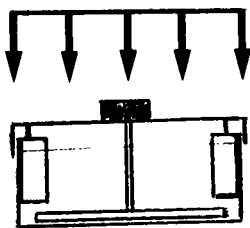
→ Surnageants filtrés et dosés

Mesure de la concentration algale

→ 10 ml de solution algale filtré, lavé et dosés

Distribution des algues tous les 4 jours

Introduction des jeunes daphnies



→ Daphnies prélevées et dosées

Mesure du pH

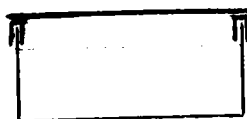
J10 → J30

J30 → J34

Introduction du poisson

→ 10 ml de milieu (J30)

→ Poisson prélevé et dosé



→ 10 ml de milieu (J34)

→ Dosage des résidus

Figure 65: Méthodologie détaillée de l'expérimentation sur modèles.

Deux erlenmeyers doivent être mis en oeuvre pour chaque dose afin d'obtenir une quantité suffisante d'algues après 20 jours de culture. Passé ce laps de temps, les solutions algales correspondant aux mêmes concentrations sont réunies. Le volume est mesuré. Une partie aliquote (50  $\mu$ l) est prélevée afin de l'analyser au Compteur COULTER. Cette détermination permet de connaître la concentration algale des différents flacons de culture soumis aux concentrations croissantes de cadmium avant toute opération ultérieure.

Les solutions algales sont ensuite centrifugées (5 minutes à 4000 tours/minute). Après quoi, on recueille une partie aliquote des surnageants qui, filtrée, sera analysée afin d'évaluer les quantités de cadmium restant dans la phase aqueuse après 10 jours de culture. Une opération de lavage des culots s'impose. Elle a pour but d'éliminer le maximum de cadmium "échangeable", en particulier au niveau des sites d'adsorption des membranes des chlorelles. Pour ce faire, les deux culots sont remis en suspension à l'aide d'un volume connu de milieu oligo L.C. témoin. On centrifuge à nouveau les solutions dans des conditions identiques aux précédentes. Cette opération est réalisée deux fois de suite. Sur les deux surnageants successivement recueillis, deux parties aliquotes sont prélevées, filtrées, ensuite mélangées à parts égales, puis analysées. Le dosage de ces milieux permet de déterminer la quantité de cadmium ainsi éliminée. En fin d'opération, le volume total du milieu est ramené à 50ml (réduction d'environ 1/20<sup>o</sup>). Le milieu se trouve ainsi considérablement enrichi en chlorelles, tout en éliminant au maximum le cadmium restant en solution ou adsorbé sur les algues elles-mêmes. Le milieu n'aura donc plus d'influence sur les daphnies par le métal qu'il pourrait contenir.

Les crustacés recevront alors essentiellement le toxique par la nourriture. Sur les solutions centrifugées et lavées, un comptage au Compteur COULTER est réalisé de manière à déterminer la quantité de solution algale à donner aux daphnies sur la base d'une ration de  $1.10^6$  chlorelles par daphnie et par heure, définie par ailleurs. Sur ces mêmes solutions, on effectue encore un prélèvement d'un volume connu (10ml) qu'on filtre sur MILLIPORE HAWP 0,45 $\mu$ . Le poids de matière sèche correspondant est mesuré, ce qui permet la détermination de la biomasse de chaque culture. Les échantillons peuvent être ensuite minéralisés et le cadmium dosé.

Toutes ces opérations sont répétées tous les quatre jours pendant 20 jours. On a donc ainsi 5 séries de culture de chlorelles échelonnées dans le temps et réalisées selon le même protocole donné par le tableau XLIX.

Les quantités d'algues ayant été déterminées pour 100 daphnies, le tableau L donne la constitution des différents milieux d'expérimentation correspondant aux cinq doses mises en oeuvre.

	0	10	50	100	250
Solution algale (en ml)	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$
Oligo L.C. (en ml) qsp.	800	800	800	800	800
VOLVIC (en ml)	1200	1200	1200	1200	1200
Quantité totale (en ml)	2000	2000	2000	2000	2000

Tableau L : Constitution des milieux d'expérimentation du modèle

Le rapport oligo L.C./VOLVIC est égal à 2/3 et respecte ainsi les conditions précédemment définies.

Les milieux étant constitués, on y introduit, par un rapide transfert à sec, les daphnies âgées de 0 à 24 heures provenant d'un élevage florissant. Celles-ci resteront au contact des chlorelles pendant 20 jours. Pendant les 10 premiers jours, les jeunes daphnies mises en expérimentation vont devenir adultes et seront alors aptes à se reproduire. Dans les 10 derniers jours, les naissances sont comptées chaque jour, permettant ainsi de connaître l'évolution du taux de reproduction en fonction du temps. Pour ce faire, nous avons été amenés à utiliser un dispositif simple (fig. 66).

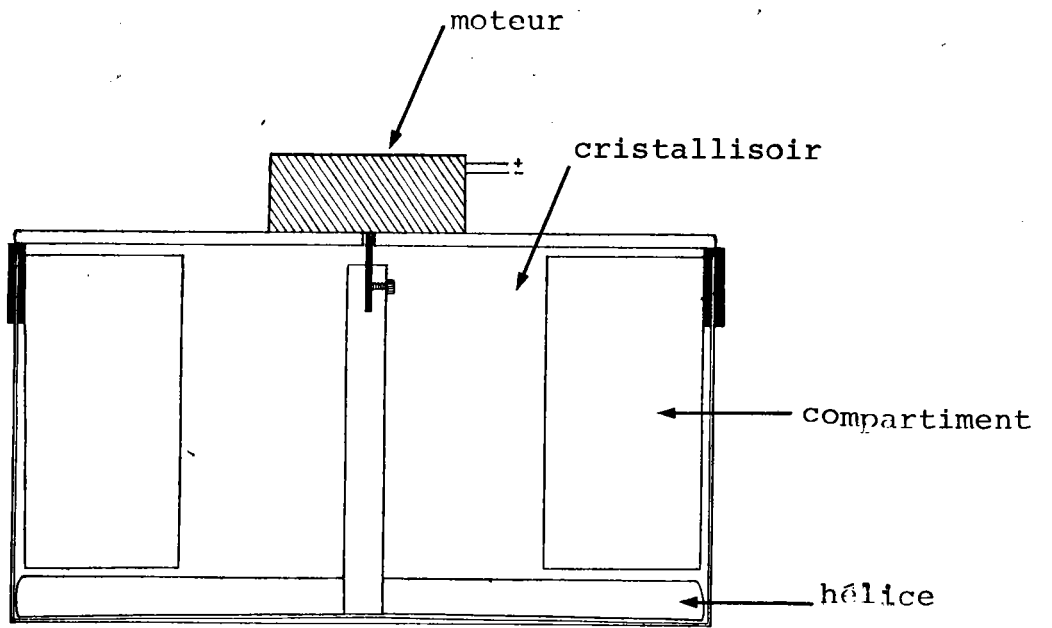
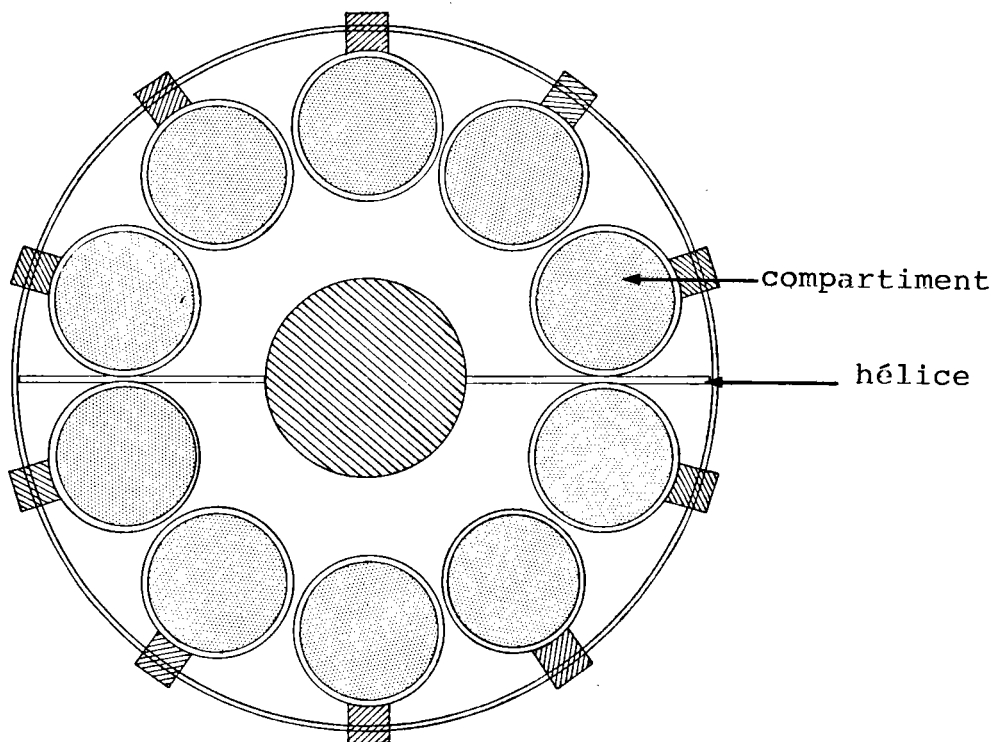


Figure 66: Schéma du dispositif utilisé (vue de profil; vue de haut)



Les daphnies-filles qui se trouvent dans le compartiment des daphnies-mères sont comptées tous les jours et placées successivement dans les compartiments suivants, au nombre de 9, correspondant chacun aux naissances journalières. Ainsi, les mères et les filles d'âge différent restent toujours au contact du même milieu. Ce dispositif est schématisé sur la figure 66. Le bac d'expérimentation est un cristallisateur de 2 litres (diamètre 190mm, hauteur 100mm). Les compartiments sont des tubes ALTUGLASS (diamètre extérieur 40mm, diamètre intérieur 34mm) coupés à la longueur de 80 mm et équipés à leur base d'un tamis en nylon de maille 340 $\mu$ m, empêchant ainsi toutes jeunes daphnies de le franchir. L'homogénéisation du milieu est réalisée grâce à une hélice de longueur légèrement inférieure au diamètre du cristallisateur et épousant le fond de celui-ci. Cette hélice, également en ALTUGLASS, est mue par un moteur synchrone CROUZET à 30 tours par minute (réf. 82334 AIG). On évite ainsi la sédimentation naturelle des chlorelles dans le milieu, assurant par là-même une répartition homogène de nourriture pour les daphnies en expérience.

Au bout de 20 jours, un échantillon de daphnies-mères et de daphnies-filles est prélevé, lavé, séché, pesé en vue du dosage du cadmium. Dans le même temps, une partie aliquote du milieu est prélevée et filtrée afin de connaître la concentration de cadmium dans la phase aqueuse. Le dispositif (hélices + compartiments) est ensuite enlevé après avoir compté les daphnies de toutes les classes et les avoir mélangé dans le cristallisateur.

Le pH du milieu est mesuré et un bullage additionnel est pratiqué. L'able est alors introduit dans le milieu. Au bout de 4 jours de contact, le poisson, qui a pu se nourrir de toutes les daphnies et des algues présentes, est alors tué par choc électrique, puis retiré du milieu. Il est ensuite lavé, séché, pesé et le dosage du cadmium total qu'il contient est fait. Dans le même temps, un prélèvement de 10ml du milieu est effectué et dosé. Les résidus comprenant les matières fécales et les algues non consommées sont récupérés et séchés en vue de leurs dosages, afin de pouvoir faire le bilan global de toute l'expérimentation. La durée totale de l'expérience est ainsi de 34 jours.

## 2. RESULTATS

Il nous a paru logique, à chaque niveau trophique, d'étudier d'abord les effets biologiques du métal et de les rattacher ensuite aux résultats analytiques obtenus afin de tenter une relation dose-effet.

### 2.1. Effets biologiques au niveau des chlorelles

Les effets biologiques au niveau des chlorelles peuvent être appréciés de diverses façons, comme nous l'avons déjà montré au chapitre I.

#### 2.1.1. COMPTAGES CELLULAIRES

Les résultats des comptages réalisés au compteur COULTER sur les différentes solutions algales sont réunis dans le tableau LI qui fournit également les moyennes et les écarts-types correspondant à chaque dose.

Pour une même concentration, il s'avère qu'il existe une grande variabilité des résultats entre les différentes séries réalisées. Les écarts-types sont anormalement grands. Pour les cinq séries réalisées, il apparaît nettement que nous avons deux populations différentes. Une première population groupe les résultats des séries 1 à 3 et se caractérise par des comptages cellulaires faibles. Une seconde population comprend les comptages des deux dernières séries, qui sont plus forts.

Pour les 2 populations différentes ou pour l'ensemble des résultats, l'analyse de variance (avec 1 facteur contrôlé) a permis de montrer que les moyennes des résultats pour les diverses concentrations de cadmium ne sont pas significativement différentes, pour un risque de 5%. En fait, dans les conditions expérimentales utilisées, le comptage cellulaire ne semble pas être un reflet de l'action toxique du cadmium.



Doses	S.1	S.2.	S.3	Moyennes	S.4	S.5	Moyennes	Moyennes et écart-types
0	18,8	27,9	30,2	25,6	53,8	51,5	52,6	36,4(+15,4)
10	25,9	26,3	23,1	25,1	60,8	67,5	64,1	40,7(+21,6)
50	28,1	30,4	37,1	31,9	64,9	74,7	69,8	47,0(+21,3)
100	24,0	35,9	30,3	30,1	59,9	67,1	63,5	43,4(+19,0)
250	18,9	24,8	25,3	23,0	43,5	59,7	51,6	34,4(+16,9)

TABEAU LI : MOYENNES ET ÉCART-TYPES DES COMPTAGES, AVANT CENTRIFUGATION, DES CULTURES ALGALES DES 5 SÉRIES. MISE EN ÉVIDENCE DE 2 POPULATIONS.

*Les résultats sont exprimés en nombre de chlorelles x 10<sup>-6</sup>/ml.*

2.1.2. BIOMASSES

La biomasse fait intervenir, non seulement la concentration, mais aussi le volume de solution algale, ainsi que le poids moyen d'une chlorelle. Elle s'exprime de la façon suivante :

$$B = c.v.\bar{p}$$

La prise en compte de ces trois paramètres exige un certain nombre de remarques quant à leur détermination.

1.  $c$  représente la concentration algale mesurée avant centrifugation, telle que nous l'avons envisagée précédemment. Elle s'exprime en cellules par ml.

2.  $v$  représente le volume de solution algale mesuré avant centrifugation en ml. Le tableau LII fournit les différents volumes obtenus. La moyenne générale est d'environ 800ml. Cette diminution de volume est due à la stérilisation, puis à l'évaporation durant les 10 jours de culture. La perte totale atteint ainsi 20% du volume de départ.

3.  $\bar{p}$  représente le poids moyen d'une chlorelle à l'état sec. Ce paramètre n'est pas directement mesurable. On le détermine en filtrant une quantité déterminée de solution algale, dont on connaît par ailleurs la concentration cellulaire. Après séchage à 105°C, on mesure ensuite le poids d'algues filtrées, qui correspond à un nombre d'individus connus. On en déduit le poids moyen d'une chlorelle qui s'exprime en pg. Le tableau LIII fournit les différents poids moyens calculés ainsi que les moyennes et écart-types correspondant à chaque dose. On constate que ce paramètre varie d'un facteur de 1 à 3 pour une même concentration. Dans les cinq séries réalisées, il apparaît nettement que nous avons, là aussi, deux populations. Une première population regroupe les résultats des séries 1 à 3, et se caractérise par des poids moyens cellulaires forts, tandis qu'une seconde population, constituée des séries 4 et 5 ont des poids moyens cellulaires plus faibles. L'analyse de variance réalisée sur les moyennes pour chacune de ces populations n'a pas révélé de différence significative au seuil de 5%. Il en a été de même pour les moyennes générales réalisées sur les 5 séries.

Doses	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5	Volume moyen et écart-type correspondant à chaque concentration	Volume moyen général et écart-type
0	760	810	845	780	840	807 ± 37	797 ± 67
10	860	830	870	820	760	828 ± 43	
50	790	820	855	760	705	786 ± 57	
100	735	790	865	600	680	734 ± 101	
250	780	800	885	870	820	831 ± 45	

TABLEAU LII : MESURE DES VOLUMES DES 5 SÉRIES DE CULTURES ALGALES.

*Les résultats sont exprimés en ml.*

Doses	S.1	S.2	S.3	Moyennes	S.4	S.5	Moyennes	Moyennes et écart-types
0	12,17	10,52	10,30	11,00	4,04	4,27	4,15	8,26 (+3,82)
10	11,69	11,00	12,61	11,77	3,84	5,87	4,85	9,00 (+3,90)
50	9,72	9,81	7,70	9,08	4,16	4,80	4,48	7,24 (+2,66)
100	10,53	7,96	9,84	9,44	4,64	4,30	4,47	7,45 (+2,88)
250	13,59	11,37	10,62	11,86	4,82	4,42	4,62	8,96 (+4,12)

TABLEAU LIII : RÉSULTATS DES POIDS MOYENS DE MATIÈRE SÈCHE D'UNE CELLULE ALGALE (EN PG)  
POUR LES 5 SÉRIES DE CULTURES ALGALES.

Témoin	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
Volume de solution algale retrouvé (en ml)	760	810	845	780	840
Concentration algale $\times 10^{-6}$ (en chlorelles/ml)	18,787	27,920	30,190	53,830	51,485
Poids moyen cellulaire (en pg)	12,17	10,52	10,30	4,04	4,27
Biomasse moyenne (en mg)	173,76	237,91	262,76	169,63	184,67
Moyenne et écart-type	205,75 $\pm$ 42,00				

TABLEAU LIV : CALCUL DE LA BIOMASSE DES CULTURES ALGALES DES DIFFÉRENTES SÉRIES TÉMOINS.

10 $\mu\text{g}$ Cd/l	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
Volume de solution algale retrouvé (en ml)	860	830	870	820	760
Concentration algale $\times 10^{-6}$ (en chlorelles/ml)	25,864	26,307	23,110	60,845	67,515
Poids moyen cellulaire (en pg)	11,69	11,00	12,61	3,84	5,87
Biomasse moyenne (en mg)	260,02	240,18	253,53	191,59	301,20
Moyenne et écart-type	249,30 $\pm$ 39,50				

TABLEAU LV : CALCUL DE LA BIOMASSE DES CULTURES ALGALES DES DIFFÉRENTES SÉRIES INTOXIQUÉES À 10  $\mu\text{g}$  Cd/l.

50 µg Cd/l	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
Volume de solution algale retrouvé (en ml)	790	820	855	760	705
Concentration algale x 10 <sup>-6</sup> (en chlorelles/ml)	28,124	30,354	37,060	64,885	74,670
Poids moyen cellulaire (en pg)	9,72	9,81	7,70	4,16	4,80
Biomasse moyenne (en mg)	215,96	244,17	243,98	205,14	252,68
Moyenne et écart-type	232,39 ± 20,60				

TABEAU LVI : CALCUL DE LA BIOMASSE DES CULTURES ALGALES DES DIFFÉRENTES SÉRIES INTOXIQUÉES À 50 µg Cd/l.

100µg Cd/l	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
Volume de solution algale retrouvé (en ml)	735	790	865	600	680
Concentration algale x 10 <sup>-6</sup> (en chlorelles/ml)	24,019	35,941	30,270	59,875	67,125
Poids moyen cellulaire (en pg)	10,53	7,96	9,84	4,64	4,30
Biomasse moyenne (en mg)	185,90	226,01	257,65	166,69	196,27
Moyenne et écart-type	206,50 <sub>-35,74</sub>				

TABEAU LVII : CALCUL DE LA BIOMASSE DES CULTURES ALGALES DES DIFFÉRENTES SÉRIES INTOXIQUÉES À 100 µg Cd/l.



250 $\mu\text{g Cd/l}$	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5
Volume de solution algale retrouvé (en ml)	780	800	885	870	820
Concentration algale $\times 10^{-6}$ (en chlorelles/ml)	18,896	24,824	25,265	43,535	59,665
Poids moyen cellulaire (en pg)	13,59	11,37	10,62	4,82	4,42
Biomasse moyenne (en mg)	200,30	225,80	237,46	182,56	216,25
Moyenne et écart-type	212,47 $\pm$ 21,56				

TABLEAU LVIII : CALCUL DE LA BIOMASSE DES CULTURES ALGALES DES DIFFÉRENTES SÉRIES INTOXIQUÉES À 250  $\mu\text{g Cd/l}$ .

Les tableaux LIV à LVIII regroupent, pour chaque dose de cadmium, les trois paramètres utilisés dans le calcul de la biomasse et donnent les biomasses moyennes (exprimées en mg) des différentes séries effectuées. Bien qu'elles varient de façon sensible, les biomasses moyennes obtenues sont, pour une même dose, du même ordre de grandeur. Si on compare ce paramètre au paramètre concentration algale précédemment étudié, on observe que les variations obtenues sont beaucoup plus faibles. Ceci s'explique par le fait que les variations des concentrations algales et des poids moyens sont inversement proportionnels. Autrement dit, une culture caractérisée par un comptage cellulaire relativement faible, mais un poids moyen cellulaire élevé à une biomasse sensiblement égale à celle d'une culture caractérisée par un comptage cellulaire fort et un poids moyen cellulaire faible. Les deux paramètres ont ainsi des significations biologiques distinctes, et représentent deux expressions différentes d'une même culture.

Par ailleurs, le tableau LIX fournit, pour les 5 doses croissantes de cadmium, les moyennes et les écarts-types des différentes biomasses moyennes ainsi calculées. L'analyse de variance a permis de montrer, au risque 5%, qu'il n'y a aucune différence significative entre les cinq moyennes.

Doses	biomasse moyenne et écart-type		
0	205,75	±	42,00
10	249,30	±	39,50
50	232,39	±	20,60
100	206,50	±	35,74
250	212,47	±	21,56

Tableau LIX : Biomasses moyennes des cultures algales aux différentes concentrations de cadmium.

On note toutefois sur la figure 67 que la biomasse moyenne obtenue est maximum pour 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  et minimum pour 0  $\mu\text{g}/\text{l}$ ; les biomasses moyennes observées pour 250 et 100  $\mu\text{g}/\text{l}$  étant comparables à celles du témoin. A moins d'envisager un effet favorable des faibles doses de cadmium (10  $\mu\text{g}/\text{l}$ , et à moindre degré 50  $\mu\text{g}/\text{l}$ ) sur la biomasse par rapport au témoin (LUCKEY, 1975), il faut bien convenir que la valeur moyenne obtenue par le témoin semble faible ou que celle obtenue pour la dose de 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  semble forte.

Quoiqu'il en soit, les variations relatives d'une moyenne à l'autre sont faibles, même si on attendait, vu les résultats précédemment acquis, des variations beaucoup plus significatives en fonction des doses croissantes de cadmium. Cette différence de réponse s'explique par des conditions expérimentales différentes. L'analyse des différentes variations enregistrées permet d'avancer le fait que les différentes cultures d'algues envisagées dans ce cas ne sont pas synchrones. Cette désynchronisation semble provenir des conditions inégales d'une culture à l'autre en ce qui concerne particulièrement l'éclairage et le bullage. Nous allons maintenant envisager comment ces conditions de culture peuvent intervenir sur l'action des doses croissantes de cadmium étudiées d'un point de vue analytique.

## 2.2. Résultats analytiques concernant les chlorelles

Dans cette partie, nous allons successivement aborder le dosage des surnageants de la première centrifugation, puis le dosage des surnageants réunis des deuxième et troisième centrifugations, que l'on appellera eaux de lavages, ensuite le dosage des algues elles-mêmes, enfin le bilan global de toute l'opération. Remarquons également que nous tiendrons compte, dans tous nos calculs, de la quantité due au milieu oligo L.C. (1,13  $\mu\text{g}/\text{l}$  en moyenne).

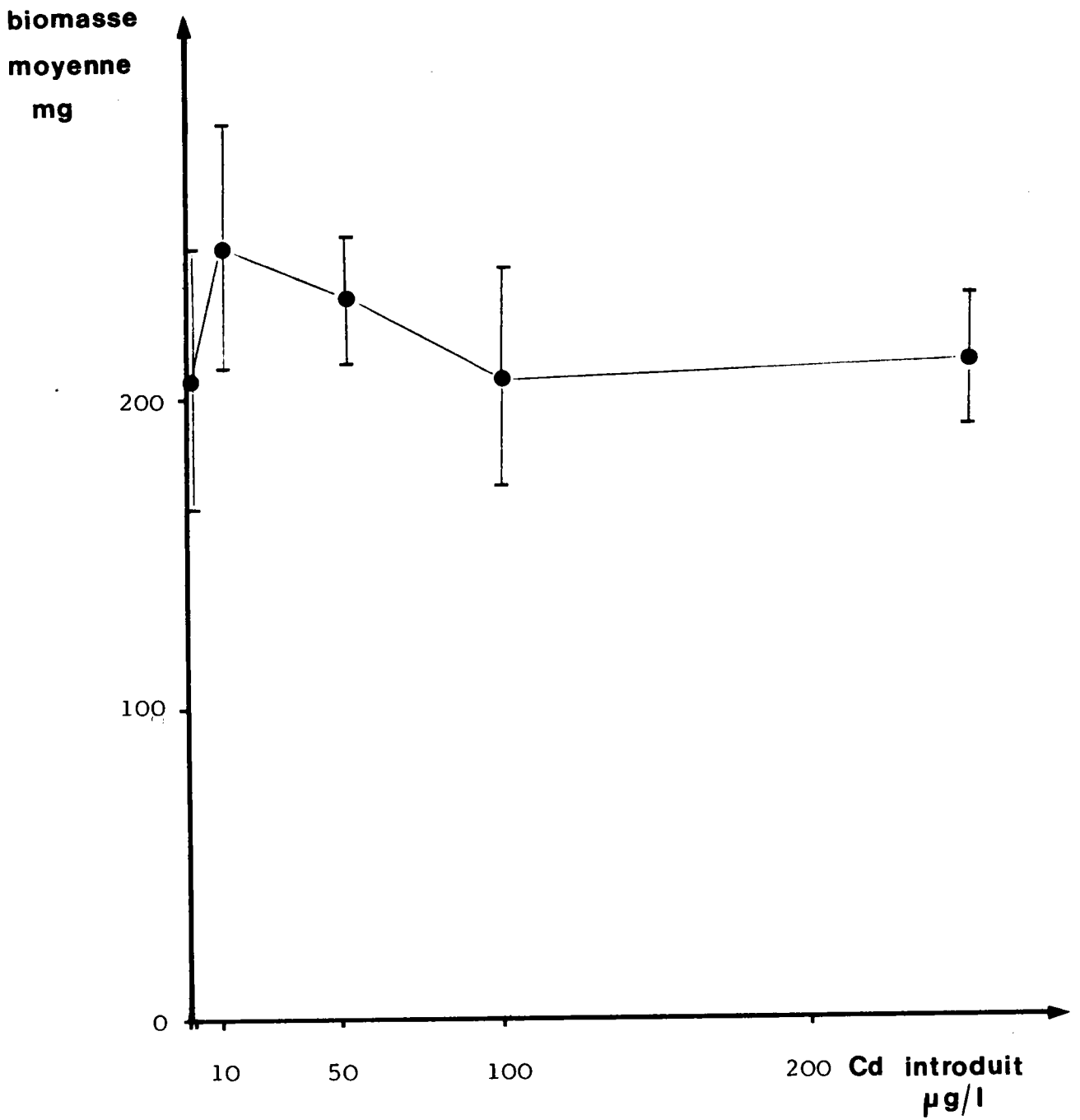


Figure 67: Moyennes et écart-types des biomasses des cultures algales des 5 séries (en poids de matière sèche).

### 2.2.1. DOSAGE DES SURNAGEANTS DE LA PREMIERE CENTRIFUGATION

Ce dosage a été effectué sur les différentes séries d'erlenmeyers. Le tableau LX fournit, pour chaque dose, les concentrations de cadmium retrouvées dans les différentes séries, ainsi que les moyennes et écart-types correspondants.

Le test de STUDENT-FISCHER a permis de préciser que la différence entre chacune des moyennes obtenues était hautement significative pour un risque inférieur à 1%. La régression linéaire entre la concentration moyenne de cadmium retrouvée et la concentration de cadmium introduite a permis de mettre en évidence un coefficient de corrélation de 0,998. On peut en conclure que la concentration de cadmium trouvée, après 10 jours de culture, dans la phase aqueuse des milieux de culture, est proportionnelle à la concentration de cadmium introduite au début, pour un risque inférieur à 0,1%.

Le tableau LXI rappelle les concentrations moyennes de cadmium trouvées dans les surnageants et fournit les pourcentages moyens de cadmium trouvés dans les surnageants par rapport au cadmium introduit (compte-tenu du milieu L.C.) soit en concentration, soit en quantité. La différence constatée entre les pourcentages exprimés en concentration (P) et ceux exprimés en quantité (P') provient du fait que l'on passe d'un volume total de 1000ml au début (pour les deux erlenmeyers) à un volume moyen de 800ml à la fin (voir tableau LIII), ce qui fait que  $P' = 0,8 P$ .

On constate ainsi que la quantité de cadmium restant dans la phase aqueuse varie entre 23,7% et 32,5% de la quantité de cadmium introduite, dans les conditions expérimentales utilisées (entre 0 et 250  $\mu\text{g/l}$ ).

### 2.2.2. DOSAGE DES EAUX DE LAVAGE

Le dosage des eaux de lavage a été effectué sur des parties aliquotes des deuxième et troisième centrifugations filtrées puis mélangées à parts égales. Le tableau LXII fournit les résultats obtenus

Doses	Concentration de cadmium retrouvée dans les surnageants des différentes séries					Moyennes et écart-types des concentrations de cadmium	Test de Student-Fischer Comparaison de deux moyennes
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5		
0	0,32	0,12	0,32	0,56	0,36	0,34 ( $\pm 0,16$ )	99,9 %
10	4,66	3,62	3,82	3,78	3,30	3,84 ( $\pm 0,50$ )	99,9 %
50	16,18	14,36	15,24	15,92	14,15	15,17 ( $\pm 0,91$ )	99 %
100	27,60	26,48	36,96	46,56	47,40	37,00 ( $\pm 9,98$ )	99,9 %
250	83,40	89,20	120,80	129,00	88,00	102,08 ( $\pm 21,14$ )	

**TABLEAU LX : RÉSULTATS DES DOSAGES DE CADMIUM DANS LES SURNAGEANTS DES CULTURES ALGALES DES 5 SÉRIES (MOYENNES ET ÉCART-TYPES).**

Doses	Concentration de cadmium effectivement introduite au départ (en µg/l)	Moyennes des concentrations de cadmium (en µg/l)	Pourcentages moyens de cadmium retrouvé dans les surnageants par rapport au cadmium introduit	
			en concentration (P)	en quantité (P')
0	1,13	0,34	29,73	24,00
10	11,13	3,84	34,47	28,54
50	51,13	15,17	29,67	23,32
100	101,13	37,00	36,59	26,85
250	251,13	102,08	40,65	33,78

TABLEAU LXI : CALCUL DES POURCENTAGES MOYENS DE CADMIUM RETROUVÉ DANS LES SURNAGEANTS PAR RAPPORT AU CADMIUM INTRODUIT (COMPTE-TENU DE LA CONCENTRATION DE CADMIUM DU MILIEU OLIGO L.C.)

Doses	Concentration de cadmium retrouvée dans les eaux de lavage ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )					Moyennes et écart-types des concentrations de cadmium ( $\mu\text{g}/\text{l}$ )	Test de Student-Fisher Comparaison de deux moyennes successives
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Série 5		
0	0,75	0,30	0,55	0,60	0,50	0,54 ( $\pm 0,16$ )	99,9%
10	1,30	1,10	1,10	1,65	1,70	1,37 ( $\pm 0,29$ )	95 %
50	2,30	2,85	9,15	10,40	5,35	6,01 ( $\pm 3,66$ )	90 %
100	7,55	9,50	12,95	33,60	13,65	15,45 ( $\pm 10,45$ )	90 %
250	14,20	26,30	37,35	65,25	47,40	38,10 ( $\pm 19,59$ )	

TABLEAU LXII : CALCUL DES MOYENNES ET ÉCART-TYPES DES CONCENTRATIONS DE CADMIUM RETROUVÉES DANS LES EAUX DE LAVAGE.



pour les différentes séries ainsi que les moyennes et écart-types calculés. Il faut distinguer le cas des solutions témoins, pour lesquelles le milieu oligo L.C. utilisé pour rincer les algues se trouve à une concentration moyenne supérieure à la concentration moyenne de cadmium restant dans la phase aqueuse après 10 jours de culture. Ce n'est pas le cas pour les solutions enrichies en toxique.

Pour ces dernières, on remarque une grande dispersion des résultats. Le test de STUDENT-FISCHER a permis de constater que la différence était significative d'une moyenne à l'autre pour un risque maximum inférieur à 10%. Cette variabilité laisse présager que l'élimination que l'on observe n'est pas un phénomène physique simple. L'étude de la dynamique d'élimination du cadmium à partir de chlorelles intoxiquées mériterait, à cet égard, une étude détaillée et plus approfondie.

Un ajustement linéaire a permis de montrer que la concentration moyenne de cadmium retrouvée dans les eaux de lavage est bien proportionnelle à la concentration de cadmium introduite pour un risque inférieur à 0,1% ( $r = 0,999$ ).

### 2.2.3. DOSAGE DU CADMIUM DANS LES ALGUES

Rappelons qu'après avoir centrifugé, lavé et compté les différentes solutions algales, des parties aliquotes de 10ml sont prélevées et filtrées sur MILLIPORE HAWP 025 0,45  $\mu$ , puis séchées à 105°C. Après pesée, les algues sont minéralisées et dosées.

Les résultats des dosages figurent dans le tableau LXIII. Entre les différentes séries, une variabilité non négligeable existe pour une même dose : les écart-types calculés sont relativement importants et augmentent en accord avec les moyennes. Le test de STUDENT-FISCHER a permis de montrer que pour un risque inférieur à 1%, les différences entre deux moyennes consécutives étaient significativement différentes.

La figure 68 permet de mettre en évidence qu'en moyenne la concentration de cadmium retrouvée dans les algues est proportionnelle à la concentration de cadmium introduite au début (compte-tenu du milieu oligo L.C.) pour un risque inférieur à 1% ( $r = 0,998$ ). La droite de régression ainsi tracée permet d'apprécier la bioaccumulation moyenne. Le facteur de concentration moyen est de 2270. On peut rapprocher ce résultat de celui obtenu pour des cultures de chlorelles placées sur un agitateur mécanique, sans bullage, et réalisées dans les erlenmeyers de 50ml où le facteur de concentration moyen calculé entre 0 et 250  $\mu\text{g}/\text{l}$  est de 3130. Ces deux facteurs de concentration sont du même ordre de grandeur, tout en correspondant à des conditions de culture différentes. Toutefois, l'influence plus précise des conditions de culture (bullage, agitation, éclairage, quantité de milieu oligo L.C....) sur le calcul des facteurs de concentration pourrait mériter une étude complémentaire pour la connaissance plus approfondie de la réponse physiologique fine de cette espèce.

En somme, les concentrations de cadmium dans les algues séchées sont au moins 1500 fois plus fortes que les concentrations de cadmium dans la phase liquide.

Il convient de distinguer, d'une part le fait de raisonner en concentration comme nous venons de le faire, qui conduit à s'exprimer en facteur de concentration, et d'autre part le fait de raisonner en quantité qui permet d'apprécier la quantité de cadmium accumulé par les algues. Or, le calcul de cette donnée à partir de la concentration de cadmium trouvée dans les algues (exprimée en  $\text{ng}/\text{mg}$ ) ne peut s'obtenir qu'en faisant intervenir la biomasse moyenne d'une culture donnée. Ce dernier paramètre a déjà été étudié au paragraphe précédent (2.1.2.) et résumé dans le tableau LX. Le calcul de la quantité moyenne de cadmium trouvé dans les algues est ainsi possible (tableau LXIV). On peut en déduire le pourcentage de cadmium accumulé par les chlorelles. Il apparaît que celui-ci varie en fonction de la dose. Proche de 80% pour le témoin, il diminue pour se stabiliser aux environs de 40-50% pour les trois dernières doses. Ce pourcentage d'accumulation est plus faible que celui trouvé précédemment dans le chapitre I (65%) ce qui s'explique par les conditions de culture différentes, comme nous l'avons montré ci-dessus pour les facteurs de concentration.

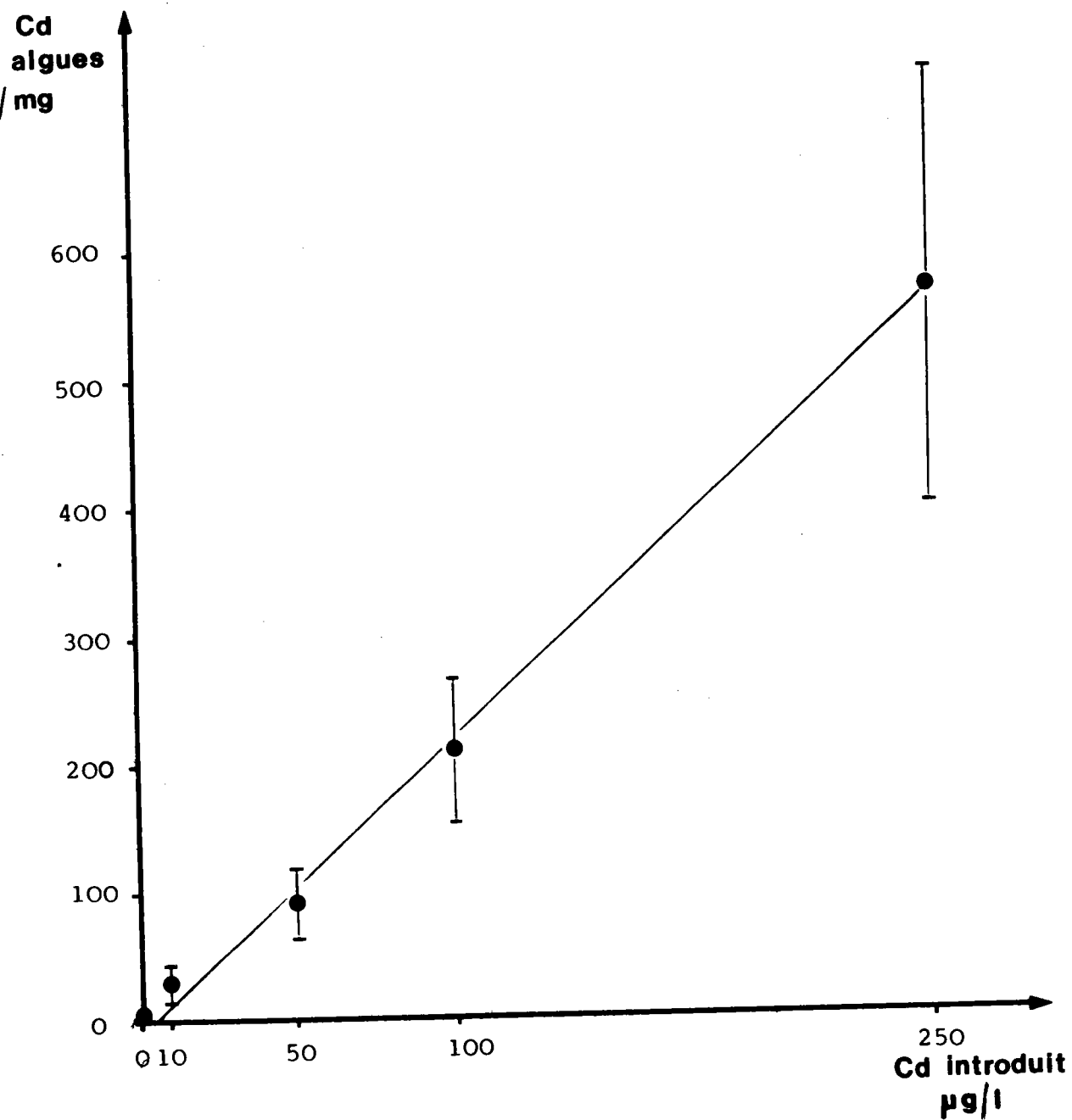


Figure 68: Relation entre la concentration de cadmium retrouvée dans les algues et la concentration introduite ( $\bar{y} = - 6,85 + 2,27 \bar{x}$ ,  $r=0,998$ ).

Doses	Concentration de cadmium retrouvée dans les algues (ng/mg)					Moyenne des concentrations et écart-types		Test de STUDENT-FISCHER
	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5			
0	4,60	1,70	2,30	7,20	6,60	4,50	$\pm 2,48$	99 %
10	20,90	16,95	25,15	51,15	39,70	30,75	$\pm 14,27$	99 %
50	120,10	55,80	88,10	109,00	89,05	92,40	$\pm 24,55$	99 %
100	250,90	146,80	184,50	286,00	182,00	210,05	$\pm 56,74$	99 %
250	623,85	460,75	452,40	843,45	470,10	570,10	$\pm 168,39$	

TABLEAU LXIII : CALCUL DES MOYENNES ET ÉCART-TYPES DES CONCENTRATIONS DE CADMIUM RETROUVÉES DANS LES ALGUES.

doses	concentration moyenne dans les algues (ng/mg)	biomasse moyenne calculée (mg)	quantité moyenne dans les algues (µg)	quantité introduite (µg)	pourcentage moyen de cadmium retrouvé dans les algues
0	4,50	205,75	0,92	1,13	81,8 %
10	30,75	249,30	7,67	11,13	68,9 %
50	92,40	232,40	21,48	51,13	42,0 %
100	210,05	206,55	43,39	101,13	42,9 %
250	570,10	212,45	121,13	251,13	48,2 %

TABEAU LXIV : CALCUL DU POURCENTAGE MOYEN DE CADMIUM RETROUVÉ DANS LES ALGUES PAR RAPPORT À LA QUANTITÉ INTRODUITE.

#### 2.2.4. BILAN DES DIFFERENTES DONNEES CONCERNANT LES ALGUES

Ce bilan est effectué à partir des valeurs moyennes calculées précédemment, à savoir le cadmium trouvé dans la phase aqueuse, le cadmium éliminé par lavage et enfin le cadmium accumulé par les algues. Toutefois, certaines de ces données ayant été exprimées en concentration, nous les avons transformées en quantité. L'addition de ces 3 valeurs pour chaque dose permet de faire le bilan, connaissant les quantités de cadmium introduites (tableau LXV). On constate que ce bilan n'est pas strictement le même dans chaque cas. En ce qui concerne le témoin et la dose de  $10 \mu\text{g/l}$ , les bilans semblent corrects et à peu près comparables, bien que dans le cas du témoin, on retrouve un peu plus de cadmium que l'on en a introduit ; il faut souligner que les quantités mises en jeu sont alors très faibles et que les erreurs de mesure expliquent facilement ce paradoxe. Pour les autres doses, le pourcentage de cadmium perdu est en moyenne de 25%. Il semble toutefois acceptable, étant donné le nombre important de manipulations qui conduisent à ces chiffres ayant chacun leur domaine d'erreur propre.

#### 2.2.5. APPORT DE CADMIUM PAR LES ALGUES AUX DIFFERENTS LOTS DE DAPHNIES

Le cadmium est apporté essentiellement par les algues intoxiquées. Le tableau LXVI fournit les différentes quantités apportées au cours des cinq inoculums ( $S_1, S_2, S_3, S_4, S_5$ ) périodiquement effectués pour chaque dose de cadmium. Ce calcul tient compte du volume de solution algale introduit, lui-même fonction du comptage cellulaire effectué après centrifugation, et de la concentration de cadmium trouvé dans les algues (voir tableau LXIII).

Le milieu L.C. introduit contient également une part négligeable de cadmium. Compte-tenu de la constitution du milieu initial et des différents inoculums effectués, la quantité moyenne de cadmium ainsi apportée est de  $0,9 \mu\text{g}$ . Le tableau LXVII groupe les quantités de métal respectivement apportées par les algues et par le milieu oligo L.

Doses	Quantité présente dans les surnageants (µg)	Quantité présente dans les eaux de lavage (µg)	Quantité présente dans les algues (µg)	Quantité totale (µg)	Pourcentage de cadmium retrouvé par rapport au cadmium introduit
0	0,27	-	0,92	1,19	105,7 %
10	3,18	0,27	7,67	11,12	99,9 %
50	11,92	1,20	21,48	34,60	67,7 %
100	27,16	3,09	43,39	73,64	72,8 %
250	84,83	7,62	121,13	213,58	85,0 %

TABLEAU LXV : BILAN DU CADMIUM RETROUVÉ POUR LES DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS DE TOXIQUE MISES EN OEUVRE.

Doses	Volume de solution algale introduit (ml)					Quantité de cadmium introduite ( $\mu\text{g}$ )					Total
	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5	S.1	S.2	S.3	S.4	S.5	
0	36,0	22,6	19,8	13,0	12,0	0,54	0,17	0,23	0,28	0,27	1,49
10	23,0	23,4	25,6	13,7	12,5	2,35	1,79	3,04	1,89	2,23	11,30
50	23,0	20,5	16,4	10,9	11,5	11,22	5,26	6,52	4,36	4,09	31,45
100	29,0	18,0	19,4	15,6	11,6	25,39	11,25	17,46	12,74	7,51	74,35
250	34,8	25,7	22,8	14,7	11,0	81,44	50,25	46,06	38,84	19,79	236,38

TABLEAU LXVI : CALCUL DES QUANTITÉS DE CADMIUM INTRODUITES DANS LES MODÈLES, VIA LES CHLORELLES



Doses	Quantités de cadmium apportées par les algues ( $\mu\text{g}$ )	Quantités de cadmium apportées par le milieu oligo L.C. ( $\mu\text{g}$ )	Quantités totales de cadmium ( $\mu\text{g}$ )	Modèles n°
0	1,49	0,9	2,39	1
10	11,30	0,9	12,20	2
50	31,45	0,9	32,35	3
100	74,35	0,9	75,25	4
250	236,38	0,9	237,28	5

TABLEAU LXVII : CALCUL DES QUANTITÉS DE CADMIUM APPORTÉES DANS CHAQUE MODÈLE.

Ces diverses données ne sont pas simplement indicatives, elles vont nous servir de références en ce qui concerne la quantité totale de cadmium fournie aux daphnies, deuxième niveau trophique que nous allons à présent envisager sous l'angle biologique et sous l'angle analytique.

Signalons que pour des raisons de commodité et de clarté dans l'exposé des résultats, nous parlerons des modèles numérotés de 1 à 5. Ceux-ci correspondent aux cristallisoirs contenant les daphnies et les algues intoxiquées respectivement de 0 à 250  $\mu\text{g}/\text{l}$ .

### 2.3. Effets biologiques au niveau des daphnies

Pendant 20 jours, les daphnies se nourrissent de chlorelles intoxiquées. Cette durée minima (préconisée par BIESINGER et CHRISTENSEN, 1972) permet d'avoir des données au niveau des daphnies et de leur descendance. Nous considérerons trois paramètres biologiques : la natalité, le taux de reproduction et le poids moyen de matière sèche.

#### 2.3.1. LA MORTALITE

Ce paramètre a déjà fait l'objet d'une étude dans la deuxième partie, chapitre II. Nous allons donc, tout de suite, envisager les résultats obtenus. Ayant introduit au début 100 daphnies dans chaque modèle, nous avons compté ensuite dans les différents cas les daphnies survivantes tous les jours à partir du 11<sup>e</sup> jour de leur introduction (tableau LXVIII). On constate que les populations de daphnies des modèles 1 et 2 présentent une faible mortalité. Par contre, les mortalités des populations des modèles 3, 4 et 5 sont supérieures et à peu près comparables. Au vu de ces résultats, il semble y avoir un seuil d'action entre les chlorelles intoxiquées à 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  et celles intoxiquées à 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  (fig. 69). Les daphnies nourries avec des chlorelles intoxiquées au-dessus d'une dose non déterminée, mais comprise entre 10 et

Modèles	Nombre initial de daphnies J 10	Nombre de daphnies survivantes										Pourcentage final de mortalité
		J 21	J 22	J 23	J 24	J 25	J 26	J 27	J 28	J 29	J 30	
1	100	96	96	96	96	96	96	96	96	92	88	12
2	100	92	90	90	88	85	82	82	82	82	82	18
3	100	39	31	31	31	29	28	26	26	26	24	76
4	100	31	28	24	24	22	21	20	19	19	18	82
5	100	34	29	28	26	26	25	20	18	16	15	85

TABLEAU LXVIII : ÉVOLUTION DU NOMBRE DE DAPHNIES SURVIVANTES DANS LES DIFFÉRENTS MODÈLES.  
POURCENTAGE FINAL DE MORTALITÉ.

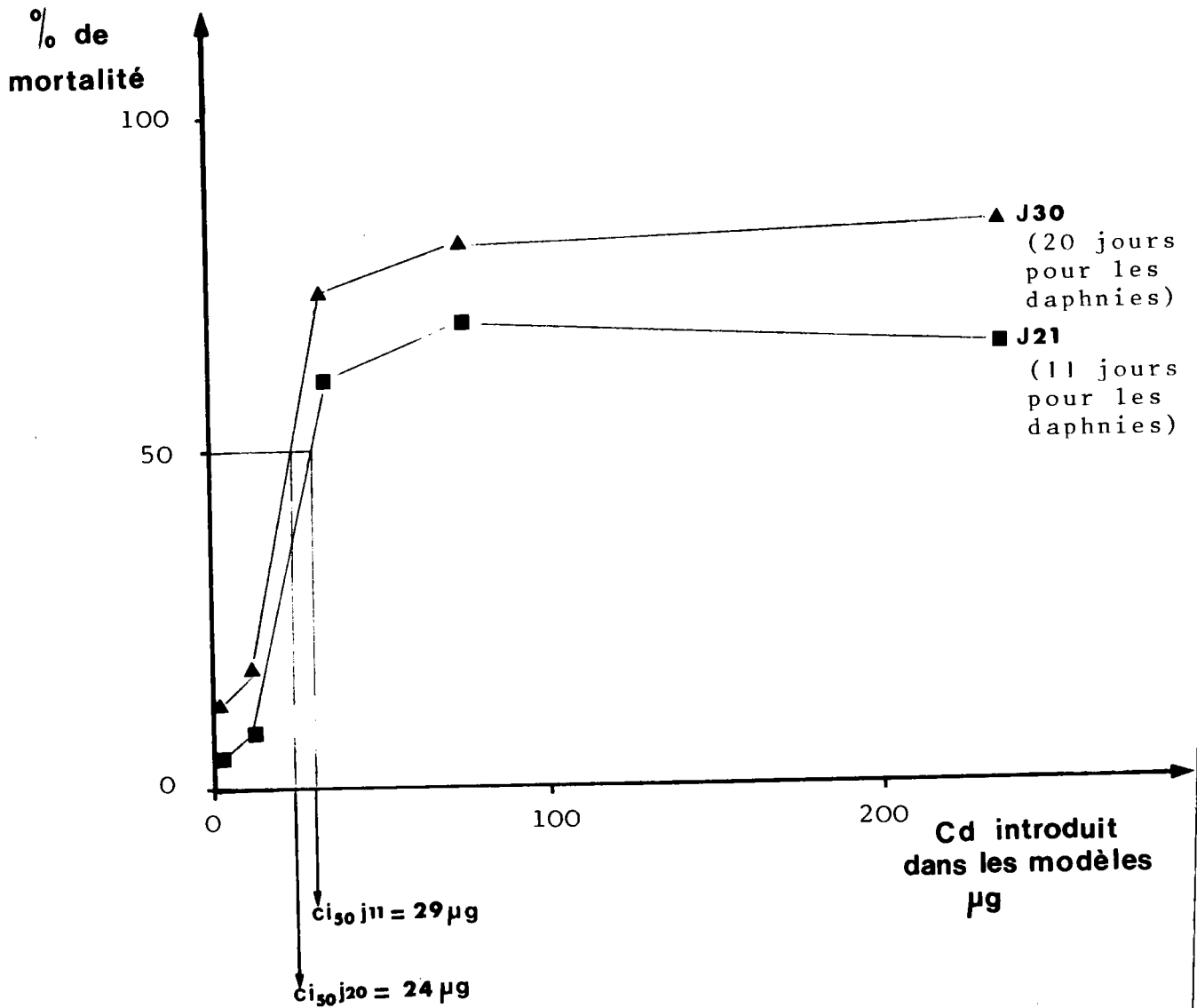


Figure 69: Relation entre le pourcentage de mortalité des daphnies et la quantité de cadmium introduite dans chaque modèle. Mise en évidence des  $CI_{50} J_{11}$  et  $J_{20}$  des daphnies.

50  $\mu\text{g}/\text{l}$ , ne peuvent pas résister à un tel apport de cadmium. Par ailleurs, les chlorelles intoxiquées à 50, 100 et 250  $\mu\text{g}/\text{l}$  ont à peu près le même résultat. Tout se passe comme si cette nourriture sélectionnait à peu près la même proportion d'individus résistants. Sur la figure 69, il semble que la CI 50-11 jours se situe aux environs de 29  $\mu\text{g}$  de cadmium et la CI 50-20 jours aux environs de 24  $\mu\text{g}$  de cadmium apporté par la nourriture.

### 2.3.2. LE TAUX DE REPRODUCTION

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau LXIX. On constate sur la fig. 70 une forte diminution du taux de reproduction des daphnies nourries avec des algues intoxiquées à 10  $\mu\text{g}/\text{l}$  par rapport au témoin (46% d'inhibition). Quant aux daphnies nourries avec des algues intoxiquées aux plus fortes doses, les taux de reproduction trouvés sont à peu près équivalents et correspondent à une inhibition de plus 90%. Comme précédemment, on constate que l'évolution des courbes 3, 4, 5 est à peu près identique et se distingue très nettement des deux autres courbes. Par contre, entre les courbes 1 et 2, la différence apparaît de façon beaucoup plus nette que pour le paramètre précédemment envisagé : le taux de reproduction se confirme être un bon reflet de l'effet des doses sub-létales de cadmium.

### 2.3.3. POIDS MOYEN DE MATIERE SECHE

Dans tous les modèles, nous avons prélevé, au jour 30 de l'expérience, 10 daphnies mères destinées au dosage. En ce qui concerne les daphnies filles, seuls les modèles 1 et 2 ont subi un prélèvement quantitativement représentatif des comptages effectués pendant 10 jours. Nous avons ainsi prélevé 100 daphnies filles, ce qui n'a pu être fait dans les trois autres cas, étant donné le nombre trop faible de daphnies produites.

	Modèle 1		Modèle 2		Modèle 3		Modèle 4		Modèle 5	
Temps	Petits/jour	Taux/jour	Petits/jour	Taux/jour	Petits/jour	Taux/jour	Petits/jour	Taux/jour	Petits/jour	Taux/jour
J21	426	4.438	360	3.913	30	0.769	50	1.613	2	0.059
J22	87	0.906	65	0.707	11	0.282	0	0	9	0.265
J23	98	1.010	69	0.767	10	0.323	8	0.286	4	0.138
J24	1800	18.750	604	6.711	33	1.065	3	0.125	1	0.036
J25	422	4.396	192	2.182	10	0.323	8	0.333	7	0.269
J26	48	0.500	31	0.365	0	0	0	0	5	0.192
J27	64	0.667	40	0.488	0	0	1	0.048	1	0.040
J28	1044	10.875	564	6.878	0	0	9	0.450	2	0.100
J29	227	2.365	141	1.720	2	0.077	1	0.053	0	0
J30	67	0.728	19	0.232	0	0	1	0.053	10	0.625
Total		44.646		23.963		2.839		2.961		1.724
Nbre de jours de ponte		10		10		10		10		10
Taux de reproduction		4.46		2.40		0.28		0.30		0.17
Pourcentage d'inhibition		-		46		94		93		96

TABLEAU LXIX : ÉVOLUTION DU TAUX DE REPRODUCTION DES DAPHNIES DE CHAQUE MODÈLE. MISE EN ÉVIDENCE DES POURCENTAGES D'INHIBITION.

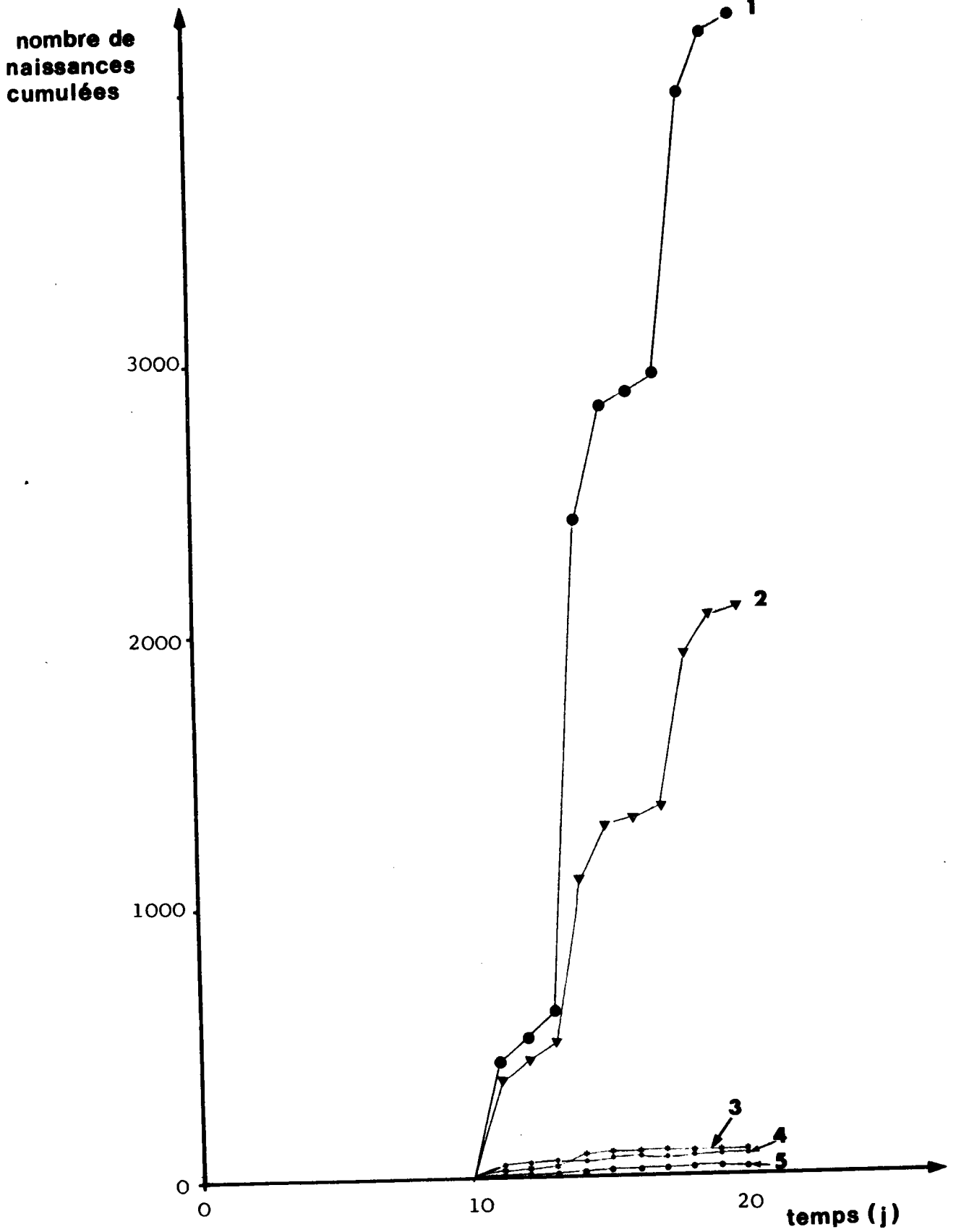


Figure 70: Courbe des naissances cumulées pour les différents modèles.

Les résultats (tableau LXX) sont exprimés en poids moyen de matière sèche d'une daphnie. De plus, le pourcentage des différents essais par rapport au témoin a été calculé. On observe ainsi une nette diminution des pourcentages entre les modèles 1 et 5.

modèles n°	Poids de matière sèche des daphnies mères ( $\mu\text{g}$ )	% des essais par rapport au témoin	Poids de matière sèche des daphnies filles ( $\mu\text{g}$ )	% des essais par rapport au témoin
1	305	100	31	100
2	238	78	30	97
3	96	31	-	-
4	104	34	-	-
5	92	30	-	-

Tableau LXX : Poids de matière sèche des daphnies mères et des daphnies filles des différents modèles . Calcul des pourcentages des essais par rapport au témoin.

Le pourcentage des modèles 3, 4 et 5 sont comparables. Ils se différencient nettement du pourcentage relatif au modèle n°2 (78%). Ainsi donc, le poids moyen de matière sèche, tout comme le taux de reproduction, est un paramètre d'étude intéressant les doses sub-létales. Nous avons d'ailleurs tenté une corrélation entre ces deux variables qui s'avère très satisfaisante ( $r = 0,988$ ).

Pour les daphnies filles, les résultats obtenus sont comparables. Compte-tenu du fait que le nombre de naissances diminue environ de moitié entre le modèle 1 et 2 (§2.3.2.), l'action du cadmium sur les daphnies filles vivantes est peu observée. On peut envisager, cet égard, un phénomène de résistance au cadmium. Il serait intéressant de développer une telle étude sur 1 ou 2 générations supplémentaires pour mettre en évidence si un tel phénomène de résistance existe vraiment.



## 2.4. Résultats analytiques concernant les daphnies

Les résultats des dosages effectués sur les daphnies mères et filles prélevées dans chacun des 5 modèles sont récapitulés dans le tableau LXXI, y ont été ajoutés les résultats des prélèvements effectués au J30 de l'expérience, fournissant la teneur en cadmium dans le milieu, après filtration.

Modèles	Cadmium dans les daphnies mères (ng/mg)	Cadmium dans les daphnies filles (ng/mg)	Cadmium retrouvé dans le milieu après filtration ( $\mu\text{g/l}$ )
1	1,35	1,75	0,45
2	32,30	38,40	1,00
3	44,70	-	2,40
4	58,10	-	5,45
5	259,85	-	11,00

Tableau LXXI : Résultats des dosages de cadmium effectués dans les daphnies mères et filles, et dans le milieu après filtration.

La figure 71 permet de se rendre compte de l'évolution du taux de cadmium des daphnies mères en fonction de la quantité introduite. Au risque d'erreur de 1%, la quantité de cadmium retrouvée est significativement liée, de façon linéaire, à la quantité introduite ( $r = 0,988$ ).

En ce qui concerne les daphnies filles, leur imprégnation semble légèrement supérieure à celle des mères tout en restant encore comparable.

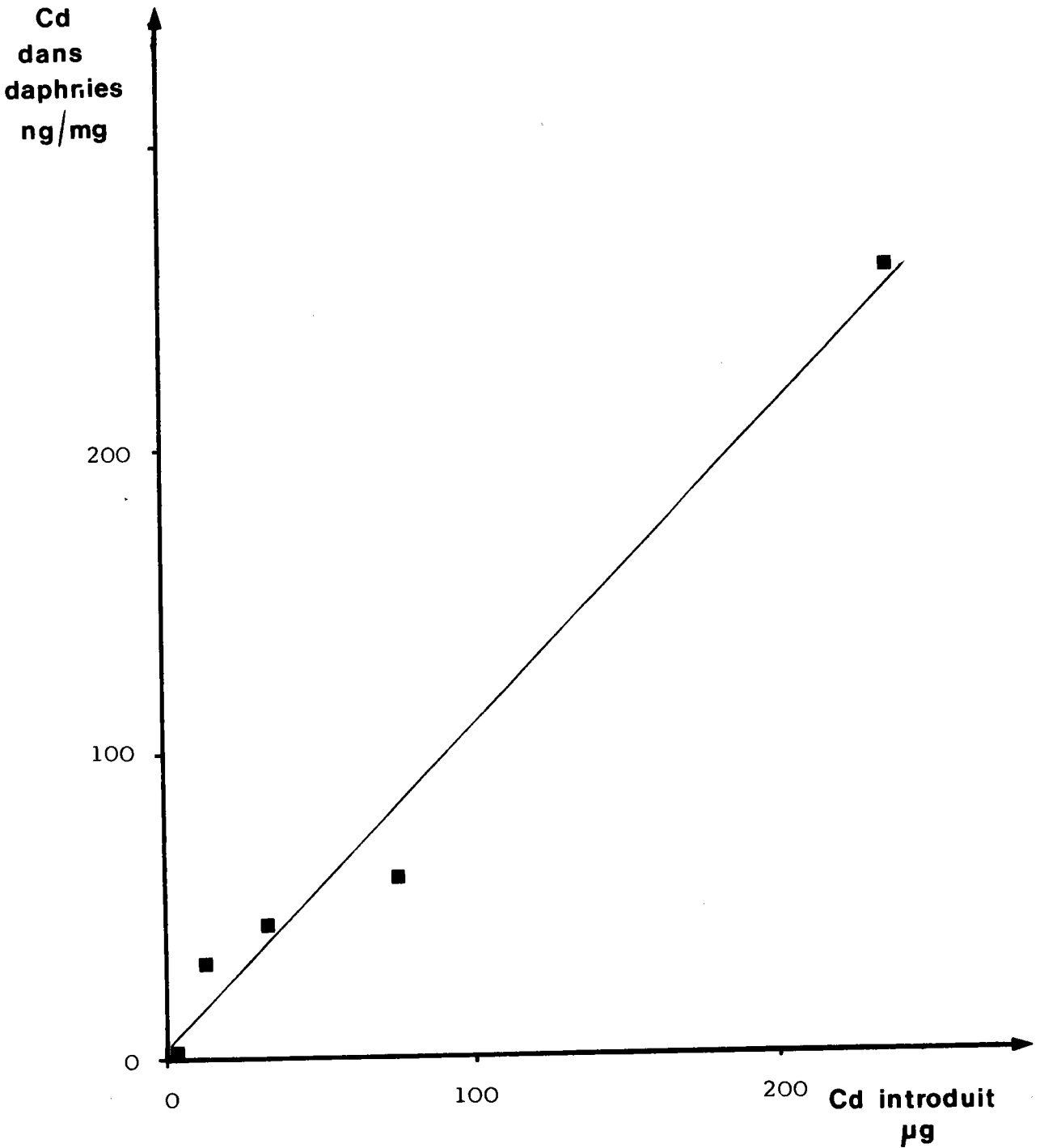


Figure 71: Relation entre la concentration de cadmium retrouvée dans les daphnies et la quantité de cadmium introduite dans les modèles  
 (  $\bar{y} = 3,40 + 1,05 \bar{x}$  ,  $r = 0,988$  )

A l'aide de ces résultats, on peut estimer la quantité de cadmium contenue dans les daphnies mères et les daphnies filles restant dans les modèles et destinées à servir de nourriture aux poissons (tableau LXXII). Du fait du faible nombre de daphnies filles retrouvées dans les modèles 3, 4 et 5, il n'est pas possible de connaître la quantité de cadmium apportée par celles-ci. On supposera donc cette quantité négligeable.

Modèles	Quantité de cadmium contenue dans les daphnies mères restantes (ng)	Quantité de cadmium contenue dans les daphnies filles restantes (ng)
1	32,60	219,50
2	553,50	221,35
3	60,10	-
4	48,35	-
5	119,50	-

Tableau LXXII : Evaluation des quantités de cadmium correspondant aux daphnies mères et filles restant dans les modèles au J30.

## 2.5. Discussion

Après 20 jours d'exposition des daphnies et 5 inoculums répétés de suspension algale, la concentration de cadmium dans la phase aqueuse est au maximum de 11  $\mu\text{g}/\text{l}$  (tableau LXXI). C'est dire qu'une faible quantité de cadmium apportée par les chlorelles se retrouve dans la phase aqueuse. Par exemple, dans le cas du modèle n°5 (chlorelles intoxiquées à 250  $\mu\text{g}/\text{l}$ ), la quantité totale apportée représente environ 237  $\mu\text{g}/\text{l}$ , et la quantité retrouvée dans la phase aqueuse environ 17  $\mu\text{g}/\text{l}$ , soit 7%.

Dans ces conditions, nous avons comparé les résultats obtenus à 2 autres séries de résultats :

(1) Tout d'abord, nous avons comparé les effets biologiques et analytiques qui viennent d'être observés avec ceux obtenus précédemment au chapitre II, §4.2. (contamination par la nourriture).

Les concentrations de cadmium dans les daphnies témoins sont ici plus faibles (1,75 au lieu de 3,20 ng/mg), de même que le taux de reproduction (4,46 au lieu de 5,63 petits par daphnie par jour) et le poids de matière sèche (305 au lieu de 560  $\mu$ g). La mortalité augmente légèrement (12% au lieu de 5%). Ces variations que l'on constate en l'absence de tout toxique, peuvent difficilement s'expliquer par la différence des temps d'exposition (20 jours au lieu de 28 jours), par les inoculums de chlorelles effectués de façon plus rapprochée (5 jours au lieu de 7 jours) ou par l'agitation continuelle créée par l'hélice placée dans le cristalliseur.

En effet, ces conditions semblent plus favorables que défavorables aux daphnies. Par contre, le fait que le milieu, bien que plus important (2000ml), reste le même durant 20 jours (alors qu'il était changé tous les 7 jours dans les expériences précédentes), peut entraîner les effets défavorables observés.

Mis à part les témoins, le cas des daphnies contaminées par des chlorelles intoxiquées à 10  $\mu$ g/l peut se comparer d'une expérience à l'autre : suivant les critères considérés, les variations observées sont plus ou moins fortes. La mortalité augmente ici légèrement (18% au lieu de 15%). La diminution du poids moyen de matière sèche par rapport au témoin est plus forte (22% au lieu de 19%). Le taux de reproduction est le critère biologique le plus affecté : par rapport au témoin, il diminue de 46% au lieu de 26%. On observe, pour le critère analytique, une variation du même ordre de grandeur, puisqu'il est environ 2 fois plus fort (32,3 au lieu de 17,5 ng/mg).

Il ressort de ces quelques données que les effets observés sur les daphnies sont plus importants dans le modèle proposé. Le calcul montre que les quantités apportées sont différentes : le tableau LXVII a montré que les 5 inoculums de chlorelles intoxiquées à 10  $\mu$ g/l apportaient 12,2  $\mu$ g de cadmium pour les 20 jours d'exposition. Le tableau LXII (chapitre II) nous avait montré précédemment que la quantité de ca

mium introduite via les chlorelles était de  $1,31 \mu\text{g}$  pour 7 jours. Sans négliger la part de ce facteur, il faut aussi signaler que, dans le modèle proposé, les daphnies sont beaucoup plus exposées : en effet, les chlorelles intoxiquées et les fèces sont continuellement remises en suspension. Celles-ci ont donc davantage de chances d'être absorbées ou réabsorbées par les daphnies que précédemment dans les cristallisoirs sans hélice.

Par ailleurs, pour les daphnies contaminées par des chlorelles intoxiquées à  $50 \mu\text{g}/\text{l}$ , les effets biologiques sont importants, tant au point de vue mortalité que natalité et poids de matière sèche. Paradoxalement, le cadmium retrouvé dans les daphnies ne semble pas refléter ces constatations, mais il faut remarquer que même précédemment dans le chapitre II à la plus forte concentration correspondant, cette fois, à la contamination par le milieu et la nourriture, une telle valeur ( $44,7\text{ng}/\text{mg}$ ) n'avait pas été atteinte.

(2) Parallèlement à l'étude sur ces modèles, nous avons effectué une série d'expériences, dont les conditions sont similaires à celles effectuées au chapitre II §4.1. (contamination par le milieu). La seule différence tient dans la durée d'exposition des daphnies qui est de 20 jours (au lieu de 28 jours), et seul le critère analytique a été envisagé. Ce faisant, nous pouvons comparer les concentrations de cadmium retrouvées après contamination par le milieu, et celles retrouvées après contamination dans les modèles (tableau LXXIII).

Les concentrations des daphnies témoins du modèle sont légèrement plus faibles. Par contre, les daphnies nourries avec des chlorelles intoxiquées à  $10 \mu\text{g}/\text{l}$  contiennent environ 2 fois plus de métal que les daphnies en contact avec  $10 \mu\text{g}/\text{l}$  dans le milieu. Dans ce cas, les quantités introduites sont à peu près équivalentes : d'une part,  $12,2 \mu\text{g}$  de cadmium sont introduits dans le modèle (voir ci-dessus et tableau LXVII), d'autre part,  $5,3 \mu\text{g}$  de cadmium sont introduits dans le milieu tous les 7 jours (tableau XLII). Les temps d'exposition étant les mêmes, il reste que seuls

diffèrent la fréquence des inoculums, le changement des milieux et l'agitation continuelle. Cette dernière condition semble la plus vraisemblable pour expliquer la différence observée entre les concentrations de cadmium retrouvées.

D'un autre point de vue, il est intéressant de constater que les chlorelles doivent être cultivées en présence de milieux contenant entre 10 et 50  $\mu\text{g}/\text{l}$  de métal, pour induire une mortalité de 50% de la population de daphnies, que ce soit en 20 jours ou en 28 jours.

Cadmium introduit $\mu\text{g}/\text{l}$	Cadmium retrouvé dans les daphnies $\text{ng}/\text{mg}$	contamination par le milieu
0	3,2	
5	11,4	
10	16,7	
15	23,5	
Cadmium dans mi- lieux de chlo- relles $\mu\text{g}/\text{l}$	Cadmium retrouvé dans les daphnies $\text{ng}/\text{mg}$	contamination par le modèle
0	1,35	
10	32,30	
50	44,70	
100	58,10	
250	259,85	

Tableau LXXIII : Comparaison entre les résultats analytiques des daphnies du modèle proposé, et ceux des daphnies contaminées par le milieu.

## 2.6. Effets biologiques au niveau des ables

Les ables n'ont pas semblé affectés pendant leurs séjours dans les différents modèles. Après 4 jours, on constate une disparition totale des daphnies dans tous les cas ; les algues sont relativement bien consommées par les poissons dans les modèles 1, 2, 3 : la présence de nombreuses fèces en est un témoignage. Par contre, peu d'algues ont été consommées par les poissons des modèles 4 et 5. La mesure du pH au 30° et au 34° jour de l'expérience n'a pas donné lieu à des variations importantes de ce dernier (compris entre 7,70 et 8,20).

## 2.7. Résultats analytiques concernant les ables

Nous allons envisager dans cette partie les résultats des dosages effectués sur les poissons et sur le milieu dans lequel ils ont vécu. Le tableau LXXIV fournit les concentrations de cadmium retrouvées dans les poissons ainsi que les rapports des concentrations des différents essais au témoin. Les résultats des dosages sur les prélèvements effectués au J<sub>30</sub> et au J<sub>34</sub> de l'expérience sont ajoutés.

Modèles	Cadmium dans les poissons (ng/mg)	$f = \frac{E}{T}$	Cadmium dans le milieu après filtration µg/l	
			J30	J34
1	0,175	-	0,44	0,92
2	0,555	3,17	1,00	1,38
3	0,935	5,34	2,38	3,25
4	0,710	4,06	5,46	5,90
5	0,715	4,09	11,00	11,60

Tableau LXXIV : Résultats des dosages de cadmium effectués dans les poissons.

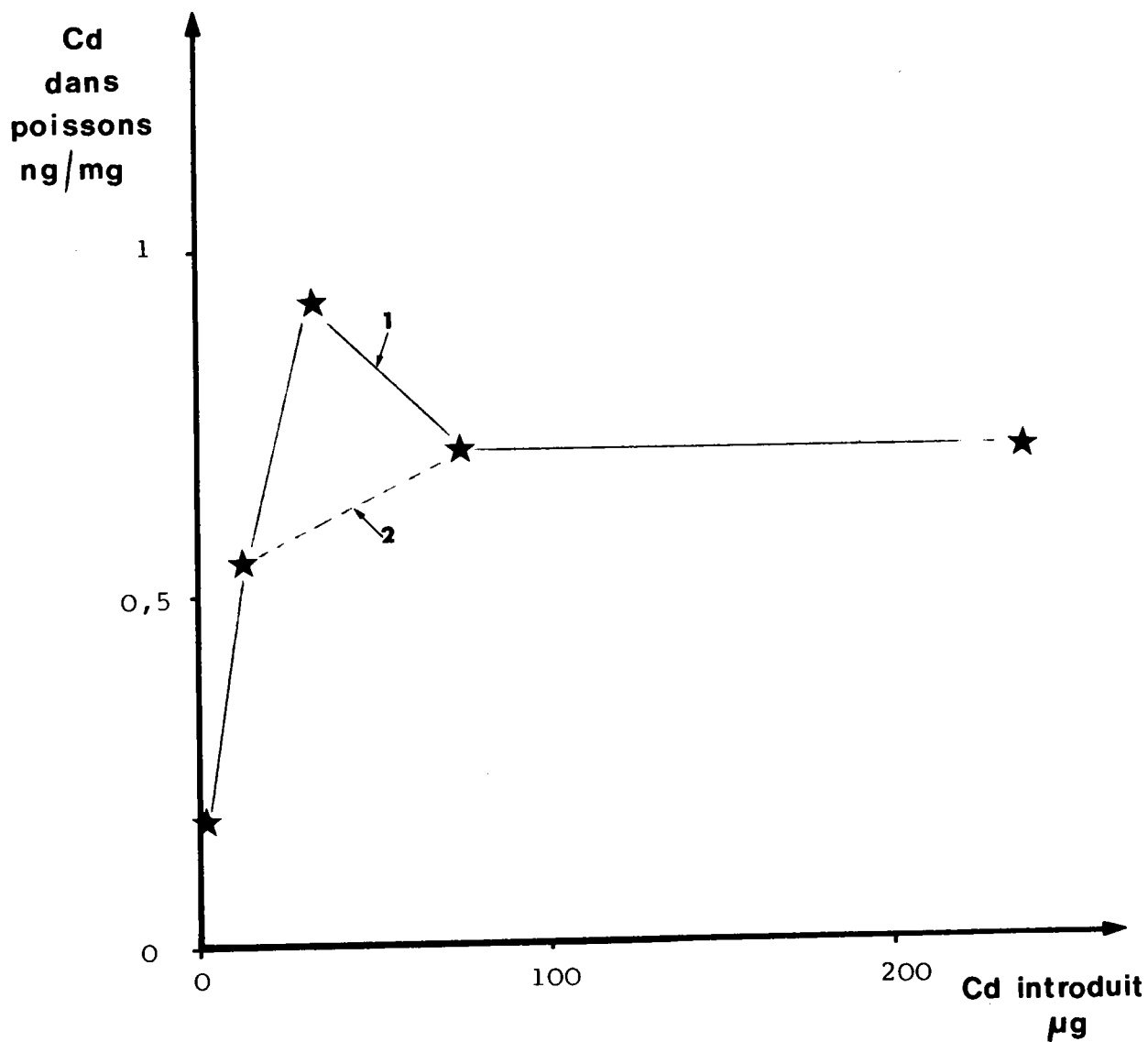


Figure 72: Relation entre la concentration de cadmium retrouvée dans les poissons et la quantité de cadmium introduite.



La figure 72(1) traduit l'évolution du taux de cadmium dans les poissons en fonction de la quantité introduite. L'ajustement d'une fonction simple n'a pas été possible. Ces résultats appellent tout de suite quelques remarques :

Les concentrations de cadmium retrouvées sont faibles dans tous les poissons contaminés. Dans le cas du modèle 2, il y a une très nette augmentation par rapport au témoin, le maximum est atteint pour le modèle 3, les poissons des modèles 4 et 5 se caractérisent par des concentrations équivalentes et plus faibles que celles du poisson du modèle 3. La concentration retrouvée dans le poisson 2 s'explique par le nombre important de daphnies mères et filles consommées (environ 2000). Par contre, pour les poissons 3, 4 et 5, les daphnies disponibles sont peu nombreuses (entre 40 et 100). De plus, les daphnies contenues dans les modèles 4 et 5 sont plus riches en cadmium que celles du modèle 3. Il semble donc que la teneur trouvée dans le poisson 3 ne s'explique pas et qu'il s'agit vraisemblablement d'un artefact d'expérience. Si l'on ne prend pas en compte ce résultat, la figure 72(2) traduit alors l'évolution du cadmium dans les poissons.

## 2.8. Discussion

Compte-tenu des observations que nous venons de faire, les concentrations de cadmium retrouvées dans les poissons peuvent se comparer à celles précédemment trouvées :

(1) Les poissons témoins ont une concentration équivalente à la moyenne précédemment trouvée (0,16 ng/mg).

(2) Le cas des poissons introduits dans les modèles 2 et 4 peuvent se comparer à celui des poissons contaminés soit par le milieu, soit par les chlorelles intoxiquées, que nous avons étudiés précédemment au chapitre III. Le tableau LXXV permet de comparer les différents résultats obtenus.

	Contamination par le milieu (10 $\mu\text{g}/\text{l}$ )	Contamination par les chlorelles (10 $\mu\text{g}/\text{l}$ )	<u>Modèle 2</u>
Quantité appor- tée ( $\mu\text{g Cd}$ )	10,45	2	12,0 (dont 0,77 par daphnies)
Concentration retrouvée (ng Cd/mg)	0,54	0,10	0,555
Rapport Q/C	19,4	20	21,6
	Contamination par le milieu (100 $\mu\text{g}/\text{l}$ )	Contamination par les chlorelles (100 $\mu\text{g}/\text{l}$ )	<u>Modèle 4</u>
Quantité appor- tée ( $\mu\text{g Cd}$ )	100,5	16,7	75 (dont 0,05 par daphnies)
Concentration retrouvée (ng Cd/mg)	2,48	0,83	0,71
Rapport Q/C	40,3	20,1	105,6

TABEAU LXXV : COMPARAISON DES RAPPORTS Q/C DES POISSONS INTRODITS  
DANS LES MODÈLES AVEC LES RÉSULTATS ANTÉRIEURS  
(CHAPITRE III).

● Le poisson du modèle 2 se caractérise par une concentration (0,555 ng/mg) pratiquement équivalente à la concentration moyenne des poissons placés dans un milieu à 10 µg/l (0,54 ng/mg). Les quantités de cadmium introduites dans l'un et l'autre cas sont, de plus, à peu près identiques ; ce qui se traduit par des rapports Q/C très voisins, tels que définis :

$$Q/C = \frac{\text{quantités apportées en } \mu\text{g}}{\text{concentration retrouvée en ng/mg}}$$

C'est dire que l'efficacité du transfert est à peu près la même. Par ailleurs, on constate une très nette différence entre les concentrations retrouvées dans le poisson n°2 et la concentration moyenne retrouvée dans les poissons nourris avec des chlorelles intoxiquées à 10 µg/l (0,555 au lieu de 0,10 ng/mg). La différence observée est vraisemblablement due à la quantité supérieure de cadmium apportée par les chlorelles (11,33 µg par rapport à 2 µg), mais aussi à la contribution des daphnies (0,77 µg), dont la teneur et le nombre ne sont pas négligeables. Cependant, les rapports Q/C sont voisins, ce qui montre que l'efficacité du transfert est comparable dans les trois cas considérés.

● Le poisson du modèle 4 se caractérise par une concentration de 0,71 ng/mg. Or la concentration moyenne de cadmium retrouvée dans les poissons nourris uniquement avec des chlorelles intoxiquées est de 0,83ng/mg (tableau XLVII). La différence observée entre ces deux résultats est faible.

Si l'on compare les quantités apportées de part et d'autre, on constate que l'on apporte 5 fois plus de cadmium dans le modèle (avec un apport, dû aux daphnies, négligeable) pour se retrouver à une concentration relativement faible dans le poisson 4. Ceci se confirme par un rapport Q/C très fort. La mauvaise efficacité du transfert dans le modèle peut s'expliquer par le fait que le poisson 4 n'a consommé qu'une faible partie des chlorelles mises à sa disposition (cf. §2.6) . En outre, l'état des chlorelles intoxiquées dans les deux cas est différent. Pour les expériences précédentes du chapitre III, les chlorelles utilisées sont des chlorelles en fin de croissance exponentielle qui ne séjournent que 4 jours dans les cristallisoirs. Par contre, dans les modèles, les algues séjournent entre 4 et 20 jours suivant les inoculums envisagés.

Ce fait expérimental pourrait ainsi expliquer pourquoi le transfert se fait de façon moins efficace dans les modèles. De ce fait l'apport dû aux chlorelles dans le modèle n°2 est lui aussi minimisé, ce qui revalorise d'autant l'influence de la quantité de cadmium apportée par les daphnies dans ce cas (0,77 µg).

● Cette observation est d'ailleurs confirmée par le fait que le poisson du modèle 5, soumis à un apport de cadmium par les chlorelles 3 fois plus grand (et un apport dû aux daphnies, tout aussi négligeable) ne montre aucune augmentation de concentration.

● En conclusion, il s'avère que le transfert s'effectue de façon moins efficace dans les modèles lorsque les daphnies sont trop peu nombreuses pour représenter un apport suffisant. Dans le cas contraire, on observe dans le poisson une augmentation relativement forte, qui ne s'explique que par le transfert au poisson du cadmium contenu dans les daphnies.

En ce qui concerne le cadmium contenu dans la phase aqueuse, on constate une légère augmentation de sa concentration entre le jour 30 et le jour 34. Celle-ci peut être due à l'évaporation pendant les 4 jours séparant les deux dosages. La mise en suspension des algues et des résidus par l'activité natatoire des poissons peut également expliquer cette variation.

## 2.9. Bilan général

Les cultures de chlorelles ont déjà fait l'objet d'un bilan dans le paragraphe 2.2.4. La quantité de cadmium introduite dans les modèles a également été calculée. Il faut donc estimer la quantité de cadmium retrouvée dans le milieu et dans les résidus (tableau LXXVI). Mais il est nécessaire de tenir compte des quantités de cadmium correspondant aux prélèvements des daphnies et des poissons, effectués en vue des dosages.

Modèle	Volume restant (l)	Concentration dans le milieu ( $\mu\text{g/l}$ )	Quantité dans le milieu ( $\mu\text{g}$ )	Poids de matière sèche des résidus (mg)	Concentration dans les résidus (ng/mg)	Quantité dans les résidus ( $\mu\text{g}$ )	Quantité totale retrouvée ( $\mu\text{g}$ )
1	1,53	0,92	1,41	295,44	4,45	1,31	2,72
2	1,55	1,38	2,14	390,31	25,38	9,90	12,04
3	1,51	3,25	4,91	250,82	101,42	25,44	30,35
4	1,54	5,90	9,09	343,09	157,64	54,08	63,17
5	1,54	11,60	17,86	365,36	571,35	208,75	226,61

TABEAU LXXVI : CALCUL DES QUANTITÉS DE CADMIUM RETROUVÉES DANS LE MILIEU (APRÈS FILTRATION) ET DANS LES RÉSIDUS.

Modèle	Quantité dans milieu et résidus ( $\mu\text{g}$ ) (cf. tab. LXXVI)	Quantité dans daphnies prélevées ( $\mu\text{g}$ )	Quantité dans poissons prélevés ( $\mu\text{g}$ )	Quantité totale retrouvée ( $\mu\text{g}$ )	Quantité introduite ( $\mu\text{g}$ ) (cf. tab. LXVII)	Bilan (%)
1	2,72	-	-	2,72	2,39	114
2	12,04	0,19	0,06	12,29	12,20	101
3	30,35	0,04	0,125	30,51	32,35	94
4	63,17	0,06	0,055	63,28	75,25	84
5	226,61	0,24	0,06	226,91	237,28	96

TABEAU LXXVII : BILAN DES QUANTITÉS DE CADMIUM RETROUVÉES PAR RAPPORT  
AUX QUANTITÉS INTRODUITES.

Il convient de les ajouter pour faire le bilan général de l'expérimentation avec les modèles (tableau LXXVII).

On observe alors que, pour les différents modèles, les pourcentages du cadmium retrouvé par rapport au cadmium introduit sont voisins de 100%. Le cas du témoin est un cas particulier, compte-tenu des faibles teneurs de cadmium mises en jeu.

### 3. DISCUSSION

Le modèle de chaîne alimentaire simplifiée qui a été utilisé a permis d'associer trois niveaux trophiques pour une durée d'expérience de 34 jours au total. Cette expérimentation qui se veut davantage prospective que définitive a toutefois permis de mettre en évidence la bioaccumulation indirecte des deux derniers niveaux trophiques, et cela sur une période de temps relativement courte. A notre connaissance, aucun modèle n'a permis jusqu'alors une telle association en présence de cadmium. Ainsi LU et coll. (1975) constate une disparition complète des daphnies avant même l'introduction du poisson (la concentration minimum de cadmium mesurée dans la phase aqueuse étant de  $4 \mu\text{g/l}$ ). Toutefois, ces auteurs retrouvent, suivant les types de sols utilisés, entre 8 et 1340 ng/mg de cadmium dans les algues, et entre 0,5 et 3,5 ng/mg de cadmium dans les gambusies ajoutés au 30<sup>e</sup> jour de l'expérience, et laissés pendant 3 jours dans le milieu.

Nous obtenons, quant à nous, des concentrations supérieures pour les algues et des concentrations équivalentes pour les poissons. En outre, nous avons pu constater une graduation des effets pour les chlorelles (où les concentrations retrouvées sont proportionnelles aux concentrations de cadmium introduites). En ce qui concerne les daphnies, les concentrations retrouvées vont de 1 à 250ng/mg, cette dernière concentration est loin d'être négligeable, mais par rapport à celles retrouvées dans les algues, de telles concentrations peuvent paraître dérisoires. En fait, les possi-

bilités cumulatives de la daphnie vis-à-vis du cadmium sont limitées, compte-tenu de sa grande sensibilité à ce métal. Il ne peut donc y avoir, dans ce cas, biomagnification du cadmium au sens où l'entendent ISENSEE et coll. (1973), c'est-à-dire nette augmentation des concentrations d'un niveau à l'autre. A fortiori, pour le poisson, le temps d'exposition trop court, ainsi que les faibles quantités de daphnies consommées ne permettent pas de mettre nettement en évidence une biomagnification à ce niveau. A cet égard, MARTY et coll. (1977) contaminent les poissons pendant une durée de 10 ou 30 jours avec un minimum de 1000 daphnies adultes pour mettre en évidence la biomagnification du méthylmercure. Dans ces conditions, l'utilisation du poisson comme accepteur terminal dans une chaîne alimentaire simplifiée destinée à mettre en évidence les éventuels phénomènes de cumulation sur une courte période, ne peut servir qu'à titre indicatif. Ces réserves faites, il n'en demeure pas moins vrai que le cadmium s'accumule dans les algues, et qu'il est transféré aux poissons par l'intermédiaire des daphnies.

Le tableau LXXVIII résume les concentrations de cadmium obtenues pour les 3 niveaux trophiques placés dans le modèle proposé. Nous y avons également ajouté les résultats obtenus pour les expériences des chapitres précédents, faites avec les mêmes temps d'exposition, en introduisant le toxique dans le milieu.



Temps d'exposition	Niveaux trophiques	Type d'expérience	Concentrations introduites ( $\mu\text{g/l}$ )				
			0	10	50	100	250
10 jours	Chlorellés	petits erlenmeyers (125 ml)	3,04	31	120	220	720
		grands erlenmeyers (1000 ml)	4,5	30,8	92,4	210	570
20 jours	Daphnies	crystallisoirs	3,2	16,7	-	-	-
		modèles	1,35	32,3	44,7	58,1	259,8
4 jours	Poissons	crystallisoirs	0,21	0,54	1,55	2,48	-
		modèles	0,175	0,555	(0,930)	0,710	0,715

TABLEAU LXXVIII : COMPARAISON DE L'EFFET NOURRITURE OBSERVÉ DANS LE MODÈLE ET DE L'EFFET MILIEU OBSERVÉ DANS LES EXPÉRIENCES SÉPARÉES PRÉCÉDEMMENT RÉALISÉES.

*Les résultats sont exprimés en ng/mg de matière sèche.*

QUATRIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALE

L'étude de la contamination des chaînes biologiques dans la nature ou au laboratoire nécessite que soit défini ou reprecisé un certain nombre de termes. Il en est ainsi de la bioaccumulation qui représente la capacité d'un organisme à accumuler un composé à partir de son environnement par tous les moyens possibles. Les possibilités de cumulation à partir du milieu environnant inorganique et/ou organique nous ont amené à différencier une *bioaccumulation directe*, une *bioaccumulation indirecte* et une *bioaccumulation totale* ainsi que les facteurs de transferts correspondants. La *biomagnification*, terme souvent mal employé, indique qu'une substance se concentre dans les chaînes biologiques avec une nette augmentation de concentrations d'un niveau trophique à l'autre. La *bioparité* permet, pour nous, de caractériser une substance, dont les concentrations retrouvées dans les différents niveaux trophiques sont équivalentes.

En fonction des données fournies par la littérature et du but poursuivi dans cette étude, à savoir la mise au point d'une chaîne trophique expérimentale relativement simple, nous avons sélectionné un producteur, un consommateur primaire et un consommateur secondaire. L'association des 3 espèces choisies (*Chlorella vulgaris*, *Daphnia magna*, *Leucaspis delineatus*) représente une chaîne alimentaire d'eaux stagnantes ou à cours lent, susceptible de se rencontrer en milieu naturel dans un étang ou dans une mare. Ce matériel biologique est fréquemment utilisé au laboratoire (tout au moins en ce qui concerne les deux premiers niveaux). Il est disponible pendant toute l'année, et les méthodes de culture et d'élevage sont relativement simples.

Les principales caractéristiques morphologiques et physiologiques des espèces choisies ont été décrites. Ces données sont nécessaires si l'on veut tenter une interprétation du mode de pénétration et du cheminement du toxique dans ces organismes. Nous nous sommes attachés à nous rapprocher, dans la mesure du possible, des conditions naturelles, en particulier pour le mode d'administration de la nourriture, ainsi que pour les concentrations de cadmium utilisées.

Les critères d'étude sont d'ordre biologique et d'ordre analytique. L'établissement de relations doses-effets, indispensables en écotoxicologie, est ainsi possible.

Les critères biologiques significatifs utilisés permettent de suivre l'évolution de chacune des populations. Ils ont été choisis en fonction de leur fiabilité, de leur reproductibilité et de leur facilité de mise en oeuvre dans un délai restreint. S'adressant à trois organismes appartenant à trois niveaux trophiques différents, même la mortalité n'est pas un critère commun. Facilement déterminée chez l'able, moins facile à observer chez la daphnie, la mort n'est pas encore un critère bien défini dans le règne végétal. Nous avons donc choisi des critères adaptés à chaque espèce, mais de nature différente.

Le critère analytique est, par contre, commun aux 3 espèces. En effet, dans le désir de rendre homogènes les différents résultats, ceux-ci sont exprimés en quantité de cadmium retrouvée par quantité de matière sèche.

Les dosages en milieu biologique font appel à la méthode de digestion nitrique et c'est la spectrophotométrie d'absorption atomique sans flamme qui a été pour nous la méthode de choix. Rappelons, à ce stade que les dosages exigent toujours de grandes précautions afin de ne pas s'exposer à des problèmes de pollution du matériel utilisé.

Il ne faut pas donner la priorité absolue au critère analytique dans l'estimation de la toxicité du cadmium, mais le considérer plus comme un critère de risques. C'est pourquoi nous avons tenté d'établir diverses relations doses/effets qui seules peuvent permettre d'envisager avec réalisme les risques encourus.

Nous avons particulièrement développé l'étude des phénomènes de toxicité et de cumulation concernant les chlorelles, car celles-ci sont, en effet, le point de départ de la chaîne, et donc des bioaccumulations indirectes éventuelles des autres niveaux trophiques.

(1) L'évolution des populations algales a été principalement suivie par des critères externes de croissance. Le dénombrement des individus par numération optique ou à l'aide d'un compteur COULTER a été comparée à la simple opacimétrie du milieu. Il apparaît que la mesure au compteur COULTER, précise et rapide, est aussi la plus riche d'informations puisque l'on peut apprécier l'histogramme de tailles, et donc indirectement l'état de la population concernée.

Par ailleurs, certains critères biochimiques peuvent contribuer à l'observation des populations, par exemple l'estimation des pigments chlorophylliens et le dosage de l'ATP. Un certain nombre de conditions est à contrôler pour avoir la meilleure reproductibilité possible : préparation des milieux, facteurs extérieurs (luminosité, agitation...), nature de l'inoculum...

L'action du cadmium a été déterminée par le calcul de la CI 50 (concentration inhibitrice pour 50% de la population), à partir des courbes de croissance et de leurs variations sous l'effet des diverses concentrations de cadmium mises en jeu.

Selon le critère envisagé, le procédé de calcul et le temps, la CI 50 présente une grande variabilité et la numération semble être le plus sensible des critères externes. Elle n'est hélas utilisable que 3-4 jours après l'ensemencement. Pendant la phase de croissance exponentielle, période que nous avons choisie pour l'estimation de l'action du cadmium sur les chlorelles, les CI 50 obtenues chaque jour sont stables, puis elles augmentent durant les dernières phases de développement.

L'opacimétrie est un critère utilisable très tôt, mais ne donne qu'un reflet par défaut de la toxicité. Cependant, la recherche du point d'inflexion des courbes de croissance, par le calcul de leurs dérivés, peut mettre en évidence une inhibition du développement due au toxique, à des concentrations pour lesquelles elle n'apparaît pas manifestement avec les autres critères.

L'utilisation de l'analyseur C1000 a permis de constater que le cadmium ralentissait la multiplication cellulaire et que tout cela comme s'il y avait un vieillissement prématuré des populations de

Parmi les critères biochimiques, l'estimation de la teneur en chlorophylles ne nous a pas apporté de meilleurs résultats, en raison des difficultés d'extraction ; de plus, cette mesure ne semble que peu différente de l'opacimétrie sans être plus enrichissante. Par contre, même s'il n'a que peu été étudié dans ce travail, le dosage de l'ATP nous paraît très intéressant car il est le reflet des cellules vivantes des populations algales.

Après avoir recherché les seuils d'inhibition de la croissance des chlorelles, nous avons voulu estimer, par le critère de la mortalité, le pouvoir cumulatif de celles-ci vis-à-vis du cadmium. Nous avons envisagé le comportement du cadmium dans le milieu et montré que sa concentration se stabilisait à une valeur légèrement inférieure à celle de la culture de référence.

Puis nous avons suivi l'accumulation du cadmium par les chlorelles, et en fonction de la teneur initiale du toxique dans le milieu et en fonction du temps.

Au 10<sup>e</sup> jour, il semble y avoir une relation linéaire, en coordonnées logarithmiques, entre le cadmium introduit et celui retrouvé dans les algues. Le facteur de concentration est alors voisin de 3000. En fonction du temps, il y a diminution de la concentration du cadmium dans les algues, vraisemblablement selon une fonction puissance. (Cela nous a paru plus préférable d'exprimer cette relation en quantifiant la quantité de cadmium retrouvée dans la masse algale de chaque culture. Dans ce cas, malgré les incertitudes sur la pesée des cultures, nous avons mis en évidence une certaine constance de la quantité de cadmium retrouvée, et ce dès les premiers jours de culture. Cela nous a conduit à calculer un rendement d'accumulation du cadmium par les chlorelles, qui serait, dans nos conditions expérimentales, de 65%. De plus, si ce rendement atteint cette valeur dès les premiers jours de culture, c'est que le cadmium pénètre facilement et rapidement dans les jeunes cellules ; puis, la quantité de cadmium retrouvée n'augmente plus, vraisemblablement en raison de l'épaisseur et de la densité des cellules plus âgées.

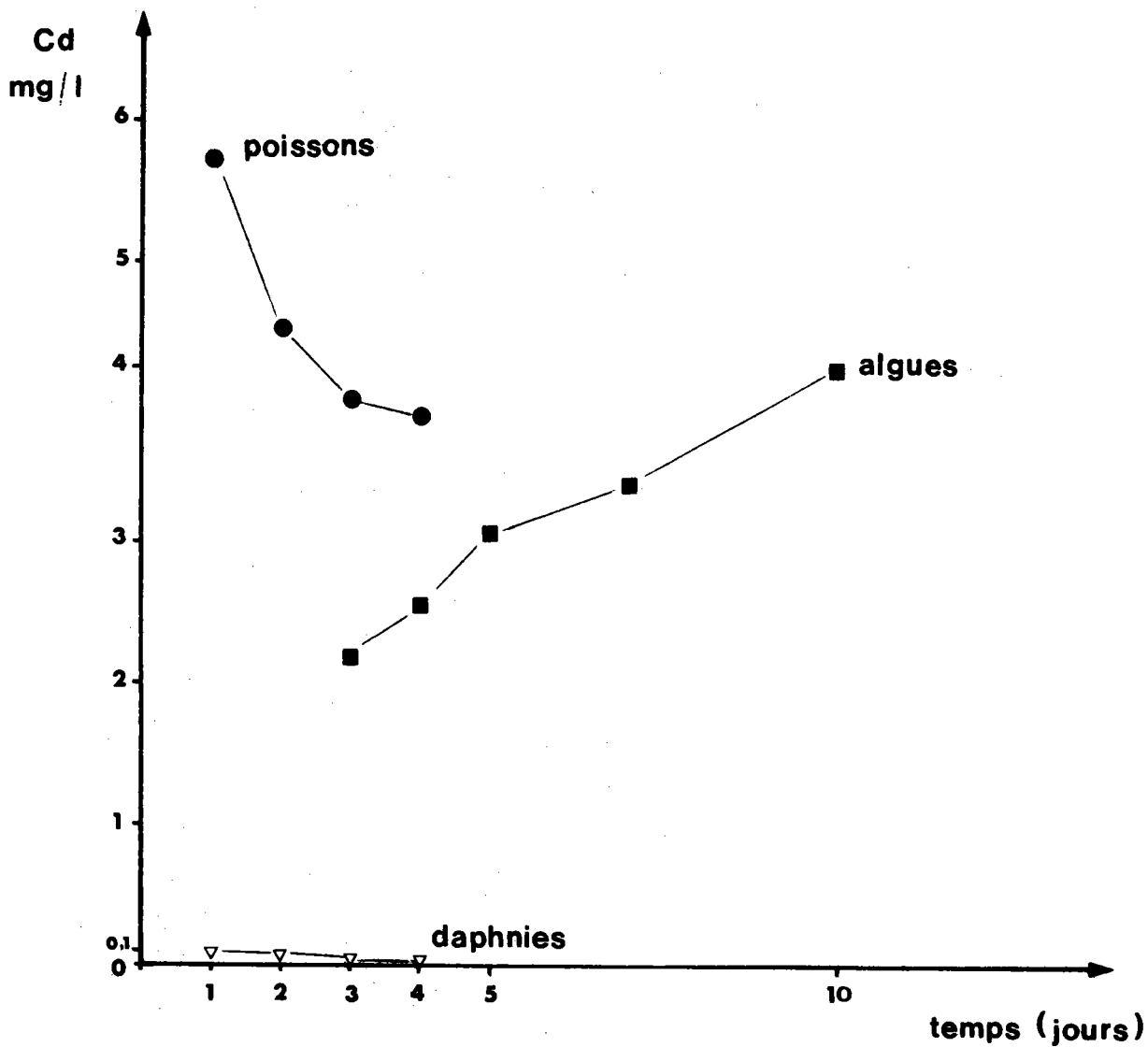


Figure 73: Données de toxicité pour les 3 espèces considérées- CI50 pour les algues- CI50 immobilité pour les daphnies- CL50 pour les poissons.

Les effets biologiques et les résultats analytiques obtenus, dans cette expérimentation, pour les chlorelles et pour les daphnies, montrent une augmentation proportionnelle aux concentrations et aux quantités de cadmium introduites. Sur les poissons, les résultats analytiques permettent de conclure que le cadmium est transmis au poisson à travers la chaîne alimentaire étudiée. Bien que les concentrations retrouvées soient relativement faibles, l'effet nourriture obtenu n'est pas négligeable.

La figure 74 permet de comparer les capacités de bioaccumulation directe de chaque espèce (à partir du cadmium introduit dans le milieu) et les capacités de bioaccumulation indirecte des daphnies et des poissons (compte-tenu que l'apport du milieu est considéré comme négligeable) à l'intérieur du modèle.

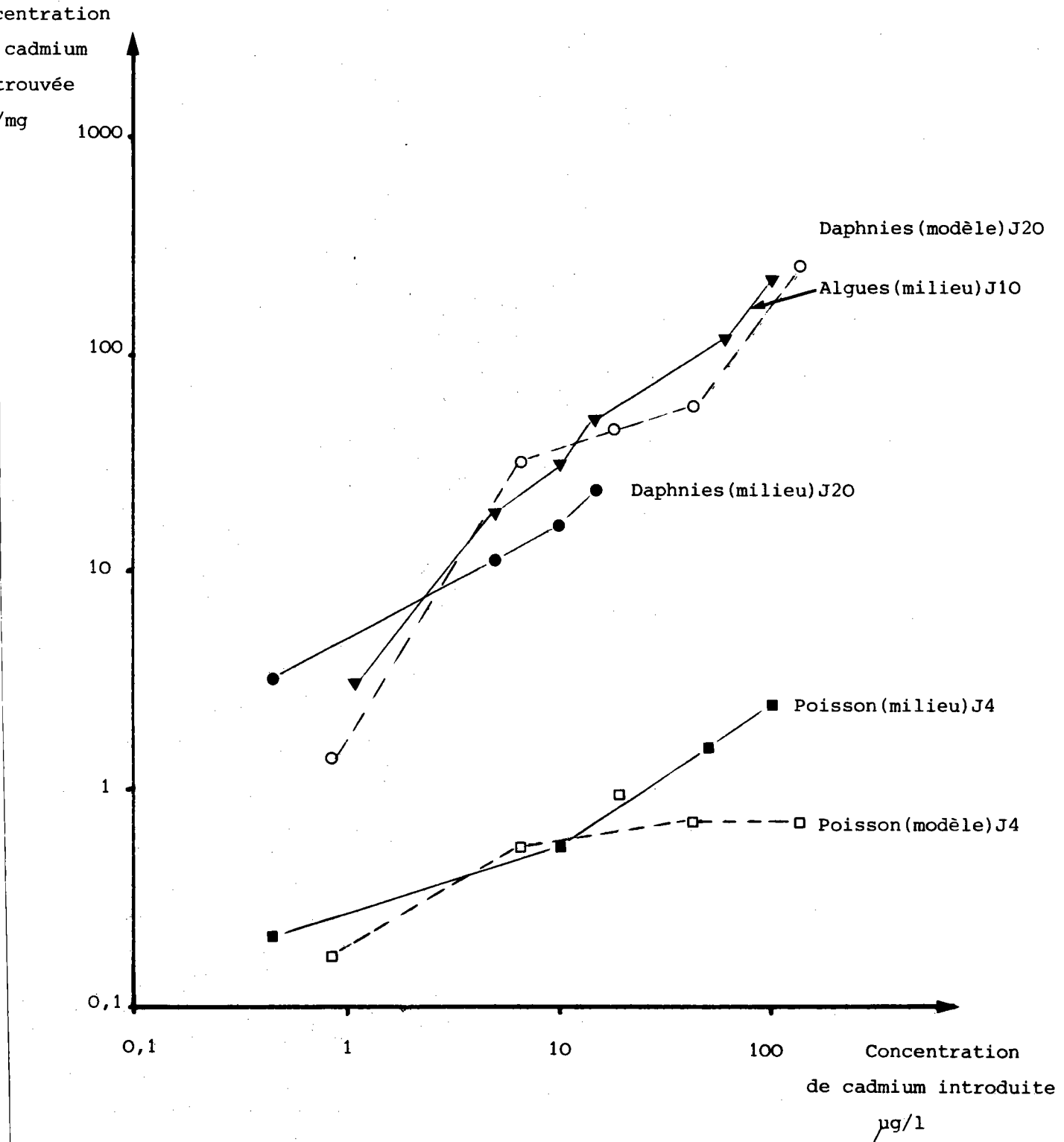
En ce qui concerne la bioaccumulation directe, la relation linéaire en coordonnées logarithmiques déjà obtenue pour les chlorelles semble se retrouver pour les daphnies, et à un degré moindre pour les poissons (pour les quelques résultats figurés). Entre la concentration de cadmium introduite et la concentration de cadmium retrouvée, la relation semble être de la forme :

$$y = ax^b$$

On constate que les algues et les daphnies semblent cumuler de façon comparable (pour des temps différents). Par contre, pour les poissons, la bioaccumulation directe est plus faible, mais le temps d'exposition est nettement plus court. Les résultats présentés sur la figure 74 sont donnés pour des durées de contact correspondant à celles utilisées dans le modèle de chaîne proposé.

Les concentrations trouvées dans les daphnies introduites dans le modèle sont également liées de façon linéaire aux concentrations introduites (calculées sur la base des quantités de cadmium trouvées dans les chlorelles). Par contre, les concentrations trouvées dans les poissons tendent vers un plateau, comme les résultats obtenus le laissaient présager.





**Figure 74:** Concentrations de cadmium retrouvées dans les 3 espèces - comparaison entre les résultats du modèle et ceux du milieu.

La comparaison des deux voies de contamination nous montrent que les daphnies dans le modèle expérimental proposé sont davantage contaminées, et que les concentrations obtenues sont, dans ce cas, comparables à celles des algues. L'apport du modèle est dans ce cas significatif. Les poissons introduits dans le modèle choisi montrent une faible contamination (plus faible que la contamination par le milieu seul). La faiblesse relative des concentrations ainsi retrouvées tient à la méthodologie employée, au faible temps d'exposition et au comportement alimentaire du poisson. Ces résultats sont confirmés par le tableau ci-dessous qui fournit les facteurs de concentration moyens calculés pour chaque espèce entre 0 et 250  $\mu\text{g}/\text{l}$ , soit par bioaccumulation directe, soit par bioaccumulation indirecte.

	Chlorelles	Daphnies	Ables
Milieu	3000	1830	72
Modèle	2200	2680	20

Tableau LXXIX : Comparaison pour les 3 organismes testés des facteurs de concentration correspondant à la contamination par le milieu et à la contamination dans le modèle.

$$f_c \text{ milieu} = \frac{\text{concentration retrouvée en ng/mg de matière sèche}}{\text{concentration introduite dans le milieu } \mu\text{g}/\text{l}}$$

$$f_c \text{ modèle} = \frac{\text{concentration retrouvée en ng/mg de matière sèche}}{\text{concentration introduite dans le milieu via les chlorelles en } \mu\text{g}/\text{l}}$$

Ce tableau traduit en fait que les chlorelles ont des facteurs de concentration plus faibles dans l'expérimentation sur le modèle proposé, compte tenu des conditions de culture de masse utilisées pour obtenir une biomasse algale suffisante. Le facteur de concentration obtenu pour les daphnies est plus fort dans le cas du modèle, ce que laissent prévoir les fortes concentrations retrouvées (fig. 74). Par contre, les ables ont des facteurs de concentration beaucoup plus faibles dans le modèle utilisé.

En définitive, ces travaux ont montré l'accumulation du cadmium par les algues, le transfert du cadmium à un organisme filtreur, à partir d'algues exposées et "vivantes", et le transfert du cadmium aux poissons à partir de daphnies contaminées.

Le test statique proposé semble permettre de prédire, dans des délais restreints et de manière simple, les possibilités de bioaccumulation, tant directe qu'indirecte, au niveau d'organismes représentatifs d'un même écosystème.

Il s'avère dès lors intéressant de pouvoir étudier la réponse de ces organismes dans un milieu différent, par exemple, dans des conditions dynamiques de test qui se rapprocheraient des faciès lotiques naturels. Dans ces conditions, peut-être devrait-on sélectionner d'autres organismes-types, car il n'est pas évident qu'un seul type de chaîne puisse refléter le comportement d'un toxique dans n'importe quel milieu. Parallèlement, la forme et la manière dont le cadmium est accumulé par les divers organismes nécessitent des études plus approfondies. La validation du modèle proposé, d'une part à l'aide d'autres métaux, d'autre part à l'aide de diverses molécules organiques, paraît devoir être une étape ultérieure nécessaire.

## BIBLIOGRAPHIE

- ACKEFORS H., 1971, Mercury pollution in Sweden with special reference to conditions in water habitat, Proc. Roy. Soc. London B., 177, 365-387.
- AFNOR, 1974, Norme expérimentale T 90301, Détermination de l'inhibition de l'immobilité de *Daphnia magna* Straus (crustacé, cladocère), AFNOR, PARIS, 12p.
- AMIARD J.C. et AMIARD-TRIQUET C., 1975, Expérience préliminaire à l'utilisation d'une chaîne trophique marine dans l'étude d'une pollution par le cobalt 60 : Bilan après une ingestion unique, Water, Air, and Soil Pollution, 5, 221-229.
- ANDERSEN A.T. et NEELAKANTAN B.B., 1974, Mercury in some marine organisms from the Oslofjord, Norw. Journal of Zoology, 22 (3), 231-235.
- ANDERSON B.G., 1932, cité par ANDERSON B.G. et JENKINS J.C., 1942.
- ANDERSON B.G., 1944, The toxicity thresholds of various substances found in industrial wastes as determined by the use of *Daphnia magna*, Sewage Works Journal, 16 (6), 1156-1165.
- ANDERSON B.G., 1945, The toxicity of DDT to *Daphnia magna*, Science, 102, 539.
- ANDERSON B.G., 1946, The toxicity thresholds of various sodium salts determined by the use of *Daphnia magna*, Sewage Works Journal, 18 (1), 82-87.
- ANDERSON B.G., 1948, The apparent thresholds of toxicity to *Daphnia magna* for chlorides of various metals when added to Lake Erié water, Trans. Amer. Fish. Soc., 78, 96-113.
- ANDERSON B.G. et JENKINS J.C., 1942, A time study of events in the life span of *Daphnia magna*, Biol. Bull., 83, 260-272.

- Anonyme, 1971, Niveaux de contamination radioactive du milieu ambiant et de la chaîne alimentaire, EURATOM, Rapport annuel 1971, EUR. 4885 f, Association Euratom. CEA, FRANCE, 58 p.
- Anonyme, 1975, Le Cadmium et l'Environnement: toxicité, économie, contrôle, OCDE, PARIS, 93 p.
- Anonyme, 1977, Report on cadmium and freshwater fish, Technical paper N°30, FAO, ROME, 21 p.
- APOSTOL S., VASILIU A., 1968, Modifications de la consommation d'oxygène chez les daphnies, sous l'influence de certaines substances toxiques de l'eau Igiena, 17 (10), 627-635.
- ARNOLD D.E., 1971, cité par VIJVERBERG J., 1976.
- ARNON D.I., 1949, Copper enzymes in isolated chloroplasts- Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, Plant Physiol. 24, 1.
- ATKINSON A.W., GUNNING B.E.S., JOHN P.C.L., 1972, cités par BAYEN, 1975.
- AUBERT M., 1972, Pollutions chimiques et chaînes trophodynamiques marines, Rev. Intern. Océanogr. Med., 28, 9-25.
- AUBERT M. et coll., 1970, Pollutions chimiques de la mer (Méthodes d'études et résultats), Rev. Intern. Med., 17, 67-77.
- AUBERT M. et coll., 1972, Utilisation d'une chaîne trophodynamique de type pélagique pour l'étude des transferts des pollutions métalliques, Rev. Intern. Océanogr. Med., 28, 27-52.
- AXELSSON B., PISCATOR M., 1966, Renal damage after prolonged exposure to cadmium- An experimental study, Arch. Environm. Hlth., 12, 360.
- BALL I.R., 1967, The toxicity of cadmium to rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson), Water Research, 1, 805-806.
- BARNARD W.M., FISHMAN M.J., 1973, Evaluation of the use of the heated graphite atomiser for the routine determination of trace metals in water, Atomic Absorption Newsletter, 12, (5), 118-124.

- BAUDIN J.P., 1977, Etude expérimentale des modalités du transfert du zinc-65 entre les principaux constituants d'un écosystème saumâtre (l'étang de Citis), Thèse doctorat ès-Sciences Naturelles, Université d'Aix-Marseille II, 183 p., LXVIII.
- BAYEN M., 1975, Propriétés physico-chimiques, structure moléculaire et réplication des ADN nucléaire et chloroplastique de *Chlorella pyrenoidosa*, souche 211/8b, Thèse doctorat ès-Sciences Naturelles, ORSAY, Université PARIS-SUD, 191 p.
- BAZZAZ M.B., GOVINDJEE A., 1974, Effects of cadmium nitrate on spectral characteristics and light reactions of chloroplasts, Environ. Lett., 6, 1-12.
- BERG A., 1968, Studies on the metabolism of cadmium and strontium in fresh water fish, I. Relative contribution of direct and intestinal absorption, Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 23, 161-196.
- BERLAND B.R., et coll., 1972, Variations de quelques facteurs estimatifs de la biomasse, et en particulier de l'ATP, chez plusieurs algues marines planctoniques? Marine Biology, 13, 338-345.
- BERMAN T., 1973, Modifications in filtration methods for the measurement of inorganic carbon uptake by photosynthesizing algae, J. Phycol., 9, 327-330.
- BIESINGER K.E., CHRISTENSEN G.M., 1972, Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*, J. Fish. Res. Bd. Canada, 29, 1691-1700.
- BINGHAM F.T., et coll., 1976, Yield and cadmium accumulation of forage species in relation to cadmium content of sludge-amended soil, J. Environ. Qual., 5 (1), 57-60.
- BITTEL R., 1973a, Etude du comportement des métaux lourds en milieu marin, en vue de l'évaluation de la capacité limite d'acceptation des écosystèmes océaniques pour la pollution chimique, Rev. Intern. Océanogr. Méd., 30, 3-37.
- BITTEL R., 1973b, Incidence des paramètres physico-chimiques sur la contamination radioactive des écosystèmes irrigués, IAEA, Vienne, SM-172/63, 291-302.
- BITTEL R., LACOURLY G., 1970, Méthodes d'approche pour l'évaluation des niveaux de pollution chimique des milieux marins et des chaînes alimentaires marines, F.A.O. Technical conference on marine pollution and its effects on living resources and fishing, ROME, 9-18 décembre.

BÖGER P., 1964, Flora 154, 174.

BOUDENE C., 1955, Recherches toxicologiques sur le cadmium- Etude analytique et biologique, Thèse d'état Pharmacie, Université de PARIS, 158 p.

BOUDENE C., ARSAC P., MEININGER J., 1976, Etude des taux de plomb dans l'air et dans la population en France, Archiv. za higijenu rada i toksikologiju, 26, 179-189.

BOUQUIAUX J., 1973, Mercury and Cadmium in the Environment, First Results of an enquiry on a European Scale, Colloque Européen " Problems of the contamination of man and his environment by mercury and cadmium ", LUXEMBOURG, 3-5 juillet.

BOURNE N.F., 1959, The determination of carbon transfer from *Chlorella vulgaris* Beyerinck to *Daphnia magna* Straus, using radio-active carbone ( $C^{14}$ ) as a tracer, Thèse Ph. D., Université de TORONTO, 103p.

BOUTET C. et CHAISEMARTIN C., 1973, Propriétés toxiques spécifiques des sels métalliques chez *Austropotamobius pallipes* et *Orconectes limonus*, C.R. Séances Soc. Biol., 167, 1933-1938.

BOYD J.E., 1957, The use of *Daphnia magna* in the microbioassay of insecticides, Thèse Ph. D., Université de PENNSYLVANIE, 194p.

BRINGMANN G. et KUHN R., 1959, Vergleichende wasser-toxikologische Untersuchungen an Bakterien, Algen und Kleinkrebsen, Gesundheits-Ingenieur, 4, 115-120.

BRINGMANN G. et MEINCK F., 1964, Wassertoxikologische Beurteilung Von Industrieabwässern, Gesundheits-Ingenieur, 8, 229-236.

BRINGMANN G. et KUHN R., 1977, Befunde der Schadwirkung wassergefährdender Stoffe gegen *Daphnia magna*, Wasser und Abwasser-Forschung, 10 (5), 161-166.

BRUINSMA J., 1961, A comment on the spectrophotometric determination of chlorophyll, Biochim. Biophys. Acta, 52, 576-578.

BRYAN G.W., 1967, cité par YOUNG M.L., 1975.

BRYAN G.W., 1971, The effects of heavy metals ( other than mercury ) on marine and estuarine organisms, Proc. Roy. Soc. London B., 177, 389-410.

BUIKEMA A.L.Jr, 1975, Some effects of light on the energetics of *Daphnia pulex* and implication for the significance of vertical migration, Hydrobiologia, 47 (1), 43-58.

- BURLEW J.S., 1953, Algal culture from laboratory to pilot plant, Carnegie Institution of Washington Publication 600, WASHINGTON D.C., 352p.
- BURNISON G. et coll., 1975, Toxicity of cadmium to freshwater algae, Proc. Canad. Fed Biol. Soc. Winnipeg, 18, 182.
- BUTLER P.A., 1969, The significance of DDT residues in estuarine fauna, dans " Chemical Fallout ", P. 205-220, C.C. Thomas, SPRINGFIELD.
- BUTLER P.A., 1973, Biological Problems in Estuarine Monitoring, Séminaire " Methodology for monitoring the marine environment ", SEATTLE, Rapport EPA-600/4-74-004, 12p.
- CABRIDENC R. et LUNDHAL P., 1974, Intérêt et limites d'un " test daphnie " pour l'étude des nuisances des polluants vis-à-vis de l'environnement, T.S.M., L'eau, 6, 340-345.
- CAILLOT C., 1974, Etude des processus de l'atomisation par voie thermo-électrique et de leurs perturbations en spectrométrie d'absorption atomique, Thèse de 3<sup>e</sup> Cycle, Université PARIS VI, 143p.
- CANTON J.H. et coll., 1975, Toxicity, Accumulation and Elimination Studies of - Hexachlorocyclohexane (  $\gamma$ -HCH ) with Freshwater Organisms of Different Trophic Levels, Water Research, 9 (12), 1163-1169.
- CASSIDY M. et LAKE P.S., 1975, The acute toxicity of cadmium for the fish *Galaxias maculatus* and changes in acute toxicity with Season and Temperature, Bull. Australian Society for Limnology, 6, 27-32.
- CEARLEY J.E. et COLEMAN R.L., 1974, Cadmium toxicity and bioconcentration in large mouth bass and bluegill, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 11, 146-151.
- CHIQUOINE A.D., 1964, Observations on the early events of cadmium necrosis of the testis, Anat. Rec., 149, 23.
- CHRISTENSEN G.M., 1975, Biochemical effects of methylmercuric chloride, cadmium chloride and lead nitrate on embryos and alevins of the brook trout ( *Salvelinus fontinalis* ), Toxicol. Appl. Pharm., 32, 191-197.
- CHURCH F.W., 1947, cité par FRIBERG L. et coll., 1976.
- COWGILL U.M. et BURNS C.W., 1975, Differences in chemical composition between two species of *Daphnia* and some freshwater algae cultured in the laboratory, Limnology and Oceanography, 20 (6), 1005-1011.



- CREASON J.P. et coll., 1972, cité par FRIBERG L. et coll., 1976.
- CREITZ G.I. et RICHARDS F.A., 1955, The estimation and characterization of plankton populations by pigment analysis.III.A note on the use of " Millipore " membrane filters in the estimation of plankton pigments, *J. Mar. Res.*, 14 (3), 211-216.
- CROSBY D.G. et TUCKER A.K., 1966, Toxicity of aquatic herbicides to *Daphnia magna*, *Science*, 154, 289-291.
- CROSS F.A. et coll., 1969, The effect of temperature, sediment and feeding on the behaviour of four radionuclides in a marine benthic amphipod, U.S.A.E.C CONF-670503, 450-461.
- CROUZET P., 1972, Contribution à la connaissance de la physicochimie et de la production primaire du lac nord de Tunis, Thèse de 3° Cycle, Université PARIS VI, 72p.
- DAS G., 1968, Influence of calcium on development, phosphate assimilation and ATP level in synchronized cultures of *Scenedesmus*, *Svensk. Botanisk. Tidskrift*, 62 (3), 448-457.
- DAS G., 1973, Aspects of metabolic development in an illuminated synchronous culture of *Scenedesmus obtusiusculus*, *Can. J. Bot.*, 51 (1), 113-120.
- DAS G. et RUNECKELES V.C., 1974, Effects of bisulfite on metabolic development in synchronous *Chlorella pyrenoidosa*, *Environmental Research*, 7 (3), 353-360.
- DAUMAS R. et FIALA M., 1969, Evaluation de la matière organique vivante dans les eaux marines par la mesure de l'adénosine triphosphate, *Marine Biology*, 3, 243-246.
- DAVIDOW B. et SABATINO F.J., 1954, Biological screening test for chlorinated insecticides, *Ass. of official agricultural chemists*, 37 (3), 902-905.
- DAVIS W.E. et coll., 1970, cité par FLEISCHER M. et coll., 1974.
- DAWSON A.B., 1935, The haemopoietic response in the catfish *Asmeiurus nebulosus* to chronic lead poisoning, *Biol. Bull. mar. biol. Lab. Woods Hole*, 68, 335-346.
- DEWEY J.E. et PARKER B.L., 1964, Mass Rearing of *Daphnia magna* for Insecticide Bioassay, *Journal of economic entomology*, 57 (6), 821-825.

- DREYER G. et GARDNER A.D., 1916, A general method of estimating the relative turbidity or opacity of fluid suspensions including bacterial emulsions, *Biochem. Jour.*, 10, 399-407.
- DURUM W.H. et coll., 1970, Reconnaissance of selected minor elements in surface water of United States, Geological Survey Circular 643, U.S. Department of the Interior, Washington D.C.
- EISLER R., 1971, Cadmium poisoning in *Fundulus heteroclitus* (Pisces; Cyprinodontidae) and other marine organisms, *J. Fish. Res. Bd. Canada*, 28, 1225-34.
- ELDERFIELD H. et coll., cités par BOUQUIAUX J., 1973.
- ELKINS H.B., 1950, cité par OLIVIER H.R., 1969.
- EPPLEY R.W. et SHARP J.H., 1975, Photosynthetic measurements in the Central North Pacific: the dark loss of carbon in 24h. incubations, *Limnol. Oceanography*, 20, (6), 981-987.
- EWALD W.G. et coll., 1976, Toxicity of polychlorinated biphenyls ( PCBs ) to *Euglena gracilis* : Cell population growth, carbon fixation, chlorophyll level, oxygen consumption and protein and nucleic acid synthesis, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 16 (1), 71-80.
- EYBL V. et SYKORA J., 1966, Die Schutzwirkung von Chelatbildern bei der akuten Kadmium-chloridvergiftung, *Acta biol. med. germ.*, 16, 61.
- FAURE J. et coll., 1975, Mesure dans l'eau et dans le sang des métaux: plomb, cuivre, zinc, cadmium et mercure. Etude dans le département de l'Isère, Journées " Contamination des Chaînes biologiques ", TOULOUSE, Ministère de la Qualité de la Vie, Collection Recherche-Environnement N° 1, P. 187-190.
- FERNANDEZ F.J. et MANNING D.C., 1971, Atomic absorption analyses of metal pollutants in water using a heated graphite atomizer, *Atomic Absorption Newsletter*, 10 (3), 65-71.
- FINDENEGG I., 1972, Das phytoplankton des Reither Sees ( Tirol, Osterreich ) in Jahre 1971, *Med. Ver. Innsbruck*, 59, 15-24.
- FLEISCHER M. et coll., 1974, Environmental Impact of Cadmium : A Review by the Panel on Hazardous Trace Substances, *Environmental Health Perspectives*, 7, 253-323.

- FOULQUIER L. et GRAUBY A., 1975, Etude expérimentale de la fixation et du transfert du cadmium et du chrome à travers les maillons d'une chaîne alimentaire d'eau douce simplifiée, Journées " Contamination des Chaînes Biologiques TOULOUSE, Ministère de la Qualité de la Vie, Collection Recherche-Environnement N° 1, p. 177-178.
- FOULQUIER L. et coll., 1977, Absorption directe et transfert du Césium-137 dans une chaîne alimentaire d'eau douce simplifiée, XX° Congrès de la Société Internationale de Limnologie, COPENHAGUE, 7-14 Novembre.
- FOX M., 1957, cité par GREEN J., 1963.
- FRANCK P.W., 1960, Prediction of population growth form in *Daphnia pulex* cultures, The Am. Naturalist, 94 (878), 357-372.
- FREAR D.E.H. et BOYD J.E., 1967, Use of *Daphnia magna* for the microbioassay of pesticides I. Development of Standardized Techniques for rearing *Daphnia* and Preparation of Dosage-Mortality Curves for Pesticides, Journal of economic entomology, 60 (5), 1228-1236.
- FREEMANN L. et FOWLER I., 1953, Toxicity of combinations of certain inorganic compounds to *Daphnia magna* Straus, Sewage and Industrial Wastes, 25 (10), 1191-1195.
- FRIBERG L. et coll., 1976, Cadmium in the Environment, 2° éd., CRC Press, CLEVELAND, 248 p.
- GAARDER T. et GRAN H.H., 1927, Investigations of the production of plankton in the Oslo Fjord, J; Cons. Int. Explor. Mer., 42, 1.
- GANOTES J. et coll., 1962, cités par RODIER J., 1975.
- GARDNER G.R. et YEVICH P.P., 1970, Histological and hematological responses of an estuarine teleost to cadmium, J. Fish. Res. board Can., 27, 2185-2196.
- GEIKE F. et PARASHER C.D., 1976, Effects of Hexachlorobenzene on some growth parameters of *Chlorella pyrenoidosa*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 15 (6), 670-677.
- GIESY J.P. et coll., 1977, Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae), Water Research, 11 (11), 1013-1020.

- GILBERT P.A. et WATSON G.K., 1977, Biodegradability testing and its relevance to environmental acceptability, *Tenside Detergents*, 4, 171-177.
- GIPPS J.F. et LINKE R.D., 1976, An experimental system using *Chlorella vulgaris* for populations studies in secondary-school biology, *Journal of Biological Education*, 10 (2), 87-91.
- GODRON D.A., 1863, Zoologie de la Lorraine ou catalogue des animaux sauvages observés jusqu'ici dans cette ancienne province, 628 p.
- GOELLER H.E. et coll., 1973, cités par Anonyme, 1975.
- GREEN J., 1963, A biology of crustacea, 2<sup>ed.</sup>, Witherby Ltd, LONDON, 165 p.
- GUNN S.A. et coll., 1967, Specific response of mesenchymal tissue to cancerogenesis by cadmium, *Arch. Pathol.*, 83, 493.
- Handbook of Chemistry and Physics*, 1977-1978, 58<sup>ed.</sup>, CRC Press, CLEVELAND.
- HANNERTZ L., 1968, Experimental Investigations on the Accumulation of Mercury in Water Organisms, Rept. Inst Freshwater Res. Drottningholm, 48, 120.
- HARRIS J.E. et WOLFE V.K., 1955, cités par BUIKEMA A.L.Jr., 1975.
- HOLMES C.W. et coll., 1974, Migration and Redistribution of Zinc and Cadmium in Marine Estuarine System, *Environmental Science & Technology*, 8 (3), 255-259.
- HOLM-HANSEN O. et coll., 1965, Fluorometric determination of chlorophyll, *Conseil Perm. Intern. Exploration Mer*, 30, 3-15.
- HOPKINS E.F. et WANN F.B., 1926, *Bot. Gaz.*, 81, 353.
- HOSS D.E., 1964, Accumulation of Zinc-65 by flounder of the genus *Paralichthys*, *Transactions of the American Fisheries Society*, 93, 364-368.
- HUBSCHMANN J.H. et ENGEL A.A., 1965, Toxicity of rubber stoppers to *Daphnia magna* Straus, *Nature*, 205 (4975), 1029-1030.
- HUEY N.A., 1972, cité par FRIBERG L. et coll., 1976.

- HUNT E.G. et BISCHOFF A.I., 1960, Inimical effects on wildlife of periodic DDD application to clear lake, Calif. Fish. Game, 46 (1), 91-106.
- ISENSEE A.R. et coll., 1973, Distribution of alkyl arsenicals in model ecosystems, Environmental Science & Technology, 7 (9), 841-844.
- ISENSEE A.R. et JONES G.E., 1975, Distribution of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxine ( TCDD ) in Aquatic Model Ecosystem, Environmental Science & Technology, 9 (7), 668-672.
- JAAKOLA T. et coll., 1971, cités par FLEISCHER M. et coll., 1974.
- JERNELÖV A. et coll., 1975, Swedish perspectives on mercury pollution, JWPCF, 47 (4) 810-822.
- JOHN M.K. et coll., 1972, Factors affecting plant uptake and phytotoxicity of cadmium added to soils, Environmental Science & Technology, 6, 1005-1009.
- JOUANY J.M. et coll., 1977, Cumulation des toxiques dans les chaînes alimentaires expérimentales : Exemple du cadmium, Ann. Fals. Exp. Chim., 70 (755-756) 459-468.
- KASTAL'SCHAIA-KARZINKINA M.A., 1942, cité par FREAR D.E.H. et BOYD J.E., 1967.
- KERSTING K. et HOLTERMANN W., 1973, The feeding behaviour of *Daphnia magna*, studied with the Coulter Counter, Verh. Int. Ver. Limnol., 18, 1435-1440.
- KESSLER E., 1962, Hydrogenase und H<sub>2</sub>-Stoffwechsel bei Algen, Votr. Botan. Hrsg. Deu Botan. Ges., 1, 92-101.
- KESSLER E. et SOEDER C.J., 1962, Biochemical contributions of the genus *Chlorella*, Nature, 194, 1096-1097.
- KESSLER E. et coll., 1963, Bildung von Sekundär-Carotinoiden bei Stickstoffmangel und Hydrogenase-Aktivität als taxonomische Merkmale in der Gattung *Chlorella*, Plant Cell Physiol. (Tokyo), 7-20.
- KETCHUM B.H. et REDFIELD A.C., 1949, Some physical and chemical characteristics of algae growth in mass culture, J. Cell. Physiol., 33, 281-300.
- KING W.G. et coll., 1974, Losses of Trace Concentrations of Cadmium from Aqueous Solution during Storage in Glass Containers, Analytical Chemistry, 46 (6), 771-773.

- KINKADE M.L. et ERDMAN H.E., 1975, The influence of hardness components (  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  ) in water on the uptake and concentration of cadmium in a simulated freshwater ecosystem, *Environment. Res.*, 10 (2), 308-313.
- KLASS E. et coll., 1974, The effect of cadmium on population growth of the green algae *Scenedesmus quadricauda*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12 (4), 442-445.
- KLEIN D.H., 1972, Mercury and others metals in urban soils, *Environmental Science & Technology*, 6, 560.
- KNEIP J.J. et coll., 1970, cités par FRIBERG L. et coll., 1976.
- KOBAYASHI J., 1971, cité par FLEISCHER M. et coll., 1974.
- KOEMAN J.H. et coll., 1975, Mercury and Selenium in Marine Mammals and Birds, *The Science of the Total Environment*, 3 (3), 279-287.
- KOLKWITZ R. et MARSSON M., 1909, *Okologie der tierischen Saprobien*, *Int. Rev. Ges. Hydrobiol. Hydrogeogr.*, 2, 126-152.
- KORSHGEN L., 1970, Soil-Food chain pesticide Wildlife relationship in Aldrin treated fields, *Journ. Wildlife*, 34 (1), 186-199.
- KRAUSKOPF K.B., 1956, cité par FLEISCHER M. et coll., 1974.
- KUHL A., 1962, Zur Physiologie der Speicherung kondensierter anorganischer Phosphate in *Chlorella*, *Votr. Botan. Hrsg. Deut. Botan. Ges.*, 1, 157-166.
- KUHL A. et LORENZEN H., 1964, Handling and culturing of *Chlorella*, dans "Method in cell physiology, chapitre 1, PRESCOTT D.M., Academic Press, PARIS.
- LAGERSPETZ K., 1958, The brackish-water tolerance of some freshwater crustaceans, *Verh. Int. Ver. Limnol.*, 13, 718-721.
- LAKE P.S. et THORP V.J., 1974, The gill lamellae of the shrimp *Paratya tasmaniensis* ( ATYIDAE : CRUSTACEA) Normal ultrastructure and changes with low levels of cadmium, 8<sup>e</sup> International Congress on electron microscopy, vol. II, CAMBERRA.
- LAMOTTE M. et BOURLIERE F., 1971, Problèmes d'Ecologie; l'échantillonnage des peuplements animaux des milieux aquatiques, MASSON & Cie, 294 P.
- LARSSON A., 1975, Some biochemical effects of cadmium on fish, dans "Sublethal effects of toxic chemicals on aquatic animals" ed. KOEMAN et STRIK, p.3-13. coll. ELSEVIER.

- LAUGEL P. et coll., 1976, Contribution à l'étude de la contamination des aliments par le cadmium- I-Evaluation des apports de cadmium par la vaisselle, Ann. Fals. Chim., 69, (741), 473-487.
- LEFEVRE M., 1942, L'utilisation des algues d'eau douce par les cladocères, Bull. Biol. Fr. et Belg., 76, 1-27.
- LEFEVRE M., NISBET M., JAKOB H., 1949, Action des substances excrétées en culture, par certaines espèces d'algues, sur le métabolisme d'autres espèces d'algues Verhandlungen der Internationale Vereinigung für theoretische und angewandte Limnologie, 10, 259-264.
- LEFEVRE M., JAKOB H., NISBET M., 1951, Compatibilités et antagonismes entre algues d'eau douce dans les collections d'eau naturelles, Trav. Assoc. Internat. limnol. theor. et appl., 11, 224-229.
- LEPAILLEUR et coll., 1973, Choix d'une technique d'étude de la toxicité d'un polluant vis-à-vis d'une souche d'algue, Etude N°E.4220, I.R.C.H.A.
- LEWOVA L.I., SHEVCHENKO N.S. et ZHAROVA L.H., 1970, Effects of the vital activity products of accompanying bacteria on the growth of some *Chlorella* strain Mikrobiol Zh (KYYIV), 32, (1), 111-115.
- LILLELUND K., 1974, Considerations on testing the accumulation of pesticides by means of artificial food chains, Ber. dt. wiss. Kommn. Meeresforsch., 23, 308-3
- LINDEGREN C.C. et LINDEGREN G., 1973, Mitochondrial modification and respiratory deficiency in the yeast cell caused by cadmium poisoning, Mutation Res., 21, 315-322.
- LINKO R.R. et coll., 1974a, PCB Residues in plankton and sediment in the Southwestern Coast of Finland, Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 12, (6), 733-738.
- LINKO et coll., 1974b, Occurrence of DDT and PCB compounds in Baltic Herring and Pike from the Turku Archipelago, Environm. Pollut., 7, (3), 193-207.
- LOCK R.A.C., 1975, Uptake of methylmercury by aquatic organisms from water and food, dans " Sublethal effects of toxic chemicals on aquatic animals" ed. KOENIG et STRIK, p.61-79, coll. ELSEVIER.
- LORENZEN H., 1956, Über Wachstum und Stoffwechsel von Grünalgen mit besonderer Berücksichtigung periodischer Erscheinungen, Dissertation, Marburg.
- LORENZEN H., 1957, Synchrone Zellteilungen von *Chlorella* bei verschiedenen Licht, Dunkel-Wechseln, Flora, 144, 473-496.

- LORENZEN C.J., 1966, Method for the continuous measurement of " in vivo " chlorophyll concentration, Deep sea research, 13, 223-227.
- LORENZEN C.J., 1967, Determination of chlorophyll and pheo-pigments : spectrophotometric equations, Limnology and Oceanography, 12, 343.
- LORENZEN C.J., 1968, Carbon/ chlorophyll relationships in an upwelling area, Limnology and Oceanography, 13 (1), 202-204.
- LOWE J.I. et coll., 1972, Effects of Mirex on Selected Estuarine Organisms, 36° North American Wildlife Conference, 170-187.
- LU P.Y. et coll., 1975, Model Ecosystem Studies of Lead and Cadmium and of Urban Sewage Sludge Containing these Elements, J. Environ. Qual., 4 (4), 505-509.
- LUCKEY T.D. et coll., 1975, Heavy metal toxicity safety and Hormonology, G. Thieme, STUTTGART, Academic Press, NEW-YORK, 120 p.
- LUNDHAL P., 1973, Etude de la toxicité des effluents au moyen d'un test " Daphnie " Bull. de l'Association pharmaceutique française pour l'hydrologie, 12, 9-15.
- MAC ARTHUR J.W. et BAILLIE W.H.T., 1929, Influence of temperature on longevity in *Daphnia magna*, The Journal of Experimental Zoology, 53 (2), 221-242.
- MAC CABE L.J. et coll., 1970, Survey of community water supply systems, J. Am. Water Works Assoc., 62, 670.
- MAC KINNEY G., 1940, J. Biol. Chem., 132, 91.
- MAC KINNEY G., 1941, Absorption of light by chlorophyll solutions, J. Biol. Chem., 140, 315-322.
- MAC LEAN M.W. et WILLIAMSON F.B., 1977, Cadmium accumulation by the marine red alga *Porphyra umbilicalis*, Physiol. Plant, 41, 268-272.
- MAC MAHON J.W. et RIGLER F.H., 1963, Mechanisms regulating the feeding rate of *Daphnia magna* Straus, Can. J. Zool., 41, 321-332.
- MALACEA I., 1966, Contribution to knowledge of cyanides, ammonia, mercury and arsenic toxic action on some species of fishes and to daphnia, Studii. Prot. Epur. Apel. Buc., 7, 751-792.
- MANN H., 1975, Der Golder fentest Deutscher Vorschlag zur Prüfung der Wirkung von Chemischen Stoffen auf Fische, Vom Wasser, 44, 1-13.



- MARTIN J.H. et BROENKOW W.W., 1975, Cadmium in plankton: elevated concentrations off Baja California, *Science*, 190, 884-885.
- MARTY R. et coll., 1977, Experimental trophic chains in freshwater environment: their ecotoxicological interests both fundamental and practical, *Seminaire Européen "Ecological tests relevant to the implementation of proposed regulations concerning environmental chemicals: evaluation and research needs"* Berlin, 7-9 decembre.
- MASHIKO K. et coll., 1972, Transfer and accumulation of calcium in the *Chlorella*-Plankton crustacean- Fish Food Chain, *Ann. Rep. Noto Mar. Lab.*, 12, 1-7.
- MATHIS B.J. et KEVERN N.R., 1975, Distribution of mercury, cadmium lead and thallium in a eutrophic lake, *Hydrobiologia*, 46(2-3), 207-222.
- MATONICKIN I. et PAVLETIC Z., 1975, Influence des ruisseaux d'alimentation sur la composition et la structure du benthos dans les lacs accumulateurs du karst yougoslave, *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 19, 1907-1920.
- MERLINI M. et coll., 1976, cités par BAUDIN J.P., 1977.
- MESTRE H., 1935, A precision photometer for the study of suspensions of bacteria and other microorganisms, *Journal of Bacteriology*, 30 (4), 335-358.
- METAIS P. et coll., 1977, *Biochimie clinique 1- Biochimie analytique*, 221p. SIMEP.
- METCALF R.L. et coll., 1971, Model Ecosystem for the evaluation of pesticide biodegradability and ecological magnification, *Environmental Science and Technology*, 5 (8), 709-713.
- METCALF R.L. et coll., 1975, Laboratory model ecosystem studies of the degradation and fate of radiolabeled tri-, tetra- and pentachlorobiphenyl compared with DDE, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 3 (2), 151-165.
- MILLER R.J., BITTEL J.E. et KOEPPE D.E., 1973, The effects of cadmium on electron and energy transfer reactions in corn mitochondria, *Physiol. Plant*, 28, 166-171.
- MINK L.L. et coll., 1971, cités par FLEISCHER M. et coll., 1974.
- MIURA T. et TAKAHASHI R.M., 1975, Effects of the IGR, TH 6040, on nontarget organisms when utilized as a mosquito control agent, *Mosquito News*, 35 (2), 154-159
- MOORE N.W., 1967, A synopsis of pesticide problem, dans "Advances in Ecological Research", 4, 75-129, Academic Press, LONDRES, 311 p.

- PETROCELLI S.R. et coll., 1975a, Controlled food-chain transfer of dieldrin residues from phytoplankton to clams, *Marine Biology*, 31 (3), 215-218.
- PETROCELLI S.R. et coll., 1975b, Biomagnification of dieldrin residues by food-chain transfer from clams to blue crabs under controlled conditions, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 13 (1), 108-116.
- PFAFF W. von, 1955, Der Daphnientest zum Nachweis von Kontaktinsektiziden, *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz*, 62, 361-370.
- PICKERING Q.H. et VIGOR W.N., 1965, The acute toxicity of zinc to eggs and fry of the fathead minnow, *Progr. Fish.-Cult.*, 27, 153-157.
- PICKERING Q.H. et HENDERSON C., 1966, The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm water fishes, *Air Wat. Poll. Int. J.*, 10, 453-463.
- PICKERING Q.H. et GAST M.H., 1972, Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow (*Pimephales promelas*), *J. Fish. Res. Board. Can.*, 29 (8), 1099-1106.
- PICKERING Q.H. et coll., 1962, The toxicity of organic phosphorus insecticides to different species of warm water fishes, *Trans. Am. Fish. Soc.*, 19, 175-184.
- PINTA M. et RIANDEY C., 1975, Etude physicochimique du mécanisme de l'atomisation thermo-électrique et de ses perturbations- Application à la spectrophotométrie d'absorption atomique dans un four en graphite, *Analisis*, 3 (2), 86-93.
- PIRSON A. et LORENZEN H., 1958, Ein endogener Zeitfaktor bei der Teilung von *Chlorella*, *Z. Botan.*, 46, 53-67.
- PISCATOR M., 1964, On cadmium in normal human kidneys together with a report on the isolation of metallothionein from livers of cadmium exposed rabbits, *Nord. Hyg. T.*, 45, 76.
- PISCATOR M., 1971, cité par FRIBERG L. et coll., 1976.
- PLANAS D., 1975, Distribution and productivity of the phytoplankton in Spanish reservoirs, *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 19, 1860-1870.
- POLIKARPOV G.G., 1966, *Radioecology of aquatic organisms*, North Holland Publishing Company, AMSTERDAM, 314 p.
- PRATT R., 1940, Influence of the size of the inoculum on the growth of *Chlorella vulgaris* in freshly prepared culture medium, *Amer. J. Bot.*, 27, 52-56.

- PRATT D.M., 1943, Analysis of population development in *Daphnia* at different temperatures, Biol. Bull., 85, 116-140.
- PRATT R. et FONG J., 1940, Studies on *Chlorella vulgaris* II- Further evidence that *Chlorella* cells form a growth-inhibiting substance, Amer. J. Bot., 27, 431-436.
- PRATT R. et coll., 1944, Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*, Science, 99, 351-352.
- PRATT R. et coll., 1945, Studies on *Chlorella vulgaris* X- Influence of the age of the culture on the accumulation of chlorellin, Amer. J. Bot., 32, 405-408.
- PRESTON A. et coll., 1972, British Isles coastal waters: the concentrations of selected heavy metals in sea water, suspended matter and biological indicators- a pilot survey, Environmental Pollution, 3, 69-82.
- RAMADE F., 1974, Eléments d'Ecologie appliquée, Ediscience, PARIS, 522 p.
- RAMADE F., 1977, Ecotoxicologie, Masson, PARIS, 205 p.
- RAVERA O. et coll., 1973, Cadmium distribution in aquatic environment and its effects on aquatic organisms, Colloque Européen "Problems on the contamination of man and its environment by mercury and cadmium", Luxembourg, 3-5 juillet 1973, 317-331.
- REINERT R.E., 1972, Accumulation of dieldrin in an alga (*Scenedesmus obliquus*), *Daphnia magna*, and the guppy (*Poecilia reticulata*), J. Fish. Res. Bd. Canada, 29 (10), 1413-1418.
- RICE T.R., 1954, Biotic influences affecting population growth of planktonic algae, Fishery Bull., 54, 227-245.
- RICE T.R., 1963, cité par YOUNG M.L., 1975.
- RICHARDS F.A. et THOMPSON T.G., 1952, The estimation and characterization of plankton populations by pigments analyses. II A spectrophotometric method for the estimation of plankton pigments, J. Marine Res., 11, 156-172.
- RICHMAN S., 1958, The transformation of energy by *Daphnia pulex*, Ecol. Monographs, 28, 273-291.
- RISEBROUGH R.W. et DE LAPPE B., 1972, Accumulation of polychlorinated biphenyls in ecosystems, Environmental Health Perspectives, 1, 39-45.
- RODIER J., 1975, L'analyse de l'eau, T.1, 5ème édition, Dunod, PARIS, 629 p.

- ROMANO J.C., 1975, Les adenosines-5'-phosphates (ATP, ADP, AMP) chez des algues phytoplanctoniques- Rôle pour la mesure indirecte de la biomasse, C.R. Acad. Sc., 281, série D, 1027-1030.
- ROMERIL M.G. et DAVIS M.H., 1976, Trace metal levels in eels grown in power station cooling water, *Aquaculture*, 8 (2), 139-149.
- ROSE M., 1929, cité par PACAUD A., 1939.
- ROSS R.T. et GONZALES J.G., 1974, The direct determination of cadmium in biological samples by selective volatilization and graphite tube reservoir atomic absorption spectrometry, *Analytica Chimica Acta*, 70, 443-447.
- RYTHER J.H., 1954, Inhibitory effects of phytoplankton upon the feeding of *Daphnia magna* with reference to growth, reproduction and survival, *Ecology*, 35 (4), 522-533.
- SALTZMAN B.E., 1953, cité par FRIBERG L. et coll., 1976.
- SANDERS H.O. et COPE O.B., 1966, Toxicities of several pesticides to two species of Cladocerans, *Trans. Amer. Fish Soc.*, 95, 165-169.
- SAWARD D. et coll., 1975, Experimental studies on the effects of copper on a marine food chain, *Marine Biology*, 29 (64), 351-361.
- SAYED Z.E.S. et BYUNG D. Lee, 1963, Evaluation of an automatic technique for counting unicellular organisms, *Journal of Marine Research*, 21 (2), 59-73.
- SCHINDLER D.W., 1968, cité par BUIKEMA A.L.Jr, 1975.
- SCHROEDER H.A. et BALASSA J.J., 1965, Influence of chromium, cadmium and lead on rat aortic lipids and circulating cholesterol, *Amer. J. Physiol.*, 29, 433-437.
- SCHWARTZ D., 1963, Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes, Flammarion Médecine Sciences, 3ème édition, 318 p.
- SCHWEIGER G., 1957, Die Toxikologische Einwirkung von Schwermetallsalzen auf Fische und Fischnäher Tiere, *Arch. Fisch. Wiss.*, 8, 54-78.
- SENEZ J.C., 1968, *Microbiologie Générale*, DOIN, 592 p.
- SETTERLING A.N. et coll., 1943, cité par SITTING M., 1974.
- SHOAF W.T. et LIUM B.W., 1976, An evaluation of methods for measuring algal growth, *J. Res. U.S. Geol. Survey*, 4 (4), 497-504.

- SILVERBERG B.A., 1976, Cadmium induced ultrastructural changes in mitochondria of freshwater green algae, *Phycologia*, 15 (2), 155-159.
- SIMON E., 1977, Cadmium tolerance in populations of *Agrostis tenuis* and *Festuca ovina* *Nature*, 265 (5592), 328-330.
- SITTING M., 1974, Pollution detection and monitoring handbook, Noyes Data Corporation Park Ridge, 401 p.
- SKYE E., 1968, Lichens and air pollution, *Acta Phytogeographica suecica*, 52, 1-23.
- SLODOBKIN L.B., 1962, Energy in animal ecology, p.69-101, dans "Advances in Ecological Research", 1, Academic Press, Londres, 203 p.
- SMITH J.C. et coll., 1955, cités par FRIBERG L. et coll., 1976.
- SMITH B.P., HEJTMANCIK E. et CAMP B.J., 1976, Acute effects of cadmium on *Ictalurus punctatus* (catfish), *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 15 (3), 271-277.
- SPELLMANN C.J., 1961, Faune de France, N°65, Poissons d'eau douce, p.32, Paul LECHEVALIER, PARIS, 302 p.
- SPOEHR h.A. et MILNER H.W., 1949, Chemical composition of *Chlorella*- effects of environmental conditions, *Plant Physiol.*, 24, 120-149.
- SPRAGUE J.B., 1969, Measurement of pollutant toxicity to fish I- Bioassay methods for acute toxicity, *Water Research*, 3, 793-821.
- "STANDARD METHODS for the examination of water and wastewater", 1971, 13ème édition, American Public Health Association, NEW-YORK, 874 p.
- STEEMAN-NIELSEN E., 1952, The use of radioactive carbon ( $^{14}\text{C}$ ) for measuring organic production in the sea, *J. Cons. Int. Explor. Mer.*, 18, 117.
- STEEMAN-NIELSEN E., 1961, Chlorophyll concentration and rate of photosynthesis in *Chlorella vulgaris*, *Physiologia Plantarum*, 14, 868-876.
- STORCH O., 1922, 1924, 1925, cités par PACAUD A., 1939.
- STRAIN H.H. et SVEC W.A., 1966, Extraction, separation estimation and isolation of the chlorophylls, dans "The Chlorophylls- physical, chemical and biological properties" Ed. VERNON L.P. et SEELY G.R., Academic Press NEW YORK and LONDON, 679 p., chap.2, 21-66.

- STREHLER B.L. et TOTTER J.R., 1952, Firefly luminescence in the study of energy transfer mechanisms, 1- Substrate and enzyme determination, Arch. Biochem. Biophys., 40, 28-41.
- STUMM W. et MORGAN J.J., 1970, Aquatic chemistry, J. Wiley and Sons, NEW-YORK, 583 p.
- SUN Y.P., 1957, Bioassay of pesticide residues, Advances in Pest Control Research, 449-496.
- SYRETT P.J., 1958, Respiration rate and adenosine triphosphate concentration in *Chlorella*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 75, 117-124.
- TAUB F.B. et DOLLAR A.M., 1964, A *Chlorella* - *Daphnia* food-chain study- the design of a compatible chemically defined culture medium, Limnol. Oceanogr., 9, 61-74.
- TERHAAR C.J. et coll., 1965, Prospective effects of low doses of cadmium chloride against subsequent high oral doses in the rat, Toxicol. Appl. Pharmacol., 7, 500.
- TERHAAR C.J. et coll., 1977, A laboratory model for evaluating the behavior of heavy metals in an aquatic environment, Water Research, 11, 101-110.
- TETRY A., 1935, cité par SPILLMANN C.J., 1961.
- TETT P. et coll., 1975, A method for the spectrophotometric measurement of chlorophyll a and pheophytin a in benthic microalgae, Limnology and Oceanography, 20 (5), 887-896.
- THOMANN R.V. et coll., 1974, A food chain model of cadmium in western lake Erie, Water Research, 8, 841-849.
- THORP V.J. et LAKE P.S., 1973, Pollution of a Tasmanian river by mine effluents II- Distribution of macroinvertebrates, Int. Rev. Ges. Hydrobiol., 58, 885-892.
- THORP V.J. et LAKE P.S., 1974, Toxicity bioassays of cadmium on selected freshwater invertebrates and the interaction of cadmium and zinc on the freshwater shrimp, *Paratya tasmaniensis* Riek., Aust. J. Mar. Freshwat. Res., 25, 97-104.
- TITMAN D., 1975, A fluorometric technique for measuring sinking rates of freshwater phytoplankton, Limnol. Oceanogr., 20 (5), 869-875.
- TOWNSLEY S.J. et coll., 1960, Uptake of radioisotopes and their transfer through food chains by marine organisms, Rapport annuel 1959-1960, United States Atomic Energy Commission, TID-6630, 40 p.

- TRUHAUT R. et BOUDENE C., 1954, Recherches sur le sort du cadmium dans l'organisme au cours des intoxications- Intérêt en médecine du travail, *Arh. Hig. Rada*, 5, 19.
- TRUHAUT R. et JOUANY J.M., 1977, Perspectives en Ecotoxicologie, *Ann. Fals. Exp. Chi* 70 (755-756), 381-391.
- TURNER J.C. et LANNON T.J., 1952, Effects of antibiotics on *Daphnia*, *Proc. Soc. Expr Biol. and Med.*, 80 (4), 684-688.
- UI J., 1971, Mercury pollution of sea and fresh water, its accumulation into water biomass, *Revue Int. Oceanogr. Med.*, XXII-XXIII, 79-128.
- UKELES R., 1968, Growth of pure cultures of marine phytoplankton in the presence of toxicants, *Appl. Microbiol.*, 10, 532-537.
- VAAJAKORPI H.A. et SALONEN L., 1973, Bioaccumulation and transfer of <sup>14</sup>C-DDT in a small pond ecosystem, *Ann. Zool. Fennici*, 10, 539-544.
- VERNON L.P., 1960, Spectrophotometric determination of chlorophylls and pheophytins in plant extracts, *Analytical Chemistry*, 32, 1144-1150.
- VIEHOEVER A., 1935, *Daphnia* propagation for experimental use, *Am. Jour. Pharm.*, 107 (3), 103-130.
- VIJVERBERG J., 1976, The effect of food quantity and quality on the growth, birth-rate and longevity of *Daphnia hyalina* Leydig, *Hydrobiologia*, 51 (2), 99-108.
- VLADIKOV V., 1931, cité par SPILLMANN C.J., 1961.
- VOYER R.A., 1975, Effect of dissolved oxygen concentration on the acute toxicity of cadmium to the Mummichog, *Fundulus heteroclitus* L., at various salinities, *Transactions of the American Fisheries Society*, 104 (1), 129-134.
- WARBURG O., 1919, Über die geschwindigkeit der photochemischen Kohlensäurersetzung lebenden Zellen, *Biochem. Zeitschr.*, 100, 230-270.
- WEBER C.W., 1969, Effects of dietary Cadmium on mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 14 420-425.
- WEISMANN A., 1877, cité par PACAUD A., 1939.
- WHITE R.C. et coll., 1972, Fluorometric estimation of chlorophylls, chlorophyllide, Pheophytins and Pheophorbides in Mixtures, *J. Agr. Food Chem.*, 20 (4), 773-778.

- WINCKLER L.W., 1888, The determination of dissolved oxygen in water, Berlin. Deutsch. Chem. Gesellsch., 21, 2843.
- WINOKUR M., 1948, Photosynthesis relationships of *Chlorella*, Amer. J. Bot., 35 (4), 207-214.
- WISNIEWSKA-KNYPL J.M. et JABLONSKA J., 1970, Selective binding of cadmium in vivo on metallothionein in rat's liver, Bull. Acad. pol. Sci. biol., 18, 321.
- WOLTERECK R., 1928, cité par PACAUD A., 1939.
- WRIGHT R.C. et RINER J.C., 1975, Determination of cadmium in blood and urine with graphite furnace, Atomic Absorption Newsletter, 14, 103-104.
- YAMAGATA N. et SHIGEMATSU L., 1970, cités par FRIBERF L. et coll., 1976.
- YENTSCH C.S. et RYTHER J.H., 1957, Short-term variations in phytoplankton chlorophyll and their significance, Limnology and Oceanography, 2, 140-142.
- YENTSCH C.S. et MENZEL D.W., 1963, A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and phaeophytin by fluorescence, Deep-Sea Research, 10, 221-231.
- YOUNG M.L., 1975, The transfer of <sup>65</sup>Zn and <sup>59</sup>Fe along a *Fucus serratus* (L.) → *Littorina obtusata* (L.) Food chain, J. mar. biol. Ass. U.K., 55, 583-610.
- ZAROOGIAN G.E. et CHEER S., Accumulation of cadmium by the american oyster *Crassostrea virginica*, Nature, 261 (5559), 408-410.
- ZITKO V. et CHOI P.M.K., 1971, PCB and other industrial halogenated hydrocarbons in the environment, Fisheries Research Board of Canada, technical report n° 272, 66 p.
- ZITKO V. et coll., 1974, Distribution of PCB and p,p'-DDE Residues in Atlantic Herring (*Clupea harengus harengus*) and Yellow Perch (*Perca flavescens*) in Eastern Canada, Pesticides Monitoring Journal, 8 (2), 105-109.
- ZITKO V. et CARSON W.G., 1976, A mechanism of the effects of water hardness on the lethality of heavy metals to fish, Chemosphere, 5, 299-303.
-



R E L I U R E

M E T Z - T H E S E S  
180, rue de Pont-à-Mousson  
MONTIGNY-lès-METZ 57000 METZ  
Tél. 69.12.94