



**HAL**  
open science

**Le développement embryo-larvaire du danio zébré  
(Brachydanio rerio) : évaluation de ce modèle pour la  
mesure de la toxicité des effluents et des sédiments :  
apports de l'analyse d'images pour les mesures  
biométriques de l'essai embryo-larvaire**

Stéphane Naudin

► **To cite this version:**

Stéphane Naudin. Le développement embryo-larvaire du danio zébré (Brachydanio rerio) : évaluation de ce modèle pour la mesure de la toxicité des effluents et des sédiments : apports de l'analyse d'images pour les mesures biométriques de l'essai embryo-larvaire. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1996. Français. NNT : 1996METZ009S . tel-01777112

**HAL Id: tel-01777112**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777112>**

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>

# THESE

présentée devant

l'Université de METZ

pour l'obtention du grade de Docteur  
spécialité: Toxicologie de l'Environnement

par Stéphane NAUDIN

**Le développement embryo-larvaire du danio zébré  
(*Brachydanio rerio*): évaluation de ce modèle pour la  
mesure de la toxicité des effluents et des sédiments.  
Apports de l'analyse d'images pour les mesures  
biométriques de l'essai embryo-larvaire.**

soutenance prévue le 23 / 02 /1996

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 157674 0

**Jury:**

**Présidente:** Mme Paule VASSEUR, professeur à l'Université de Metz

**Membres:** Mme Jeanne GARRIC, chargé de recherche au Cemagref de Lyon

M. Gérard BLAKE, professeur à l'Université de Savoie

M. Jean-François FERARD, professeur à l'Université de Metz

M. Edouard HIS, directeur de recherche à l'IFREMER d'Arcachon (rapporteur)

M. Pierre ROUBAUD, maître de conférence à l'Université de Paris VII (rapporteur)

## - Sommaire -

### Résumé

### Abréviations et terminologie utilisées

### Espèces de poisson citées

### Introduction générale

## A - partie bibliographique

### 1- Les essais embryo-larvaires sur les poissons

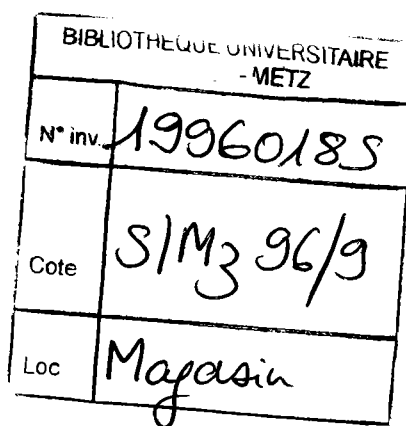
- 1.1- Introduction
- 1.2- Les essais de toxicité existant sur les poissons
  - 1.2.1- Les essais de toxicité aiguë
  - 1.2.2- Les essais de toxicité sublétales et chronique
  - 1.2.3- Terminologie relative aux différentes phases de vie des poissons
- 1.3- Place des essais sur les Stades Embryo-Larvaires (SEL)
- 1.4- Présentation des essais embryo-larvaires
  - 1.4.1- Introduction
  - 1.4.2- Les espèces utilisées
  - 1.4.3- Description des critères de toxicité
    - 1.4.3.1- La survie embryonnaire
    - 1.4.3.2- L'éclosion
    - 1.4.3.3- La survie larvaire
    - 1.4.3.4- La croissance
    - 1.4.3.5- Les malformations
  - 1.4.4- Conclusion

### 2- Les facteurs de modulation de la réponse toxique

- 2.1- Introduction
- 2.2- Facteurs liés au milieu
  - 2.2.1- La dureté
  - 2.2.2- Le pH
  - 2.2.3- La température
  - 2.2.4- L'oxygène dissous
  - 2.2.5- Autres facteurs
- 2.3- Facteurs liés à l'organisme exposé
  - 2.3.1- L'espèce
  - 2.3.2- Le stade de développement
- 2.4- Conclusion

### 3- Tolérances des poissons aux conditions physico-chimiques du milieu

- 3.1- Introduction
- 3.2- Tolérance à la température
- 3.3- Tolérance au pH
- 3.4- Tolérance à la teneur en oxygène dissous
- 3.5- Tolérance à la teneur en sels ammoniacaux





#### **4- Présentation du modèle: le danio zébré**

- 4.1- Description de l'espèce
- 4.2- Intérêt comparatif de ce modèle pour les essais SEL
- 4.3- Sensibilité du danio zébré par rapport à d'autres espèces
- 4.4- Variabilité des résultats des essais SEL

#### **5- Utilisation de bioessais pour l'évaluation de la toxicité d'effluents et de sédiments**

- 5.1- Introduction
- 5.2- Application des bioessais aux effluents
  - 5.2.1- Introduction
  - 5.2.2- Généralités sur les effluents de station d'épuration
  - 5.2.3- Généralités sur les effluents industriels
  - 5.2.4- Méthodes d'évaluation de la toxicité des effluents
  - 5.2.5- Apports des essais SEL sur poisson dans les batteries de bioessais
  - 5.2.6- Choix techniques lors des essais sur effluent
- 5.3- Application des bioessais aux sédiments
  - 5.3.1- Introduction
  - 5.3.2- Méthodes d'évaluation de la toxicité de sédiments

#### **6- Utilisation de bioessais pour la mise en évidence d'effets tératogènes**

- 6.1- Introduction
- 6.2- Méthodes d'évaluation des risques tératogènes environnementaux
- 6.3- Exemples de susceptibilité de différentes espèces aux composés tératogènes
- 6.4- Présentation d'une substance tératogène: le dibutylphtalate

#### **7- Intérêt de l'analyse d'images pour le suivi de bioessais**

- 7.1- Introduction
- 7.2- Présentation de la technique d'analyse d'images
- 7.3- Application aux bioessais

### **B - partie expérimentale**

#### **1- Mise en oeuvre de l'essai SEL sur le danio zébré**

- 1.1- Introduction
- 1.2- Origine des géniteurs
  - 1.2.1- Géniteurs issus du commerce
  - 1.2.2- Géniteurs élevés au laboratoire
- 1.3- Maintenance des géniteurs
  - 1.3.1- Conditions d'élevage
  - 1.3.2- Alimentation
- 1.4- Obtention des oeufs

- 1.5- Protocole de l'essai SEL
  - 1.5.1- Principe
  - 1.5.2- Déroulement
    - 1.5.2.1- Récipients utilisés
    - 1.5.2.2- Eau de dilution
    - 1.5.2.3- Préparation des solutions à tester
    - 1.5.2.4- Mise en place de l'essai
    - 1.5.2.5- Suivi de l'essai
    - 1.5.2.6- Protocole de nourrissage
  - 1.5.3- Exploitation des résultats
  - 1.5.4- Conditions de validité
- 1.6- Précautions supplémentaires pour l'initiation de l'essai
  - 1.6.1.- Introduction
  - 1.6.2- Amélioration de l'initiation des essais SEL
  - 1.6.3- identification des stades embryonnaires utilisés

## **2- Mise au point du suivi de l'essai SEL par analyse d'images**

- 2.1- Introduction et vocabulaire utilisé
- 2.2- Objectifs
- 2.3- Description de l'analyse d'images
- 2.4- Matériel utilisé
  - 2.4.1- Equipement pour l'acquisition d'images
  - 2.4.2- Equipement pour le traitement des images
  - 2.4.3- Description du logiciel Visilog 4
- 2.5- Fiabilité du matériel
  - 2.5.1- Reproductibilité des mesures sur tout le champ de la caméra
  - 2.5.2- Reproductibilité des mesures au centre du champ de la caméra
  - 2.5.3- Précision des mesures dimensionnelles
  - 2.5.4- Déformations géométriques lors de certains traitements d'images
- 2.6- Application aux essais embryo-larvaires sur le danio zébré
  - 2.6.1- Caractéristiques des stades embryo-larvaires du danio zébré
  - 2.6.2- Etalonnage
  - 2.6.3- Récipients utilisés
  - 2.6.4- Conditions de prise d'images
  - 2.6.5- Opérations retenues pour le traitement des images
  - 2.6.6- Mesures et détections possibles
  - 2.6.7- Résolution de la caméra
  - 2.6.8- Développement d'un algorithme pour les mesures de taille
    - 2.6.8.1- Palliatif aux limites du logiciel
    - 2.6.8.2- Reproductibilité des mesures de taille
  - 2.6.9- Variabilité des mesures de taille et de surface
  - 2.6.10- Corrélation entre la taille, la surface et le poids sec
  - 2.6.11- Mesures séquentielles
  - 2.6.12- Paramétrage des déformations
    - 2.6.12.1- Introduction
    - 2.6.12.2- Matériel et méthode employés
    - 2.6.12.3- Résultats
    - 2.6.13.4- Discussion
    - 2.6.12.5- Conclusion
  - 2.6.13- Discussion et conclusion sur les apports de l'analyse d'images aux essais SEL

### **3- Domaines de tolérance des stades embryo-larvaires du danio zébré**

- 3.1- Introduction
- 3.2- Dispositif expérimental
- 3.3- Tolérance des stades embryo-larvaires à la température
- 3.4- Tolérance des stades embryo-larvaires au pH
  - 3.4.1- Essai préliminaire
  - 3.4.2- Essai définitif
- 3.5- Tolérance des stades embryo-larvaires à la salinité
- 3.6- Tolérance des stades embryo-larvaires à la dureté
  - 3.6.1- Essai préliminaire
  - 3.6.2- Essai définitif
- 3.7- Interaction entre la dureté et la toxicité d'un détergent anionique
- 3.8- Tolérance des stades embryo-larvaires à l'ammoniac
  - 3.8.1- Dispositif expérimental
  - 3.8.2- Résultats des essais
- 3.9- Tolérance des stades embryo-larvaires à l'hypoxie
  - 3.9.1- Dispositif expérimental
  - 3.9.2- Résultats des essais
- 3.10- Conclusion

### **4- Essais embryo-larvaires sur effluents**

- 4.1- Introduction
- 4.2- Essai sur un effluent de papeterie
- 4.3- Essai sur un effluent de teinturerie
- 4.4- Essai sur effluents de station d'épuration
  - 4.4.1- Caractéristiques physico-chimiques
  - 4.4.2- Essais SEL sur deux effluents de station d'épuration
  - 4.4.3- Vérification de la contribution de l'ammoniac à la toxicité des échantillons
  - 4.4.4- Essai sur un détergent anionique: le LAS
- 4.5- Discussion sur le déroulement des essais SEL sur effluents
- 4.6- Pertinence des essais SEL pour l'évaluation de la toxicité sublétales des effluents
- 4.7- Conclusion

### **5- Pertinence des mesures de croissance**

- 5.1- Reproductibilité des taux de croissance dans les lots témoins
  - 5.1.1- Introduction
  - 5.1.2- Choix des lots témoins pour l'analyse
  - 5.1.3- Vérification de la distribution des données de taille et de l'homogénéité des variances
  - 5.1.4- Analyse de variance
  - 5.1.5- Comparaison des moyennes
  - 5.1.6- Conclusion
- 5.2- Contribution du critère de croissance à la sensibilité des essais SEL
- 5.3- Conclusion

## **6- Intérêt des stades embryo-larvaires du danio zébré comme modèle de tératogénèse**

- 6.1- Introduction
- 6.2- Précautions relatives à la dissolution du dibutylphtalate
- 6.3- Résultats de l'essai embryo-larvaire
- 6.4- Recherche de la phase sensible du développement
- 6.5- Etude histologique
- 6.6- Discussion et conclusion

## **7- Essais embryo-larvaires sur sédiments**

- 7.1- Introduction
- 7.2- Projet de protocole
  - 7.2.1- Principe
  - 7.2.2- Prélèvement, stockage des échantillons
  - 7.2.3- Préparation des solutions à tester
  - 7.2.4- Mise en place de l'essai
  - 7.2.5- Suivi de l'essai
  - 7.2.6- Mesures physico-chimiques
  - 7.2.7- Expression des résultats
- 7.3- Validité de l'essai développé
  - 7.3.1- Introduction
  - 7.3.2- Méthodes
  - 7.3.3- Résultats et discussion
    - 7.3.3.1- Analyse physico-chimiques
    - 7.3.3.2- Résultats des bioessais
  - 7.3.4- Conclusion sur la toxicité des sédiments révélée par la batterie de bioessais
  - 7.3.5- Apport des bioessais sur le danio zébré et la daphnie
- 7.4- Conclusion sur l'intérêt des essais SEL sur sédiment

## **Conclusion générale**

## **Références bibliographiques**

## **Annexes**

## Abréviations et terminologie utilisées

La signification des sigles anglo-saxons est donnée entre parenthèse.

### *Critères de toxicité*

- CL50: Concentration Létale 50%: concentration qui va entraîner la mort de 50% des organismes exposés
- CME0: Concentration Minimale avec Effet Observé: concentration la plus faible pour laquelle un effet significatif est déterminé (à  $p < 0,05$ ) pour un des critères de toxicité par rapport au témoin - ce critère est équivalent à la LOEC utilisé par les anglo-saxons (Lowest Observed Effect Concentration)
- CSEO: Concentration Sans Effet Observé: plus forte concentration testée inférieure à la CME0 - ce critère est équivalent à la NOEC utilisé par les anglo-saxons (No Observed Effect Concentration)
- CTMA: Concentration Toxique Maximale Admissible souvent assimilée à la VCh - ce critère est équivalent à la MATC utilisé par les anglo-saxons (Maximum Acceptable Toxicant Concentration)
- VCh: Valeur Chronique: moyenne géométrique entre la CSEO et la CME0 - ce critère est équivalent à la ChV utilisé par les anglo-saxons (Chronic value)

### *Molécules*

- ADN: Acide DésoxyriboNucléique
- ATP: Adénosine TriPhosphate: molécule représentant la principale forme de l'énergie cellulaire
- DBP: DiButhylPhtalate
- DEHP: DiEthylHexylPhtalate
- DMSO: DiMéthylSulfOxyde
- EDTA: (Ethylène-Diamino-Tétraacétique acid) acide ethylène-diamino-tétraacétique: agent chélateur
- HAP: Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
- LAS: (Linear Alkylbenzene Sulfonate) alkylbenzène sulfonate linéaire: détergent anionique
- PCB: PolyChloroBiphényle
- PCP: PentaChloroPhénol
- TBT: (TriButyl Tin) tribytylétain

## Abréviations et terminologie utilisées (suite)

### *Organismes ou label*

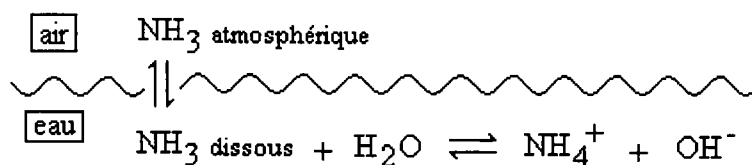
- CEN: Commission Européenne de Normalisation  
 EPA: (Environmental Protection Agency) agence pour la protection de l'environnement aux Etats-Unis  
 ISO: (International Standard Organization) organisation internationale de standardisation  
 NF: Norme Française  
 OCDE: Organisation de Coopération et de Développement Economique  
 OMS: Organisation Mondiale de la Santé  
 SETAC: (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) société de toxicologie et de chimie de l'environnement

### *Autres abréviations*

- DBO5: Demande Biochimique en Oxygène sur 5 jours  
 SEL: Stades Embryo-Larvaires  
 STEP: STation d'EPuration

## Terminologie relative à l'ammoniac

Pour éviter toute confusion, nous utiliserons les termes proposés par Fouchier et al. (1970) dont l'équation d'équilibre est représentée ci-dessous:



NH<sub>3</sub> gazeux ou dissous dans l'eau : ammoniac (m)\*

NH<sub>4</sub><sup>+</sup>: ion ammonium

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + OH<sup>-</sup> ou NH<sub>4</sub>OH: ammoniaque (m) ou eau ammoniacale (f) ou hydroxyde d'ammonium (m)

\* (m): nom masculin; (f): nom féminin

## Espèces de poisson citées

Les espèces de poisson seront désignées uniquement par leur nom vulgaire français mise à part pour le "sheepshead minnow" pour lequel il n'existe pas de traduction française.

Lorsque des espèces aquatiques seront mentionnées alors qu'elles ne font pas partie des poissons, nous indiquerons leur nom vulgaire suivi de leur nom latin entre parenthèses et nous préciserons leur appartenance (e.g. algue, microcrustacé).

milieu	nom français	nom anglais	nom latin
	<i>Salmonidés</i>		
ED, EH	crativomer	lake trout	Salvelinus namaycush
ED, EH	omble chevalier	arctic char	Salvelinus alpinus
AD	saumon de l'Atlantique	atlantic salmon	Salmo salar
ED, EH	saumon de fontaine	brook trout	Salvelinus fontinalis
ED, EH	saumon rosé	pink salmon	Oncorhynchus gorbuscha
ED, EH	truite arc-en-ciel	rainbow trout	Oncorhynchus mykiss
ED, EH	truite de rivière	brown trout	Salmo trutta
ED, EH	truite fardée	cutthroat trout	Salmo clarki
	<i>Cyprinidés et autres familles</i>		
EM	bar d'Amérique	striped bass	Morone saxatilis
ED	barbeau	barbel	Barbus barbus
ED	barbue de rivière	channel catfish	Ictalurus punctatus
ED	black-bass à grande bouche	largemouth bass	Micropterus salmoïdes
ED	black-bass à petite bouche	smallmouth bass	Micropterus dolomieu
ED	brème	bream	Abramis brama
ED	brochet	northern pike	Esox lucius
EM	capucette	atlantic silverside	Menidia menidia
ED	carpe commune	common carp	Cyprinus carpio
EM, ES	choquemort	mummichog	Fundulus heteroclitus
EM	colin de l'Alaska	pollock	Theragra chalcogramma
ED	corégone	whitefish	Coregonus sp.
ED	crapet arlequin	bluegill sunfish	Lepomis macrochirus
ED	danio zébré (poisson zèbre)	zebrafish	Brachydanio rerio
ED, ES	fondule de floride	flagfish	Jordanella floridae

## Espèces de poisson citées (suite)

ED, ES	gambusia	mosquitofish	Gambusia holbrooki
ED	gardon	roach	Rutilus rutilus
ED	goujon	gudgeon	Gobio gobio
ED	guppy	guppy	Poecilia reticulata
EM	hareng	herring	Clupea harengus
ED	killi	killifish	Rivulus marmoratus
ED	loche thermale	bleeker	Lepidocephalichthys termalis
EM	loup	sea bass	Dicentrarchus labrax
ED	ménomini des montagnes	mountain whitefish	Prosopium williamsoni
ED, ES	modaka	japanese medaka	Oryzias latipes
EM	morue	cod	Gadus morhua
ED	ombre commun	grayling	Thymallus thymallus
EM	plie rouge	winter flounder	Pseudopleuronectes americanus
EM	poisson rouge	goldfish	Carassius auratus
EM	ptérois	lion fish	Pterois volitans
EM	rascasse	scorpionfish	Scorpaena guttata
EM	sole anglaise	english sole	Parophris vetulus
ED	tanche	tench	Tinca tinca
ED, ES	tilapia	tilapia	Oreochromis niloticus
ED	vairon tête-de-boule	fathead minnow	Pimephales promelas
ED, ES		sheepshead minnow	Cyprinodon variegatus

AD: anadrome: qualifie un poisson vivant et se nourrissant normalement en milieu marin mais remontant vers les eaux continentales pour y frayer

ED: eau douce

EH: euryhalin: qualifie un poisson qui tolère des variations de salinité de son milieu

EM: eau de mer

ES: eau saumâtre



## Introduction générale

La charte européenne de l'eau adoptée par le conseil de L'Europe en 1968 définit la pollution de l'eau comme "une modification physique, chimique ou biologique, de la qualité de l'eau, provoquée généralement par l'homme, qui la rend impropre ou dangereuse à la consommation humaine, à l'industrie, à l'agriculture, à la pêche, aux loisirs, aux animaux domestiques et à la vie sauvage".

Etant donné l'importance de l'eau dans notre vie, notre intérêt à préserver sa qualité est essentiel. De plus, notre utilisation contradictoire de l'eau, à la fois ressource et vecteur de nos déchets, nous rend responsable de leur impact sur le milieu naturel.

Dès à présent, l'eau de plusieurs cours d'eau du territoire français renferment de telles concentrations en contaminant que leur traitement destiné à produire de l'eau conforme aux critères de potabilité est désormais impossible.

L'apport de micropolluants dans ce milieu est un phénomène permanent dû soit à des sources de contamination ponctuelles plus ou moins épurées (effluents industriels, rejets de stations d'épuration, lixiviats de décharge), soit à des sources plus diffuses telles que les eaux de ruissellement urbains ou agricoles drainant hydrocarbures, métaux lourds, engrais et pesticides. La diversité des éléments toxiques ou eutrophisants qui contaminent le milieu aquatique est susceptible d'affecter gravement les communautés végétales et animales occupant la colonne d'eau ou bien vivant au contact du sédiment. Le souci de préserver cet écosystème a conduit à la mise en place de projets de recherche visant à connaître et à contrôler les apports de contaminants vers le milieu aquatique. Ceci grâce à trois démarches complémentaires: analytique, écotoxicologique et biocénétique orientées sur l'état du biotope et des communautés vivant dans ce milieu ainsi que sur les rejets (composition et toxicité) lorsqu'ils sont identifiés.

Concernant la démarche écotoxicologique, un axe de recherche actuel consiste à étudier des indicateurs d'exposition et/ou d'effets *in situ*. Une autre approche permet d'évaluer la toxicité d'échantillons d'effluent ou de sédiments en condition de laboratoire à l'aide de bioessais.

Depuis les années 80, il est admis sur le plan international que ces essais sont des outils indispensables pour le contrôle de la toxicité de rejets liquides et des travaux d'experts internationaux sous l'égide de l'OCDE ont abouti à la rédaction d'une directive méthodologique à ce sujet (OCDE, 1987). En 1989, l'EPA proposait également des recommandations concernant le contrôle des effluents incluant l'utilisation de bioessais. Par ailleurs, les travaux exposés lors d'un congrès de la SETAC (Workshop on sediment toxicity assessment) en 1993, ont permis de regrouper des protocoles d'essais adaptés à l'estimation de la charge toxique du sédiment; compartiment reconnu pour son pouvoir d'accumulation et de concentration des micropolluants de l'eau circulante.

L'intérêt de ces tests de laboratoire repose sur la possibilité de maîtriser certaines conditions biotiques (espèce, âge, prédation) et abiotiques (photopériode, température, composition physico-chimique des milieux) qui autorisent une standardisation des méthodes et donc une comparaison des résultats obtenus sur différentes espèces et par plusieurs laboratoires. Leur caractère évidemment réducteur peut être amélioré par l'exploitation des informations apportées par une batterie d'essais regroupant des organismes représentatifs de différents niveaux trophiques.

Ces essais se caractérisent aussi par l'échelle de temps durant laquelle l'impact d'un échantillon est observé et par le type de perturbation suivi; ces deux paramètres ayant une incidence sur la signification des résultats en terme de pérennité des populations concernées. Ainsi certains tests visent à déterminer les effets à court terme d'un effluent ou d'un sédiment (e.g. activité bioluminescente bactérienne, survie d'une espèce de microcrustacé ou de poisson), d'autres s'intéressent à des effets sublétaux à plus long terme (e.g. croissance algale, croissance ou reproduction de poissons) ou bien des effets spécifiques (e.g. mutagenèse ou tératogenèse).

Dans le cadre des essais de toxicité sublétaux appliqués aux poissons, cette étude s'est intéressée aux réponses apportées par les stades embryo-larvaires du danio zébré (*Brachydanio rerio*). Ce type d'essai a été proposé par McKim (1977), Macek et Sleigh (1977) pour la prédiction de la toxicité chronique de polluants; celle-ci étant déterminée précisément par des essais sur cycle de vie complet donc plus long et plus coûteux à réaliser.

La sensibilité particulièrement élevée des premiers stades de vie de poissons (e.g. la truite arc-en-ciel, le crapet arlequin, le danio zébré et le vairon tête-de-boule) a ainsi conduit à de nombreux travaux visant à apprécier la toxicité sublétaux de métaux lourds, de substances organiques, d'effluents et de sédiments. Il existe un éventail important de protocoles adaptés à ces différents échantillons et pour différentes espèces; ces méthodologies ne préconisant pas toujours le même stade embryonnaire pour l'initiation des essais et les mêmes critères à exploiter sur des durées également différentes.

Sur le modèle du danio zébré, nous avons voulu optimiser la sensibilité de notre essai embryo-larvaire par une amélioration de notre protocole et par la connaissance de ses tolérances à des paramètres physico-chimiques de l'eau (e.g. pH, oxygène dissous). Ces travaux ont alors permis la réalisation d'essais sur plusieurs effluents et sédiments en sachant apprécier la contribution de certains constituants des échantillons comme l'ammoniac aux effets observés.

La première partie de ce travail est destinée à présenter le contexte de l'étude. Après avoir présenté les bioessais portant sur les poissons, il sera fait une description plus précise des essais embryo-larvaires et de la pertinence des critères de toxicité exploitables. Dans une optique méthodologique, nous aborderons ensuite les facteurs biotiques et abiotiques susceptibles de compromettre la validité des résultats apportés par ces bioessais. Un

prolongement de cette approche consistera à évoquer les amplitudes de plusieurs paramètres physico-chimiques de l'eau tolérées par les poissons et plus particulièrement par leurs stades embryo-larvaires. Nous ferons alors une présentation de notre modèle: le danio zébré en précisant les arguments qui justifient son choix sur le plan pratique et au niveau de sa sensibilité comparée à d'autres espèces.

La suite de l'exposé présentera les caractéristiques principales de deux types d'échantillons: effluents et sédiments ainsi que les méthodes adaptées à l'évaluation de leur toxicité. La composition de certains effluents nous amènera également à nous intéresser aux effets d'un détergent anioniques et de substances tératogènes sur les stades embryo-larvaires de poissons. Pour finir, il sera fait une courte description de la technique d'analyse d'images qui sera utilisée pour le suivi de nos essais et en particulier pour la mesure de la taille des larves au terme des essais embryo-larvaires.

La partie expérimentale débutera par une description détaillée du protocole de l'essai embryolarvaire sur le danio zébré ainsi qu'un certain nombre d'améliorations que nous avons pu y apporter concernant l'initiation des essais et le protocole de nourrissage. Le suivi de ce test grâce à l'analyse d'images sera ensuite présenté après vérification de la fiabilité de notre matériel. Nous définirons à cette occasion la précision de nos mesures dimensionnelles ainsi que les traitements d'images que nous devons éviter étant donné la configuration des différents éléments de notre matériel. Les applications de cette technique au niveau du comptage, de la mensuration des larves et de la détection de malformations seront ensuite présentées. Nous aurons également l'occasion de discuter de l'avantage respectif des mesures de taille et de surface comme mesure indirecte de la biomasse.

La suite de notre exposé concerne les résultats obtenus lors d'une série d'essais destinés à déterminer les domaines de tolérance des stades embryo-larvaires du danio zébré à différents paramètres physico-chimiques de leur milieu. La connaissance de ces limites permettra la réalisation d'essai sur des échantillons d'effluents et de sédiments en sachant évaluer leur contribution aux effets (sub)létaux observés. L'ensemble des essais embryolarvaires réalisés sur ces échantillons complexes permettra de dégager un certain nombre de précautions méthodologiques indispensables à l'évaluation de leur toxicité. Par ailleurs, parmi les micropolluants identifiés dans les échantillons d'effluents urbains, la présence d'un détergent anionique en forte concentration et d'un phtalate (substance tératogène) nous conduira à vérifier leurs effets spécifiques.

La sensibilité de notre modèle sera évaluée par comparaison des résultats apportés par des organismes d'essai de différents niveaux trophiques.

Enfin, nous analyserons l'homogénéité de croissance des larves témoins ainsi que la contribution de ce critère de toxicité à la sensibilité globale de l'essai embryolarvaire.

La conclusion sera l'occasion de dresser un bilan de notre travail en évaluant la pertinence de notre bioessai pour l'estimation de la toxicité d'effluents ou de sédiments. Nous jugerons également les gains de sensibilité, d'information et de temps apportés par l'analyse d'images.

## **A - partie bibliographique**

### **1- Les essais embryo-larvaires sur les poissons**

#### **1.1- Introduction**

Les poissons représentent un modèle de choix pour les essais écotoxicologiques sur le milieu aquatique.

Leur degré de complexité important, leur appartenance aux vertébrés et la maîtrise de l'élevage de nombreuses espèces ont motivé leur utilisation.

Le chapitre suivant va présenter l'éventail des protocoles (standardisés ou non) portant sur les poissons et plus particulièrement ceux mettant à profit la forte sensibilité aux toxiques de leurs stades embryonnaires et larvaires.

#### **1.2- Les essais de toxicité existant sur les poissons**

Le modèle "poisson" fait l'objet d'un grand nombre de méthodes de test de toxicité aiguë (court terme), sublétale (moyen terme) ou chronique (long terme) dont il est important de distinguer les caractéristiques et les objectifs.

##### **1.2.1- Les essais de toxicité aiguë**

Ils se caractérisent par des expositions courtes à des concentrations en toxiques élevées. Le critère de toxicité est la survie des organismes adultes exprimée sous forme d'une Concentration Létale touchant un pourcentage d'individus testés sur une durée déterminée; la CL50(96h.) par exemple. Ces méthodes permettent d'apprécier rapidement le potentiel toxique d'une substance sans apporter d'information sur son mode d'action et avec une représentativité écologique très faible. Dans le cas de rejets de substances ou d'effluents dans le milieu aquatique, les niveaux de toxicité sont généralement sublétaux mais affectent la biocénose de façon continue. Néanmoins, ces essais (rapides et peu coûteux) sont demandés dans les dossiers de notification de substances nouvelles et peuvent, par ailleurs, orienter le choix des concentrations pour les essais sublétaux ou chroniques.

##### **1.2.2- Les essais de toxicité sublétale et chronique**

Les variables "concentration en toxique" et "durée d'exposition" sont prises en compte lors de ces essais de manière à se rapprocher des conditions environnementales (exposition à de faibles concentrations et sur toutes les étapes de l'ontogenèse, voire sur plusieurs générations) et pour appréhender la nature et les conséquences des perturbations induites. La mise en évidence d'effets non-létaux tels qu'une inhibition de croissance ou de la reproduction peut signifier un risque pour la pérennité de l'espèce étudiée. Des observations histologiques ou comportementales permettent également de préciser les cibles (organes, système nerveux) des produits analysés. Une distinction est faite entre les essais de toxicité chronique qui consistent

en une exposition des poissons sur un cycle de vie complet: de l'embryon à la prolarve de la génération suivante (Mount et Stephan, 1967; Rand et Petrocelli, 1985) et les essais de toxicité sublétale comme l'illustre la figure 1.

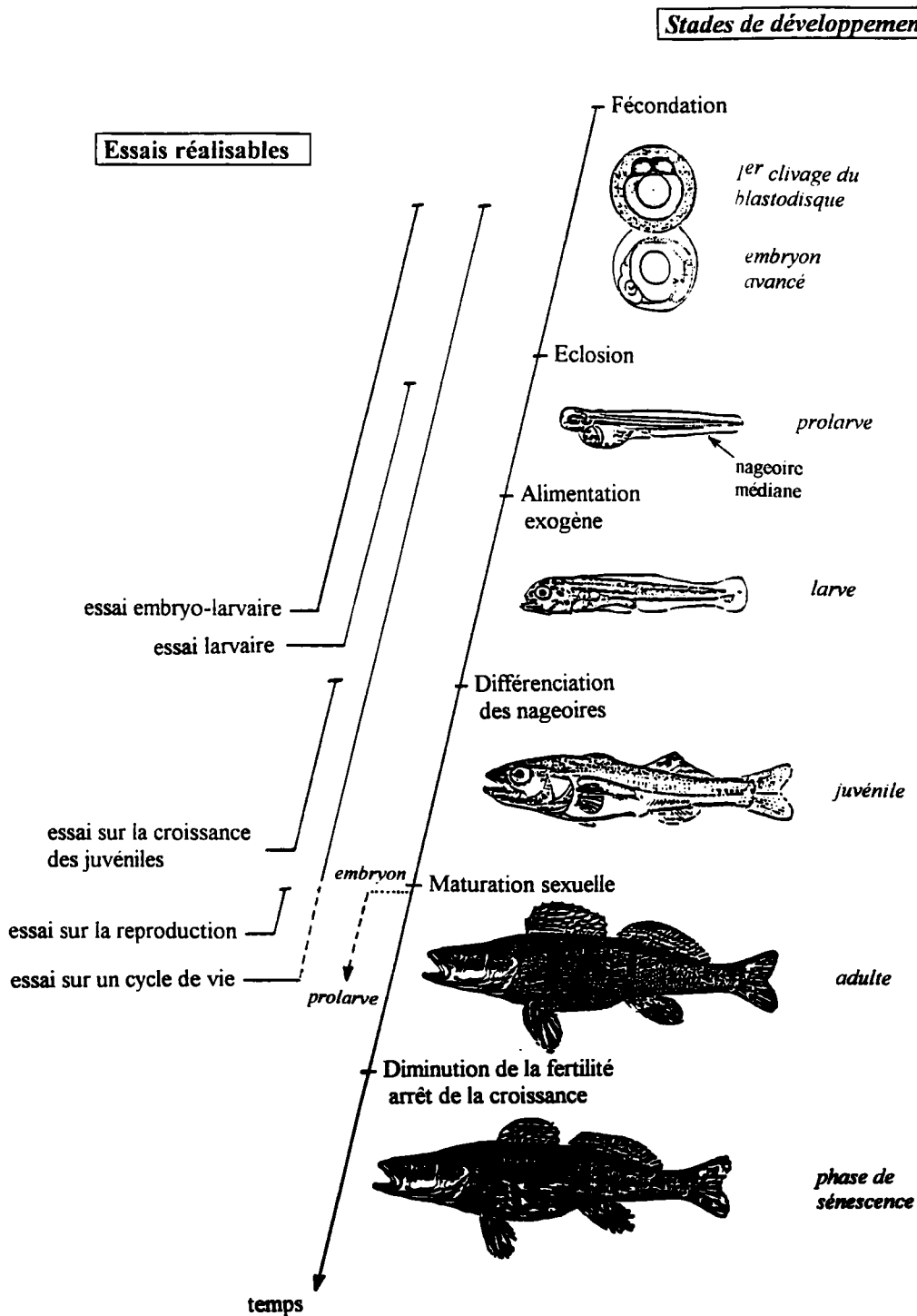


Figure 1: Phases de développement des poissons et programmation des différents essais (l'échelle de temps ne tient pas compte de la durée réelle des différentes phases et l'échelle dimensionnelle est différente selon le stade de développement)

Les essais sur cycle de vie permettent une prise en compte des critères d'éclosion, de croissance, de survie et de succès de reproduction (âge de première ponte, nombre d'oeufs pondus, taux d'éclosion et survie des prolarves).

Les essais sublétaux couvrent, pour leur part, des phases précises du cycle de vie en évaluant la toxicité de substances à l'aide des critères suivants:

- l'éclosion des embryons, la croissance et la survie des larves (norme ISO, 1988; méthode standard EPA, 1989; directive OCDE n°210, 1992; méthode standard Environnement Canada, 1992a),
- la survie et la croissance des larves (méthode standard EPA, 1989; méthode standard Environnement Canada, 1992b),
- la croissance des poissons juvéniles en 14 jours (directive OCDE n°204, 1984),
- le délai de maturation et le succès de la reproduction (Bresh, 1982; Dalverny, 1993).

Malgré la meilleure pertinence écologique des essais chroniques, leur durée (et donc leur coût) a motivé la mise au point d'essais de substitution sublétaux dotés d'un meilleur rapport "informations apportées" / "durée" (Dalverny, 1993). Il faut en effet compter respectivement 7 et 29 mois pour réaliser un essai sur un cycle de vie du danio zébré et du saumon de fontaine. Il est également possible d'associer les informations d'essais sublétaux portant sur les stades embryo-larvaires et la reproduction par exemple. Plusieurs auteurs préconisent cette combinaison pour tirer profit de la forte sensibilité de ces deux phases du cycle de vie (Bresh, 1982; Landner et al., 1985; Mayer et al., 1986; Dalverny, 1993). De plus, les informations apportées permettent de calculer le taux intrinsèque d'accroissement qui régit la dynamique d'une population en se basant sur les probabilités de reproduction et de survie des individus (Lotka, 1913; Wong, 1990). Cette méthode nécessite cependant quatre mois d'essai sur le danio zébré et n'est par exemple pas applicable aisément pour l'évaluation de la toxicité sublétale d'effluents étant donné les contraintes liées à un tel essai (e.g. volumes d'échantillon nécessaires, conservation). Le chapitre A.1.3 précisera les avantages et inconvénients des essais embryo-larvaires ainsi que leur pertinence écologique.

### **1.2.3- Terminologie relative aux différentes phases de vie des poissons**

Il est important de préciser la signification des termes relatifs à l'embryogenèse et à l'ontogenèse des poissons ovipares selon les définitions données par Balon en 1975.

La phase embryonnaire commence au moment de la fécondation de l'oeuf. Elle est caractérisée par une nutrition (endogène) de l'embryon à partir du vitellus et se répartit en trois sous-phases:

- la phase de clivage recouvre le début du développement embryonnaire ainsi que les stades blastula et gastrula jusqu'au début de l'organogenèse,

- la phase embryonnaire commence lorsque l'organogenèse est initiée et s'arrête une fois l'éclosion achevée,
- la phase éleuthéroembryonnaire (du grec eleutheros: libre) prend effet après l'éclosion et dure jusqu'à la fin de la résorption de la vésicule vitelline et le début de l'alimentation exogène.

La phase larvaire débute au moment de la transition à l'alimentation exogène et se termine après l'ossification de la colonne vertébrale et la disparition de la nageoire médiane. Elle se divise en 2 sous-phases:

- la phase de la protoptérygiolarve débute au moment de la transition à l'alimentation exogène et se termine au commencement de la différenciation de la nageoire médiane embryonnaire,
- la phase de la ptérygiolarve (ou alevin) commence au début de la différenciation des nageoires impaires jusqu'à ce que la nageoire médiane embryonnaire ne soit plus visible.

La période juvénile débute lorsque les nageoires sont complètement différenciées et que les organes embryonnaires sont remplacés par des organes définitifs. Le poisson se couvre progressivement d'écailles.

La phase adulte débute lors de la première maturation des gamètes qui s'accompagne du comportement de ponte. Le taux de croissance, continu jusqu'à ce stade, diminue de plus en plus jusqu'à l'entrée en phase de sénescence. Celle-ci correspond à l'arrêt de la croissance et une diminution progressive des performance de reproduction (quantité et qualité des gamètes produits).

Pour les stades qui concernent les essais embryo-larvaires, cette terminologie, bien que très précise, est fastidieuse à utiliser. De plus, l'utilisation du terme "éleuthéroembryon" peut porter à confusion car on associe généralement l'embryon à une phase encapsulée. Ainsi en accord avec Boudry (1991), nous utiliserons toujours les termes suivants:

- embryon: de la fécondation jusqu'à l'éclosion en précisant les stades embryonnaires lorsque cela est nécessaire (0-4 jrs.),
- prolarve: de l'éclosion jusqu'à ce que la vésicule vitelline soit résorbée (4-7 jrs.),
- larve: de la transition à l'alimentation exogène jusqu'à la différenciation des nageoires (7-20 jrs.).

Les chiffres entre parenthèse représentent la durée des phases de développement du danio zébré dont il sera question plus loin dans le texte.

Notons que l'âge des prolarves et des larves sera toujours exprimé en jours à partir de la fécondation et non en âge post-éclosion. En effet, comme nous le verrons, le moment de l'éclosion ne correspond pas à un stade précis du développement.



### 1.3- Place des essais sur les Stades Embryo-Larvaires (SEL)

Les essais sur les premiers stades de vie ont été proposés par différents auteurs comme alternatives acceptables aux essais sur cycle de vie après avoir mis en évidence la forte sensibilité de cette phase de vie des poissons à la contamination de leur milieu (Macek et Sleigh, 1977; Woltering, 1984). Ces essais consistent à exposer le modèle de poisson choisi depuis le stade embryonnaire jusqu'à la phase larvaire ou juvénile. Les observations portent sur le développement des embryons, l'éclosion, la survie et la croissance des larves et des juvéniles ainsi que sur l'apparition de malformations; critères qui seront détaillés au § A.1.4.3. En terme de sensibilité, une étude basée sur 72 essais portant sur 37 substances inorganiques et 4 espèces de poisson d'eau douce montre que pour 83% des essais, les premiers stades de vie fournissent des Concentrations Minimales avec Effet Observé (CMEO) dans un rapport inférieur ou égal à 2 comparées aux CMEO relevées au terme des essais sur cycle de vie complet (McKim, 1977). De plus, Macek et Sleigh (1977) concluent que ces essais présentent la même sensibilité que les essais sur cycle de vie pour des substances sans effet cumulatif et avec un mode d'action direct de type "narcotique". L'effet de narcose est considéré comme un effet physiologique réversible et non spécifique, indépendant d'une structure chimique particulière. Il correspond à une inhibition de l'activité nerveuse et respiratoire. Cet effet peut être observé avec divers types de substances: hydrocarbures (aromatiques, aliphatiques ou chlorés), alcools, éthers, cétones, aldéhydes et quelques composés nitrés aliphatiques (Veith et Call, 1984 cités par Kristensen, 1990).

Pour d'autres auteurs, la reproduction des poissons est perturbée à des teneurs en toxiques bien inférieures à celles qui affectent les stades embryo-larvaires sur des critères de survie et de croissance (Mount et al., 1967; Spehar, 1967; Benoit, 1976; Pickering, 1980; Mayer et al., 1986; Suter et al., 1987). Pour le dernier auteur cité, le désaccord avec McKim est vraisemblablement lié aux méthodes d'exploitation des résultats. En effet, Suter et al. (1987) ont comparé des niveaux d'inhibition et non pas des CMEO déterminées par des tests statistiques. Etant donné que les critères d'âge de première ponte et de quantité d'oeufs produite présentent une forte variabilité au sein d'un même lot de géniteurs, les niveaux d'inhibition significatifs sont attribués à des concentrations en toxique plus élevées.

Malgré la mise en oeuvre plus longue et difficile des essais sur cycle de vie partiel incluant la reproduction, il est certain que cette phase est déterminante pour la dynamique des populations. De plus, un transfert de contaminants lipophiles des géniteurs aux gamètes peut conditionner l'ampleur et la nature des effets observés lors du développement embryo-larvaire de leur progéniture. En effet, la constitution du vitellus (riche en lipides) est une étape pendant laquelle des polluants hydrophobes (e.g. pesticides, hydrocarbures polycycliques ou aliphatiques) seraient transférés du géniteur femelle aux gamètes liés à des lipoprotéines (Mommsen et Walsh, 1988). Ce transfert simultané de réserves lipidiques et de contaminants lipophiles des tissus du poisson femelle vers ses ovocytes lors de l'ovogenèse a été vérifié par

plusieurs auteurs après dosages de PCBs dans différents tissus de poissons matures prélevés dans le milieu naturel (Hansen, 1985; Vodick et Peterson, 1985). Ainsi, dans le cas de contaminants organiques (pesticides et PCBs), l'embryon serait contaminé en utilisant les réserves vitellines au cours de son développement et il en résulterait des mortalités embryonnaires et larvaires (Von Westernhagen et al., 1989; Hansen, 1985; Westin et al., 1983, Victor et al., 1986; Chen et al., 1986), l'apparition de malformations (Holdway et Dixon, 1986) et une fragilisation des phases larvaires et juvéniles vis-à-vis des contaminations de leur milieu (Landner et al., 1985). Cet auteur indique que l'exposition des géniteurs mâles contribue aussi à augmenter la sensibilité larvaire.

Après une série d'essais conduite au laboratoire sur les cycles de vie de quatre espèces exposées à 34 composés organiques et inorganiques, McKim (1977) n'avait pas observé ces tendances, indiquant que les différences de sensibilité des stades embryo-larvaires étaient dans la plupart des cas inférieures à un facteur de 2 que les embryons proviennent de géniteurs déjà exposés à la substance testée ou non.

Bien que les essais SEL ne recouvrent qu'une des phases critiques du cycle de vie, les informations qu'ils apportent permettent une évaluation satisfaisante de la toxicité chronique de substances ou d'effluents (Norberg-King, 1989). La phase embryo-larvaire recouvre, en effet, des étapes déterminantes du développement que sont: l'éclosion, les transitions à la respiration branchiale et à l'alimentation exogène en plus d'une métamorphose continue (Blaxter, 1988). Une étude de Birge et al. (1989) a permis d'établir la pertinence écologique de tests embryo-larvaires de huit jours sur le vairon tête-de-boule. En parallèle à cet essai de laboratoire réalisé sur un effluent urbain prélevé en continu, une analyse hydrobiologique, portant sur les populations de macro-invertébrés *in situ*, a été effectuée en plusieurs points à l'aval du rejet de la station d'épuration étudiée. Les résultats ont montré une bonne corrélation entre le critère de "survie" des essais embryo-larvaires et les variables écologiques relatives au peuplement de macro-invertébrés. De plus, les auteurs ont montré que la concentration d'effluent estimée sans effet (ou valeur chronique VCh) calculée au terme des essais SEL correspond étroitement (36,9 contre 33%) avec la concentration réelle d'effluent du premier point en aval du rejet où aucune perturbation significative de la communauté d'invertébrés n'a été décelée.

A ce stade de la présentation des essais embryo-larvaires, il est important de préciser en détail les différentes méthodologies proposées dans la littérature.

## **1.4- Présentation des essais embryo-larvaires**

### **1.4.1- Introduction**

Les essais sur les premiers stades de vie de poissons consistent en une exposition de l'oeuf (récemment fécondé) jusqu'au stade larvaire voire juvénile.

Plusieurs protocoles existent pour ces essais et se distinguent par les stades de début et de fin d'exposition, les critères de toxicité relevés et par le choix des espèces. Une méthodologie proposée par Dave et al. (1987) et standardisée par la suite (ISO, 1988) prévoit un essai de 15 jours sur le danio zébré, sans apport de nourriture, qui couvre le début de la phase embryonnaire (entre 2h. et 4h. post-fécondation) jusqu'à la mort des larves après épuisement de leur réserve énergétique. Les critères exploités sont l'éclosion, la survie et la croissance larvaire. Toujours sur le danio zébré, Balk (1988) a proposé un essai raccourci, d'une durée de huit jours, sans apport de nourriture également. Cependant, des études réalisées par Garric et al. (1990a) ont montré que la sensibilité de cet essai peut être améliorée par un apport de nourriture qui permet, en particulier, l'observation de différences de croissance plus marquées. De plus, le passage de l'alimentation endogène à une alimentation exogène peut constituer une nouvelle voie de contamination (Rosenthal et Alderdice, 1976).

Par ailleurs, le taux de mortalité larvaire est parfois un critère de toxicité plus sensible que le taux de mortalité durant les premiers jours qui suivent l'éclosion (Birge et al., 1985). Ces observations ainsi que l'existence d'effets toxiques différés incitent à prolonger les essais au delà de la phase d'alimentation endogène. De la même manière, la directive de l'OCDE (1992) recommandent de poursuivre les essais jusqu'au stade juvénile soit 32 jours (post-fécondation) pour des cyprinidés (e.g. danio zébré, vairon tête-de-boule) et 60 jours pour les salmonidés pour tenir compte des vitesses relatives de développement. D'autres auteurs proposent au contraire de restreindre les essais à une exposition courte des (pro)larves sur sept jours (avec nourrissage) pour une évaluation rapide et moins coûteuse des effets sublétaux d'effluents notamment (Norberg et Mount, 1985; Norberg-king, 1989). Ces travaux ont conduit à l'établissement d'une méthode standard EPA (1989) axée sur la mesure de la survie et de la croissance de larves de vairon tête-de-boule. Un autre essai fait l'objet d'un protocole standard EPA (1989) orienté sur la survie des embryons et des prolarves ainsi que sur l'apparition de malformations sur une durée de sept jours et sans nourrissage. Le fait d'exclure la phase embryonnaire ou larvaire des périodes d'exposition ne paraît cependant pas à même de garantir une sensibilité optimale de ces essais; un approfondissement de cette question sera fait au chapitre A.1.4.3.

### **1.4.2- Les espèces utilisées**

Les recommandations concernant le choix des espèces pour la réalisation des essais SEL tiennent compte des connaissances acquises sur la sensibilité de ces espèces à divers types de contaminants, de leur représentativité écologique et de la maîtrise technique de leur reproduction. Les espèces proposées par l'OCDE (directive 210, 1992) regroupent des poissons d'eau de mer (e.g. "sheepshead minnow", capucette) et des poissons d'eau douce parmi lesquels on compte des représentants des eaux "froides" (e.g. truite arc-en-ciel, saumon de fontaine) et des eaux "chaudes" (e.g. danio zébré, vairon tête-de-boule, modaka, carpe commune). Pour les essais réalisés aux Etats-Unis, il est certain que la truite arc-en-ciel ou le vairon tête-de-boule possèdent une forte représentativité car ce sont des espèces endémiques. Dans les pays européens par contre, à défaut d'espèces endémiques recommandées pour ces essais, une espèce exotique: le danio zébré et une espèce introduite: la carpe commune sont surtout utilisées. L'extrapolation des résultats d'un essai conduit sur une espèce d'eau "chaude" à l'impact de la substance étudiée dans les eaux continentales de régions à climat tempéré n'est de ce fait pas aisée. Elle nécessite des précautions importantes concernant les populations de poisson en place et les facteurs biologiques (e.g. cinétique de biodégradation) et physiques (e.g. solubilité) qui peuvent y intervenir. Ces facteurs de modulation de la toxicité seront abordés dans le § A.2.

### **1.4.3- Description des critères de toxicité**

La manifestation des atteintes à l'intégrité des organismes peut s'exprimer par un effet ultime: la mortalité embryonnaire ou larvaire ou bien par des effets sublétaux: perturbation du développement (croissance ou malformation) ou de leur comportement.

A l'inverse de l'adulte, les voies de pénétration des xénobiotiques ainsi que leur cinétique évoluent au cours du développement embryo-larvaire avec le passage de l'état de cellules embryonnaires indifférenciées à celui d'un organisme complexe (Lefebvre, 1990).

De plus, l'impact de ces contaminants est tributaire de leur devenir dans l'organisme (accumulation, élimination ou activation par métabolisation). Les paragraphes qui suivent vont s'attacher à décrire les critères de toxicité des essais SEL ainsi que leur sensibilité.

#### **1.4.3.1- La survie embryonnaire**

Après la fécondation de l'ovocyte, la membrane chorionique va être momentanément semi-perméable. La formation du liquide périvitellin va nécessiter, en effet, une hydratation à partir du milieu environnant et des contaminants dissous pourront être entraînés lors de ce flux d'eau (Longwell, 1977; Gillet et al., 1983, Heath, 1987). Cette étape sera suivie d'un processus enzymatique d'imperméabilisation du chorion faisant intervenir du calcium (Environnement Canada, 1992b). Par la suite, une perméabilité du chorion aux gaz dissous et à certains ions demeure afin d'assurer les fonctions de respiration et d'osmorégulation de l'embryon

(Alderdice, 1988). Certaines molécules lipophiles pourraient également franchir la membrane de l'oeuf par un mécanisme de transfert passif (Helmstetter et Alden, 1995) alors que les contaminants inorganiques (e.g. métaux lourds) ne pourraient plus pénétrer dans l'oeuf après l'étape d'imperméabilisation du chorion (Rosenthal et Alderdice, 1976); phénomène que Fu et al. (1990) attribuent à leur complexation aux groupements sulfidryl (-SH) des protéines du chorion.

La cinétique de contamination de l'oeuf de carpe par une substance très lipophile comme la deltaméthrine (pesticide pyréthrianoïde) a ainsi été mise en évidence par Lefebvre (1990). Cet auteur observe une forte accumulation de cette molécule juste après la fécondation puis une stabilisation de la cinétique d'accumulation durant le reste de la phase embryonnaire. De plus, il s'avère que les annexes péri-embryonnaires (chorion, liquide périvitellin) retiennent sur une longue période des quantités importantes de déltaméthrine et que cet effet de réservoir pourrait se traduire par des effets toxiques différés au cours du développement embryonnaire.

Dans le cas de l'exposition d'embryons de vairon tête-de-boule au zinc, Benoit et Holcombe (1978) ont observé une sensibilité particulière lorsque l'exposition commence avant le processus d'imperméabilisation du chorion qui intervient entre 30 et 60 min. après la fécondation.

De la même façon, les premières étapes du développement (de la fécondation à la fin de l'épibolie) ont été identifiées comme étant particulièrement sensibles à plusieurs types de perturbations physico-chimiques du milieu: choc de pH (Gillet et Roubaud, 1983), choc froid (Jaoul et Roubaud, 1982), contamination par des hydrocarbures aliphatiques, aromatiques et des organométaux (Von Westernhagen, 1988; Heath, 1987). Selon Hisaoka (1958) et Laale (1977), c'est au moment du premier clivage que l'embryon encapsulé est le plus sensible. Ces observations justifient les recommandations de l'OCDE (1992) qui préconisent de débiter l'exposition à la substance étudiée dès que possible après la fécondation et si possible avant la première division du blastodisque.

Bien que ne précisant pas le stade de développement des embryons au début des essais, Kristensen (1990) conclut au terme d'un grand nombre d'essai SEL sur des substances organiques et métalliques portant sur plusieurs espèces que la phase embryonnaire contribue dans une faible proportion à la sensibilité globale des essais. Il recommande pourtant d'inclure cette phase dans les essais de manière à déceler les effets d'éventuelles substances tératogènes. Comme il a déjà été évoqué au § A.1.4.1, d'autres auteurs travaillant sur le vairon tête-de-boule ont décidé de restreindre l'essai à une exposition des prolarves. L'exposition préalable des embryons n'apportant pas de gain de sensibilité à l'essai en terme de survie (Pickering, 1988; Norberg-King et al., 1989). Cependant, leur protocole d'essais embryo-larvaire prévoyait une initiation des essais avec des oeufs de moins de 36h. compte tenu de l'étalement des pontes de cette espèce. Il est donc permis de remettre en cause leur conclusion car ce sont

les premières étapes de l'embryogenèse qui ont été identifiées comme particulièrement sensibles aux stress physico-chimiques du milieu d'incubation (Von Westernhagen, 1988).

De plus, une exposition n'entraînant pas d'effets toxiques sur les embryons peut cependant augmenter leur sensibilité aux stades ultérieurs comme il a déjà été signalé. Ainsi, l'exposition d'embryons de fondules de Floride âgés de 24h. au méthoxychlore, réduit la tolérance des larves à ce même produit. Par contre, l'exposition d'embryons de trois jours n'a pas d'impact sur la tolérance des larves (Holdway et Dixon, 1986). Les auteurs attribuent cette différence de tolérance larvaire à des mécanismes de protection se situant au niveau du chorion chez les oeufs de trois jours. Ces différences de sensibilité selon le stade de développement exposé laissent supposer l'existence de phases "d'exposition critique".

Néanmoins, sur la phase avancée de l'embryogenèse et pour des substances lipophiles tel que le Benzo(a)pyrène, Kocan et Landolt (1984) ont montré que la perméabilité des embryons de truite arc-en-ciel exposés à une même concentration est d'autant plus élevée que le stade de développement est avancé; le stade pré-éclos présentant une absorption 2 à 10 fois plus grande que celle du stade préblastula. De même, sur des embryons de danio zébré, Bresch (1982) a constaté que l'incorporation de thymidine (marquée au tritium) est mesurable avec des embryons âgés de 20h. (post-fécondation) et absente pour des embryons âgés de 10h. La cinétique de pénétration des molécules organiques pourrait donc dépendre de leur nature chimique.

Ces résultats indiquent l'existence de phases d'accumulation et de sensibilité particulière au cours du développement embryonnaire et soulignent l'importance d'inclure la phase embryonnaire et notamment les premières étapes du développement dans la période d'exposition des essais SEL.

#### **1.4.3.2- L'éclosion**

Les chances d'éclosion des embryons sont conditionnées par les perturbations subies au cours de la phase encapsulée ou la libération insuffisante de chorionase (enzyme chargée de lyser le chorion) traduisant un dysfonctionnement des glandes émettrices (Lefebvre, 1990) ou bien encore par l'inhibition de l'activité catalytique de cette enzyme par des conditions ambiantes acides (Heath, 1987). L'éclosion peut également être compromise par une insuffisance de contractions musculaires contribuant à la rupture du chorion; une perturbation du métabolisme énergétique de l'embryon pourrait en être responsable (Dave et Xiu, 1991).

Les retards ou anticipations d'éclosion par rapport à la durée "normale" de l'embryogenèse traduisent une atteinte de l'embryon (Von Westernhagen, 1988) mais sont difficilement exploitables comme critère de toxicité car le processus d'éclosion ne correspond pas à un stade précis du développement embryonnaire (Bremiller et al., 1993; Balon, 1985; Laale, 1977).

Il est plutôt recommandé de surveiller le taux d'éclosion, la survie et la croissance des larves; critères qui sont connus pour intégrer les atteintes de la phase embryonnaire (Benoit et al., 1982).

### 1.4.3.3- La survie larvaire

Juste après l'éclosion, la prolarve apparaît particulièrement sensible à la présence de toxique du fait de la disparition de la protection apportée par le chorion et le liquide périvitellin, bien que dans certain cas ceux-ci contribuent à sensibiliser l'embryon par rétention des contaminants (Lefebvre, 1990). En effet, cette forte sensibilité des prolarves peut résulter d'une perturbation non létale durant l'embryogenèse dont les effets ne se manifestent qu'après l'éclosion (Holdway et Dixon, 1986) ou bien d'une accumulation du toxique dans l'embryon avant l'apparition de la cible physiologique (Lefebvre, 1990).

Un autre phénomène qui peut intervenir simultanément correspond à l'entrée en fonction des activités de biotransformation. En effet, les xénobiotiques qui pénètrent dans l'organisme sont pris en charge dans la majorité des cas par des systèmes enzymatiques en cascade qui conduisent le plus souvent à une atténuation de leurs effets toxiques. Cette métabolisation transforme généralement les molécules en les rendant plus hydrosolubles. Cependant, certaines substances peuvent être dégradées en dérivés plus toxiques que la substance initiale (précurseur inactif). Ce dernier cas a été vérifié par Ansari et Kumar (1984) lors de l'exposition d'embryons et de prolarves de danio zébré au malathion (pesticide organophosphoré). Seules les prolarves présentent une forte sensibilité à ce pesticide. Ceci serait lié à l'acquisition de la capacité à métaboliser le malathion à ce stade et c'est précisément le métabolite qui est neurotoxique.

La mise en place de ce processus de détoxification est progressive au cours du développement embryonnaire comme l'a montré Boudry (1991) sur l'omble chevalier, le corégone et l'ombre commun. L'augmentation d'une activité enzymatique de biotransformation (éthoxyrésorufino-o-dééthylase) a été mesurée à la fin de la phase embryonnaire et montre un maximum d'activité catalytique juste après l'éclosion. Il s'agit là de la synthèse constitutive de cette enzyme sans intervention de contaminants inducteurs. Dans le cas d'une exposition à un PCB (polychlorobiphényle), l'induction d'une autre enzyme de détoxification (aryl hydrocarbène hydroxylase) chez des embryons de saumon de fontaine et de choquemort s'est révélée particulièrement élevée au moment de l'éclosion (Binder et Stegeman, 1983). D'après Boudry (1991), ces augmentations de capacité métabolique correspondent plus à une réelle acquisition de la capacité de synthèse des enzymes de détoxification à ce stade, plutôt qu'à une contamination plus importante de la prolarve après disparition de la membrane chorionique.

Notons que l'exposition d'embryons aux premiers stades de développement à de faibles concentrations en métaux lourds diminuerait leur sensibilité après l'éclosion. L'induction de

protéines séquestrantes (métallothionéines) pourrait être à l'origine de ces observations (Heath, 1987).

L'étape suivante constituée par le passage de l'alimentation endogène à une alimentation exogène est également une période du développement critique en terme de transition enzymatique et de ressource énergétique, d'autant plus qu'elle peut constituer une nouvelle voie de contamination des organismes (Rosenthal et Alderdice, 1976; Van Leeuwen et al., 1985; Dalverny, 1993).

Les observations faites au terme des essais SEL indiquent que le critère de survie des larves est souvent plus sensible que la survie des embryons, des juvéniles et des adultes (Eaton et al., 1978). De plus, lors d'une série de 34 tests de toxicité chronique sur 28 produits et sept espèces réalisée par Mayer et al. (1986), il a été montré que la survie était de sensibilité égale ou supérieure aux autres critères de toxicité (croissance, reproduction) pour 63% des essais.

L'analyse d'un nombre important d'essais SEL sur le vairon tête-de-boule a montré que les mortalités larvaires apparaissent dans la majorité des cas dans l'espace d'une semaine après l'éclosion (Hughes et al., 1989). Ces auteurs considèrent par ailleurs que la mesure de ce paramètre nécessite un minimum d'effort et apparaît comme un bon outil pour l'estimation de la toxicité à long terme.

#### **1.4.3.4- La croissance**

En général, la modification de croissance consécutive à une exposition aux polluants, va dans le sens d'une diminution qui traduit des troubles physiologiques (e.g. assimilation, répartition énergétique) ou biochimiques (e.g. inhibition de la synthèse d'ATP) pouvant s'accompagner d'une baisse de capacité motrice et d'un retard d'acquisition de la maturité sexuelle. La dynamique des populations affectées peut donc être gravement bouleversée (Woltering, 1984). Chez la truite arc-en-ciel par exemple, Chapman et Shumway (1978) ont constaté une inhibition dose-dépendante de la croissance des larves exposées au pentachlorophénate de sodium depuis le stade embryonnaire. Cette substance perturberait le métabolisme énergétique des organismes par découplage des enzymes mitochondriales assurant la phosphorylation oxydative (Kristensen, 1990). Un retard de l'âge de première ponte a également été mis en évidence lors d'expositions prolongées de danios zébrés depuis le stade embryonnaire à des concentrations de chrome et de cadmium induisant une inhibition de croissance (Dalverny, 1993). Lors de cette étude, une inhibition de la croissance des larves a d'ailleurs été mesurée à des concentrations qui n'affectent pas la survie (cf. tableau 1). Le mécanisme biochimique par lequel l'ion cadmium ( $Cd^{2+}$ ) affecte le fonctionnement cellulaire consisterait en une inhibition compétitive de plusieurs enzymes grâce à son analogie de structure et de charge avec l'ion zinc ( $Zn^{2+}$ ). Ce dernier est en effet un cofacteur de la ADN polymérase, de l'anhydrase carbonique et de l'alcool déshydrogénase (Vasseur, comm. pers.). Le bon fonctionnement de la première enzyme est évidemment nécessaire à toute réplication de la chromatine préalable à la mitose



(Debey et Sobel, 1992). La réduction de l'appétit des larves provoquées par certaines substances serait un autre mécanisme pouvant engendrer une inhibition de croissance (Cairns et Loos, 1967).

La sensibilité de la croissance a été montrée comme étant le plus souvent comparable aux autres critères (survie et reproduction) au terme d'essais SEL sur plusieurs xénobiotiques et quatre espèces (Chorus, 1987; Hughes, 1989).

Woltering (1984) ne recommande pourtant pas cette mesure lors des essais embryo-larvaires en raison des différences de sensibilité de ce critère selon les espèces utilisées. De plus, il mentionne deux autres facteurs pouvant compromettre la signification des inhibitions de croissance mesurées. Tout d'abord l'alimentation, dont il serait difficile d'adapter les quantités distribuées en fonction du nombre de poissons survivants. En accord avec Eaton (1974a) et Bresch (1982), il en résulterait des modifications de compétition favorisant la croissance des larves survivantes dans les lots où la mortalité est importante. La qualité de la nourriture disponible peut aussi avoir une incidence sur la croissance comme le confirment Ward et Ballantine (1985). D'autre part, le plus grand espace disponible, pour les individus survivants en cas de forte mortalité a également été mis en cause comme un facteur pouvant conditionner la croissance (Eaton, 1974a; Norberg-King, 1989). En élevant le même nombre de danios zébrés dans des récipients de volume différents au laboratoire, durant un mois et avec une alimentation identique, nous n'avons pourtant observé aucune différence au niveau de leur croissance.

Par ailleurs, la directive de l'OCDE (1992) propose de ne pas tenir compte des mesures de croissance à des concentrations supérieures ou égales à celles qui entraînent un effet significatif sur la survie; ceci afin d'éviter les erreurs d'interprétation dans les cas où les xénobiotiques affectent sélectivement les poissons les plus petits d'un échantillon (généralement les plus faibles).

Malgré les précautions nécessaires pour une exploitation rigoureuse de ce critère, sa mesure systématique est recommandée du fait de sa grande sensibilité (Norberg et Mount, 1985; Chorus, 1987; Hughes, 1989; Norberg-King, 1989; Kristensen, 1990).

Il est à noter que les effets observés peuvent varier en fonction de la durée des essais. En effet, lors de l'étude de la toxicité du chrome (VI), du cadmium et de l'atrazine vis-à-vis des stades embryo-larvaires du danio zébré, Dalverny (1993) a pu montrer l'évolution des CMEO relatives aux critères de croissance et de survie en fonction du temps (cf. tableau 1).

Tableau 1: Concentrations toxiques (CMEO) du chrome (VI), du cadmium et de l'atrazine sur les stades embryo-larvaires du danio zébré, en terme de croissance et de mortalité selon Dalverny (1993).

âge (jrs.)	chrome (mg/l)		cadmium (µg/l)		atrazine (mg/l)	
	croissance	survie	croissance	survie	croissance	survie
8	15,9	>15,9	36	> 324	> 2,63	> 2,63
10	nd	15,9	36	> 324	0,75	> 2,63
15	5,3	9,2	36	108	0,75	> 2,63
20	5,3	5,3	36	108	0,75	> 2,63
30	5,3	5,3	36	108	0,75	> 2,63
50	5,3	5,3	36	36	1,40	> 2,63

Lors d'une exposition embryo-larvaire prolongée jusqu'à la phase juvénile, une sensibilité maximale s'obtient à l'aide du critère de croissance entre le 10ème et le 30ème jour pour l'atrazine et même au delà pour les deux métaux. On remarque que les CMEO du critère de croissance sont toujours plus faibles que celles de la survie du moins pendant la première partie de l'essai. Pour l'atrazine, on observe également un phénomène de tolérance progressive à partir du 50ème jour de l'essai ainsi que pour les deux métaux au 130ème jour (données non reportées dans le tableau). Ce phénomène a également été observé par Pickering (1980) et Benoit (1976) lors d'essais sur cycle de vie portant sur le vairon tête-de-boule et la truite arc-en-ciel. Les explications probables de cette compensation progressive de l'inhibition de croissance ont été détaillées plus haut selon les indications de Woltering (1984). Il pourrait également s'agir de l'atteinte du début de la phase de croissance en plateau pour les témoins à cet âge. Bien que la croissance soit inhibée dans les lots contaminés, leur taille va tendre progressivement vers celle des poissons témoins selon une programmation génétique du développement. La pertinence écologique de ce critère n'en est pas pour autant diminuée car la croissance est le reflet de l'intégrité de mécanismes biochimiques et physiologiques essentiels. De plus, les inhibitions de croissance "présagent" de retards d'acquisition de maturation sexuelle dont les conséquences sont importantes en terme de dynamique des populations (Chapman et Shumway, 1978; Dalverny, 1993).

Par ailleurs d'après le tableau 1, les valeurs de CMEO calculées au niveau de la croissance pour les trois toxiques sont minimales le 10ème jour (le 15ème jour pour le chrome faute de mesure à 10 jours). Cette durée d'essai pourrait convenir pour la réalisation d'essais sublétaux sur des échantillons disponibles en faible quantité comme c'est le cas pour les effluents.

Lors d'essais larvaires sur le vairon tête-de-boule portant sur neuf substances organiques, Norberg-King (1989) préconise de limiter les essais à une durée de sept jours. Les CMEO obtenues à 7 ou 32 jours seraient équivalentes dans 60% des cas et dans un rapport de 2 pour

77% des essais. Comme pour les essais sur le danio zébré, le critère de croissance serait de sensibilité supérieure ou égale à la survie lors de la majorité des essais (en terme de CME0).

La durée recommandée par la directive 210 de l'OCDE (1992) est pourtant de 32 jours (post-fécondation). Il est certain que ces essais courts ne peuvent apporter qu'une estimation de la toxicité chronique de substances ou d'effluents. L'avantage apporté par leur rapidité de réalisation et leur sensibilité satisfaisante lors d'exposition à des substances de type "narcotiques" peut avoir pour contrepartie des erreurs d'appréciation dans le cas de xénobiotiques accumulables.

Les essais SEL courts devraient de préférence inclure la transition de l'alimentation endo/exogène car elle correspond à une phase critique du développement sur le plan énergétique et sur les voies de contamination des larves (Lefebvre, 1990). De plus, un changement enzymatique important se déroule durant cette phase et peut contribuer (en plus des activités métaboliques acquises après l'éclosion) à activer certaines familles de substances comme les anilines (Van Leeuwen et al., 1990).

Sur le plan technique, la mesure de croissance peut se faire par la mesure de la taille ou du poids des organismes. Plusieurs études s'accordent sur une sensibilité équivalente de ces deux approches suite à l'exposition à des substances pures (Benoit et al., 1982; Kristensen, 1990) ou à des effluents (Foster et al., 1994). Ce dernier auteur préconise de réaliser les mesures de taille par des techniques non destructives (photographie ou analyse d'images) de préférence à la mesure de poids qui interdit plusieurs mesures au cours de l'essai et nécessite le regroupement des larves de petite taille.

#### **1.4.3.5- Les malformations**

L'observation d'anomalies du développement apparaissant au niveau embryonnaire ou larvaire peut traduire un effet tératogène des substances testées. C'est généralement durant la phase embryonnaire que les perturbations structurales et fonctionnelles interviennent (Kristensen, 1990; nos observations sur un phtalate) d'où les recommandations d'inclure cette phase dans les essais sur les premiers stades de vie. Au même titre que les cas d'inhibition de croissance, les malformations peuvent présenter des risques pour la survie de la population, notamment lorsqu'elles diminuent les capacités de nage ou entravent la reproduction. Un développement plus complet sur ce critère sera fait au § A.6.

#### **1.4.4- Conclusion**

La phase embryo-larvaire du développement du poisson représente un modèle toxicologique particulièrement intéressant. Lorsque l'exposition couvre les premières étapes de l'embryogenèse jusqu'à la phase larvaire, les réponses exploitables sont multiples et intégratrices de la sensibilité d'une population de cellules indifférenciées jusqu'à celle d'un

organisme entièrement constitué. Les phases prolarvaires et larvaires semblent représenter une étape critique du développement particulièrement susceptible aux contaminations, ainsi qu'une période d'expression des altérations ou contaminations subies durant le développement embryonnaire.

A la multitude de critères de toxicité exploitables, il est possible d'ajouter des observations histologiques (Von Westernhagen, 1988) ou bien le suivi de l'étape de fécondation en présence d'un xénobiotique lorsque les essais sont réalisés avec des oeufs obtenus par fécondation *in vitro* comme c'est le cas pour la carpe (Ghillebaert, 1991).

## **2- Les facteurs de modulation de la réponse toxique**

### **2.1- Introduction**

Différentes caractéristiques de l'eau de dilution et des organismes utilisés lors des essais peuvent influencer la toxicité des substances ou des effluents analysés. Ceci a conduit à l'élaboration de protocoles standards permettant de s'affranchir en grande partie des facteurs biotiques et abiotiques, ce qui améliore la reproductibilité des résultats et autorise leur comparaison entre laboratoires et entre espèces.

Il est néanmoins important de considérer ces facteurs lors de l'interprétation des niveaux toxiques obtenus et plus particulièrement lors de l'extrapolation des résultats aux conditions du "terrain". D'une façon plus globale, le tableau 2 va reprendre les phénomènes principaux qui peuvent conditionner les effets d'une substance toxique.

Au niveau des essais sur poissons d'eau douce, nous aborderons ensuite un certain nombre de facteurs abiotiques (e.g. pH, dureté..) et biotiques (e.g. stades exposés, espèce).

### **2.2- Facteurs liés au milieu**

La liste exhaustive de tous ces facteurs est difficile à établir de part leur multiplicité. Elle regroupe surtout des paramètres physico-chimiques (e.g. pH, dureté, température, radiation lumineuse, oxygène dissous, minéralisation, matières en suspension et matière organique) mais également la biodégradation qui peut prendre une ampleur importante lors d'essais sur des effluents urbains par exemple. Cette dégradation peut non seulement diminuer les concentrations des xénobiotiques mais aussi abaisser la concentration en oxygène dissous jusqu'à des niveaux létaux.

En fait, les facteurs physico-chimiques que nous détaillerons peuvent représenter une perturbation en eux-mêmes si leur niveau s'écarte du domaine de tolérance d'un organisme; nous en verrons quelques exemples au chapitre A.3.

Les paragraphes suivants vont traiter de l'importance des variations de toxicité causées par plusieurs paramètres considérés dans les domaines de tolérance des espèces citées. Le choix

de ces facteurs repose sur le fait que leur niveau peut fluctuer lors des essais embryo-larvaires appliqués à l'évaluation de la toxicité sublétales d'effluents.

Tableau 2: Facteurs à envisager pour la compréhension d'un effet toxique

<b>caractéristiques de la substance toxique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- propriétés physico-chimiques (lipophilicité, solubilité, ionisation.. )</li> <li>- mode d'action avec ou sans métabolisation</li> </ul>
<b>caractéristiques du stress toxique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- concentration</li> <li>- durée d'exposition</li> </ul>



modulation de la toxicité par hydrolyse, complexation, adsorption, photolyse, biodégradation..



<b>caractéristiques de l'organisme exposé</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- stade(s) exposé(s)</li> <li>- contamination "héritée" des géniteurs</li> <li>- perméabilité des barrières biologiques</li> <li>- capacité de métabolisation (stade de développement)</li> <li>=&gt; élimination ou activation</li> <li>- présence de la cible (stade de développement)</li> <li>- rôle de la cible</li> <li>- capacité de compensation</li> </ul>
---	--



<b>caractéristiques de la réponse</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- immédiate ou différée</li> <li>- létale</li> <li>- sublétales "microscopique"</li> <li>- sublétales "macroscopique"</li> <li style="padding-left: 20px;">☐ croissance</li> <li style="padding-left: 20px;">☐ déformation</li> <li style="padding-left: 20px;">☐ mobilité</li> </ul>
---------------------------------------	--

### 2.2.1- La dureté

La dureté de l'eau est liée à la présence de sels de calcium et de magnésium sous forme de (bi)carbonates par exemple. Elle s'exprime d'ailleurs souvent en mg/l de carbonate de calcium.

#### ☐ influence de la dureté sur la toxicité de substances organiques

La toxicité du phénol et de certains pesticides organophosphorés et carbamates testés sur plusieurs espèces semble indépendante de la dureté de l'eau de dilution (Pickering et Henderson, 1966b; Sprague, 1985). Par contre, la toxicité d'autres substances organiques dont

les hydrazines s'est révélée supérieure en eau douce vis-à-vis du vairon tête-de-boule adulte lors d'essais de toxicité aiguë (Pickering et Henderson, 1966a).

La toxicité de détergents anioniques en solution vis-à-vis des poissons varie considérablement selon la dureté de l'eau. Ainsi le détergent anionique LAS (Linear Alkylbenzène Sulfonate) s'est révélé en moyenne une fois et demie plus toxique en eau dure qu'en eau douce lors d'essais de toxicité aiguë sur le crapet arlequin et le vairon tête-de-boule (Henderson et al., 1959; Hokanson et Smith, 1971).

Lors d'une étude sur la truite arc-en-ciel et le poisson rouge, Tovell et al. (1974) ont montré que l'absorption et la toxicité d'un autre détergent anionique SLS (Sodium Lauryl Sulphate) sont supérieures en eau dure qu'en eau douce. La toxicité du SLS ne dépend pas uniquement de la dureté de l'eau de dilution utilisée durant l'essai, mais aussi de la dureté de l'eau d'acclimatation des poissons. Les variations du taux d'absorption seraient dues soit à un changement important de la perméabilité de certains tissus (branchies en particulier), causé surtout par la présence du calcium ou à une modification de la biodisponibilité du détergent. En effet, son transfert à travers la membrane branchiale serait facilité après diminution du caractère ionique de la molécule due à des interactions ioniques avec les ions calcium et magnésium. L'influence de la dureté de l'eau sur la toxicité des détergents n'est cependant pas vérifiée pour tous les détergents anioniques (Sprague, 1985).

#### □ influence de la dureté sur la toxicité de métaux

La toxicité des métaux lourds (e.g. Ni, Zn, Cu, Cr-III, Cd) est généralement moindre en eau dure comme cela a été mis en évidence par Brown (1968) et Pickering et Henderson (1966b) lors d'essais de toxicité aiguë sur plusieurs espèces. Les rapports de sensibilité peuvent être de 10 et 20 pour le chrome et le cadmium respectivement lorsque les essais sont effectués avec une eau à 20 ou 360 mg/l de CaCO<sub>3</sub>.

La concentration élevée d'ions (bi)carbonates d'une eau dure conduirait à une complexation des métaux diminuant la proportion de métal sous forme ionique et biodisponible (Calamari et al., 1980). De plus, les niveaux plus élevés en calcium des tissus de poissons élevés en eau dure confèreraient une imperméabilité plus grande des membranes branchiales aux ions métalliques (Lloyd, 1965).

Ces tendances ont été vérifiées dans le cadre d'essais SEL portant sur trois espèces exposées à deux métaux (Cu et Cd) car des inhibitions de croissance et des mortalités larvaires sont apparues avec une ampleur d'autant plus importante que la dureté du milieu était faible (Lett et al., 1976; Sauter et al., 1976; Gingerich et al., 1988).

### 2.2.2- Le pH

Des modifications de toxicité importantes peuvent être observées en fonction de l'acidité du milieu pour la plupart des molécules ionisables. Les formes non ionisées étant généralement plus toxiques du fait de leur meilleure capacité à franchir les membranes biologiques (Sprague, 1985).

Un exemple connu est l'ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) dont la forme hydratée ( $\text{NH}_4^+$ ) est moins toxique. L'équilibre de dissociation est fonction de la température et du pH. Une élévation du pH du milieu de 7,5 à 8,5 conduit à une proportion  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  neuf fois plus importante. De la même façon, selon Brémond et Perrodon (1979), la toxicité du sulfure de sodium est beaucoup plus élevée en milieu acide, étant sous sa forme non ionisée ( $\text{H}_2\text{S}$ ).

#### □ influence du pH sur la toxicité de substances organiques

Cette influence du pH est relatée dans de nombreux travaux portant sur des pesticides de différentes familles chimiques comme le dinitrophénol (herbicide), l'antimycine (piscicide) et le pentachlorophénol (PCP). Testées sur différentes espèces de poisson, ces molécules exercent une toxicité plus grande à des pH inférieurs à leur pKa car leur forme non dissociée semble plus biodisponible (Lipschuetz et Cooper, 1961; Marking, 1975). Dans le cas du PCP, c'est le phénol non ionisé qui correspond à une forme plus lipophile transitant plus facilement à travers les membranes des poissons (Dave, 1984).

Pour d'autres molécules comme le zectran et le malathion (deux insecticides), c'est une hydrolyse à pH alcalin qui expliquerait les différences de toxicité constatées (Bender, 1969).

A l'occasion d'essais embryo-larvaires sur le modèle de la carpe, Ghillebaert (1991) a montré l'influence du pH sur la toxicité à moyen terme de deux pesticides: le DNOC (Di-nitro-ortho-crésol, insecticide) et le captafol (fongicide). Les niveaux de toxicité trouvés ont été reportés dans le tableau suivant.

Tableau 3: Niveaux de toxicité (CL50-7jrs. en mg/l) de deux pesticides à différents pH pour les stades embryo-larvaires de la carpe (Ghillebaert, 1991)

substance	pH		
	6,9	7,8	9,0
DNOC	< 0,25	0,72	> 2
captafol	< 0,25	0,79	> 2

Dans l'intervalle de tolérance au pH des stades embryo-larvaires de la carpe, ce paramètre peut donc modifier d'un facteur proche de 10 les seuils de toxicité de ces deux pesticides.

Dans le cas d'un détergent anionique (LAS), le pH n'a aucune influence sur leur toxicité (EIFAC, 1973). Lorsque les essais portent sur un effluent, les différences de toxicité sont en partie liées à la dissociation des composés nocifs. McLeay et al. (1979) mentionnent l'exemple d'un effluent de papeterie qui s'est montré environ trois fois plus toxique vis-à-vis de la truite

arc-en-ciel à pH=5 qu'à pH=9. La forme non ionisée dominante d'un acide résinique à pH=5 serait la cause des différences de toxicité observées.

#### ▣ **influence du pH sur la toxicité des métaux**

Dans le cas des métaux, la forme libre ou ionisée est généralement douée d'une plus grande toxicité (Sprague, 1985).

Pour le cuivre, une grande proportion de ce métal se trouve sous forme ionique  $\text{Cu}^{2+}$  la plus toxique à pH=5, alors qu'en milieu basique, ce métal est présent sous forme d'hydroxydes et de carbonates non biodisponibles (Spear et Pierce, 1979).

Parmi les métaux plus toxiques en milieu acide (pH<6) pour différentes espèces de poisson, on trouve aussi le chrome(VI) et le plomb alors que d'autres métaux (Cd, Ni, Zn et Al) manifestent une toxicité supérieure à des pH>8,3 (Van der Putte et Lubbers, 1981; Dave, 1984; Schubauer-Berigan et al., 1991; Stouthart et al., 1995).

Notons que lors des essais conduits à pH<6, donc en dehors du domaine de tolérance des espèces utilisées, les poissons témoins ont servi de témoins positifs pour les pH utilisés mais les mortalités constatées correspondent vraisemblablement à l'addition des effets toxiques des métaux et de l'acidité.

#### ▣ **influence du pH sur la toxicité d'un organo-métal**

Une exposition de prolarves d'ombre commun à des doses sublétales de TBT (tributylétain) conduit à une bioaccumulation plus importante à pH=8 qu'à pH=6. Cette différence serait liée à la forme hydroxylée du TBT à pH=8, plus biodisponible que la forme cationique qui domine en milieu plus acide (Fent et Looser, 1995).

### **2.2.3- La température**

A l'intérieur du domaine de tolérance pour chaque espèce, la température exerce un effet important sur le métabolisme des poissons, organismes poïkilothermes. Des mécanismes vitaux comme la croissance et la reproduction se déroulent de façon optimale à l'intérieur d'intervalles précis de température, bien que des phénomènes d'acclimatation existent (Sprague, 1985). Tout comme l'acidité de l'eau, la température peut conditionner la biodisponibilité de substances en agissant sur leur solubilité et la forme sous laquelle elles vont agir.

Il n'y a pas de règle générale quant à l'influence de variations de température sur les réactions des poissons aux toxiques. Les observations rapportées dans la littérature dépendent de la molécule testée, de l'espèce et souvent du critère de toxicité choisi.

Lors d'une étude bibliographique importante, Sprague (1985) a d'ailleurs relevé de nombreux exemples qui attestaient d'un rapprochement des seuils de toxicité à différentes températures à la fin des essais chroniques; la stabilisation des niveaux sans effets étant plus longue lorsque les essais sont conduits à basse température. C'est ce que confirment deux études récentes sur



la toxicité sublétales de deux nitrophénols sur les stades embryo-larvaires de la truite arc-en-ciel (Howe et al., 1994) et du "sheepshead minnow" (Linton et al., 1994).

#### ▣ **influence de la température sur la toxicité de substances organiques**

Pour des substances comme l'acide naphthénique ou un détergent anionique (LAS), aucune différence significative n'est observée lors d'essais de toxicité aiguë sur des crapets arlequins acclimatés et mis en test à 20°C ou à 25°C (Hokanson et Smith, 1971).

Parmi les pesticides, l'endrine et le pentachlorophénol sont plus nocifs lorsque les essais sont conduits à des températures élevées (en limite de la zone de tolérance). Dans des eaux plus froides donc plus riches en oxygène dissous, la moindre irrigation des branchies pourrait expliquer une cinétique de contamination plus faible des poissons (Sprague, 1985). Pour la perméthrine (insecticide pyréthriinoïde) par contre, la toxicité envers la truite arc-en-ciel est cinq fois plus élevée à 10°C qu'à 15°C (Kumaraguru et Beamish, 1981 cités par Sprague, 1985). Dans ce cas, il est possible que le métabolisme de détoxification soit ralenti à basse température comme l'a mis en évidence Stegeman (1979) sur le choquemort où l'induction de cytochrome P450 par un hydrocarbure aromatique a pu être mesurée à 16,5°C mais non à 6,5°C.

#### ▣ **influence de la température sur la toxicité de métaux**

Hodson et Sprague (1975) ont montré que la résistance au zinc de saumons de l'Atlantique (acclimatés à 3, 11 ou 19°C) est meilleure à la plus basse température mais d'un rapport de sensibilité de 4 entre les températures extrêmes pour une exposition de 24h., on passe à un rapport de 1,3 puis 0,6 pour des expositions de 96h. et 15 jours respectivement. Il y a donc une homogénéisation des CL50 quand l'exposition est prolongée voire même une légère inversion de sensibilité. Pour expliquer ces résultats, les auteurs suggèrent que le métabolisme plus intense des organismes acclimatés à température élevée leur conférerait une meilleure capacité à développer des mécanismes de séquestration du métal (e.g. métallothionéines) et/ou d'élimination.

Le facteur "espèce" est également important comme le montre l'exemple apporté par Pickering et Henderson (1966b). Le vairon tête-de-boule est, en effet, trois fois plus tolérant au zinc à 15°C qu'à 25°C alors qu'aucune différence de sensibilité n'est constatée pour le crapet arlequin.

### **2.2.4- L'oxygène dissous**

Le taux d'oxygène dissous d'une eau influence généralement indirectement la toxicité des substances par modification des mécanismes respiratoires.

Lors d'essais sublétaux sur des larves de crapet arlequin, Pickering (1968) a voulu évaluer l'éventuelle interaction du zinc et du taux d'oxygène dissous. Il lui a été possible de relier l'inhibition de croissance aux différentes concentrations en oxygène mais aucun effet attribuable à l'interaction oxygène/zinc n'a été observé.

Par ailleurs, l'existence d'une corrélation négative entre la teneur en oxygène dissous et la toxicité de plusieurs substances (cuivre, plomb, zinc, phénols) sur la truite arc-en-ciel a été montrée par Lloyd (1961). L'auteur a suggéré que l'irrigation des branchies serait supérieure lorsque la concentration en oxygène dissous du milieu est faible de manière à favoriser les échanges gazeux. La diffusion des contaminants de l'eau vers le milieu intérieur en serait d'autant augmentée. La mortalité du crapet arlequin exposé à un détergent anionique (LAS) est également plus forte lorsque la teneur en oxygène dissous est plus faible (Hokanson et Smith, 1971). Hicks et DeWiit (1971) observent le même phénomène lors d'essais de toxicité aiguë sur un effluent de papeterie.

Alors que les variations de toxicité précédemment décrites sont de faible amplitude (dans un rapport inférieur à 1,5), Lloyd (1961) ainsi que Thurston et al. (1981) ont indiqué que la toxicité aiguë de l'ammoniac peut doubler lorsque le taux de saturation en oxygène passe de 80 à 30%. L'hypothèse avancée suggère que le flux d'eau plus important entre les lamelles branchiales et la diffusion intensifiée des gaz ( $O_2$  et  $CO_2$ ) à travers la membrane entraîne localement une diminution de la concentration en gaz carbonique avec une élévation concomitante du pH. La quantité d'ammoniac qui diffuserait à travers la membrane branchiale en serait augmentée. Sur cette même substance, Magaud et al. (sous presse) a réussi à montrer un effet synergique entre la concentration en  $NH_3$  et le degré d'hypoxie du milieu en terme de toxicité aiguë sur des truitelles arc-en-ciel.

### **2.2.5- Autres facteurs**

Signalons tout d'abord que certains facteurs évoqués plus haut peuvent se conjuguer pour modifier la toxicité ou la biodisponibilité d'une substance. C'est le cas de l'ammoniac dont l'équilibre avec la forme ionique ( $NH_4^+$ ) dépend du pH et de la température. Pour le cuivre, Spear et Pierce (1979) ainsi que Mance (1987) indiquent que la toxicité de l'ion  $Cu^{2+}$  dépend à la fois du pH, de l'alcalinité et de la dureté de l'eau.

Il faut également mentionner l'existence d'interactions entre certaines molécules qui peuvent se traduire par des effets toxiques en synergie par exemple, ou bien par des modifications de solubilité. C'est le cas d'un agent chélatant (EDTA) utilisé dans les lessives qui diminue la solubilité de certains métaux (Huebert et Shay, 1992).

Aux facteurs physico-chimiques déjà mentionnés, il est nécessaire d'ajouter le phénomène de photolyse et d'adsorption aux éléments solides en contact du milieu aqueux. Ce facteur est à considérer tout particulièrement lors d'essais sur des molécules très lipophiles (Lefebvre, 1990). Lorsque les essais portent sur des effluents ou utilisent de l'eau prélevée dans le milieu naturel pour les dilutions, le phénomène de biodégradation et de complexation aux substances humiques peut également conditionner la toxicité des molécules présentes (Hutchinson et Sprague, 1987). Ces facteurs sont à prendre en compte lors de la conception des essais de toxicité (méthode de renouvellement des milieux) et lors de l'interprétation des résultats.

## 2.3- Facteurs liés à l'organisme exposé

Lors du chapitre A.1.4.3, il a été question du choix des stades à exposer et des critères de toxicité à mesurer préférentiellement. Nous verrons ici les différences de sensibilité selon les espèces utilisées ainsi que les stades du cycle de vie exposés.

### 2.3.1- L'espèce

Il est généralement admis que les cyprinidés sont moins sensibles aux xénobiotiques que les salmonidés. Des essais de toxicité aiguë sur cinq toxiques (appartenant à des familles chimiques différentes) ont permis à Fogels et Sprague (1977) de montrer que le danio zébré et la fondule de Floride sont respectivement 2,6 et 4,2 fois plus tolérants que la truite arc-en-ciel. A titre indicatif, nous pouvons également mentionner les résultats d'une étude comparative importante réalisée par Slooff et al. (1983). Ces auteurs ont effectué des essais de toxicité aiguë de 48h. en exposant quatre espèces à deux métaux (Hg-II, Cd), cinq solvants (heptanol, propanol, trichloroéthylène, benzène et acétone) et huit substances organiques (acétate d'éthyl, propionate d'éthyl, allylamine, aniline, pyridine, o-crésol, pentachlorophenol, aldehyde salicylique). Les niveaux de toxicité (CL50) permettent de classer par ordre de sensibilité croissante: le guppy, le modaka, le vairon tête-de-boule et la truite arc-en-ciel. Pour toutes ces substances, le facteur "espèce" ne semble pas prépondérant en terme de toxicité aiguë car les CL50 sont dans le même ordre de grandeur. Cependant, une sensibilité particulièrement faible (facteur  $\geq 30$ ) du guppy et du modaka comparée aux autres espèces a été observée dans le cas du cadmium.

Lors de l'étude de la toxicité aiguë de treize insecticides organophosphorés sur quatre espèces, Pickering et al. (1962) ont constaté des rapports de CL50 compris entre 4 et 900; le crapet arlequin et le guppy étant généralement plus sensibles que le vairon tête-de-boule et le poisson rouge. Ceci pourrait être lié aux différences spécifiques d'équipement enzymatique responsable de l'activation métabolique des molécules initiales en dérivé oxon comme l'ont montré Ansari et Kumar (1984) lors de l'étude de la toxicité du malathion.

Il est également intéressant de noter que la sensibilité relative du guppy et du vairon tête-de-boule est inversée pour cette famille de substance par rapport aux observations de Slooff et al. (1983).

Par ailleurs, la comparaison de la toxicité aiguë de deux métaux (chrome-VI et cadmium) et un herbicide (atrazine) vis-à-vis de trois espèces permet également certains constats comme le présente le tableau 4. De manière à pouvoir comparer les CL50, nous avons regroupé les résultats d'essais utilisant des poissons juvéniles ou adultes et des eaux de dilutions de caractéristiques comparables (pH, dureté).

Tableau 4: Toxicité aiguë du chrome(VI), du cadmium et de l'atrazine vis-à-vis de 4 espèces (les résultats des CL50-96h. sont exprimés en mg/l)

espèce	chrome	cadmium	atrazine	auteurs
vairon tête-de-boule	26,1	1,3	15	Dorn (1987), Spehar (1984), Macek (1977)
truite arc-en-ciel	69	2,3	4,5	Benoit (1976), Spehar (1984), Macek (1976)
saumon de fontaine	59		6,3	Benoit (1976), Macek (1976)

Les résultats de toxicité aiguë montrent un rapport maximum de 2,7 entre la sensibilité des trois espèces pour les deux métaux avec une sensibilité plus importante du vairon par rapport aux deux salmonidés. On observe une tendance inverse après l'exposition à l'atrazine.

Dans le cas d'essai de toxicité aiguë, le facteur "espèce" ne semble donc pas à l'origine d'une trop grande disparité des résultats si ce n'est pour les insecticides organophosphorés.

### 2.3.2- Le stade de développement

Au cours du premier chapitre, l'existence de phases de forte sensibilité du développement embryo-larvaire a été évoquée. Il s'agit des premières étapes de l'embryogenèse où l'hydratation du liquide périvitellin peut constituer une voie d'entrée importante de contaminants. Juste après l'éclosion, la prolarve a été décrite comme une période où l'exposition aux contaminants est modifiée par la disparition du chorion mais aussi par l'entrée en fonction des activités métaboliques (dé)toxifiantes. Un autre changement enzymatique a lieu lors de la transition entre l'exploitation des réserves vitellines et l'alimentation exogène; constituant en elle-même une nouvelle voie potentielle de contamination.

Des essais de détermination de la CL50(96h.) sur différents stades embryo-larvaires de black-bass à grande bouche ou de truite arc-en-ciel exposés à différents contaminants (pesticides, cadmium), ont par exemple montré que la sensibilité augmente au cours du développement embryo-larvaire (Johansen et al., 1985; Van Leeuwen et al., 1985). Cette plus grande réceptivité à l'égard des contaminants serait liée au degré de complexité croissant de l'organisme et plus particulièrement, à l'apparition de cibles moléculaires (e.g. enzymes) et cellulaires (e.g. hématie, neurone, hépatocyte).

Des expositions courtes à trois métaux (Zn, Cr-VI et Cd) et deux pesticides (un carbamate et un organophosphoré) durant le développement embryo-larvaire de différentes espèces concordent pour attribuer la plus forte susceptibilité à la fin de la phase embryonnaire ainsi qu'à la phase larvaire; cette dernière ayant une sensibilité supérieure ou égale à la phase juvénile (Skidmore, 1965; Sauter et al., 1976; Gorge et Nagel, 1990; Kaur et Dhawan, 1993). L'étape de maturation correspond également à une phase très sensible du cycle de vie comme nous l'avons évoqué au § A.1.3.

La sensibilité spécifique de l'étape larvaire n'exclut pas la possibilité qu'elle constitue en outre une période d'expression "préférentielle" des perturbations subies durant l'embryogenèse comme il a été montré par Lefebvre (1990). Ainsi, pour une exposition à la deltaméthrine (pesticide pyréthrinoïde) à la même concentration, on observe une anticipation de l'effet toxique plus le stade embryonnaire (au moment de l'exposition) est avancé. Des expositions de 24h. faites à partir "d'âges" embryonnaires différents (24h., 48h. ou 72h.) conduisent à de fortes mortalités un jour après l'éclosion (96h.) quelle que soit la phase embryonnaire exposée. Lorsque cette courte exposition porte sur les prolarves (entre 96h. et 120h. ou entre 120h. et 144h.), les mortalités apparaissent avec un décalage de deux jours dans chaque cas. Ces résultats suggèrent que ce pesticide est accumulé par les embryons et par les prolarves et que sa cible moléculaire ou cellulaire n'apparaît que 24h. après l'éclosion. L'effet différé constaté lorsque l'exposition concerne les prolarves pourrait correspondre au délai nécessaire à l'activation métabolique de la deltaméthrine.

D'une façon plus générale, la sensibilité des organismes va dépendre de la perméabilité des différents tissus, des capacités de métabolisation, d'élimination des xénobiotiques, de la présence des cibles toxiques qui sont des caractéristiques propres à chaque stade de développement.

## 2.4- Conclusion

Parmi les facteurs abiotiques décrits au début de ce chapitre, l'acidité du milieu est un paramètre qui conditionne de façon déterminante la forme chimique et donc la biodisponibilité de nombreuses substances toxiques. En ce qui concerne la toxicité de certains métaux et des détergents anioniques, la dureté est également d'une grande importance. Une prise en compte particulière de ces paramètres ne doit pas faire oublier l'influence que peuvent avoir parfois le taux d'oxygène dissous et la température sur les réponses des organismes. Au niveau des variables biotiques, les stades de développement exposés et suivis conditionnent en grande part les résultats. Par contre, la variable "sexe" ne nécessite pas d'attention particulière puisque les poissons utilisés durant les essais SEL sont immatures. De même, l'espèce choisie ne semble pas constituer une source de variation trop importante sauf pour certains métaux ou des molécules qui deviennent particulièrement toxiques après transformation enzymatique.

De manière à améliorer la représentativité des essais sublétaux appliqués à des substances pures (dont les caractéristiques du milieu récepteur sont inconnues), ces informations encouragent à mettre en oeuvre des essais multiparamétriques en prévoyant par exemple, plusieurs conditions de pH ou de dureté.

Dans le cas d'essais sur des échantillons d'effluent, les caractéristiques physico-chimiques du milieu récepteur devraient être prises en compte pour appuyer l'interprétation des résultats. Une attention particulière doit également être apportée lors de ces essais (souvent réalisés en condition semi-statique) à l'évolution des paramètres tels que le pH ou l'oxygène dissous.

Ceux-ci peuvent conditionner la biodisponibilité de certains micropolluants (cas du pH) ou fragiliser les organismes d'essai lorsque ces paramètres s'écartent des intervalles qu'ils tolèrent (appelés domaines de tolérance). Quelques exemples de domaines de tolérance seront d'ailleurs abordés dans le chapitre suivant.

### **3- Tolérances des poissons aux conditions physico-chimiques du milieu**

#### **3.1- Introduction**

Du chapitre sur les facteurs de modulation de la toxicité, il ressort la nécessité de connaître les domaines de tolérance des espèces de poisson choisies à différents facteurs abiotiques. Lors des essais sur effluent par exemple, il est important de connaître la concentration en oxygène dissous minimale requise par les stades testés pour savoir si l'effet d'une teneur trop faible en oxygène s'ajoute au stress imputable aux produits nocifs de l'échantillon. De même, les conditions de pH peuvent non seulement constituer une agression pour les organismes exposés au delà de certaines limites mais également conditionner la biodisponibilité de certaines substances.

Nous indiquerons successivement les domaines de tolérance à la température, au pH ainsi qu'aux concentrations en oxygène dissous du danio zébré et/ou d'autres espèces car ce sont des caractéristiques auxquelles il est nécessaire de prêter attention lors de nos essais.

La tolérance des poissons à l'ammoniac sera également abordée car sa contribution fréquente à la toxicité d'effluents urbains fait qu'il constitue un paramètre important à prendre en compte.

Concernant la dureté, nous n'avons pas d'informations relatives aux effets des eaux dures ou douces sur le développement embryo-larvaire des poissons. Les seuls travaux dans ce domaine concernent l'influence de la dureté sur la toxicité de substances organiques ou métaux comme il a été exposé au chapitre A.2.2.1.

#### **3.2- Tolérance à la température**

Chaque espèce possède son préférendum thermique pour lequel son métabolisme, son développement et sa reproduction se déroulent de façon optimale. Il est de 12°C pour la truite arc-en-ciel, 20°C pour le gardon (Brémond et Perrodon, 1979) et 26°C pour le danio zébré. Ce dernier à l'âge adulte supporte des températures extrêmes de 15,5 à 35°C (Garric et al., 1990a). Une distinction peut être faite entre les espèces sédentaires, le plus souvent eurythermes et les espèces migratrices, généralement sténothermes (Herzig et Winkler, 1986). Les stades embryo-larvaires ont souvent des tolérances plus restreintes que les adultes (Schirone et Gross, 1968). Pour la plupart des espèces et dans le domaine de tolérance de leur développement embryonnaire, il existe une relation inverse (généralement non linéaire) entre

la température d'incubation et la durée de l'embryogenèse (Blaxter, 1988). Le développement embryonnaire des salmonidés s'exprime d'ailleurs souvent en degré-jour.

Aux températures "limites", une diminution du taux d'éclosion et une perturbation du comportement des larves après l'éclosion ont été observées sur plusieurs espèces de cyprinidés (Herzig et Winkler, 1986).

Le domaine de tolérance des espèces est lié à leur habitat d'origine et peut être plus ou moins étendu comme l'illustre le tableau 5.

Tableau 5: Intervalles de température compatibles avec le développement embryonnaire de trois espèces de cyprinidés et un salmonidé

<b>espèce</b>	<b>température (°C)</b>	<b>auteur</b>
danio zébré	23 - 34	Schirone (1968)
carpe	12 - 28	Reznitchenko (1985)
gardon	7,5 - 24	Kokurewicz (1970)
truite arc-en-ciel	2 - 14	Environnement Canada (1992a)

Il est intéressant de noter que dans le domaine de tolérance thermique des embryons du danio zébré (23 - 34°C), le rythme de succession des divisions cellulaires est sensiblement le même jusqu'au stade de la blastula haute avancée (Schirone et Gross, 1968).

Au niveau de la sensibilité embryonnaire, deux auteurs ont étudié plus en détail les périodes du développement particulièrement sensibles aux variations thermiques. Sur le modèle de l'embryon de tilapia, Rana (1990) a recherché les limites de tolérance lors d'expositions commençant juste après la fécondation ou à partir du stade beaucoup plus avancé de la pigmentation oculaire (PO). Dans le premier cas, le développement s'est déroulé complètement (bien qu'à des rythmes différents) jusqu'à l'éclosion pour des températures d'incubation comprises entre 25 et 30°C. Lorsque l'exposition a commencé au stade PO, cet intervalle était un peu plus large (23,5 - 32°C). Cette sensibilité accrue de la première partie du développement a été étudiée de façon plus détaillée par Roubaud et al. (1985) sur le modèle de la carpe. Des chocs froids courts (0,3°C pendant 10 min.) décalés de quelques minutes entre plusieurs groupes d'embryons ont permis de mettre en évidence une sensibilité décroissante à ce stress thermique (à partir de la fécondation) entrecoupée de façon régulière par de courtes périodes de plus forte sensibilité. Après l'exposition au choc froid, le critère de tolérance a porté sur le taux de survie embryonnaire à 48h. Cette cyclicité pourrait être en rapport avec le rythme des mitoses dont une ou plusieurs phases (anaphase,..., télophase) aurait une susceptibilité particulière à ce type de stress.

### 3.3- Tolérance au pH

Brémond et Perrodon (1979) ont classé les effets de différents niveaux de pH sur la faune piscicole (cf. tableau 6) après recensement de données recueillies dans le milieu naturel.

Tableau 6: Domaine de tolérance des populations de poisson au pH de l'eau (Brémond et Perrodon, 1979)

pH < 5,0	disparition de la plupart des espèces
5,0 < pH < 6,0	réduction des fréquence de ponte et du taux d'éclosion des oeufs pour les cyprinidés (au pH < 6,5 pour les salmonidés)
6,0 < pH < 8,5	intervalle optimal pour la vie et la reproduction
9,0 < pH	mortalité pour de nombreuses espèces

Des conditions très acides (jusqu'à pH=4) ont été mesurées dans les pays Scandinaves en raison des pluies acides ce qui a entraîné la disparition de la biocénose de nombreux lacs (Hindar et al., 1994).

Le pH de l'eau compatible avec la survie et la reproduction de plusieurs poissons d'eau douce semble être compris entre 6 ou 6,5 et 8,5. En condition de laboratoire et sur les stades embryon-larvaires du danio zébré et de la carpe, la limite inférieure du pH tolérée semble être identique mais des conditions légèrement plus alcalines semblent ne pas compromettre leur développement (cf. tableau 7).

D'un point de vue expérimental, la détermination du domaine de tolérance d'une espèce aux conditions de pH est réalisée le plus souvent en condition semi-statique et à l'aide d'agents tampons pour limiter les dérives de pH dues à l'équilibre carbonique de l'eau.

Tableau 7: Domaine de tolérance des stades embryon-larvaires de deux espèces au pH

espèce	pH	utilisation de tampons	durée [embryon - ? ]	auteur
danio zébré	6 - 9	oui	mort des larves (non-nourries)	Dave (1984)
danio zébré	7 - 10	oui	éclosion	Johansson (1973)
carpe	6,8 - 9	oui	mort des larves (non-nourries)	Ghillebaert (1991)
carpe	6,5 - 9,5	non	éclosion	Kaur (1980)

Selon Heath (1987), des lésions épithéliales et une perturbation des mécanismes d'osmorégulation seraient provoquées dans les conditions limites de pH.



Dans des conditions acides sublétales, Milligan et Wood (1982) ont mesuré, chez la truite arc-en-ciel, une fuite ionique au niveau branchial qui conduirait par une cascade d'événements à une augmentation excessive de la pression artérielle et donc à une insuffisance circulatoire.

En terme d'effet sublétal de l'acidité du milieu sur le vairon tête-de-boule adulte, Lemly et Smith (1987) ont mis en évidence une perturbation réversible de la chémoréception à des pH inférieurs à 6. Des inhibitions de prise alimentaire ont ainsi été observées sans compensation apparente par le choix visuel de la nourriture.

Au niveau des stades embryon-larvaires de salmonidés, Sayer et al. (1993) ont identifiés plusieurs types de perturbation. Grâce à la protection du chorion, les stades embryonnaires paraissent peu sensibles à des conditions relativement acides du milieu d'incubation. Par contre, à la fin de l'embryogenèse, la perméabilité croissante de l'enveloppe chorionique aux ions peut expliquer le blocage du processus d'éclosion du fait de l'inhibition de la chorionase par les ions hydronium (Heath, 1987). Après l'éclosion, l'acidité du milieu contribuerait à transformer certains métaux dont l'aluminium (même présents à l'état de trace) en leur forme la plus biodisponible et donc la plus nocive. Des effets sublétaux de l'acidité concerneraient également une inhibition de la minéralisation des (pro)larves préjudiciable à leur croissance ainsi qu'une atteinte de leurs fonctions d'osmorégulation et de respiration (Sayer et al., 1993).

### 3.4- Tolérance à la teneur en oxygène dissous

D'après Heath (1987), les besoins en oxygène des poissons dépendent de leur stade de développement et de leur état physiologique (e.g. période de reproduction, de migration).

La pression partielle de l'eau en oxygène dissous conditionne l'approvisionnement des poissons en oxygène puisque la diffusion de ce gaz entre l'eau et le sang se fait de manière passive au travers des membranes branchiales. Il faut cependant prendre en compte la capacité des poissons à augmenter le flux d'eau qui balaye leurs branchies ce qui favorise les échanges gazeux.

Le tableau 8 reprend les exigences minimales de plusieurs populations de poissons des eaux continentales établies dans la directive CEE 78/659 ainsi que la grille proposée par Davis (1975) pour le Canada.

Tableau 8: Exigences minimales en oxygène dissous de populations de poissons d'eau douce (exprimé en mg d'O<sub>2</sub>/l)

peuplement			auteur
cyprinidés	salmonidés	embryons et alevins de salmonidés	
5	7		CEE (1978)
5,5	8	10	Davis (1975)

Ces données sont le reflet des taux d'oxygénation des milieux occupés par ces espèces. Les exigences supérieures des salmonidés sont encore accrues aux premiers stades de développement de leur progéniture.

Chez la plupart des espèces, des mécanismes d'adaptation à des conditions d'hypoxie se mettent en place par augmentation de la concentration d'hémoglobine circulante et de la capacité de cette protéine à fixer l'oxygène (Heath, 1987).

Doudoroff et Shumway (1970) rapportent que les premiers stades embryonnaires de plusieurs espèces d'eau douce sont relativement résistants aux conditions d'hypoxie. La glycolyse anaérobie serait alors la principale voie métabolique conduisant à la synthèse d'ATP. Au fil du développement embryonnaire, la glycolyse aérobie se met progressivement en place ce qui conduit à une augmentation de la consommation en oxygène. Celle-ci atteint un maximum au moment de l'éclosion et durant la phase prolarvaire avant de diminuer progressivement durant la période juvénile (Spor, 1984).

Alors que les exigences minimales des stades embryo-larvaires n'ont pas été définies précisément, deux travaux traitent de la consommation en oxygène de différents stades de développement de la carpe et du danio zébré (Skidmore, 1967; Kaushik et al., 1982). Un aperçu des résultats est donné dans le tableau 9.

Tableau 9: Consommation en oxygène durant différents stades de développement de deux espèces de cyprinidés (Skidmore, 1967; Kaushik et al., 1982)

espèce	stade	consommation	
		$\frac{mg.O_2}{10^3 \text{ poissons} \times h.}$	$\frac{mg.O_2}{kg. poisson \times h.}$
danio zébré 25°C	embryon à 2 jrs.	0,09	2100
	prolarve à 4 jrs.	0,2	4670
	prolarve à 7 jrs.	0,3	7650
	larves à 11 jrs.	0,17	8060
	juvenile à 40 jrs.	20,25	3980
	adulte à 100 jrs.	160,2	2170
carpe 20°C	embryon à 2 jrs.	0,95	nd
	prolarve à 4 jrs.	1,2	nd
	prolarve à 10 jrs.	2,8	nd
	larve à 15 jours	1,9	nd

nd: non déterminé

L'expression de la consommation par unité de poids sec donne une information intéressante sur l'évolution de la consommation en oxygène. Pour le danio zébré, il ressort que les besoins maximum se situent au stade larvaire et il est intéressant de noter que la consommation en

oxygène des adultes est sensiblement équivalente à celle des embryons. Les données disponibles sur la carpe (exprimées pour 1000 individus) sont moins faciles à exploiter du fait des différences de poids entre les stades et entre les espèces. Les concentrations minimales en oxygène dissous tolérées par les stades embryo-larvaires de ces deux espèces ne sont pas calculables à partir de ces résultats mais ont été étudiées pour plusieurs autres espèces et le tableau 10 en montre deux exemples.

Tableau 10: Concentrations en oxygène minimales requises pour le développement embryo-larvaire de deux espèces.

espèce (famille)	température (°C)	CSEO* (mg d'O <sub>2</sub> /l)	auteur
crustivomer (salmonidé)	7	6,0	Carlson (1974)
brochet (esocidé)	15	4,9	Rombough (1988)

\* Concentration Sans Effet Observé

Les effets sublétaux relevés par les auteurs concernent des retards de développement embryonnaire et de croissance ainsi qu'une inhibition de la mobilité larvaire.

Signalons que la température semble conditionner la résistance des poissons à des conditions d'hypoxie quel que soit leur stade de développement. En effet, l'activité métabolique et donc le besoin en oxygène augmentent lorsque la température croît (Rombough, 1988). Par ailleurs, cet auteur ajoute qu'un phénomène de bradycardie est observable chez les juvéniles et les adultes de plusieurs espèces soumis à des stress hypoxiques alors que ce réflexe n'est pas fonctionnel chez les embryons et les larves.

### 3.5- Tolérance à la teneur en sels ammoniacaux

Les données comparatives trouvées dans la littérature concernent surtout la toxicité aiguë de l'ammoniac (cf. tableau 11) et les salmonidés paraissent plus sensibles que les cyprinidés.

Tableau 11: Toxicité aiguë de l'ammoniac (NH<sub>3</sub>) vis-à-vis de quatre espèces d'après Russo (1985)

espèce	CL50 (96h.) en mg/l	auteur
truite arc-en-ciel	0,2 - 1,1	Russo (1985)
saumon rosé	0,08 - 0,1	"
crapet arlequin	0,49 - 4,6	"
barbue de rivière	1,8 - 3,8	"
vairon tête-de-boule	1,7 - 2,6	EPA (1993)

Les effets à long terme (1 à 12 semaines) sur différentes espèces (salmonidés et cyprinidés) apparaissent à des concentrations allant de 0,002 à 0,15 mg/l (Burkhalter et Kaya, 1977).

Concernant le mécanisme de contamination et d'action toxique, l'ammoniac, neutre et lipophile, va diffuser de l'eau vers le milieu intérieur de manière passive à travers l'épithélium branchial. Ce composé va alors affecter deux voies métaboliques cellulaires essentielles: la glycolyse et le cycle de Krebs conduisant à une déplétion en ATP et une acidose plasmatique (Smart, 1978). Celle-ci va entraîner une diminution de la capacité de transport d'oxygène par l'hémoglobine ce qui va augmenter la susceptibilité des poissons à des conditions d'hypoxie (Thurston, 1984). En présence d'ammoniac, la fonction respiratoire est également affectée au niveau tissulaire (hyperplasie de l'épithélium branchial) ce qui tendrait à réduire les échanges gazeux. Russo (1985) indique que les perturbations concernent aussi la prise alimentaire, l'assimilation et la croissance des organismes exposés à des doses sublétales.

Lors d'un essai sur cycle de vie du vairon tête-de-boule, Thurston et al. (1986) ont obtenu des effets significatifs sur le critère de survie de la première génération à 0,91mg/l d'ammoniac alors que des lésions cérébrales sur ces poissons ont été observées à des concentrations aussi faibles que 0,21mg/l. Sur la deuxième génération, le développement embryonnaire est affecté à 0,37mg/l. Cet essai ayant été initié avec des prolarves de 3 à 5 jours, il n'est malheureusement pas possible de savoir si les embryons de la deuxième génération sont moins tolérants à l'ammoniac.

Lors d'un essai SEL de 73 jours portant sur la truite arc-en-ciel, Solbé et al. (1989) ont évalué l'intensité des effets de l'ammoniac selon le stade embryonnaire au début de l'exposition. Lorsqu'elle est commencée dans un délai de 24h. après la fécondation, des mortalités supérieures à 70% ont été mesurées à 0,027mg/l. Lorsque l'exposition est initiée au stade embryonnaire d'apparition de l'oeil, 40% des individus sont morts à 0,27mg/l principalement au stade larvaire. La plus grande sensibilité des premiers stades embryonnaires est donc mise en évidence une nouvelle fois.

Il est également important de mentionner l'effet des nitrites et nitrates qui peuvent apparaître à cause des oxydations bactériennes successives de l'ion ammonium. Parmi ces deux composés, les nitrites exercent la toxicité la plus forte vis-à-vis des poissons par diffusion dans le sang et formation d'un composé stable avec l'hémoglobine qui devient non fonctionnelle pour le transport de l'oxygène. En terme de toxicité aiguë, Russo (1985) indique que la CL50(96h.) des nitrites est respectivement de 0,33 et de 7,57mg/l pour la truite arc-en-ciel et le vairon tête-de-boule. Thurston et al. (1978) ont montré, par ailleurs, que ce seuil de toxicité aiguë vis-à-vis de la truite arc-en-ciel est proche de la CMEO déterminée après exposition de truites fardées à différentes concentrations de nitrites depuis le stade juvénile sur une période de six mois.

Signalons qu'une augmentation de la concentration en ions chlorures et du pH (dans la gamme 6,4 - 9) conduisent à une diminution de la toxicité de ce composé azoté (CECPI, 1984).

Lors du suivi de la qualité physico-chimique de milieux d'essai, il est donc recommandé de compléter le dosage d'ammoniac par une mesure de la concentration en nitrites.

## 4- Présentation du modèle: le danio zébré

### 4.1- Description de l'espèce

Le danio zébré, aussi appelé "poisson zèbre", est un cypriniforme tropical de la famille des cyprinidés. C'est un poisson osseux, homocercue qui ne possède pas de nageoire adipeuse. La bouche est légèrement protractile et porte une paire de barbillons, les mâchoires ne possèdent pas de dents mais plusieurs rangées de dents pharyngiennes servant à broyer la nourriture.

Ce poisson fusiforme de petite taille (4,5 à 5 cm de long à l'âge adulte) a un corps cylindrique montrant sept à neuf stries longitudinales bleu-cobalt sur fond argenté qui se prolongent sur les nageoires caudales et anales; ses flans sont jaune-ocres.

A l'âge adulte, il est facile de distinguer le mâle de la femelle car cette espèce présente un dimorphisme sexuel. La femelle possède un abdomen plus bombé que le mâle, une ligne dorsale convexe et une papille génitale distincte (Ansari et al., 1982). Le mâle a un corps plus élancé, une nageoire anale plus longue, une ligne dorsale rectiligne (cf. figures 2 et 3) et présente une coloration plus vive que la femelle.

Le cycle de vie de cette espèce est court car seulement 75 à 90 jours sont nécessaires à sa maturation en condition artificielle.

Ce poisson d'eau douce vit naturellement dans de petits cours d'eau plus ou moins rapides et sa distribution géographique couvre certains affluents du Gange, plusieurs cours d'eau de la côte Coromandel de l'Inde et de certaines régions de Birmanie (Laale, 1977). Dans ces régions, l'eau est douce et peu chargée en sels minéraux. La température est variable d'un cours d'eau à l'autre mais elle reste cependant supérieure à 20°C; des températures inférieures à 23°C conduisant à une inhibition de la reproduction. Le danio zébré a un comportement grégaire et se reproduit dans des zones peu profondes présentant des herbiers où il dépose ses oeufs non adhérents.

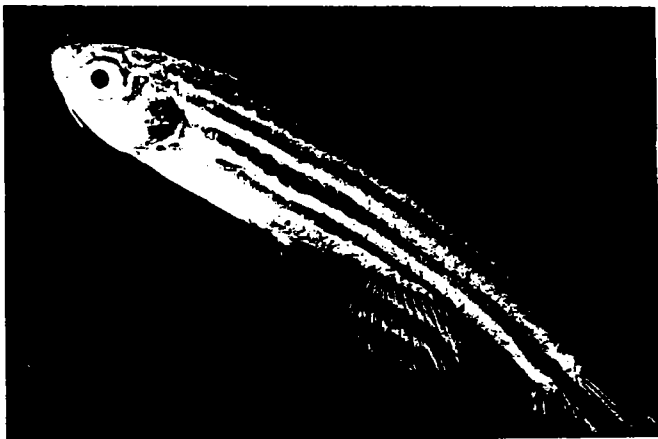


Figure 2: Danio zébré adulte mâle



Figure 3: Danio zébré adulte femelle

La position systématique de cette espèce est la suivante:

Embranchement:	Vertébrés
Super classe:	Gnathostomes
Classe:	Ostéichthyens
Sous classe:	Actinopterygiens
Infra classe	Néopterygiens
Division	Halecostomiens
Sous division	Téléostéens
Infra division	Eutélostéens
Super ordre:	Ostariophysiens
Ordre:	Cypriniformes
Sous ordre:	Cyprinoïdes
Super famille	Cyprinoïdea
Famille:	Cyprinidae
Sous famille:	Rasborinae
Genre:	Danio
Sous genre:	Brachydanio
Espèce:	rerio

La dénomination "poisson zèbre" fait référence aux rayures du corps de ce poisson mais serait une source de confusion selon Laale (1977) avec le ptérois (*Pterois volitans*) qui présente également des zébrures mais ne possède aucune parenté phylogénétique avec le *Brachydanio rerio*. L'auteur préconise donc d'employer le nom vulgaire "danio zébré".

Cette espèce a fait l'objet de nombreuses études depuis les années 30 en raison de la simplicité de son élevage. Des recherches fondamentales en génétique et en biologie du développement portent sur ce poisson qui constitue également un bon modèle de toxicologie du fait de sa sensibilité à une grande variété de produits chimiques. Une revue complète de la littérature portant sur sa biologie et les recherches entreprises sur cette espèce a été publiée par Laale en 1977.

## 4.2- Intérêt comparatif de ce modèle pour les essais SEL

Le choix d'une espèce est souvent le résultat d'un compromis entre sa sensibilité aux toxiques et des considérations économiques et pratiques. En effet, les possibilités d'approvisionnement et le coût des géniteurs, leur prolificité, les installations d'élevage nécessaires, la difficulté des manipulations sont des facteurs de sélection importants. Se pose aussi la question de la représentativité écologique de l'espèce utilisée. On ne peut pas considérer par exemple le danio zébré comme représentatif des milieux aquatiques septentrionaux. Des espèces endémiques voire introduites sont plus appropriées. Pourtant, les cycles saisonniers de la

reproduction des espèces des régions tempérées rendent impossible la réalisation d'essais embryo-larvaires tout au long de l'année. Bien que des techniques de stimulation de la reproduction existent, leur mise en oeuvre requière un matériel et une technicité importante.

Ainsi, malgré son origine asiatique, la facilité d'élevage du danio zébré, sa sensibilité "toxicologique" et l'importante documentation disponible à son sujet en font un bon modèle de toxicologie pour évaluer la toxicité "intrinsèque" de substances ou d'effluents.

Cette espèce est d'ailleurs la plus utilisée en Europe et fait partie des espèces recommandées dans la ligne directrice de l'OCDE pour la réalisation d'essais de toxicité aiguë (directive 203 de 1981) et des essais SEL (directive 210 de 1992).

Les avantages de son utilisation concernent:

- la simplicité de maintenance des géniteurs au laboratoire et la capacité réduite des aquariums nécessaires étant donné la petite taille de cette espèce,
- la résistance des géniteurs aux infections et leur tolérance à des fluctuations des paramètres physico-chimiques du milieu (température, dureté..),
- sa reproduction toute l'année, avec des intervalles courts entre les pontes (5 à 10 jours),
- la libération des oeufs qui se déroule en quelques heures après le lever du jour (même artificiel),
- le nombre important d'oeufs produits par femelle (100 à 500 par ponte),
- la transparence des oeufs (l'observation d'éventuelles perturbations du développement embryonnaire est donc possible) et leur non adhérence (ce qui facilite leur manipulation),
- la rapidité de l'embryogenèse (72 à 96 heures),
- sa sensibilité aux toxiques du même ordre de grandeur que celle d'autres espèces (Garric et al., 1991).

D'autres espèces peuvent être exploitées pour la réalisation d'essais SEL et par quelques exemples, nous aborderons les implications pratiques inhérentes à leur élevage ainsi qu'à l'obtention de leurs oeufs.

- La fondule de Floride est un poisson d'eau chaude avec un cycle de vie court (environ 2 mois). Bien que cette espèce produise des oeufs toute l'année, ses pontes sont espacées d'une quinzaine de jours au lieu de 5 à 10 jours pour le danio zébré. De plus, la fondule femelle étale la libération de ses oeufs sur toute une journée ce qui n'est pas compatible avec la réalisation d'essais SEL où il est nécessaire de disposer au même moment d'un nombre important d'oeufs avec des stades de développement initiaux et homogènes (Bresh, 1982).
- Le vairon tête-de-boule est l'espèce la plus utilisée aux Etats-Unis et au Canada. Il fait l'objet d'essais embryo-larvaires ou larvaires uniquement (Norberg-King, 1989). Les oeufs peuvent s'obtenir toute l'année grâce à un conditionnement thermique et

photopériodique. L'inconvénient de cette espèce réside dans l'étalement de ses pontes ce qui ne permet pas d'initier des essais complets avec des embryons de moins de 36h. si l'on dispose d'une dizaine de couples reproducteurs. De plus, les oeufs sont adhérents et doivent être "décrochés" délicatement des supports de pontes.

- La carpe commune originaire d'Asie a été introduite avec succès dans la plupart des régions tropicales ou tempérées du globe en raison de sa grande adaptabilité et sa robustesse. Ceci s'explique par son élevage aisé et sa prolificité très importante. Sa reproduction artificielle est maîtrisée ce qui permet l'obtention d'oeufs fécondés presque toute l'année. Une femelle mature peut produire environ 100.000 oeufs par kilogramme de poids vif ce qui autorise la réalisation simultanée de nombreux essais sur un matériel biologique homogène (Lefebvre, 1990). La mise en condition de reproduction des géniteurs (par conditionnement thermique et injection hormonale) et la récolte des oeufs nécessitent cependant une bonne technicité.
- La truite arc-en-ciel et d'autres salmonidés sont également utilisés aux Etats-Unis ainsi qu'au Canada et une méthode standard pour la réalisation d'essai embryo-larvaires a été établie (Environnement Canada, 1992b). Les techniques d'induction de ponte et de fécondation artificielle permettent de disposer d'oeufs sept mois par an en utilisant la truite arc-en-ciel et le saumon de l'Atlantique. L'élevage des géniteurs est plus délicat que pour les autres espèces citées plus haut du fait de la sensibilité de ces espèces à la qualité physico-chimique de l'eau et aux infections. Des quantités d'oeufs importantes peuvent être obtenues à partir d'une seule femelle (1200 à 1600 par kg de poids vif) mais comme pour la carpe, la récupération des gamètes avant la fécondation artificielle nécessite des installations et des compétences importantes. Un autre inconvénient de cette méthode réside dans la difficulté de contrôler le degré de maturation ovocytaire qui peut conditionner la viabilité des embryons (Lefebvre, 1990).

Notons que la durée de développement du stade oeuf jusqu'à la fin de la phase prolarvaire dure 45 jours pour la truite arc-en-ciel (à 10°C) alors qu'elle est comprise entre 7 et 15 jours pour le danio zébré, le vairon tête-de-boule ou la carpe. Ainsi, la durée prolongée des essais sur salmonidés implique un couple effort/coût plus important.

Un avantage de la fécondation artificielle est de pouvoir évaluer les effets des substances sur l'étape de fusion des gamètes qui est également une phase critique du cycle de vie (Roubaud, comm. pers.). Un autre intérêt de cette technique est de permettre l'initiation des essais avec des embryons dès les premiers stades de développement ce qui garantit une sensibilité optimale aux essais SEL.

Par ailleurs, l'utilisation de gamètes issus de femelles et mâles appartenant respectivement à une même fratrie (e.g. deux frères croisés avec deux soeurs) est un gage d'homogénéité génétique selon Lefebvre (1990). En terme de représentativité écologique, il n'est peut être



pourtant pas judicieux de viser cette homogénéité qui sous-entend un nivellement de la sensibilité des organismes; situation peu répandue dans le milieu naturel. La prise en compte de la variabilité génétique des populations naturelles (existant au sein de chaque espèce) paraît préférable même si elle conduit à une dispersion plus importante des résultats. A ce sujet, les travaux d'Environnement Canada (1992b) attribuent le qualificatif "d'acceptable" à des coefficients de variation situés entre 20 et 30%. L'utilisation d'oeufs ou de gamètes provenant d'un groupe de géniteurs (sans relation de parenté, de préférence) nous semble un facteur important d'amélioration de la signification écologique des résultats.

### 4.3- Sensibilité du danio zébré par rapport à d'autres espèces

Le tableau 12 illustre les différences de sensibilité entre trois espèces (la truite arc-en-ciel, du danio zébré et de la fondule de Floride) déterminés par Fogels et Sprague (1977) après réalisation de tests de toxicité aiguë sur cinq substances de référence.

Tableau 12: Comparaison de la sensibilité de trois espèces lors d'une exposition aiguë à cinq substances de référence (Fogels et Sprague, 1977)

substance	espèce	CL50(96h.) en mg/l	$\frac{CL50}{CL50(truite)}$
cuivre	truite arc-en-ciel	0,102	
	danio zébré	0,149	1,5
	fondule de Floride	1,27	12,5
Na-PCP	truite arc-en-ciel	0,23	
	danio zébré	1,13	4,9
	fondule de Floride	1,74	7,5
phénol	truite arc-en-ciel	11,6	
	danio zébré	29,0	2,5
	fondule de Floride	36,3	3,1
Picloram	truite arc-en-ciel	26,0	
	danio zébré	35,5	1,4
	fondule de Floride	26,1	1,0
SDS	truite arc-en-ciel	4,62	
	danio zébré	7,97	1,7
	fondule de Floride	8,10	1,8

Na-PCP: pentachlorophenate de sodium (pesticide)

Picloram: acide 4-amino-3,5,6-trichloropicolinique (herbicide)

SDS: sodium dodecyl sulfâte (détergent anionique)

Ces informations indiquent que le danio zébré est de sensibilité légèrement inférieure à la truite arc-en-ciel avec un rapport maximum des CL50 égal à 5 pour le Na-PCP, les autres

rapports étant inférieurs ou égaux à 2,5. La fondule de Floride possède une sensibilité proche de celle du danio zébré mais montre une plus forte tolérance au cuivre.

Lorsque les différences de sensibilité sont comparées au niveau des stades embryo-larvaires (tableau 13), il apparaît, pour le cadmium, le chrome et l'atrazine, une sensibilité supérieure du saumon de fontaine ou de la truite arc-en-ciel par rapport aux deux cyprinidés (danio zébré et vairon tête-de-boule) dans un rapport de 2 à 3.

Tableau 13: Comparaison de la sensibilité de plusieurs espèces au terme d'essais embryo-larvaires sur trois substances (les résultats sont exprimés en mg/l)

substance	espèce	CTMA*	durée (jrs.)	auteur
chrome	danio zébré	3 mg/l	30	Dalverny (1993)
	vairon tête-de-boule	2 mg/l	32	Norberg-king (1989)
	truite arc-en-ciel	0,073 mg/l	60	Sauter (1976)
cadmium	danio zébré	21 µg/l	30 à 75	Dalverny (1993)
	vairon tête-de-boule	37 - 57 µg/l	60	Pickering (1972)
	saumon de fontaine	7 - 12 µg/l	60	Sauter (1976)
atrazine	danio zébré	750 µg/l	30	Dalverny (1993)
	saumon de fontaine	240 µg/l	90	Macek (1976)

\*Concentration en Toxique Maximale Admissible (sauf pour l'atrazine où il s'agit des CME0)

L'ensemble de ces informations amènent à attribuer au modèle "cyprinidé" du danio zébré une sensibilité satisfaisante à différents composés organiques et inorganiques.

Les différences de durée d'essais indiquées entre les salmonidés et les cyprinidés tiennent compte des temps nécessaires pour atteindre approximativement les mêmes stades de développement. En effet, la durée du développement du stade oeuf jusqu'à la fin de la phase prolarvaire dure 45 jours pour la truite arc-en-ciel (maintenue à 10°C) alors qu'elle est de sept jours pour le danio zébré (à 26°C).

#### 4.4- Variabilité des résultats des essais SEL

En plus de la sensibilité relative des espèces, il est important de connaître la variabilité des réponses obtenues lors d'essais successifs dans le même laboratoire (répétabilité) et lors d'essais menés en parallèle par différents laboratoires (reproductibilité). Le tableau 14 reprend les résultats de répétabilité calculés à partir de CME0 ou de valeurs chroniques recensées par plusieurs auteurs sur trois espèces.

Tableau 14: Exemples de valeurs de répétabilité calculées au terme d'essais embryo-larvaires

essai (nombre)	espèce	durée (jrs.)	critère(s)	toxique	CV%*	auteur
embryo-larvaire (2)	danio zébré	15	survie	zinc	< 10	Dave (1987)
embryo-larvaire (4)	danio zébré	8	croissance	cadmium	10	Garric (1991)
larvaire (5)	"sheepshead minnow"	7	survie et croissance	cuivre SDS	40 38	Hughes (1989)
larvaire (6)	vairon tête-de-boule	7	survie et croissance	PCP SDS	39 23	Pickering (1988)

PCP: Pentachlorophénol (pesticide)

SDS: Sodium sodécylsulfate (détergent anionique)

\* Coefficient de Variation

Il est difficile de comparer les variabilités recensées pour les différentes espèces car les essais ne portent pas sur les mêmes stades de développement et sur les mêmes xénobiotiques.

Néanmoins, les réponses apportées par le danio zébré exposé au zinc et au cadmium montrent une répétabilité très satisfaisante. Sur cette espèce, Dave (1987) indique un coefficient de variation de 15% en comparant les CMEO obtenues sur le zinc par cinq laboratoires.

## 5- Utilisation de bioessais pour l'évaluation de la toxicité d'effluents et de sédiments

### 5.1- Introduction

Un nombre important de bioessais est proposé pour l'évaluation de la toxicité sublétales de substances pures (métaux ou molécules de synthèse) et de nombreux travaux relatent leur application à des échantillons "complexes": effluents et sédiments. Concernant les essais embryo-larvaires sur poisson, l'espèce la plus citée dans la littérature est le vairon tête-de-boule qui fait l'objet d'un protocole standard sur effluents (EPA, 1989). Une méthodologie adaptée à l'évaluation de la contamination de sédiments par exposition directe ou à différents extraits a également été développée sur les stades embryonnaires et larvaires de cette espèce (Francis et al., 1984; Dawson et al., 1988).

Avant de présenter plus globalement les approches "biologiques" adaptées à l'évaluation de la toxicité d'effluents et de sédiments, nous aborderons les caractéristiques physico-chimiques générales de ces échantillons.

## **5.2- Application des bioessais aux effluents**

### **5.2.1- Introduction**

La mesure de la toxicité des effluents est un domaine très vaste du fait de la diversité de leur origine et des moyens analytiques et biologiques qui sont actuellement proposés pour leur suivi. Nous verrons succinctement les caractéristiques physico-chimiques de certains rejets industriels et urbains ainsi que les bioessais et précautions méthodologiques adaptés à l'évaluation de leur toxicité.

### **5.2.2- Généralités sur les effluents de station d'épuration**

Les eaux usées urbaines regroupent des apports hétérogènes liés aux rejets domestiques et aux activités artisanales et industrielles insérées dans le tissu urbain. La plupart des stations d'épuration (STEP) reçoivent aussi des eaux pluviales étant donné la prédominance de réseaux unitaires d'évacuation des eaux (Ménard, 1992). L'efficacité des STEP est généralement bonne pour la réduction de la charge en graisses, en particules décantables et pour la dégradation de la matière organique et de certaines molécules (e.g. détergents). Par contre, la majeure partie des molécules organiques, des substances minérales ne font que transiter dans les stations et sont rejetées dans le milieu naturel (Nguyen, 1995). Ménard (1992) ajoute à cela que le taux d'épuration des STEP n'est jamais maximum (69% en moyenne pour la France) et qu'à l'impact souvent eutrophisant des rejets s'ajoute une contamination microbiologique (germes pathogènes ou bactéries des boues activées).

Au niveau physico-chimique, il est possible de proposer des caractéristiques générales pour les effluents en sortie de STEP. Ils possèdent un pH souvent compris entre 7 et 8, une conductivité élevée et une teneur en matières en suspension qui dépend du fonctionnement de la station. Ce dernier conditionne aussi les quantités de matière organique rejetées et la demande biochimique en oxygène (DBO) des effluents qui peut, selon Vernier (1992), représenter à elle seule une menace importante (par asphyxie) pour la faune aquatique du milieu récepteur selon ses caractéristiques (débit, température). A cela s'ajoutent des concentrations généralement importantes en ammoniac et phosphore, complétées par un mélange de très nombreuses substances organiques de familles chimiques différentes (e.g. solvants, constituants des lessives, hydrocarbures aromatiques et aliphatiques). Nguyen (1995) indique, par ailleurs, que les métaux lourds (Zn, Cu, Pb, Cr, Ni, Cd) ne sont présents en général qu'à de faibles concentrations dans ces effluents du fait de leur élimination importante par adsorption à la matière particulaire décantable.

Parmi les molécules organiques détectées régulièrement, plusieurs d'entre elles sont considérées comme des substances prioritaires selon des critères de toxicité, de biodégradabilité et de bioaccumulation retenus par plusieurs instances (inter)nationales tels que l'OMS, l'US-EPA ou la CEE (Nguyen, 1995). Citons également la présence de molécules à activité tératogène dans un effluent urbain de la région Lyonnaise (Le Douarin, 1994) et la

détection d'activités mutagènes dans les effluents de plusieurs STEP de Californie (Rappaport et al., 1979).

### ▣ caractéristiques chimiques et toxiques d'un détergent anionique: l'alkylbenzène sulfonate linéaire ou LAS

Au cours des essais sur effluents de STEP dont il sera question dans la partie expérimentale, des teneurs importantes de ce détergent ont été mesurées. Nous avons choisi de nous intéresser à cette substance afin d'évaluer sa contribution à la toxicité de ces effluents.

Le LAS est le principal surfactant anionique utilisé dans la formulation des détergents et lessives, à travers le monde (McAvoy et al., 1993). Les formulations commerciales contiennent un mélange de molécules avec une structure de base identique (cf. fig. 4) et avec une chaîne carbonée de taille différente.

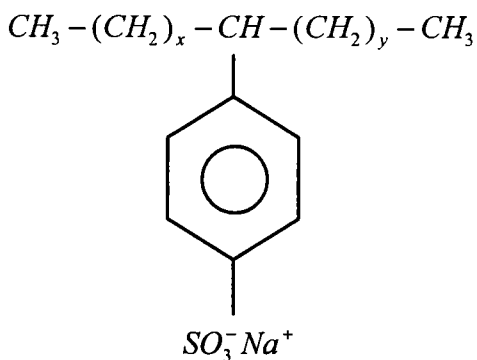


Figure 4: Formule développée du LAS ( $n = x+y = 7$  à 11 unités de carbone)

La solubilité du LAS dans l'eau est de 350 mg/l à 20°C et sa biodégradabilité est rapide puisque le temps de demi-vie est de 0,23 jours pour un groupement alkyl composé de 12 atomes de carbone, et de 0,73 jours pour le noyau benzénique (Larson et Payne, 1981). Le traitement par boues activées des eaux domestiques en station d'épuration permet d'ailleurs un taux d'élimination du LAS supérieur à 95% (McAvoy et al., 1993; Nguyen, 1995).

Aux Etats-Unis, les eaux domestiques d'une cinquantaine de villes renferment des concentrations en LAS comprises entre 4,2 et 5,7mg/l à l'entrée des stations d'épuration qui sont ramenées entre 0,04 et 1,04mg/l en sortie (McAvoy et al., 1993). Selon les cours d'eau étudiés et le taux d'épuration des eaux domestiques dans les pays concernés, les concentrations sont très variables et atteignent parfois quelques milligrammes par litre (Larson et Payne, 1981; Thoumelin, 1991). Dans le Rhin, les concentrations en LAS mesurées vont de 0,01 à 0,06mg/l (Cheneval, 1993).

La toxicité du LAS vis-à-vis des poissons est conditionnée par plusieurs facteurs. Parmi ceux-ci, nous avons déjà évoqué la dureté au § A.2.2.1, mais la longueur de la chaîne carbonée, la concentration en oxygène dissous, l'acclimatation préalable ainsi que le stade de développement des poissons sont également à prendre en compte (Hokanson et Smith, 1971;

Abel, 1974). Ainsi, au cours d'un test sur le cycle de vie du vairon tête-de-boule, Holman et Macek (1980) ont observé une plus forte sensibilité des stades embryo-larvaires au LAS. L'importance de ces facteurs a limité les comparaisons de sensibilité qu'il est possible de faire entre les espèces car la description des molécules utilisées ou la dureté du milieu ne sont pas toujours précisées. Les tableaux 15 et 16 réunissent néanmoins quelques informations intéressantes.

Tableau 15: Toxicité **aiguë** du LAS vis-à-vis de trois espèces de poisson

espèce	CL50(96h.) en mg/l	dureté exprimée en CaCO <sub>3</sub> (mg/l)	longueur (n) de la chaîne carbonée	auteur
vairon tête- de-boule	12,3	40	n moy.=11,2	Holman (1980)
	0,86	40	n moy.=13,3	"
crapet arlequin	3	nc	12	Swisher (1964)
	0,6	nc	14	"
truite arc- en-ciel	1,7	nc	n moy.=11,8	Abel (1974)

nc: non communiqué

Tableau 16: Toxicité **sublétale ou chronique** du LAS vis-à-vis de deux espèces de poisson

espèce	CSEO en mg/l	dureté exprimée en CaCO <sub>3</sub> (mg/l)	longueur (n) de la chaîne carbonée	auteur
vairon tête-de- boule (essai sur cycle de vie)	5,1 - 8,4	39	11,2	Holman (1980)
	0,48	200	11,7	
	0,11-0,25	39	13,3	
crapet arlequin (essai SEL)	1,8	150	n moy.=11,5	Hokanson (1971)

Il ressort que la toxicité de ce détergent anionique est d'autant plus forte que la chaîne carbonée est longue. Il est probable qu'une augmentation du caractère lipophile des molécules soit en cause. Par ailleurs, on ne note pas de différence de toxicité importante entre les essais aigus et chroniques sur le vairon tête-de-boule.

Un des mécanismes d'action du LAS consiste en une atteinte de l'épithélium branchial qui se traduit par une hyperplasie voire même des lésions cellulaires. La modification induite de la perméabilité membranaire semble entraîner la mort des individus par asphyxie plutôt que par dysfonctionnement de l'osmorégulation (Swisher, 1964; Brémond et Perrodon, 1979). Lors d'expositions sublétales, Abel (1974) a noté des retards de croissance qui seraient liés à une perturbation du comportement de prise alimentaire par atteinte de la chémoréception.

Des effets au niveau du milieu intérieur ne sont pas à exclure d'après l'étude de Tovell et al. (1974) qui a mesuré des concentrations de Sodium Lauryl Sulphate (un autre détergent anionique) dans les tissus de truite arc-en-ciel et de poisson rouge après une exposition aiguë. Les auteurs ont d'ailleurs mesuré une bioaccumulation et une toxicité de ce détergent d'autant plus importante que la dureté du milieu est élevée.

### 5.2.3- Généralités sur les effluents industriels

Pour les effluents industriels, il est encore plus difficile d'identifier des caractéristiques physico-chimiques générales. Elles dépendent entièrement du type d'activité et des éventuels procédés d'épuration mis en oeuvre. Globalement il a été évalué qu'en 1991, les industries françaises rejetaient tous les jours dans le milieu naturel ou dans le réseau d'assainissement collectif: 1570 tonnes de matières en suspension, 2140 tonnes de matières oxydables et 35.660 k.équitox\* de matières toxiques. Le secteur agro-alimentaire était à l'origine d'environ 45% de la pollution en matières oxydables alors que les industries chimiques et de traitement de surface contribuaient respectivement à 45 et 40% de la pollution toxique. Enfin les industries agro-alimentaires et chimiques étaient respectivement responsables de 37 et 32% de la pollution azotée (Lopès, 1994).

Il est possible de décrire les caractéristiques de certains de ces effluents; ceux issus des laiteries sont très concentrés en matières organiques dissoutes (DBO5 pouvant atteindre 5g d'O<sub>2</sub>/l) et peuvent être très acides ou très alcalins.

L'industrie pétrochimique rejette principalement des hydrocarbures aliphatiques et aromatiques et des sulfures mais peu de matières biodégradables (DBO5 entre 150 et 500mg/l).

Les rejets des industries textiles contiennent pour leur part des solvants, des colorants, des sulfures, des graisses, des substances réductrices et parfois des pesticides. Ces eaux sont acides ou alcalines et présentent une forte DBO. Dans le cas des industries papetières, la composition des rejets dépend de la méthode de production de pâtes (chimique et/ou mécanique) et de la technique de blanchiment utilisées (chlore ou ozone). Oikari et Niittylä (1985) indiquent, de plus, que ces effluents sont caractérisés par des teneurs importantes en matières organiques et particulaires (jusqu'à 3g/l), en lignine, en sulfites, en alumine, en phénols chlorés, en acides résineux et en métaux lourds. Des concentrations élevées en organo-mercuriels dans les effluents de certaines papeteries suédoises ont été dosées et ont pour origine l'acétate de phénylmercure utilisé comme antifongique pour la conservation des pâtes. Des composés "à risque" comme des dioxines et furanes ou des substances à activité mutagène ont également été identifiés dans ces rejets (Douglas et al., 1983, Owens, 1991; Lee et al., 1991).

---

\* l'équitox est l'unité qui correspond à 100/CI50 sur la base du test de toxicité aiguë sur la daphnie (*Daphnia magna*)

### 5.2.4- Méthode d'évaluation de la toxicité des effluents

Pour une évaluation du risque que font courir de tels rejets sur la faune et la flore du milieu récepteur et en complément de leur caractérisation physico-chimique, une approche biologique apporte un niveau d'intégration important en terme de mesure effective de la toxicité aiguë ou chronique (OCDE, 1987). En effet, pour un bon nombre d'effluents, toutes les substances présentes ne sont pas toujours connues sur un plan toxicologique. Ceci rend difficile la prévision de l'impact du mélange de composés chimiques rejetés du fait des interactions chimiques possibles (Mather-Mihaich, 1991). D'autant plus que certains effluents peuvent ne pas manifester de toxicité aiguë alors que les méthodes analytiques ont identifié et quantifié des composés à des concentrations toxiques (Garric, comm. pers.).

Cette approche complémentaire chimique et biologique est d'ailleurs mise en oeuvre pour le contrôle de l'impact de rejets sur le milieu naturel dans de nombreux pays. Aux Etats-Unis par exemple, l'EPA (instance compétente) accorde les autorisations de rejet d'après le dosage de substances prioritaires et l'établissement des seuils de toxicité estimés par une batterie d'essais chroniques portant sur une algue (croissance), sur un microcrustacé (survie et reproduction) et sur une larve de poisson (malformation, croissance, survie). En Suède, les critères d'évaluation portent sur les résultats des analyses chimiques, des essais de toxicité aiguë et sublétales ainsi que sur des tests de biodégradation et de bioaccumulation (Bengtsson et Renberg, 1986). En France, les agences de l'eau prennent en compte, pour le calcul de redevance, plusieurs mesures physico-chimiques et le résultat d'un seul essai de toxicité aiguë alors que beaucoup d'effluents ne révèlent leur nocivité qu'au cours d'essais chroniques (Norberg et Mount, 1985). Un travail méthodologique important est pourtant mené dans notre pays pour appréhender de façon plus complète la toxicité des effluents (Vasseur et al., 1991). Il est vrai que l'éventail des méthodes de laboratoire disponibles et éprouvées pour l'évaluation de l'impact des rejets en terme de toxicité aiguë et chronique à différents niveaux trophiques s'est considérablement élargi durant les 20 dernières années. Des essais de toxicité spécifique permettant de déceler des substances mutagènes ou inductrices de systèmes de défense (e.g. enzymes de détoxification, protéines de séquestration) ont également vu le jour et sont de plus en plus exploités.

Lors d'une enquête menée par Garric et al. (1993) à propos des essais aigus et chroniques préconisés par des personnes compétentes de différents pays occidentaux, les tests les plus souvent cités ont été:

- le test Microtox portant sur l'inhibition de la bioluminescence d'une bactérie (*Photobacterium phosphoreum*) pendant 15 ou 30 mn.,
- l'essai de croissance algale (*Selenastrum capricornutum*) durant 4 jours,
- l'essai de survie et reproduction de la céridaphnie (*Ceriodaphnia dubia*) sur 7 jours,
- l'essai de survie et croissance des stades embryo-larvaires de poissons (*Pimephales promelas* ou *Brachydanio rerio*).



Lors d'un vaste projet de contrôle de rejets industriels au Canada, Costan et al. (1993) ont retenu cette batterie de tests si ce n'est qu'ils ont soustrait l'essai sur poisson et ajouté un essai de mutagenèse (SOS Chromotest).

Une approche intéressante est également menée depuis plusieurs années aux Etats-Unis en intégrant des bioessais et des techniques chimiques et analytiques pour parvenir à l'identification des causes principales de toxicité des rejets. Ceci permet une orientation des procédés d'épuration à mettre en place. Ce procédé baptisé TIE (Toxicant Identification Evaluation) permet par exemple d'évaluer la contribution respective des métaux lourds, des composés organiques apolaires ou de l'ammoniac à la toxicité globale de l'effluent (Gasith et al., 1988; Jop et al., 1991). L'ammoniac est effectivement une cause importante de toxicité pour les poissons lors d'essais sur les effluents de STEP et de certaines industries chimiques et agro-alimentaires (Russo, 1985; Environnement Canada, 1981; Burkhard et Jenson, 1993).

### **5.2.5- Apports des essais SEL sur poisson dans les batteries de bioessais**

Après la mise en oeuvre de batteries de bioessais sur des échantillons d'effluents, il ressort généralement que la sensibilité des stades embryo-larvaires des poissons est moindre que celle des algues ou des cériodaphnies (Garric, comm. pers.). Ceci est en partie lié au cycle de vie complet considéré pour les essais sur algues et cériodaphnies alors que les essais sur poissons ne considèrent que les premières étapes du cycle de vie. L'importance de leur mise en oeuvre peut pourtant se définir en deux points. Tout d'abord, les poissons sont les représentants d'un niveau trophique, ce sont des vertébrés (ce qui les rapproche de l'homme) et leur degré de complexité supérieur aux autres modèles sous-entend une sensibilité potentielle plus grande à des xénobiotiques doués de modes d'actions spécifiques. De plus, les transitions de l'état unicellulaire à l'état pluricellulaire et différencié que comprend le modèle embryo-larvaire multiplient les cibles moléculaires ou fonctionnelles qui peuvent être atteintes de façon immédiate ou différée (Lefebvre, 1990). Enfin, ces essais sont les seuls à pouvoir révéler des effets tératogènes dont la prise en compte est très importante (Birge et al., 1985).

Ce dernier avantage peut s'illustrer par l'étude de Ruoppa et Nakari (1988) qui ont étudié la toxicité sublétales d'un effluent de papeterie grâce à des essais embryo-larvaires de 14 jours sur le danio zébré. Aucune mortalité n'a été constatée mais les auteurs ont observé des malformations au niveau des yeux et de la colonne vertébrale ainsi que des oedèmes touchant différents tissus.

Un certain nombre d'essais sur ce type d'effluent ont mis à profit la sensibilité des stades embryo-larvaires du vairon tête-de-boule, du bar d'Amérique et du brochet pour révéler des effets sur le taux d'éclosion, la croissance et la survie larvaire (Burton et al., 1984; Tana et Nikunen, 1986; Owens, 1991). D'autres évaluations de la toxicité d'effluents industriels et urbains ont utilisé des embryons et larves de carpes et de six espèces marines (hareng, morue, bar d'Amérique, choquemort, plie rouge et "sheepshead minnow") et les perturbations

généralement mentionnées concernent des inhibitions de croissance et des mortalités larvaires (Weis et al., 1989; Hutchinson et Williams, 1989; Hughes, 1989; Costello et Gamble, 1992; Kaur et al., 1993). Les deux derniers auteurs mettent en rapport certains effets observés avec certaines caractéristiques physico-chimiques des échantillons analysés. De faibles teneurs en oxygène dissous et surtout des concentrations élevées en ammoniac des effluents de STEP pourraient être la cause des mortalités larvaires observées par Costello et Gamble (1992). Le même constat est fait par Kaur et al. (1993) sur l'effluent d'une usine d'engrais. Ces auteurs indiquent également la possibilité de mortalités embryonnaires par asphyxie pour des effluents riches en matière en suspension issues de papeteries ou de tanneries. Enfin, la présence de concentrations élevées de chlore (2,6g/l) dans ce dernier rejet semble contribuer à une grande part de sa toxicité. Ces constats soulignent les problèmes expérimentaux liés à la réalisation de bioessais sur effluents qui sont des mélanges souvent complexes de substances de solubilité différentes, parfois volatiles et instables (Lloyd, 1989).

### **5.2.6- Choix techniques lors des essais sur effluent**

Concernant les méthodes relatives à l'échantillonnage, la conservation et les techniques d'ajustement (O<sub>2</sub>, pH), une directive CEN (1995) indique en détail les précautions à prendre. Nous évoquerons tout de même certains choix méthodologiques qui émanent de plusieurs travaux.

Pour l'échantillonnage des rejets, le choix du lieu de prélèvement est primordial et il est recommandé de recueillir un échantillon moyen sur 24h. par exemple de manière à intégrer les variations de composition et de débit au cours du temps (Lloyd, 1989). Une question importante concerne également la température et la durée de conservation. Les effluents ont effectivement tendance à se transformer rapidement après le prélèvement par des processus (photo)chimiques et biologiques (Lenore et al., 1989). Pour des durées de conservation inférieures à 36h., la directive de l'EPA (1989) recommande la réfrigération des effluents. Nous aborderons la possibilité de congeler les échantillons dans la partie expérimentale.

D'autres choix concernent l'ajustement de l'acidité, des teneurs en oxygène dissous et en matière en suspension (MeS). Un protocole proposé par Environnement Canada (1992b) conseille de ne pas réajuster le pH des échantillons acides ou basiques car cette caractéristique constitue un aspect de la toxicité du rejet étudié. De plus, les auteurs rappellent que des réajustements de pH peuvent modifier la toxicité des substances présentes comme nous l'avons également signalé au § A.2.2.2. Selon les directives CEN (1995): si les objectifs de l'essai sont d'étudier la toxicité de l'effluent indépendamment du pH, un réajustement est possible s'il ne conduit pas à la formation d'un précipité. La discussion relative à la concentration en oxygène dissous des échantillons est similaire, d'autant qu'une aération peut entraîner l'élévation du pH (par entraînement du CO<sub>2</sub>) et favoriser l'élimination de substances volatiles.

Nous préconisons, de plus, de rechercher les tolérances des organismes utilisés à ces paramètres (cf. § A.3) et de mesurer leur niveau dans les plus fortes concentrations testées au moment de la préparation des dilutions et après 24 heures. Notre expérience nous a montré que dans le cadre d'essais sublétaux, les dilutions faites sont telles que l'effet "tampon" de l'eau de dilution ajoutée rend les conditions d'acidité ou d'hypoxie compatibles avec la survie des organismes d'essai. Si le réajustement de ces caractéristiques des échantillons n'est pas jugé nécessaire, leur suivi tout au long de l'essai est toutefois recommandé.

Les valeurs importantes de DBO des effluents de STEP conduisent pourtant parfois à des conditions d'hypoxie surtout lorsque s'ajoute la dégradation des restes de nourriture. Les teneurs élevées en MeS qu'ils renferment sont également une cause de toxicité. On peut citer l'asphyxie des oeufs de poisson que ces particules provoquent ou bien la gêne du nourrissage des daphnies. Une fois rejetées dans le milieu naturel, ces particules sédimentent rapidement ce qui autorise d'aborder séparément la toxicité des substances solubles des effluents et les matières particulières (et les micropolluants adsorbés). Leur séparation par décantation, filtration ou centrifugation permet la détermination de l'impact de ces deux phases (Environnement Canada, 1992b).

## **5.3- Application des bioessais aux sédiments**

### **5.3.1- Introduction**

Le contrôle du degré de contamination du sédiment est un domaine tout aussi complexe que celui des effluents en raison en partie de la diversité des éléments toxiques retenus par le substrat à partir de ces mêmes rejets. A cette source de contamination s'ajoute toutes les pollutions diffuses liées, par exemple, au lessivage des pesticides à partir des terres agricoles (Munoz, 1992). De nombreux micropolluants ont, en effet, une faible solubilité dans l'eau et ont tendance à s'adsorber sur la matière en suspension qui est amenée plus ou moins rapidement (selon la vitesse du courant) à sédimenter sur le fond des cours d'eau (Reynoldson et Day, 1993). Une autre voie de contamination de ce compartiment repose sur l'action de filtre qu'il exerce vis-à-vis des composés de la lame d'eau qui percole à travers la couche sédimentaire dans le sens du courant ou bien en allant alimenter les nappes adjacentes au cours d'eau. Le substrat agit à la manière d'un filtre chimique du fait des propriétés fixatrices des argiles et de la matière organique présente (Golterman et al., 1983). En conséquence, de nombreux sédiments contiennent des concentrations beaucoup plus importantes en micropolluants organiques et inorganiques que la colonne d'eau et peuvent garder les "traces" des pollutions antérieures du cours d'eau (Bouché, 1993). Les répercussions de cette contamination se font tout d'abord au sein de ce milieu qui abrite une flore et une faune importantes et très diversifiées dont le rôle trophique est essentiel dans les écosystèmes aquatiques (Giesy et Hoke, 1989). De plus, ce compartiment peut jouer le rôle de réservoir de contaminants qui affectent la qualité de la colonne d'eau en raison des échanges permanents de

substances minérales et organiques qui existent entre ces deux compartiments (Burton, 1991). Enfin, les particules sédimentaires peuvent être remises en suspension lors d'événements hydrologiques particuliers naturels ou artificiels (e.g. crue, vidange de barrage) et entraîner une contamination importante de la colonne par équilibre des phases dissoutes et adsorbées (Reynoldson et Day, 1993). Ceci s'ajoute bien évidemment à la pollution mécanique causée par les particules en suspension (Garric et al., 1990b).

Cette qualité de filtre "intégrateur" attribuée aux sédiments vis-à-vis de la pollution circulante a conduit de nombreuses études à s'intéresser à ce compartiment pour effectuer un suivi de la qualité du milieu aquatique. Ces travaux se sont penchés sur l'état des communautés d'invertébrés *in situ* (indices biotiques), le degré de contamination des sédiments et leur toxicité évaluée par des bioessais (en condition de laboratoire le plus souvent).

En plus des motivations scientifiques concernant la dynamique physico-chimique et biologique de ce milieu, des études se sont intéressées aux conditions de stockage de boues ou de sédiments selon leur degré de contamination. En effet, face à un phénomène d'accumulation de sédiment, conséquence de rejets riches en particules ou d'aménagements hydrauliques qui modifient les conditions de transport particulaire (e.g. barrage, digue portuaire), les gestionnaires choisissent souvent de les extraire du milieu. Reynoldson et Day (1993) indiquent à ce sujet que 55 millions de mètres cubes de sédiment, contaminés pour la plupart, sont dragués annuellement des principales voies navigables d'Allemagne.

#### □ exemples de contaminations de certains sédiments

Parmi les micropolluants retrouvés dans les sédiments, on relève des PCBs (Ankley et al., 1992), des phénols, des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques (Schubauer-Berigan et Ankley, 1991) et des métaux lourds (Giesy et Hoke, 1989). Certains sédiments du Rhin au niveau des Pays-Bas contiennent des concentrations importantes en dioxines et furanes (respectivement 1,76µg/kg et 2,98µg/kg de poids sec) attribuées principalement aux rejets des industries chimiques le long de ce cours d'eau (Evers et al., 1993).

Citons également la présence de concentrations élevées d'ammoniac dans certains sédiments; composé dont nous avons évoqué la toxicité au § A.3.5. Selon Garric (1987), l'eau interstitielle des sédiments accumulés dans le barrage de Grangent sur la Loire contenait 58,6mg/l d'ions ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) en 1986. A l'origine de cette forte concentration, on peut soupçonner une contamination par les effluents urbains et industriels de la région stéphanoise.

D'autres études ont porté sur des sites où la source de contamination est mieux identifiée. Dans les sédiments d'un cours d'eau recevant des eaux pluviales (lessivage de routes en particulier), Boxall et Maltby (1995) ont ainsi mis en évidence une contamination par des phénols, des hydrocarbures aromatiques et aliphatiques.

Dans les sédiments de surface d'un port japonais, des teneurs importantes en TBT (tributylétain) sont attribuées à l'utilisation massive de cet organométal dans les peintures "antifouling" des embarcations et pour la protection des filets (Yonezawa et al., 1993). Cette

molécule a également été retrouvée à des concentrations allant jusqu'à 4mg/kg (poids sec) dans les sédiments de la baie de Chesapeake. Les huîtres de ce milieu subissent une contamination importante (jusqu'à 5,6mg/kg) et la présence de TBT est parfois mesurable dans leur chair alors que cette molécule était indétectable dans le sédiment (Espourteille et al., 1993). Ceci illustre l'importance de la prise en compte de plusieurs compartiments appartenant au biotope et à la biocénose pour une appréciation plus juste du degré des contaminations et de la biodisponibilité des micropolluants.

### 5.3.2- Méthodes d'évaluation de la toxicité de sédiments

En complément des analyses physico-chimiques faites sur les sédiments, une pléthore de bioessais et de méthodes d'exposition est proposée dans la littérature pour évaluer leur degré de contamination par des substances toxiques. La pertinence de différents protocoles et des modèles biologiques employés a d'ailleurs été le thème d'un congrès (Workshop on sediment toxicity assessment, 1993). Les critères d'évaluation des bioessais portent sur la représentativité écologique des organismes choisis, les stades de développement considérés, la méthode et la durée d'exposition. Sont également pris en compte: la sensibilité et la capacité discriminatoire du test, sa fiabilité (standardisation, données de référence, reproductibilité), sa simplicité ainsi que les coûts de l'élevage et des tests (Giesy and Hoke, 1989; Bouché, 1993).

En terme de représentativité, il est indéniable que l'étude des communautés d'invertébrés *in situ* apporte les résultats les plus intégrateurs (Chapman, 1986; Krantzberg et Boyd, 1992). Cette approche pose pourtant des problèmes d'interprétation en raison de facteurs typologiques et de la difficulté de comparaison avec des situations de référence (Giesy and Hoke, 1989). De plus, les populations d'invertébrés semblent surtout perturbées par des baisses de concentration en oxygène dissous entraînées par des pollutions de type organique. Des indices biotiques reflétant une contamination par des éléments toxiques organiques ou métalliques sont en cours d'investigation. Les travaux de Rosso (1995) à ce sujet ont montré que l'effet nocif des micropolluants sur les peuplements d'oligochètes dépend du potentiel complexant des sédiments que l'auteur définit par les teneurs en carbone organique total, en fer, en manganèse et par l'abondance des sables.

Une approche alternative consiste à placer des microcrustacés dans des cages *in situ* au contact des sédiments (Sasson-Brickson et Burton, 1991). Un projet analogue est conduit actuellement par l'INRA pour évaluer la toxicité de sédiments du lac Léman à l'aide d'embryons et de larves de corégone.

En condition de laboratoire, Burton (1989) ainsi que Reynoldson et Day (1993) estiment que la représentativité moins bonne des bioessais pourrait être compensée par la mise en oeuvre d'une batterie de bioessais associant des organismes de plusieurs niveaux trophiques ayant des modes de vie différents en rapport avec le substrat (benthique ou épibenthique). Les essais proposés dans la littérature portent sur la gamme d'organismes connus pour le contrôle des

échantillons liquides auxquels s'ajoutent des oligochètes, des diptères et éphéméroptères vivant enfouis dans le sédiment, du moins durant une partie de leur cycle de vie. La liste des espèces utilisables est si importante que nous nous bornerons, dans le cadre de ce travail, à faire une synthèse des batteries proposées par Giesy et Hoke (1989) ainsi que Burton (1991) pour l'évaluation de la toxicité aiguë et sublétales de sédiments.

Tableau 17: Batterie de bioessais adaptée à l'évaluation de la toxicité de sédiments (Giesy et Hoke, 1989; Burton, 1991)

organisme	critère	exposition	durée
bactérie - Microtox ( <i>Photobacterium phosphoreum</i> )	bioluminescence	eau interstitielle ou extrait aqueux	15 mn.
algue ( <i>Selenastrum capricornutum</i> )	croissance	eau interstitielle ou extrait aqueux	96 h.
insecte - larves de chironome ( <i>chironomus tentans</i> )	survie et croissance	sédiment entier	10 jrs.
microcrustacé ( <i>Daphnia magna</i> )	survie	sédiment entier	48 h.

Par ailleurs, pour l'évaluation de la phytotoxicité à court terme, Pardos et al. (1991) proposent une méthode originale portant sur la quantification de l'activité photosynthétique de phytoplancton naturel; nous en reparlerons dans la partie expérimentale. De manière à évaluer la toxicité chronique des échantillons étudiés, Bouché (1993) préconise la prolongation de l'essai sur le chironome jusqu'à l'émergence des adultes (15 jours supplémentaires), ce qui permet de prendre en compte la sensibilité de plusieurs stades de développement. La littérature fait également souvent référence à un essai portant sur la reproduction de l'amphipode *Hyalella azteca* (Neberker et Miller, 1988). Selon Burton (1991), il est important d'intégrer un modèle vertébré (amphibien ou poisson) pour connaître les réactions d'un niveau trophique supérieur, permettre des études de bioaccumulation et révéler d'éventuels effets histologiques et tératogènes. De plus, la représentativité écologique des poissons se justifie dans la mesure où les embryons de nombreuses espèces se développent au contact du sédiment.

L'espèce de poisson la plus exploitée est le vairon tête-de-boule par le biais d'essais embryolairaires (Francis et al., 1984; Reynoldson et Day, 1993). Des sédiments contaminés par des métaux ont induit par exemple des malformations au niveau des larves de cette espèce. Grâce à différentes extractions de ces sédiments complétées par un suivi analytique, Dawson et al. (1988) ont pu mettre en cause les fortes teneurs en zinc. Des malformations larvaires importantes ont également été observées par Cooper et al. (1993) après exposition d'embryons de modaka à des sédiments contaminés par des dioxines et furanes. D'autres études sur des poissons adultes (carpe ou truite arc-en-ciel) se sont orientées sur la mesure de l'induction

d'enzymes de détoxification par de tels composés à risque contenus dans le sédiment (Van der Weiden et al., 1993; Otto et al., 1994).

Signalons que de nombreux protocoles utilisent des espèces marines pour l'analyse de sédiments issus de ce milieu (Workshop on sediment toxicity assessment, 1993). Certains de ces modèles peuvent d'ailleurs être utilisés pour des sédiments d'eau douce (ou leurs extraits) en tenant compte des modifications possibles de toxicité des échantillons après l'ajout de sel. Citons l'exemple de la bactérie *Photobacterium phosphoreum* du test Microtox et de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) dont la sensibilité élevée des stades embryonnaires est mis à profit pour évaluer la toxicité de sédiments contaminés (Chapman et Morgan, 1983; Quiniou et Toularastel, 1991).

La méthode d'exposition est également très importante lors de la conception d'un essai et conditionne la signification des résultats. Les protocoles peuvent porter sur le sédiment entier (phase solide et phase liquide surnageante), l'eau interstitielle et les extraits aqueux ou organiques. Le choix d'une méthode doit respecter la biologie de l'organisme. Il est inconcevable, par exemple, d'exposer des larves de chironomes (exclusivement benthiques) à un extrait aqueux alors que la daphnie (épibenthique) pourra évoluer dans les milieux liquides avec ou sans sédiment au fond des récipients d'essai.

Les avantages et les inconvénients des différents protocoles possibles ont été résumés dans le tableau 18 à partir des indications de Burton (1991).

Dans la mesure des compatibilités de protocole, toutes les méthodes d'exposition peuvent être employées pour les essais aigus. Dans le cas d'essais qui comprennent des expositions plus longues, l'eau interstitielle et l'extrait aqueux sont moins appropriés du fait de leur dégradation attribuée en partie à la coprécipitation d'hydroxydes de fer et de métaux (Burton, 1991).

Les bioessais réalisés simultanément avec différentes méthodes d'exposition révèlent généralement une toxicité plus forte lors de l'utilisation de sédiment entier ou de l'eau interstitielle comparée à l'extrait aqueux (Harkey et al., 1994). L'explication proposée par Giesy and Hoke (1989) est que de nombreux micropolluants sont faiblement solubles dans l'eau.

La mise en oeuvre de bioessais avec plusieurs méthodes d'exposition et de fractionnement complétées par des dosages chimiques peut permettre de préciser les familles de micropolluants responsables de la toxicité constatée de façon analogue à la méthode TIE évoquée au § A.5.2.4 (Schubauer-Berigan et Ankley, 1991; Boxall et Maltby, 1995).

Ce type d'approche alliant la biologie et la physico-chimie a révélé que la granulométrie des sédiments et leur teneur en matière organique conditionnent la biodisponibilité des micropolluants (Giesy and Hoke, 1989; Burton, 1991; Meyer et al., 1993). Ces facteurs de modulation de la toxicité ne permettent d'ailleurs pas de mélanger le sédiment à analyser avec

un sédiment "propre" en proportion variable dans l'optique de rechercher un effet dose/réponse sur le sédiment entier (Burton, 1991; Landrum et al., 1993).

Des systèmes expérimentaux permettant la mise en suspension continue des sédiments ont également été développés afin d'évaluer la désorption des contaminants hydrophobes ainsi que la toxicité mécanique des particules (Chilton, 1991; Schmidt-Dallmier et al., 1992).

Tableau 18: Critique des différentes méthodes d'exposition possibles lors des bioessais sur les sédiments (Burton, 1991)

<b>méthode</b>	<b>avantages</b>	<b>inconvénients</b>
sédiment entier	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réalisme bon</li> <li>- simplicité</li> <li>- faible influence de la durée du stockage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- difficile de montrer un effet dose/réponse</li> <li>- pas de méthode standard</li> <li>- présence de la biocénose indigène</li> <li>- possibilité d'hypoxie de la phase surnageante</li> </ul>
eau interstitielle	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réalisme bon</li> <li>- méthode relativement standardisée</li> <li>- possible de déterminer un effet dose/réponse</li> <li>- possibilité de faire une extraction séquentielle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ne peut être recueillie de tous les sédiments</li> <li>- altération physico-chimique rapide</li> <li>- présence possible de fortes teneurs en H<sub>2</sub>S et NH<sub>3</sub></li> </ul>
extrait aqueux	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réalisme vis-à-vis de situations de remise en suspension</li> <li>- méthode standardisée</li> <li>- possible de déterminer un effet dose/réponse</li> <li>- extraction sélective des substances hydrophiles</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- influence des teneurs en matières organiques</li> <li>- altération physico-chimique</li> <li>- nécessite parfois une filtration qui retient certains éléments toxiques</li> </ul>
extrait organique	<ul style="list-style-type: none"> <li>- extraction sélective des substances hydrophobes</li> <li>- faible influence de la durée de stockage de l'extrait</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- réalisme médiocre</li> <li>- toxicité des solvants</li> <li>- pas de méthode standard</li> </ul>



## **6- Utilisation de bioessais pour la mise en évidence d'effets tératogènes**

### **6.1- Introduction**

La tératogenèse se définit comme le processus pathologique qui conduit à l'apparition de malformations embryonnaires. Ces anomalies du développement (structurales et/ou fonctionnelles) peuvent être provoquées par une substance toxique qui sera alors qualifiée de tératogène (Ramade, 1993). Suite à l'épisode tragique de la "thalidomide" en 1961, un renforcement important du contrôle des substances de synthèse (e.g. médicaments, additifs alimentaires, pesticides) s'est mis en place avant leur mise sur le marché. Les tests disponibles portent sur un nombre important d'espèces: mammifères, oiseaux, amphibiens, poissons, invertébrés et des essais alternatifs *in vitro* (sur culture de cellules) sont de plus en plus utilisés (Birge et al., 1983; Faustman, 1988). Lorsqu'un effet tératogène est détecté par un quelconque modèle, il est toujours confirmé sur un modèle mammifère; l'existence des cibles des toxiques et les capacités de biotransformation peuvent être, en effet, très différentes entre les espèces et parfois même lorsqu'elles sont proches phylogénétiquement. De plus, l'effet de substances tératogènes peut s'avérer différent sur les mammifères en raison du rôle, le plus souvent protecteur, des systèmes de détoxication (biotransformation ou séquestration) du foie et du placenta vis-à-vis de l'embryon (Faustman, 1988). Les essais sur les modèles non mammaliens apportent cependant une prédiction satisfaisante pour des substances tératogènes à mode d'action direct (Van Leeuwen et al., 1990). Sur les espèces ovipares, l'exposition aux substances à tester se fait sur les géniteurs ou bien directement sur les embryons (Boudry, 1991).

Comme pour les essais de toxicité aiguë ou chronique, une batterie d'essais de tératogénicité est préconisée pour obtenir des informations représentatives et considérer le potentiel de biotransformation de plusieurs espèces (Van Leeuwen et al., 1990).

L'application de ces essais n'est pas étendue aux xénobiotiques retrouvés dans l'environnement bien que la catastrophe de Minamata ait souligné les risques de transformation biochimique et de bioamplification de certains composés rejetés par les activités humaines (Birge et al., 1983; Solomon et Faustman, 1987).

En dehors des problèmes de santé humaine, l'occurrence d'anomalies du développement chez des espèces sauvages en réponse à la contamination de leur milieu peut compromettre leur pérennité (Newsome et Piron, 1982; Birge et al., 1983).

Des substances tératogènes ont d'ailleurs été identifiées dans des effluents urbains et industriels qui sont déversés dans le milieu aquatique (Cook et al., 1994). Il en est de même pour plusieurs pesticides couramment employés dont une partie est retrouvée comme contaminant de ce milieu par lessivage des terres cultivées (De Flora et al., 1991). Une fréquence élevée de déformations vertébrales a été notée par exemple sur des poissons pêchés dans une zone de la côte suédoise où des effluents de papeteries sont déversés (Bengtsson,

1991). Un autre exemple décrit par Slooff (1982) concerne des observations de malformations diverses (asymétrie du crâne, vertèbres fusionnées, déformation du squelette) affectant des brèmes du Rhin qui ont été trouvées en proportions plus importantes dans les zones particulièrement polluées de ce cours d'eau sur la portion hollandaise.

Les contaminations peuvent également affecter la progéniture des poissons. Des cas de mortalité embryonnaire et des apparitions de larves malformées ont ainsi été observées après exposition des femelles cristivomer et danio zébré au TCDD par la nourriture à des doses qui n'affectaient pas la survie des adultes (Wannemacher et al., 1992; Cook et al., 1994).

## 6.2- Méthodes d'évaluation des risques tératogènes environnementaux

Les études visant à identifier les contaminants environnementaux tératogènes et/ou embryotoxiques utilisent souvent comme modèles les stades embryo-larvaires de poissons et les espèces retenues sont la truite arc-en-ciel, le barbus de rivière, le modaka, le danio zébré et le vairon tête-de-boule (Birge et al., 1983). Cette dernière espèce fait d'ailleurs l'objet d'un protocole standard de l'EPA (1989). La littérature mentionne également un essai de tératogénicité dénommé FETAX (Frog Embryo Teratogenesis Assay on *Xenopus*) portant sur le modèle amphibien du xénope (*Xenopus laevis*) sur une durée de 96h. (Bantle et al., 1989; Dawson, 1994). Pour les poissons, les essais sont initiés juste après la fécondation et se terminent généralement 4 jours après l'éclosion pour les espèces d'eau "chaude" et 28 jours pour les espèces d'eau "froide" (Collins, 1987; Van Leeuwen et al., 1990). L'avantage des poissons est que leurs embryons peuvent être manipulés et observés durant tout le développement du fait de la transparence des chorions pour la plupart des espèces. Les critères relevés sont l'apparition de malformations dans l'oeuf ou après éclosion (Faustman, 1988).

Tableau 19: Composés tératogènes identifiés grâce à des essais embryo-larvaires sur différentes espèces de poisson

type d'élément	exemples
métal	Se <sup>6+</sup> ; Zn <sup>2+</sup> ; As <sup>3+</sup> ; Cd <sup>2+</sup> ; Cu <sup>2+</sup> ; Hg <sup>2+</sup>
organométal	Méthylmercure; tributylétain
substance organique	hydrazine; aniline; chlorobenzène; 2,4-dichlorophénol; acide nitriloacétique; phénol; fraction soluble de pétrole brut; PCBs; TCDD; benzo(a)pyrène; éthanol; hydroxyurée; cycloheximide; éthyl et méthyl nitrosourée; éthyl et méthyl méthanesulfonate; nitrosodiéthylamine; dibuthylphtalate
pesticide	atrazine; 2,4-D; DDT; 2,4,5-T; PCP; organophosphorés (malathion et phosphamidon); carbamates (carbaryl, carbofuran)

De tels essais ont permis la mise en évidence des effets tératogènes de certains métaux et molécules organiques sur différentes espèces de poissons (Schreiweis et Murray, 1976; Birge et al., 1983; Solomon et Faustman, 1987; Von Westernhagen, 1988; De Flora et al., 1991; Fent et Meier, 1992; Kaur et Dhawan, 1993) et le tableau 19 en a présenté un aperçu.

Ces différents contaminants entraînent une ou plusieurs anomalies précises (e.g. scoliose, microphthalmie) mais il est souvent fait mention d'une combinaison de toute une série de symptômes (Von Westernhagen, 1988; Weis et Weis, 1976; EPA, 1989, Kaur et Dhawan, 1993) qui affectent la plupart des tissus des larves et que l'on peut énumérer brièvement:

- oedème de la cavité péritonéale,
- anomalie de formation des yeux (microphthalmie, synophthalmie, cyclopie), des otolithes, des mâchoires, des nageoires, de la pigmentation,
- courbure anormale du coeur, contractions cardiaques fébriles, oedème du péricarde,
- bouleversement de la répartition des organes, absence de certains organes,
- malformation de la colonne vertébrale: courbure latérale (scoliose), ventrale (lordose) ou dorsale (kyphose),
- queue tronquée.

De plus, ces larves sont quasiment immobiles, nagent de manière atypique en réaction à un stimulus et ne survivent que quelques jours.

Au niveau histologique, Laale et Lerner (1981) indiquent que cette combinaison de malformations se traduit par des anomalies tissulaires du système nerveux central et des yeux, des malformations au niveau du squelette (soudure de vertèbres), de la musculature et de l'épiderme (hyperplasie, oedème). Il est intéressant de noter que Bernardini et al. (1994) décrivent une anomalie généralisée similaire sur le xénope exposé à deux substances tératogènes (le sulfate de zinc et l'heptanol).

Signalons que différents stress (hypoxie, choc thermique ou acide, choc de salinité) peuvent également conduire à cette anomalie du développement qui n'est, par ailleurs, pas spécifique d'un seul polluant (Rosenthal et Alderdice, 1976; Laale et Lerner, 1981; Rombough, 1988).

En réponse à des substances tératogènes, la fréquence d'apparition de cette anomalie particulière est proportionnelle à la durée d'exposition et à la concentration dans une certaine gamme au delà de laquelle le xénobiotique devient embryolétal (Laale et Lerner, 1981).

Les premiers stades après la fécondation sont les plus susceptibles aux tératogènes et les premières anomalies n'apparaissent généralement qu'après la gastrulation (Von Westernhagen, 1988). Cet auteur précise également que la fréquence d'apparition et la gravité des anomalies est plus importante lorsque les embryons sont exposés à un mélange de substances tératogènes (e.g. hydrocarbure + dispersant).

Les mécanismes qui conduisent à l'apparition de ces anomalies du développement ne sont pas encore élucidés en raison de la complexité des séquences de prolifération et de différenciation cellulaire au cours du développement embryonnaire (Faustman, 1988) mais plusieurs hypothèses sont avancées. Tout d'abord, un stress physico-chimique semble pouvoir affecter des mécanismes de médiation inter-cellulaire au cours du développement. Ainsi, une inhibition temporaire du rythme de développement de certains tissus pourrait modifier le gradient entre les étapes de différenciation de différents tissus (Schirone et Gross, 1968; Laale et Lerner, 1981). Une altération de fonction des membranes cellulaires en terme de communication intercellulaire est d'ailleurs également citée parmi les modes d'action de carcinogènes épigénétiques.

De son côté, Heath (1987) a observé que des inhibiteurs de la phosphorylation oxydative (e.g. dinitrophénol, naphthalènes, hydrocarbures aromatiques) diminuant la synthèse d'ATP, conduisent généralement à un arrêt de la différenciation des cellules embryonnaires voire même à leur dédifférenciation. Par ailleurs, Laale et Lerner (1981) signalent que l'embryon possède des capacités d'osmorégulation limitées et qu'une légère modification de la composition physico-chimique de son environnement peut perturber le cours du développement embryonnaire comme le suggère l'apparition fréquente d'un oedème péritonéal. Signalons enfin que des inhibitions de la réplication de l'ADN et de la transcription ont été constatées suite à l'exposition d'embryons de danio zébré à plusieurs substances tératogènes (Von Westernhagen, 1988). Les inhibiteurs de synthèse d'ADN sont d'ailleurs connus pour leur effet tératogène sur une grande variété d'organismes quel que soit leur mécanisme d'action. Ainsi, le zinc, pourtant cofacteur de l'ADN-polymérase, inhibe la synthèse d'ADN dès lors qu'il est en excès et se révèle tératogène (Dawson et al., 1988).

Notons que l'éventuelle contribution de dommages génétiques au phénomène de tératogenèse n'est pas encore élucidée (De Flora et al., 1991) mais il est troublant de constater que parmi les substances énumérées plus haut que le cadmium, le DDT, l'hydrazine, le 2,4-dichlorophenol, la TCDD, le benzo(a)pyrène sont identifiés comme ayant un effet cancérigène probable sur l'homme sachant que 90% des substances cancérigènes sont mutagènes sur des modèles animaux (Marzin et Vo Phi, 1985).

Un vaste domaine d'investigation existe donc encore à ce niveau pour mettre en évidence les mécanismes impliqués.

Par ailleurs, il convient de préciser que toute apparition d'embryons ou de larves malformées ne signifie pas que la substance testée est tératogène. Il convient de vérifier qu'il n'y ait pas eu de stress thermique ou hypoxique durant l'essai. Il est également important de considérer la fréquence d'apparition de faux positifs pour l'espèce utilisée. Pour l'essai sur le xénope (FETAX), elle est supérieur à 9% (Bantle et al., 1989) ce qui amène ses utilisateurs à employer un "indice tératogénique" qui correspond au rapport entre la CL50 et la CE50 à 96h. La CE50 correspond à l'apparition de 50% de larves malformées et une substance n'est

qualifiée de potentiellement tératogène que si cet indice est supérieur ou égal à 1 (Dumont et al., 1983 cités par Faustman, 1988). Cette restriction n'est pas mentionnée lors des essais sur les stades embryo-larvaires de poissons et cela pourrait être lié à l'occurrence beaucoup plus faible de faux positifs. Chez la truite arc-en-ciel, cette fréquence est estimée entre 1 et 2% (Birge et al., 1983; Von Westernhagen, 1988) et elle se limite à 0,02% pour le danio zébré (Landner et al., 1985). Selon cet auteur, ce taux réduit de faux positifs autorise une mise en rapport sans ambiguïté des anomalies observées avec les substances auxquelles les embryons ont été exposés.

### 6.3- Exemples de susceptibilité de différentes espèces aux composés tératogènes

Toutes les espèces ne présentent pas la même susceptibilité aux substances tératogènes. La truite arc-en-ciel est généralement plus sensible que les autres modèles de poissons ou d'amphibiens (Birge et al., 1983). Ceci pourrait être lié à la durée du développement embryonnaire des salmonidés comme nous l'avons déjà signalé.

Les réponses apportées par les stades embryo-larvaires de plusieurs espèces exposées au zinc sont regroupées dans le tableau 20.

Tableau 20: Effet tératogène du zinc sur les stades embryo-larvaires de quatre espèces

espèce	CE50* (mg/l)	CL50 (mg/l)	auteur
vairon tête-de-boule	0,6 - 0,8	3,6	Dawson (1988)
danio zébré	18,5	10	Van Leeuwen (1990)
truite arc-en-ciel	0,52	0,5	"
xénope	3,6	34,5	Dawson (1988)

\* concentration de zinc qui conduit à l'apparition de 50% de larves malformées / nombre de larves vivantes

Le danio zébré paraît donc l'espèce la moins susceptible aux effets tératogènes du zinc et il est intéressant de comparer les valeurs des deux critères d'embryotoxicité pour les différentes espèces. La CE50 est supérieure à la CL50 pour le danio zébré, sensiblement égale pour la truite et très inférieure pour le xénope qui manifeste une résistance très forte à ce métal en terme de survie.

La susceptibilité du danio zébré et de la truite arc-en-ciel a également été comparée lors de l'exposition de leur stades embryo-larvaires à deux substances utilisées dans la fabrication de caoutchoucs synthétiques (Van Leeuwen et al., 1990).

Tableau 21: Effet tératogène de deux substances sur les stades embryo-larvaires de deux espèces (Van Leeuwen et al., 1990)

substance	espèce	CE50 (mg/l)	CL50 (mg/l)
TMTM*	danio zébré	0,032	0,029
	truite arc-en-ciel	0,038	0,017
TMTD**	danio zébré	0,034	0,006
	truite arc-en-ciel	0,001	0,0006

\* tetramethylthiurammonosulfide

\*\* tetramethylthiuramdisulfide

Ces résultats indiquent que le danio zébré présente une susceptibilité aux effets tératogènes et létaux du TMTM proche de celle de la truite arc-en-ciel. Pour le TMTD en revanche, la tolérance des stades embryo-larvaires du danio zébré est plus importante.

Au niveau des manifestations tératogènes, le modèle du danio zébré ne se distingue pas des autres espèces car il a été observé la même combinaison de symptômes de malformation que celles que nous avons énuméré plus haut pour un nombre important de substances tératogènes. Parmi celles-ci, on peut citer le malathion (Ansari et kumar, 1984), l'éthyl carbamate (Battle et Hisaoka, 1952), deux fongicides (folpet, difolatan) selon Abedi et Turton (1968), l'aniline, le chloroacétaldéhyde et le cyclohexanol (Groth et al., 1993), le colorant bleue trypan (Laale, 1962) et l'ochratoxine A (Debeauvais et al., 1984). Signalons que seule une anomalie squelettique apparaît après exposition à certaines substances comme la quinone (Groth et al., 1993).

Concernant les phases de susceptibilité particulière, Kristensen (1990) note que des effets tératogènes ne sont observés après exposition au cuivre que lorsque les essais sont initiés juste après la fécondation. Comme il en a déjà été fait mention, des stress thermiques et hypoxiques lors des premiers stades de développement du danio zébré peuvent être responsables de l'apparition de malformés (Laale, 1977).

#### 6.4- Présentation d'une substance tératogène: le dibutylphtalate

Les phtalates sont utilisés massivement comme composés plastifiants dans l'industrie des plastiques et surtout lors de la fabrication du polychlorure de vinyle. La majeure partie des phtalates retrouvés dans le milieu naturel est d'origine diffuse liée à la dégradation des matières plastiques (Brémond et Perrodon, 1979). Plusieurs molécules de cette famille ont également été décelées dans les rejets d'une station d'épuration de la région Lyonnaise (Nguyen, 1995). Leurs effets toxicologiques et tératogènes, en particulier, font qu'ils sont considérés comme des substances prioritaires pour l'EPA (Keith et Teillard, 1979). Dans la législation internationale, seul le diéthylhexylphtalate (DEHP) est agréé pour les emballages alimentaires et le matériel médical (Singh et al., 1972). Le dibutylphtalate ou DBP (cf. fig. 5) est un autre ester de phtalate qui a fait l'objet de nombreuses études.

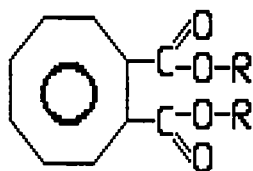


Figure 5: Formule développée des esters de phtalate (R =  $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_3$  pour le dibutylphtalate)

Cette substance se présente sous la forme d'un liquide visqueux et incolore. Elle est soluble dans de nombreux solvants organiques et peu soluble dans l'eau (400 mg/l à 25°C). Le DBP possède une tension de vapeur de 0,98mm de Hg à 148°C et peut donc être considéré comme faiblement volatile (Vershueren, 1983).

La biodégradation du dibutylphtalate est relativement rapide: elle conduit au monobutylphtalate après 1 à 4 semaines d'incubation en présence de micro-organismes tel que *Penicillium liliacum*, puis à l'acide phtalique qui se dégrade à son tour par décarboxylation (Engelhardt et al., 1975). Dans une solution colloïdale provenant d'un étang, la dégradation aérobie du dibutylphtalate est de 53% après un jour, et de 98% après cinq jours (Johnson et Lulves, 1975). Deux phtalates (DBP et DEHP) sont pourtant retrouvés dans différents compartiments du milieu aquatique comme le montre les deux tableaux suivants.

Tableau 22: Contamination de l'eau par le DBP et le DEHP

échantillon	DBP en ng/ml	DEHP en ng/ml	auteur
effluent de STEP (Lyon)	nd	0,3	Nguyen (1994)
eau souterraine de l'Etat de New-York	470	170	Rao (1985)
golfe du Mexique: - zone côtière	0,074	0,130	Giam (1978)
- au large	0,093	0,080	
delta du Mississipi	0,095	0,070	Giam (1978)
rivière Tama (région de Tokyo)	1,9	2,5	Morita (1974)
eau du robinet à Tokyo	2,34	1,3	Morita (1974)

nd: non détecté

Tableau 23: Contamination de sédiments superficiels par le DBP et le DEHP

échantillon	DBP en ng/g	DEHP en ng/g	auteur
golfe du Mexique: - zone côtière	7,6	6,6	Giam (1978)
- au large	3,4	2,0	
delta du Mississipi	13	69	"
lac de Constance	100 - 300	200 - 700	Giam (1980)

La contamination du milieu aquatique par ces deux molécules semble donc concerner de nombreuses régions du globe. Du fait de leur caractère hydrophobe, leur accumulation dans

les sédiments et dans la chaîne alimentaire paraît importante (cf. tableau 24). La bioaccumulation du DBP par plusieurs espèces d'invertébrés d'eau douce a d'ailleurs été mise en évidence par Sanders et al. (1973).

Tableau 24: Contamination de poissons par le DBP et le DEHP

échantillon	DBP en ng/g de poids frais	DEHP en ng/g de poids frais	auteur
poissons du golfe du Mexique	< 0,1	4,5	Giam (1978)
poissons consommés - saumon	37	89	Williams (1973)
au Canada: - thon	78	160	

A titre indicatif, la toxicité du DBP a été étudiée par Singh et al. (1972) sur le rat et la DL50(7jrs.) est de 3,17g/kg (injecté dans la cavité péritonéale). Au niveau des effets tératogènes sur ce modèle mammifère, lorsque des femelles gestantes reçoivent 0,63g/kg de DBP toujours par injection intrapéritonéale, 25% des embryons présentent des malformations (cotes soudées et anomalies du crâne).

Par ailleurs, la toxicité aiguë de cette molécule sur différentes espèces de poisson peut se résumer par le tableau 25. Bien que les valeurs des CL50 sont du même ordre de grandeur, il est surprenant de constater que la truite arc-en-ciel est l'espèce la moins sensible.

Tableau 25: Toxicité aiguë du dibutylphtalate (DBP) sur plusieurs espèces de poisson selon Mayer et Sanders (1973)

espèce	CL50 (96h.) en mg/l
vairon tête-de-boule	1,3
crapet arlequin	0,73
barbue de rivière	2,91
truite arc-en-ciel	6,47

En terme de toxicité sublétales exercée sur les poissons, un effet tératogène a été observé par Davis (1988) sur des larves de killi après exposition des adultes à une concentration en DBP de 1mg/l. En plus de courbures affectant les nageoires, l'analyse histologique effectuée sur les larves a révélé des déformations de la colonne vertébrale et la fusion de plusieurs vertèbres caudales.

Le seul essai embryon-larvaire appliqué au DBP dont nous avons connaissance porte sur le vairon tête-de-boule dont les taux d'éclosion et de survie larvaire (à 20 jours) ont été inhibés à partir de 1mg/l (McCarthy et Whitmore, 1985). Les auteurs ne mentionnent cependant aucune malformation même à la plus forte concentration testée (1,8mg/l). Des investigations



supplémentaires par exposition directe des stades embryo-larvaires d'une autre espèce seraient donc intéressantes à réaliser.

## **7- Intérêt de l'analyse d'images pour le suivi de bioessais**

### **7.1- Introduction**

L'analyse d'images constitue une méthode intéressante pour le suivi des essais biologiques (e.g. biométrie, histologie) et son spectre d'application est très vaste. Après une présentation générale de cette technique, nous verrons quelques exemples d'applications en écotoxicologie. Sur ce thème, il faut signaler que peu d'auteurs ont pris soin de décrire leurs protocoles et leurs mises au point techniques. Dans le cadre de notre étude, cet aspect sera abordé dans le chapitre 2 de la partie expérimentale.

### **7.2- Présentation de la technique d'analyse d'images**

Les techniques d'imageries électroniques ont découlé du couplage d'un capteur optique (caméra) à un système informatique et permettent d'analyser une scène pour en retirer les informations utiles (Coster et Chermant, 1989).

L'originalité du capteur utilisé repose sur ses capacités de contrôle à distance (non destructif) pouvant percevoir des signaux très variés (lumières visible, UV, IR, rayons X). En association avec des logiciels de plus en plus performants, les systèmes de vision effectuent, en des temps records, des opérations de reconnaissance de formes, de contrastes, d'états de surface et de granulométries. Ces techniques permettent également la localisation et la mesure d'objets ainsi que leur classification multi-critère.

Longtemps réservée à des secteurs techniques de pointe comme l'imagerie spatiale, l'analyse d'images devient de plus en plus accessible (convivialité et coût) et connaît un champ d'application croissant. Cette technique s'est largement implantée dans le domaine industriel (secteur de l'électronique, de la mécanique, de l'agro-alimentaire), agricole et plus récemment dans les laboratoires de recherche (Damerval, 1992). L'amélioration du pouvoir de résolution des caméras et des capacités de traitement des micro-ordinateurs ont concouru à cette large diffusion. Les attentes des utilisateurs concernent:

- le caractère non invasif et sans contact du capteur qui est adaptable à différents outils optiques (e.g. microscope) pour réaliser contrôles et mesures,
- la réduction des tâches répétitives voire des risques de manipulation,
- la rapidité de mesures multiples et instantanées,
- la précision et la reproductibilité des mesures et des traitements (pouvant parfois dépasser les capacités d'analyse humaine),
- la suppression de la subjectivité des tests visuels humains.

Dans le domaine des sciences biologiques, le traitement automatisé des images est confronté à la variabilité morphométrique des objets. Des algorithmes complexes permettent de nombreuses applications et notamment en microscopie pour le comptage de bactéries ou de virus (Aupinel et al., 1994), en histologie pour la quantification de l'ADN, la reconnaissance de cellules malignes (Guizard et al., 1992).

Toujours dans le domaine biologique mais avec une finalité industrielle, l'analyse d'images est utilisée pour identifier avec une cadence élevée les espèces de poisson pêchées (Strachan et al., 1990), compter les larves en pisciculture ou suivre leur croissance (Charlon et al., 1994; Poxton et Goldsworthy, 1986). Des travaux de recherche ont porté, par exemple, sur l'étude des cernes de croissance d'écaillés et d'otolithes (en coupe) pour déterminer respectivement l'âge des populations de poisson et la fréquence des stress subis (De Pontual et Prouzet, 1988).

### 7.3- Application aux bioessais

Des techniques de vision informatisée sont appliquées au niveau de nombreux tests de toxicité dans un but de quantification ou de paramétrage. Pour le comptage des embryons vivants de carpes au cours d'essais embryo-larvaires, Lefebvre (1990) a mis au point une méthode basée sur la détection de l'aspect opaque des embryons morts du fait de la coagulation rapide de leurs protéines. Au cours d'essais larvaires sur le vairon tête-de-boule exposé au sulfate de cuivre et à plusieurs effluents, Foster et al. (1994) ont mis à profit l'analyse d'images pour mesurer la taille des larves sans avoir à les anesthésier ou à les sacrifier. L'avantage relevé par ces auteurs concerne surtout la possibilité de répéter les mesures au cours des essais sans perturber les larves ce qui permet d'améliorer le suivi des effets sur la croissance. De plus, cette technique permet un gain de temps par rapport à la mesure du poids sec faite habituellement.

D'autres applications intéressantes de l'analyse d'images concernent l'étude des mouvements et des formes des organismes en rapport avec la concentration en éléments toxiques du milieu. Plusieurs essais sont d'ailleurs basés sur la quantification et la description de la mobilité et du comportement d'invertébrés. Charoy et al. (1995) se sont penchés sur la vitesse de déplacement et la sinuosité des trajectoires d'une espèce de rotifère (*Brachionus calyciflorus*). Sur quatre substances de référence, les CE50 obtenues sur des critères comportementaux au bout de deux heures étaient du même ordre de grandeur que les CL50(24h.). Le suivi des déplacements de daphnies (*Daphnia magna* et *Daphnia pulex*) a également été exploité dans un espace bi- ou tridimensionnel lors d'exposition à deux pesticides organiques et au chrome (Goodrich et Lech, 1990; Dodson et al., 1995, Berckmans et al., 1994). Les effets de chaque substance ont été décrits par un ou plusieurs indices du comportement (e.g. vitesse, angle de virage moyen, sinuosité). Aucun indice ne se révèle pourtant pertinent dans tous les cas, ce qui sous-entend que les manifestations observées sont intimement liées au mécanisme d'action des toxiques.

Les études comportementales sur les poissons ont fait l'objet de nombreuses études et les critères exploités portent sur l'activité de locomotion ainsi que sur le comportement d'évitement, de prédation et de reproduction. Si des modifications de comportement sont constatées en présence de traces de xénobiotique, elles ne sont pas toujours prédictives de mortalités à long terme mais peuvent présager des perturbations importantes sur la pérennité des populations concernées (Rand, 1985).

Un exemple de prédiction "comportementale" a été mis en évidence par Sullivan et al. (1978) sur des vairons tête-de-boule adultes exposés à des concentrations sublétales de cadmium. Après 21 jours d'exposition à une concentration deux fois plus faible que la valeur chronique VCh (déterminée à l'échelle d'un cycle de vie), les auteurs ont observé visuellement un comportement anormal de formation de banc ainsi qu'une vulnérabilité accrue à un prédateur (black-bass à grande bouche).

Par ailleurs, une surexcitation ou un comportement de fuite ne peuvent être reliés directement à la toxicité d'un élément toxique présent dans le milieu. Il est de toute façon préconisé que les études comportementales soient exploitées en combinaison avec des essais de toxicité aiguë et chronique afin d'appréhender plus globalement les effets des xénobiotiques étudiés (Rand, 1985).

D'autre part, les analyses morphométriques appliquées aux poissons ont été très développées dans une optique de reconnaissance des espèces pêchées (Arnarson et al., 1988) ou en transit dans une passe à poisson (Castignolles, 1995). Elles font appel à différents descripteurs mathématiques (e.g. axes principaux, périmètres, surface, forme, moments d'inertie) utilisés souvent en combinaison. Un exemple de descripteur morphométrique développé par Strachan et al. (1990) consiste à mesurer la hauteur de 10 tronçons équidistants perpendiculaires au grand axe du poisson (cf. fig. 6).

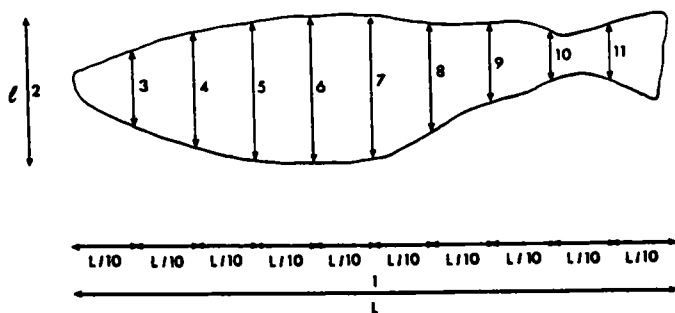


Figure 6: Exemple de mesures calculables à partir du contour numérisé d'un poisson pour établir un descripteur morphométrique (Strachan et al., 1990)

L'ensemble des 11 mesures extraites constitue une description synthétique du profil du poisson utilisable pour une reconnaissance multi-espèce. L'exploitation de tels descripteurs après stockage de la répartition de leurs valeurs pour une série de poisson "référence" a permis la classification des individus observés avec un taux d'erreur maximum de 4,8% pour six

espèces migratrices (Castignolles, 1995) et 10% pour sept espèces marines (Strachan et al., 1990) grâce à des outils de traitement de données performants (e.g. analyse discriminante, réseaux neuronaux).

Ces méthodes de traitement peuvent être adaptées au repérage d'individus malformés. Sur l'huître creuse (*Crassostrea gigas*), un descripteur de circularité a été mis en oeuvre pour détecter les anomalies du développement embryonnaire lors d'expositions à divers xénobiotiques (Whale et al., 1993). Par ailleurs, sur des larves de choquemort exposées à un effluent urbain chloré, Weis et al. (1989) ont relevé des déformations vertébrales. En classant visuellement l'ampleur des déformations en trois groupes (faible, moyen, fort), ils ont pu relier l'ampleur des déformations à la concentration en effluent auquel les embryons étaient exposés. Il ne fait cependant aucun doute que les outils mathématiques et informatiques décrits précédemment peuvent améliorer la précision des appréciations portées sur la fréquence et la gravité des anomalies touchant des larves de poisson au terme de bioessais.

## **B - partie expérimentale**

Les développements de l'essai sur les stades embryo-larvaires (SEL) du danio zébré ont porté tout d'abord sur la recherche des tolérances de ces organismes à différents paramètres de l'eau comme le pH, l'oxygène dissous et l'ammoniac. La connaissance de ces domaines de tolérance facilite la réalisation et l'interprétation des résultats de ce test appliqué à des échantillons complexes (effluents et sédiments). Parmi les critères de toxicité utilisés, un effort méthodologique a été entrepris pour le suivi de la croissance et la détection de larves malformées par analyse d'images.

### **1- Mise en oeuvre de l'essai SEL sur le danio zébré**

#### **1.1- Introduction**

Le protocole d'essai décrit dans ce chapitre constitue la méthode de "base" utilisée lors des différentes expériences. Les adaptations qui seront faites pour les besoins des essais seront détaillées dans les chapitres correspondants. La méthodologie de l'essai embryo-larvaire décrite ci-dessous s'est inspirée de la norme ISO (1988) et découle des développements qui ont été effectués au laboratoire par Garric et al. (1991) et Dalverny (1993). Ce protocole commence naturellement par des recommandations relatives à l'obtention des géniteurs, leur élevage et la récupération de leurs oeufs.

#### **1.2- Origine des géniteurs**

##### **1.2.1- Géniteurs issus du commerce**

Le laboratoire s'est approvisionné en danios zébrés adultes dans un magasin d'aquariophilie pendant plusieurs années. Ces poissons sont importés de Singapour où ils sont élevés en pisciculture semi-intensive. Afin d'obtenir des poissons matures mais âgés de moins d'un an, des individus d'un poids moyen de 0,3g ont été retenus en accord avec les courbes de croissance relevées dans la littérature (Eaton et Farley, 1974b; Craig et Fletcher, 1984).

L'obtention d'oeufs de bonne qualité à partir de ces danios zébrés n'est pourtant pas garantie car ces poissons peuvent être d'âges assez différents ce qui a des conséquences sur la qualité des oeufs produits (Dalverny, 1993). De plus, ces géniteurs ne pondent pas toujours de façon régulière et il est parfois difficile de stimuler la libération des oeufs par l'éclairage de la salle d'élevage. En conséquence, les embryons récupérés sont en nombre aléatoire et présentent des stades de développement hétérogènes. Avec des géniteurs élevés au laboratoire, nous n'avons pas constaté ces inconvénients en raison de l'homogénéité de l'âge des géniteurs et vraisemblablement d'une acclimatation précoce à nos conditions d'élevage (qualité d'eau, photopériode, présence humaine).

## **1.2.2- Géniteurs élevés au laboratoire**

Dès le stade embryonnaire, des danios zébrés ont été élevés dans un aquarium pourvu d'un substrat planté de plusieurs espèces végétales et dont l'eau n'est pas renouvelée. En plus des organismes que les larves peuvent trouver dans ce microcosme, un apport important de paramécies est fait durant les deux premières semaines de leur vie. Cette nourriture vivante peut être absorbée dès le début de leur phase d'alimentation et favorise le développement des larves (Newsome et Piron, 1982). Il s'est en effet avéré que les prolarves ont des exigences nutritionnelles très particulières et que les aliments artificiels pourtant prévus pour ces stades semblent carencés en certains oligo-éléments, acides aminés ou vitamines indispensables.

A partir de la deuxième semaine, des nauplies d'artémia sont également distribuées quotidiennement aux larves ainsi que de la nourriture deshydratée de granulométrie adaptée. A partir du 75ème jour, dès l'apparition du comportement de reproduction, les poissons sont transférés dans un aquarium de stockage pour permettre une récolte hebdomadaire des oeufs. Ces géniteurs fournissent alors, dès l'âge de quatre mois, des pontes abondantes et inductibles par l'éclairage. Ces performances de ponte sont exploitables jusqu'à l'âge d'environ 15 mois; limite à partir de laquelle le taux d'oeufs d'aspect opaque (dénommé oeufs blancs) au moment de la ponte et après 24 heures va augmenter progressivement. Les oeufs blancs observés juste après la ponte correspondent à des ovocytes surmatures apparaissant suite à un phénomène de rétention d'oeufs dont l'occurrence augmente lorsque les femelles vieillissent (Laale, 1977). Les oeufs blancs observés 24h. après la ponte sont des ovocytes non fécondés qui entament un semblant de développement embryonnaire suite à leur activation au contact de l'eau. Les divisions successives du blastodisque deviennent anarchiques au bout de quelques heures et les protéines de l'ébauche embryonnaire et celles du vitellus finissent par coaguler en moins de 24 heures.

Sur trois lots de géniteurs produits au laboratoire et âgés de moins 15 mois, nous avons observé un taux d'oeufs blancs inférieur à 10% au moment de la ponte et inférieur à 20% après 24h. d'incubation. Nous avons préféré ne plus utiliser les lots de géniteurs pour la réalisation des essais SEL au delà de cet âge. Pour les lots "jeunes", il est cependant recommandé de faire un suivi mensuel de l'apparition du nombre d'oeufs blancs. Il faut préciser que de manière à ne pas développer de souche et pour limiter la consanguinité, un lot du commerce est régulièrement intégré à l'élevage.

## **1.3- Maintenance des géniteurs**

### **1.3.1- Conditions d'élevage**

Environ 70 géniteurs sont stockés dans des aquariums d'une contenance de 80l. avec un apport d'eau permanent de manière à assurer un renouvellement complet toutes les 3 à 4 heures. Le débit est largement supérieur à 1ml/min/kg de poisson ce qui assure une qualité d'eau constante et limite le risque d'élévation de la concentration en sels ammoniacaux issus des

rejets des poissons, de la dégradation de l'urée et des fèces (Dalverny, 1993). L'eau utilisée provient d'un forage ajusté en dureté par mélange avec de l'eau osmosée de manière à obtenir une dureté de  $100 \pm 20 \text{ mg/l}$  ( $\text{CaCO}_3$ ) et une conductivité de  $300 \mu\text{S/cm}$ . L'eau a un pH compris entre 7,5 et 8,5 et est maintenue à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  avec une aération permanente. L'éclairage des aquariums est assuré 14h. par jour et fournit une intensité lumineuse d'environ 2000 lux à la surface de l'eau. L'allumage et l'extinction de l'éclairage sont progressifs afin de ne pas stresser les poissons.

Pour limiter tout risque d'épizootie, les aquariums sont brossés et vidés trois fois par semaine et les accessoires (bulleur, surverse) sont désinfectés une fois par semaine. De manière à éviter toute contagion, chaque aquarium possède son matériel d'entretien et ses pondoirs. Tout poisson qui présente des signes de pathologie ou un comportement atypique est retiré de l'aquarium. En cas d'hydropisie (symptôme de redressement des écailles), les autres poissons de l'aquarium sont traités de façon préventive avec une solution de vert de malachite et de formol (Poupard, 1979).

### 1.3.2- Alimentation

Le régime alimentaire choisi apporte une alimentation variée aux poissons combinant à la fois nourriture déshydratée et nourriture vivante qui est distribuée de la façon suivante:

- tous les jours: un mélange nutritif est fourni à raison de 2% du poids de poisson, distribué en 4 repas. Ce mélange est composé de 7/10 de poids en paillettes "Tetramin" pour 2/10 d'aliment déshydraté "Nacip" ( $400\text{-}600 \mu\text{m}$ ) et 1/10 de larves de moucheron rouges selon des rapport de poids,
- quatre fois par semaine: des nauplies d'artémia (microcrustacé),
- une fois par semaine: un complément vitaminique "Seraonip" et des tubifex lyophilisés,
- un jour par semaine, les poissons sont mis à jeûner selon les recommandations de Terver (1980).

La composition des différents aliments déshydratés ainsi que le protocole de culture des nauplies d'artémia figurent en annexe 5.

Ces techniques d'élevage sont inspirées des recommandations détaillées faites par Dalverny (1993) ainsi que Bremiller et al. (1993).

### 1.4- Obtention des oeufs

Les géniteurs sont répartis au préalable dans les aquariums dans le rapport d'une femelle pour deux mâles. Les mâles se distinguent par leur taille plus petite et leur couleur plus dorée en comparaison aux femelles qui ont un aspect plus argenté et présentent une distension de l'abdomen avant la ponte. De plus, les nageoires pelviennes des mâles recouvrent la papille uro-génitale alors que ce n'est pas le cas chez les femelles (Garric et al., 1990a).

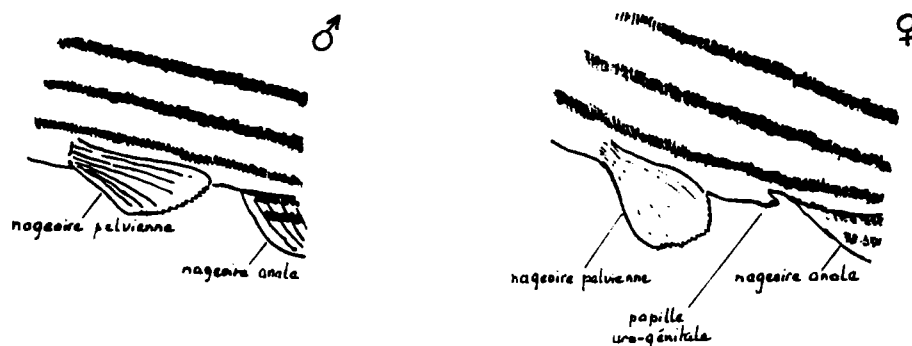


Figure 7: Distinction entre le mâle et la femelle du danio zébré à maturité

Les femelles sont capables de pondre à des intervalles allant de 4 à 10 jours (Laale, 1977) et il semble que des pontes aient lieu régulièrement dans les aquariums même sans les pondoirs dont nous parlerons un peu plus loin. Au laboratoire, les géniteurs sont incités à pondre une fois par semaine même si des essais SEL ne sont pas programmés. Une récolte régulière tend à augmenter le nombre d'oeufs récupérés à chaque fois et à en améliorer la qualité (moins d'oeufs blancs).

Le soir précédent le jour de ponte, plusieurs bacs de ponte couverts de grillage en plastique avec une maille de 3mm sont placés dans l'aquarium. Le grillage est de couleur sombre de manière à créer un contraste de couleur avec le fond blanc des aquariums et favoriser l'attrait des bacs de ponte.

Juste après l'éclairage, les géniteurs vont se réunir sur les pondoirs et évoluer en "essaims" sur le grillage lors de la libération et de la fécondation des oeufs. Ce grillage joue certainement un rôle dans la stimulation mécanique du processus de ponte tout en protégeant les oeufs de la prédation des adultes. Pour un lot de 70 géniteurs, il est ainsi possible d'obtenir un minimum de 2000 oeufs par semaine.

Environ 2h. à 2h.30 après l'allumage de la lumière, les pondoirs sont récupérés et le nombre d'oeufs est déterminé en plaçant le récipient au dessus d'une source lumineuse. Les oeufs télolécithes sont translucides et non adhérents ce qui facilite leur manipulation et l'évaluation de leur qualité. Les oeufs blancs sont comptabilisés et éliminés avant les prélèvements d'oeufs pour les essais.

## 1.5- Protocole de l'essai SEL

### 1.5.1- Principe

Cet essai consiste à mesurer la toxicité d'une substance ou d'un effluent vis-à-vis des stades embryo-larvaires du danio zébré. Les critères de toxicité mesurés sont l'éclosion des



embryons, la survie et la croissance des larves ainsi que l'apparition d'embryons ou de larves malformées. Les essais ont une durée de 10 jours et seront réalisés avec un renouvellement continu ou périodique des milieux selon le dispositif expérimental utilisé.

La figure 8 illustre plusieurs stades embryo-larvaires observés lors de cet essai; les étapes de l'embryogenèse décrites par Hisaoka et Battle (1958) figurent en annexe 1.

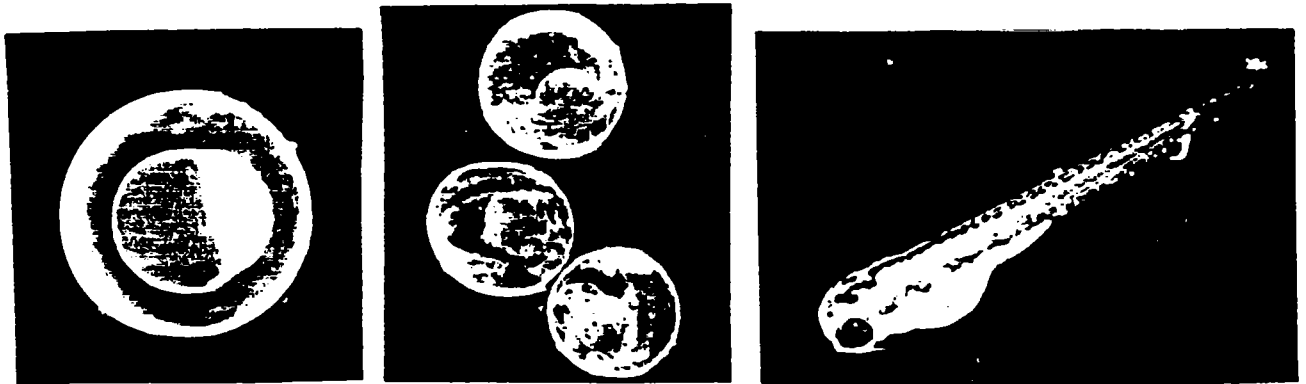


Figure 8: Stades embryo-larvaires du danio zébré: blastula à 4 heures post-fécondation (gauche); embryon au stade de la pigmentation du corps à 49h. (milieu) et prolarve juste après l'éclosion (96h.)

## 1.5.2- Déroulement

### 1.5.2.1- Récipients utilisés

Des récipients en verre ou en matière chimiquement inerte sont préparés en triplicats et remplis avec les solutions à tester. D'une capacité d'environ 250ml, ces récipients offrent une grande interface entre le milieu d'essai et l'air pour favoriser l'oxygénation des milieux à défaut d'aération par bullage.

Pour les essais avec renouvellement continu des milieux, ces béciers sont équipés de surverses (avec embouts interchangeable munis d'un tamis) qui permettent l'évacuation des solutions apportées en continu tout en empêchant le passage des larves (cf. fig. 9)

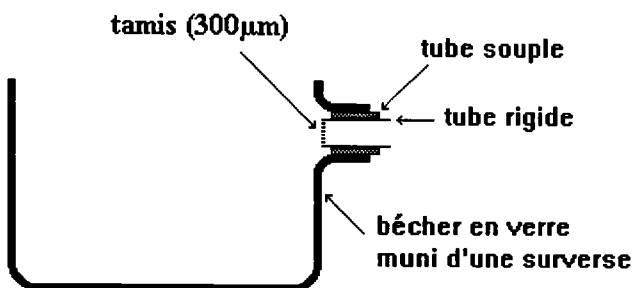


Figure 9: Schéma détaillé d'un récipient d'essai (en coupe)

Si pour un composé ou un effluent testé, il y a risque d'adsorption, les récipients peuvent être conditionnés en recevant préalablement pendant 24 heures, une concentration en toxique équivalente à celle de l'essai.

### **1.5.2.2- Eau de dilution**

L'eau de dilution utilisée a les caractéristiques suivantes:

- dureté =  $200 \pm 25$  mg/l de  $\text{CaCO}_3$
- pH compris entre 7,5 et 8,5
- conductivité =  $500 \pm 50$  mS à  $20^\circ\text{C}$
- oxygène dissous  $\geq 70\%$  de la saturation (7 à 8 mg/l à  $26^\circ\text{C}$ )

La différence de dureté de l'eau d'élevage et de l'eau de dilution des essais tient compte du fait que les pontes des géniteurs paraissent plus régulières et plus abondantes à faible dureté ( $100\text{mg/l}$  de  $\text{CaCO}_3$ ). Pour tenir compte de la directive OCDE (1992), une eau à  $200\text{mg/l}$  de  $\text{CaCO}_3$  est utilisée pour les essais SEL. L'innocuité de ce saut de dureté imposé aux embryons a été préalablement vérifiée. La composition physico-chimique complète de l'eau utilisée figure en annexe 7.

### **1.5.2.3- Préparation des solutions à tester**

A partir de l'effluent ou de la substance à tester, au moins cinq concentrations sont préparées selon une progression géométrique. Cette précaution autorise une transformation logarithmique des concentrations testées en conservant le même poids à chaque résultat ce qui valide les calculs de régression ou de points particuliers (e.g. CE50). Notons que des données de toxicité aiguë facilitent le choix des concentrations à tester.

Si un agent solubilisant doit être employé, sa concentration sera choisie en fonction de sa toxicité vis-à-vis des stades embryo-larvaires et de préférence inférieure ou égale à  $0,1\text{ml/l}$  selon la norme ISO (1988). Elle devra être identique pour tous les récipients d'essai.

### **1.5.2.4- Mise en place de l'essai**

Deux heures avant l'initiation de l'essai, les récipients pleins sont amenés à la température d'incubation de  $26 \pm 1^\circ\text{C}$  dans une enceinte ou un bain thermostaté.

Les oeufs utilisés doivent provenir de géniteurs stockés depuis au moins 15 jours au laboratoire sans avoir subi de traitement de désinfection pendant cette période.

L'essai est initié avec des oeufs de moins de 2h.30. Cinquante oeufs sont prélevés à l'aide d'une pipette et déposés dans chaque récipient d'essai en apportant un minimum d'eau. Les récipients sont répartis de façon aléatoire de manière à ne pas lier des concentrations croissantes ou décroissantes à tester avec l'âge des embryons ce qui représenterait un biais expérimental.

Après l'introduction des oeufs, des couvercles sont placés sur les récipients pour limiter l'évaporation des milieux ainsi que les échanges thermiques. Les récipients sont alors replacés de façon aléatoire dans une enceinte ou un bain thermorégulé. L'incubation des oeufs se fait à  $26\pm 1^\circ\text{C}$  avec une photopériode de 14 heures de lumière par jour.

### **1.5.2.5- Suivi de l'essai**

Après 24h. d'incubation, les oeufs blancs sont comptés et éliminés; le nombre d'embryons est ramené à 30 par récipient. Cette précaution est destinée à prendre en compte un même nombre d'embryons vivants pour les critères de toxicité qui seront observés par la suite (éclosion et survie larvaire).

A l'origine naturelle des oeufs blancs (cf. § B.1.4) peut s'ajouter une mortalité embryonnaire causée par un xénobiotique. Un nombre d'oeufs blancs significativement élevé comparé aux témoins est donc révélateur d'une toxicité précoce vis-à-vis des embryons.

Les jours suivants, les opérations journalières consistent à:

- relever les paramètres physico-chimiques (température, pH et concentration en oxygène dissous) pour vérifier la stabilité des milieux. La teneur en ammoniac est mesurée régulièrement pour les essais sur effluent surtout pendant la période de nourrissage des larves,
- compter les embryons, les (pro)larves vivantes et retirer les individus morts. En cas de doute, l'état des embryons est vérifié à la loupe binoculaire en observant les battements cardiaques. Les embryons morts depuis plusieurs heures présentent une couleur blanchâtre caractéristique de la coagulation des protéines. L'état des larves immobiles est vérifié par leur réaction à un stimulus mécanique et par observation des battements cardiaques. Comme les embryons, les larves mortes depuis plusieurs heures prennent une teinte blanche,
- compter et décrire les larves malformées, noter tout comportement atypique des larves,
- éliminer les déchets déposés sur le fond des récipients (reste de nourriture, fèces) et les enveloppes chorioniques vides après l'éclosion,
- lorsque le dispositif d'essai nécessite le renouvellement quotidien des milieux, un système de siphonnage à faible débit est utilisé pour éviter de stresser les larves (cf. annexe 6). Le renouvellement n'est assuré qu'à 95% de manière à maintenir constamment les larves dans l'eau. Les récipients sont alors lentement remplis avec les solutions nouvellement préparées.

A la fin de l'essai (10ème jour), le nombre de larves vivantes ainsi que celles présentant une malformation ou un comportement atypique est déterminé et la taille individuelle de toutes les larves est mesurée par analyse d'images selon un protocole qui sera détaillé au chapitre B.2.

### 1.5.2.6- Protocole de nourrissage

A partir du 5ème jour (post-fécondation), les prolarves sont nourries deux fois par jour à l'aide d'aliments déshydratés du commerce (Nacip) à raison d'environ 0,5mg/jr./larve; les particules distribuées ont une granulométrie comprise entre 100 et 200µm. Durant les premiers essais réalisés, cet aliment a été distribué en quantité approximative à l'aide d'une spatule.

Une distribution précise et reproductible de cet aliment a ensuite été obtenue à l'aide d'un dispositif adapté qui a permis d'homogénéiser la nourriture disponible pour chaque larve et d'un récipient à l'autre. Cette précaution a amélioré la pertinence des mesures de croissance conformément aux interrogations de Woltering (1984) sur cette partie du protocole (cf. § A.1.4.3.4).

La quantité de nourriture est à adapter en fonction du nombre de larves restantes sachant qu'une surcharge alimentaire va entraîner une baisse du taux d'oxygène dissous et une formation d'ammoniac, et qu'une disponibilité alimentaire insuffisante va être à l'origine d'un phénomène de compétition entre les larves. Il n'a pas été possible d'adapter la quantité de nourriture sèche au nombre exact de larves survivantes à l'aide de notre dispositif de distribution et nous nous sommes basés sur des classes de 10 poissons comme l'illustre le tableau suivant.

Tableau 26: Ration quotidienne de nourriture sèche distribuée aux larves

nombre de larves par récipient	1 - 10	11 - 20	21 - 30
quantité distribuée (mg)	5	10	15

A partir du 6ème jour, les prolarves reçoivent également des nauplies d'artémia. Il est possible d'améliorer le nourrissage des prolarves en distribuant deux fois par jour des paramécies vivantes (Eaton et Farley, 1974a).

La composition des différentes nourritures, les méthodes d'élevage de nauplies ou de paramécies ainsi que les schémas des différents instruments mis au point sont consultables en annexe 5 et 6.

### 1.5.3- Exploitation des résultats

Les mesures et observations faites durant l'essai permettent d'analyser statistiquement le nombre d'oeufs blancs, d'embryons éclos, de larves survivantes ainsi que leur taille à la fin de l'essai. L'apparition d'anomalies embryonnaires ou larvaires sera également considérée. Dans les tableaux de résultats qui seront présentés, nous avons choisis d'exprimer les résultats sans les ramener à un pourcentage.

La mesure de la taille des larves a été réalisée grâce à un lecteur de microfiches lors des premiers essais puis par analyse d'images comme il sera décrit dans le prochain chapitre. Ces deux techniques nécessitant des temps de manipulation importants, nous avons généralement

mesuré un échantillon aléatoire de 20 larves (sur 30) dans deux des trois réplicats prévus pour chaque concentration soit environ 240 larves par essai.

Les traitements statistiques sont effectués à l'aide du logiciel Toxstat 3.0 (Gulley et al., 1989). La normalité des données et l'homogénéité des variances sont tout d'abord vérifiées à l'aide des tests de Shapiro-Wilks et de Bartlett respectivement. Si ces deux conditions sont vérifiées, les différences significatives sont alors calculées (au risque de 5%) à l'aide des tests paramétriques de Dunnett ou du test T avec ajustement de Bonferroni selon le nombre de réplicats par lot. Dans le cas où les conditions relatives à la normalité et à la variance ne sont pas remplies, les tests de comparaison de rang de Steel ou de Wilcoxon sont mis en oeuvre.

La concentration la plus faible pour laquelle un effet significatif est déterminé pour un des critères de toxicité sera considérée comme la CMEO (Concentration Minimale avec Effet Observé). La plus forte concentration testée inférieure à la CMEO se verra attribuer le qualificatif de CSEO (Concentration Sans Effet Observé). Dans le cadre d'essais de toxicité sublétales, la CMEO est souvent utilisée ainsi que la VCh (Valeur Chronique), moyenne géométrique entre la CSEO et la CMEO. Néanmoins, ces informations sont dépendantes des concentrations effectivement testées et pour s'affranchir de cette limite, il est possible de déterminer la concentration inhibant une réponse à un niveau donné (e.g. 20%) grâce à des modèles de calcul. Nous avons d'ailleurs utilisé cette technique lors de travaux d'évaluation de méthodes de conservation d'un effluent (Naudin et al., 1995) car ce procédé de calcul est bien adapté pour comparer les résultats de plusieurs essais. Lors des développements méthodologiques qui seront décrits dans les prochains chapitres, nous ne nous sommes livrés qu'à de rares comparaisons de ce type et nous avons préféré nous limiter à la détermination des CMEO.

#### **1.5.4- Conditions de validité**

Pour que l'essai soit considéré comme valide, les conditions suivantes doivent être remplies par les lots témoins (Dalverny, 1993):

- taux d'oeufs blancs à 24h. < 30%
- temps d'éclosion à 26°C compris entre 3 et 5 jours
- taux d'éclosion > 95%
- survie larvaire au 10ème jour > 80%

### **1.6- Précautions supplémentaires pour l'initiation de l'essai**

#### **1.6.1- Introduction**

A plusieurs reprises au cours de la partie bibliographique, l'importance d'initier les essais avec des embryons aux premiers stades de développement a été soulignée pour garantir une sensibilité maximale aux essais embryo-larvaires. La directive de l'OCDE (1992) recommande d'ailleurs de commencer l'exposition des embryons avant le clivage du blastodisque ou le plus

tôt possible après cet événement. Lors de l'initiation d'un essai SEL complet (6 lots avec 3 réplicats), cette condition est difficile à remplir avec le danio zébré car plus de 900 oeufs sont requis.

Comme nous l'avons mentionné dans le protocole au chapitre B.1.4, la technique habituelle du laboratoire consiste à recueillir les oeufs 2h. à 2h.30 après le début des pontes de manière à obtenir un nombre d'oeufs suffisant. L'inconvénient de cette méthode réside dans le fait que les embryons de danio zébré se développent rapidement (cf. table d'identification chronologique en annexe 1), ce qui nous amène à initier les essais avec une majorité d'embryons au stade Blastula et avec un faible pourcentage d'embryons à des stades inférieurs.

### 1.6.2- Amélioration de l'initiation des essais SEL

De manière à utiliser des embryons de stades embryonnaires initiaux et homogènes, nous avons utilisé la méthode de fécondation *in vitro* qui est d'ailleurs utilisée pour les essais embryo-larvaires sur la carpe et plusieurs espèces de salmonidés. Pour le danio zébré, une description de cette méthode est faite par Bremiller et al. (1993) et nous l'avons mis en oeuvre à plusieurs reprises. Il en ressort que sur cette espèce de petite taille, l'utilisation de cette technique peut être intéressante pour des expérimentations ne nécessitant qu'un faible nombre d'oeufs. Par contre, elle n'est pas appropriée à l'échelle d'un essai SEL car il n'est possible de récupérer qu'une centaine d'embryons synchrones. De plus, des gamètes mâles ne peuvent être obtenus qu'avec des géniteurs "jeunes" qui, de surcroît, succombent parfois à la manipulation. Enfin, il s'agit d'une méthode exigeante en préparation (milieux, matériel) et qui nécessite la collaboration de deux personnes.

Une autre voie de recherche a consisté à optimiser notre protocole de récolte. La récupération délicate des pondeurs toutes les 30 minutes après le début de l'éclairage de la salle d'élevage (stimulus de ponte) a permis de connaître les plages principales de pontes (cf. tableau 27).

Tableau 27: Répartition des pontes de danio zébré après le début de l'éclairage de la salle d'élevage

	moment de la récolte* (min.)				
	30	60	90	120	220
% d'oeufs / total	45,5	37,3	8,7	4,9	3,6
% d'oeufs cumulé	45,5	82,8	91,5	96,4	100

\* à partir du début de l'éclairage

Ces résultats indiquent que la majeure partie de la ponte se déroule dans la première heure après le début de l'éclairage. La récupération des oeufs au terme de ce délai permet donc de disposer de la quasi-totalité des embryons répartis entre trois stades de développement initiaux.

Un prolongement de cette technique consiste à retirer délicatement les pondoires de l'aquarium 20 minutes après l'éclairement et à les replacer après les avoir vidés. Vingt minutes plus tard, ces pondoires sont de nouveaux relevés. Les embryons récoltés à chaque fois sont de stades antérieurs au premier clivage. Cette opération peut être répétée une nouvelle fois selon le besoin en oeufs. Comparée à la fécondation *in vitro*, cette méthode est facile à mettre en oeuvre, ne nécessite qu'une personne et permet de récupérer plusieurs centaines d'embryons par lot de 80 géniteurs. Il est cependant nécessaire d'habituer les poissons à ces transferts de pondoires qui peuvent stopper les pontes lors des premiers essais.

Ce protocole de récolte d'oeufs a été mis au point à la fin du travail expérimental et n'a donc été utilisé que pour les essais sur la tolérance des stades embryo-larvaires aux concentrations en ammoniac et en oxygène dissous de l'eau.

### 1.6.3- Identification des stades embryonnaires utilisés

Dans cette démarche d'emploi d'embryons de stades initiaux et homogènes, il est recommandé de répertorier les stades embryonnaires au début et à la fin de l'initiation des essais. Ceci peut se faire en prélevant cinquante oeufs de façon aléatoire dans le lot d'oeufs utilisé et en les fixant par immersion dans une solution de formol à 3%. Une fois l'essai mis en place, la proportion des différents stades de développement peut être déterminée en se servant de la table d'identification chronologique (cf. annexe 1).

## 2- Mise au point du suivi de l'essai SEL par analyse d'images

### 2.1- Introduction et vocabulaire utilisé

La technique d'analyse d'images a été mise à profit pour améliorer le suivi des essais SEL notamment au niveau du comptage des larves et de la mesure de leur taille. Les atouts de cette technique d'observation et de mesure sont multiples et ses applications dans les domaines de la biologie sont en pleine expansion. Pour commencer, nous avons évalué la fiabilité des opérations de traitement et de mensuration de notre matériel avant de développer une méthode adaptée à notre essai. Avant d'aborder ce chapitre, il est important de prendre connaissance de quelques termes techniques.

**point image:** plus petit élément constituant l'image numérique, dénommé pixel en anglais (forme abrégée de "picture element"),

**résolution de la caméra:** défini la capacité de séparation de lignes ou de points distincts. Ce pouvoir séparateur dépend du champ couvert, de l'objectif de la caméra et des caractéristiques du capteur (nombre de points image). La définition de l'image sur l'écran de visualisation ne

dépend pas de la résolution de ce dernier mais de celle de la caméra et de la carte d'acquisition,

**niveau de gris:** valeur numérique correspondante au résultat de la numérisation de l'intensité lumineuse d'un point de l'image. Un point parfaitement noir aura la valeur 0 et un point blanc, la valeur 255,

**binarisation:** transformation d'une image, au départ, en niveaux de gris (échelle de 256 niveaux) en une image binaire où chaque point image se verra affecter la valeur 0 ou 1. Cette réduction de l'information est indispensable pour les traitements ultérieurs de l'image et se fait en fonction de deux seuils de niveau de gris (min. - maxi.) déterminés par le manipulateur,

**objet:** unité d'observation qui peut aller de l'élément isolé à un ensemble composé d'éléments identiques et indissociables,

**trame:** juxtaposition horizontale de points image; sur le principe de la télévision, l'image n'est jamais transmise complètement mais sous forme de l'ensemble des lignes disjointes (nommées trames) paires puis impaires,

**fermeture:** opération illustrée sur la figure 10. Elle associe les objets d'une image si leur espacement est de taille inférieure à celle d'un élément de référence (dont on peut choisir le diamètre) nommé "élément structurant".

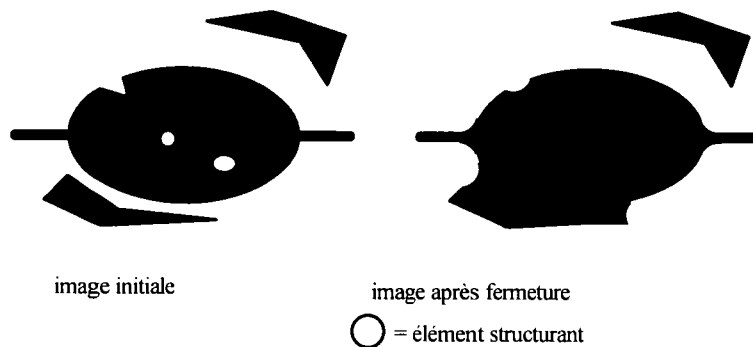


Figure 10: Opération de fermeture appliquée à une image

## 2.2- Objectifs

Au laboratoire, la mesure de la taille des larves été effectuée jusqu'à présent par deux méthodes:

- la photographie des larves vivantes suivie d'une mesure sur négatif à l'aide d'un lecteur de microfiches (utilisé pour sa fonction de grossissement),
- la mesure directe des larves euthanasiées sur un lecteur de microfiches adapté pour recevoir des lames porte-objets.

Les principaux inconvénients consistent, pour la photographie, en un contrôle à posteriori de la qualité des images. L'exploitation des mesures est conditionnée par le réglage de la netteté ainsi que par la qualité du développement du négatif. Avec le lecteur de microfiches, il est nécessaire de sacrifier les larves avant la mesure ce qui n'autorise aucun contrôle de leur



croissance au cours du temps. Les performances de ces méthodes sont résumées dans le tableau 28.

Ces constatations ont amené le laboratoire à se doter d'un équipement d'analyse d'images monochrome afin d'obtenir:

- des mesures multiples (taille, surface, déformation), précises, rapides et non destructives,
- un outil de suivi de nos essais (comptage des larves, mensurations séquentielles),
- un moyen de recherche de nouveaux critères de toxicité pertinents à exploiter sur l'essai embryon-larvaire (e.g. mobilité, comportement),
- une possibilité d'archivage des images permettant une vérification éventuelle des mesures ou la mesure ultérieure d'un critère révélé pertinent.

Tableau 28: Caractéristiques de plusieurs méthodes de mesure appliquées aux essais embryon-larvaires

possibilités	photographie	lecteur de microfiches	analyse d'images
précision des contours	variable	bonne	bonne
mesures séquentielles	oui	non	oui
obtention des résultats	> 24 h.	rapide	rapide

### 2.3- Description de l'analyse d'images

L'analyse d'images comporte deux parties distinctes et complémentaires: tout d'abord, l'**acquisition de l'image** qui consiste à saisir une image à la manière d'un appareil photographique en contrôlant instantanément la qualité de cette image. Cette opération se fait grâce à un capteur assimilable à une surface constituée d'une multitude de minuscules éléments photosensibles (les points image). La quantité d'énergie reçue par chacun de ces points image est convertie successivement en signal électrique (analogique) puis numérique. Ainsi, à chaque point image est associé une valeur (de 0 à 255) correspondante à son intensité lumineuse initiale, aussi appelé "niveau de gris". A titre indicatif, des études de comportement ont permis de constater que l'oeil humain ne distingue guère plus de 32 niveaux de gris (Guizard et al., 1992). Chaque image consiste ainsi en un fin maillage horizontal et vertical où chaque point image renferme de façon codée son intensité lumineuse (ou niveau de gris). La deuxième partie concerne le **traitement de l'image**; rendu possible grâce à l'organisation matricielle des informations et qui se scinde en plusieurs étapes:

- l'amélioration éventuelle de l'image (e.g. rehaussement de contrastes, suppression du bruit de fond),
- la binarisation,
- la caractérisation de tous les objets au niveau dimensions, forme, contrastes,

- l'isolement des objets visés,
- l'extraction des mesures souhaitées.

## 2.4- Matériel utilisé:

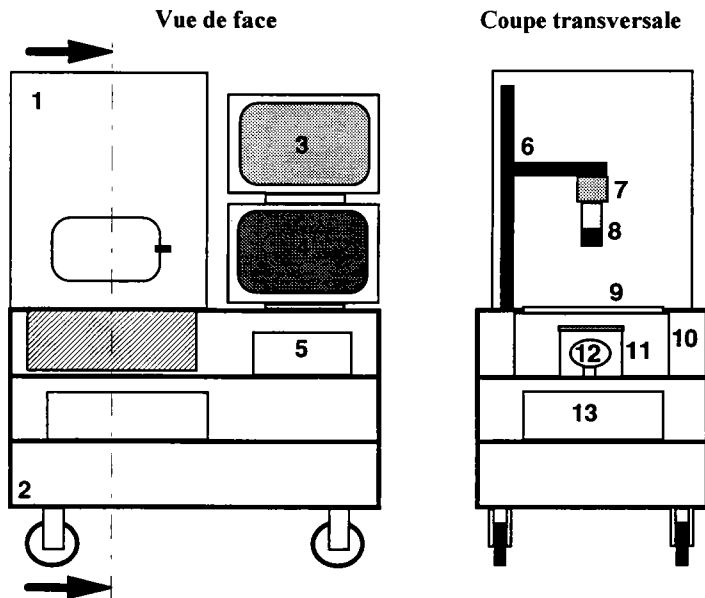


Figure 11: Vue de face et vue en coupe de la station mobile d'acquisition d'images

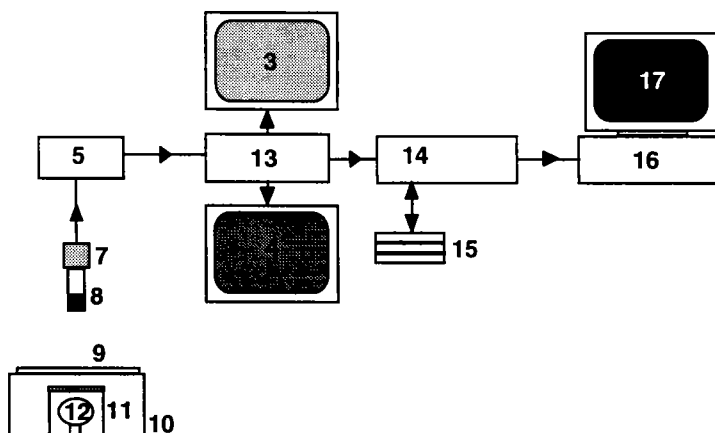


Figure 12: Détail de la chaîne d'acquisition et de traitement des images

### Légende commune

- 1- "chambre" noire
- 2- chariot
- 3- moniteur interface-logiciel
- 4- moniteur de visualisation des images
- 5- boîtier de la caméra
- 6- statif
- 7- caméra
- 8- objectif
- 9- vitre (sur laquelle est posé l'objet dont on veut acquérir l'image)
- 10- cache pour l'éclairage
- 11- diffuseur de lumière
- 12- source lumineuse
- 13- ordinateur PC
- 14- mini-ordinateur Vax
- 15- disque de stockage des images
- 16- station de travail SUN
- 17- moniteur interface-logiciel et de visualisation

### 2.4.1- Equipement pour l'acquisition d'images (Fig. 11)

Le matériel de prise d'images a été disposé sur un chariot roulant pour pouvoir l'utiliser dans plusieurs pièces du laboratoire. Le système d'éclairage ainsi que la caméra liée au statif sont enfermés dans une "chambre noire" ce qui permet de se soustraire de toute lumière parasite et

donc d'avoir des conditions d'éclairage rigoureusement identiques de nos objets quel que soit l'ensoleillement du laboratoire.

Comme source lumineuse, il a été employée une lampe fluocompacte électronique Osram de 15 Watts possédant une fréquence de fonctionnement bien supérieure à celle du secteur de manière à éviter des interférences de fréquence avec le balayage de la caméra. De plus, sa durée de vie est plus importante que les sources lumineuses classiques (lampes néons, lampes à incandescence). L'intensité lumineuse à la surface de la vitre sur laquelle seront posés les échantillons est de 1200 Lux.

Le capteur est une caméra Lhesa (LH510) noir et blanc équipée d'un objectif macro TV zoom lens 18-108 mm (valeurs extrêmes de la focale) F2,5 (ouverture du diaphragme). La caméra est reliée à un boîtier au niveau duquel plusieurs paramètres peuvent être définis (durée d'exposition, gain lumineux).

Avant de parvenir à l'ordinateur PC (Compaq, Deskpro 50m, 8 Méga-octets de mémoire vive), les informations de la caméra transitent par une carte d'acquisition Matrox PIP (résolution de 512x512 points image) avant d'être saisies grâce au logiciel Visilog 4.

La visualisation des images et l'interface-logiciel se font respectivement grâce à un moniteur couleur (Trinitron-SONY) et un moniteur couleur type VGA.

Signalons qu'il existe plusieurs méthodes pour éclairer les objets lors de l'acquisition des images: le rétro-éclairage et l'éclairage latéral comme représenté sur la figure 13.

La première solution a été retenue pour deux raisons:

- le rétro-éclairage favorise la restitution des contrastes et des formes en évitant les problèmes d'ombres (Guizard et al., 1992),
- comme nos récipients d'observations contiennent de l'eau et sont recouvert d'une lame de verre (cf. § B.2.6.3.), l'éclairage latéral fait apparaître des reflets qui peuvent masquer les objets à observer.

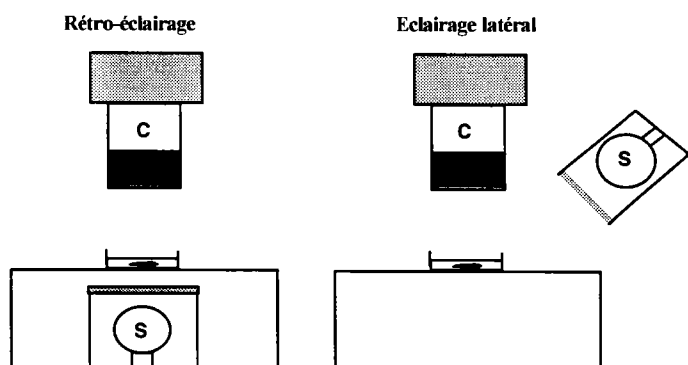


Figure 13: Eclairages possibles des objets lors de l'acquisition d'images (S = source lumineuse; C = caméra)

Ce principe du rétro-éclairage a été retenu dans les dispositifs de prise d'images de plusieurs auteurs mais la saisie effective des images est souvent réalisée après enregistrement d'une

séquence d'images à l'aide d'un magnétoscope (Lefebvre, 1990; Foster, 1994; Castignolles, 1995; Charoy, 1995). Les images successives ou celles choisies par le manipulateur sont alors digitalisées avant leur traitement. Cette étape supplémentaire est surtout adaptée pour l'étude d'événements prolongés avec un besoin de séquençage rapide ( $\geq 25$  images/sec.) lors d'études comportementales ou pour l'identification de poissons en mouvement (Castignolles, 1995).

### **2.4.2- Equipement pour le traitement des images (Fig. 12)**

Pour cette opération, les images sont transférées à un ordinateur sous un environnement UNIX (station de travail SUN, sparc St10) plus puissant en terme de fréquence de calcul et doté d'une mémoire vive plus importante (16 Méga-octets). Un moniteur couleur haute définition permet à la fois l'interface-logiciel et la visualisation des images. Le logiciel utilisé à ce niveau est toujours Visilog 4 mais sous sa version complète. Le transfert des images est réalisé grâce au mini-ordinateur Vax du Cemagref qui gère également leur stockage. Chaque image occupe 256 Kilo-octets, ce qui donne une idée de l'espace mémoire nécessaire.

### **2.4.3- Description du logiciel Visilog 4**

Ce logiciel d'analyse d'images propose de nombreuses fonctions et options tant pour l'acquisition d'images que pour leur traitement. De plus, sa structure est évolutive car il renferme un outil d'enregistrement en langage "C" qui permet à la fois l'automatisation du traitement d'une série d'images et l'intégration d'algorithmes de calcul pour des applications précises.

Un choix important de logiciels existe actuellement sur le marché, proposant généralement des traitements dédiés à des applications particulières comme dans les domaines de la microbiologie, de l'histologie ou de l'étude comportementale (Guizard et al., 1992). Pour cette raison, plusieurs auteurs ont développé leur propre logiciel de traitement en incorporant les algorithmes qui répondent à leurs besoins (Foster, 1994; Castignolles, 1995). Le choix de Visilog représente une solution intermédiaire du fait du nombre très important de possibilités d'analyse offertes tout en restant abordable pour les non-spécialistes.

## **2.5- Fiabilité du matériel**

Des vérifications préalables des performances de notre matériel ont été faites pour s'assurer de la reproductibilité des mesures, leur précision et prendre en compte les limites du traitement des images lors de l'application de cette technique à nos essais.

### **2.5.1- Reproductibilité des mesures sur tout le champ de la caméra**

La première vérification de reproductibilité a été réalisée en mesurant la surface d'un disque placé à différents endroits du champ de la caméra. L'objectif de la caméra est réglé sur un

champ rectangulaire de 44 sur 55 mm de coté divisé en 5 colonnes (repérées de A à E) et 4 lignes (numérotées de 1 à 4).

Ce disque est disposé successivement sur chacune des 20 cases et une saisie de l'image est faite à chaque fois. La figure 14 montre que les surfaces mesurées au centre de l'image sont les plus faibles entourées de valeurs d'autant plus fortes que l'on s'éloigne du centre. Une asymétrie droite / gauche est également révélée alors que le réglage selon un axe vertical de l'ensemble caméra / objectif a été préalablement vérifié.

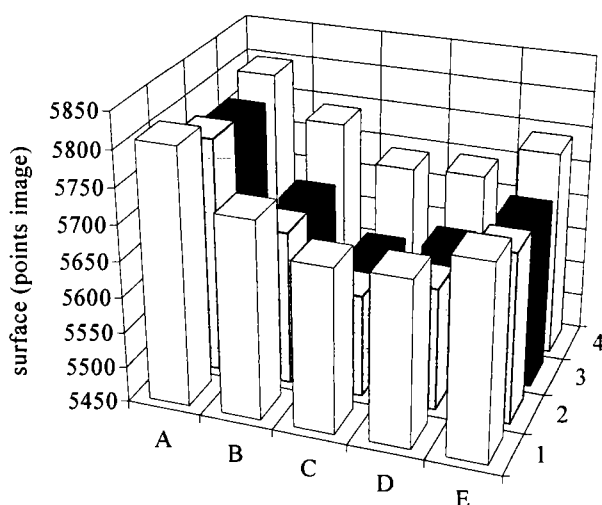


Figure 14: Reproductibilité des mesures de surface d'un objet sur tout le champ de la caméra

Cette distorsion "dimensionnelle" est reconnue comme étant une imperfection fréquente des objectifs (Guizard et al., 1992). Sur le tableau 29, il apparaît que la déformation radiale est la plus forte pour le plus faible grossissement et qu'elle est minimale avec le grossissement fort ou intermédiaire.

Tableau 29: Ecarts de surface d'un disque placé dans toutes les zones du champ de la caméra (exprimés en points image)

<b>position caméra</b>	<b>haute</b>	<b>intermédiaire</b>	<b>basse</b>
<b>grossissement</b>	<b>fort</b>	<b>intermédiaire</b>	<b>faible</b>
surface moyenne	5774	5700	6066
écart maximum de surface	218	215	248
écart-type	62,90	61,89	70,36
C.V.% *	1,09	1,09	1,18

\* coefficient de variation

### 2.5.2- Reproductibilité des mesures au centre du champ de la caméra

Dans les mêmes conditions que celles décrites dans le paragraphe précédent, le disque est déplacé légèrement à l'intérieur d'une même case au centre du champ et une saisie de l'image est faite à 10 reprises.

Les résultats de surface du disque peuvent se résumer dans le tableau 30.

Tableau 30: Ecart de surface d'un disque placé dans la zone centrale du champ de la caméra (exprimés en point image)

<b>position caméra</b>	<b>haute</b>	<b>intermédiaire</b>	<b>basse</b>
<b>grossissement</b>	<b>fort</b>	<b>intermédiaire</b>	<b>faible</b>
surface moyenne	5652	5606	5822
écart maximum de surface	19	14	22
écart-type	5,12	4,47	7,31
C.V.%	0,09	0,08	0,13

La reproductibilité de la mesure de surface est supérieure dans ce cas avec la meilleure performance pour le grossissement intermédiaire.

### 2.5.3- Précision des mesures dimensionnelles

Deux tiges en acier, à bouts arrondis ont été étalonnées au micromètre puis mesurées par analyse d'images 10 fois de suite, disposées sur une lame de verre et avec des orientations différentes à chaque prise de vue. Les résultats sont consignés dans le tableau 31.

Tableau 31: Précision dimensionnelle de deux techniques de mesure (les résultats sont exprimées en mm)

<b>technique de mesure</b>		<b>Etalon 1</b> = 7,86 mm	<b>Etalon 2</b> = 13,46 mm
analyseur d'images	moyenne	7,82	13,39
	écart-type	0,03	0,03
	C.V.%	0,34	0,19
lecteur de microfiches	moyenne	7,89	13,50
	écart-type	0,02	0,04
	C.V.%	0,21	0,30

A titre de comparaison, les mesures ont également été faites sur un lecteur de microfiches en utilisant un grossissement similaire et il apparaît que les deux techniques apportent une précision satisfaisante aux mesures qu'il est cependant préférable de restreindre au dixième de millimètre.

## 2.5.4- Déformations géométriques lors de certains traitements d'images

En plus de la déformation géométrique décrite dans les § B.2.5.1 et B.2.5.2, le traitement d'images utilisant la rotation d'objets peut conduire à certaines erreurs dimensionnelles. Cette fonction est pourtant intéressante car elle permet de tourner artificiellement un objet en vue de la mesure de ses axes principaux. En effet, ces mensurations ne sont pas accessibles directement sous Visilog 4 qui ne fournit les mensurations d'objets que selon les deux axes du repère orthonormé de l'image.

Cette opération de rotation pose cependant des problèmes de fidélité géométrique et donc dimensionnelle comme l'illustrent les deux exemples ci-dessous, si bien qu'une autre méthode sera exploitée pour la mesure de taille de nos poissons au chapitre B.2.6.8.

### ▣ premier exemple

Une tige disposée de façon quelconque sur l'image initiale est orientée à 45°, 90°, 135° et 180° dans le repère orthogonal x / y de l'image par des rotations autour de son centre de gravité. On procède après chaque rotation à une mesure de longueur de cette tige (cf. tableau 32) en appliquant le théorème de Pythagore aux coordonnées de ses extrémités après un étalonnage de l'appareil.

Tableau 32: Mesure de la longueur d'un objet après rotation autour de son centre de gravité.

rotation (d°)	orientation finale (d°)	longueur (mm)
0	16*	13,2
29	45	15,3
74	90	12,9
119	135	15,3
164	180	17,8

\* orientation initiale de la tige

La rotation d'un objet dans l'image ne permet donc pas de conserver ses caractéristiques dimensionnelles et nous en verrons les raisons un peu plus loin.

### ▣ deuxième exemple

Un carré disposé de façon quelconque sur l'image initiale est orienté de manière à aligner un de ses cotés sur l'axe des (x) du repère de l'image grâce à une rotation autour de son centre de gravité comme l'illustre la figure 15.

La restitution du carré fait tout d'abord apparaître un parallépipède (pour une raison que nous développerons juste après cet exemple), et on obtient un autre parallépipède après une rotation de 38° (sens trigonométrique) pour rendre un coté parallèle à l'axe des (x). Seul le parallélisme entre les cotés opposés de la figure géométrique est donc restitué mais pas les angles.

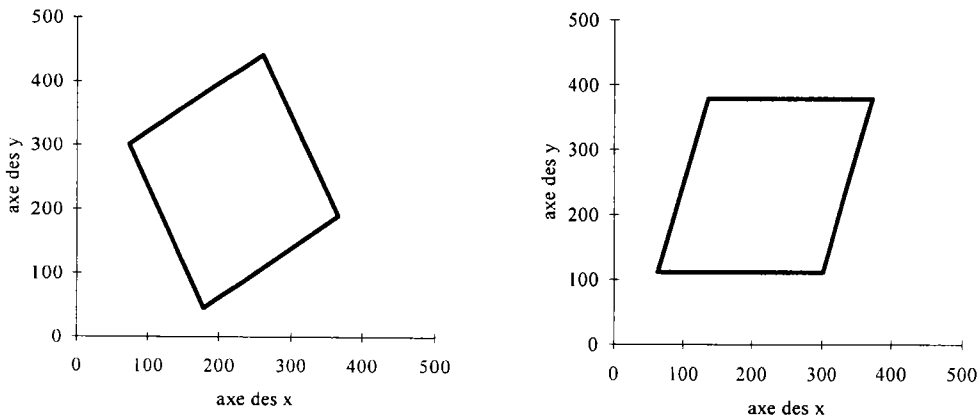


Figure 15: Restitution de l'image d'un carré disposé de façon quelconque (figure de gauche) et après rotation autour de son centre de gravité (figure de droite)

Cette non conservation des caractéristiques dimensionnelles et géométriques des objets après rotation peut s'expliquer par les configurations différentes des systèmes d'acquisition et d'exploitation des images. La grille rectangulaire de la figure 16 représente les points image carrés activés par la présence dans le champ de la caméra d'objets contrastés comme un disque et une tige orientée à  $45^\circ$ .

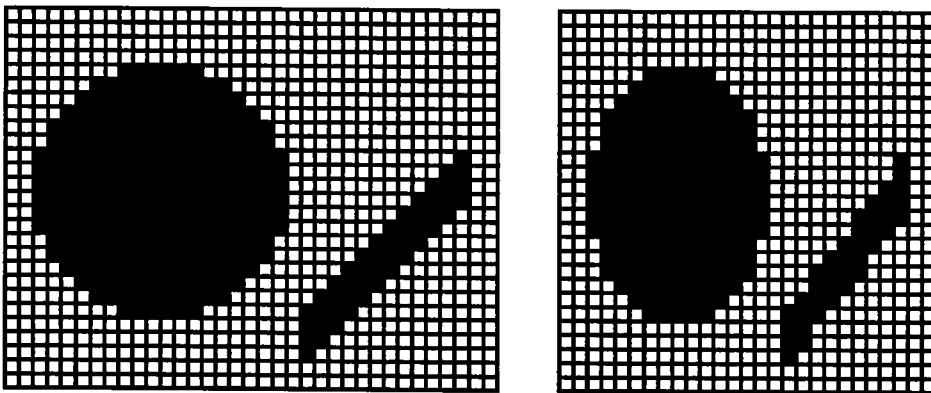


Figure 16: Exemple d'image saisie (à gauche) et restituée par le système d'exploitation (à droite)

L'image restituée met en évidence une déformation horizontale des objets qui est liée à la différence de résolution entre la caméra et le système d'exploitation. La première possède un maillage rectangulaire de 756 par 588 points image alors que celle du système d'exploitation est de 512 par 512.

La restitution de l'image se fait donc après un échantillonnage de l'image initiale selon un maillage carré ce qui a pour conséquence de comprimer horizontalement l'image. La plupart des caméras possèdent une résolution rectangulaire conformément aux normes de l'audio-



visuel (Guizard et al., 1992). Ceci n'est pas trop gênant pour les mensurations d'objets circulaires ou rectilignes si on a procédé à un étalonnage préalable sur les deux axes du repère. Par contre, les angles se trouvent transformés comme l'illustrent les deux grilles: une tige orientée à  $45^\circ$  ( $\alpha$ ) par rapport à l'horizontale est restituée avec un angle  $\beta$  de  $52,1^\circ$ . La relation trigonométrique qui relie les deux angles est:  $\beta = \text{Arctg}\left(\frac{756 \times \text{tg}(\alpha)}{588}\right)$

L'erreur de restitution va dépendre de la valeur de l'angle  $\alpha$  comme l'illustre le tableau ci-dessous.

Tableau 33: Erreur de restitution ( $\beta-\alpha$ ) selon l'orientation de l'objet initial  $\alpha$  (les angles sont exprimés en degré)

$\alpha$	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90
$\beta$	0	12,8	25,1	36,6	47,2	56,9	65,8	74,2	82,2	90
$\beta-\alpha$	0	2,8	5,1	6,6	7,2	6,9	5,8	4,2	2,2	0

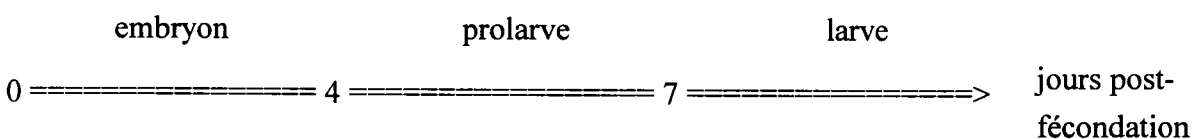
En considérant un repère trigonométrique, le décalage angulaire fluctue d'une valeur nulle pour les angles 0, 90, 180, 270° à une valeur maximum de  $7,2^\circ$  pour les angles de 41, 139, 221 et 319°. L'exploitation de mesures d'angles sera donc évitée dans le cadre de notre travail et l'utilisation d'un capteur à maillage carré est recommandée pour des applications où les mesures d'angle et les rotations sont indispensables.

## 2.6- Application aux essais embryo-larvaires sur le danio zébré

Une fois ces vérifications effectuées, l'outil d'analyse d'images a été mis à profit pour le suivi de la croissance des larves de danio zébré lors d'essais embryo-larvaires après quelques mises au point techniques liées aux "contraintes biologiques".

### 2.6.1- Caractéristiques des stades embryo-larvaires du danio zébré

Les conditions techniques établies pour l'analyse d'images ont découlé principalement de caractéristiques de nos organismes d'essai comme la mobilité ou la pigmentation. Il est possible de présenter ces caractéristiques selon un ordre chronologique pour un développement embryo-larvaire à  $26^\circ\text{C}$  et d'après une terminologie présentée au § A.1.2.3:



- les oeufs sont translucides et non adhérents. Il est donc possible de les transférer dans un récipient pour distinguer les embryons en développement des embryons morts qui présentent un aspect opaque. La pigmentation des embryons va apparaître à partir du 2ème jour (post-fécondation) en commençant au niveau des yeux,

- juste après l'éclosion (4ème jour), les prolarves présentent une forte courbure latérale liée à leur position dans l'oeuf et vont se redresser en quelques heures. Il convient d'attendre le 5ème ou 6ème jour avant de noter les larves malformées,
- le 5ème jour, les prolarves réagissent à des stimuli par des déplacements courts mais rapides. Elles se laissent ensuite tomber au fond (en position horizontale ou oblique, la tête en bas) ou adhèrent à un support vertical (grâce à une glande ventrale adhésive). Leur taille est d'environ 3,3 mm. A partir de ce stade, il est possible de prendre des images des larves après les avoir disposées dans un volume d'eau de faible profondeur de manière à les observer en position horizontale,
- le 6ème jour, les prolarves alternent des phases d'immobilité avec des périodes de nage par saccades,
- au 7ème jour, les larves achèvent de résorber leur vésicule vitelline et nagent en permanence et toujours selon un rythme saccadé; leur position d'équilibre est horizontale et elles commencent à s'alimenter (proies vivantes et particules sèches). Lors des prises de vue, il est alors important d'éliminer les impuretés (reste de nourriture, fèces) qui peuvent s'agglomérer ou adhérer aux larves compliquant ainsi l'exploitation des images.
- au 10ème jour, les larves ont atteint une taille moyenne de 4,3 mm et leur pigmentation n'a pas beaucoup évoluée et reste non homogène sur la surface du corps comme le montre la figure 17.

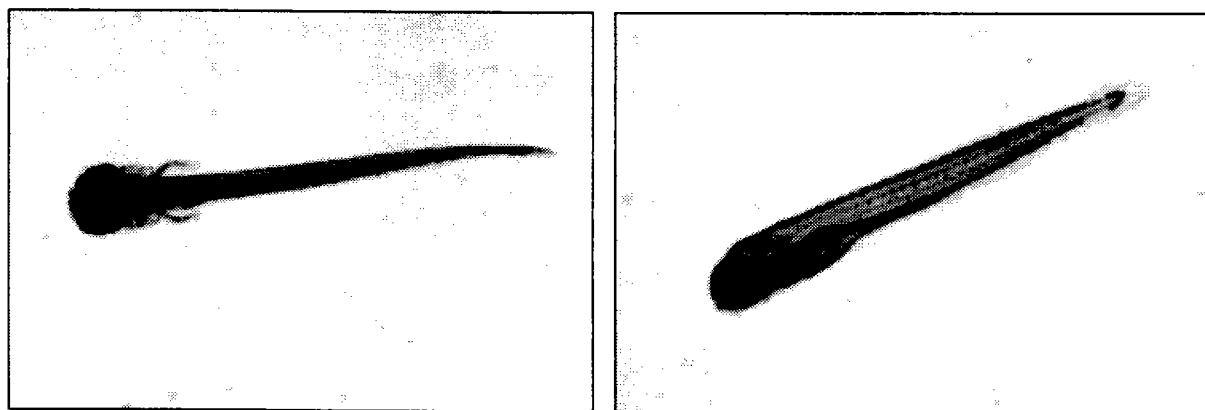


Figure 17: Allure générale d'une larve de danio zébré âgée de 10 jours (taille = 4,2mm) vue par sa face dorsale et latérale

Avec la caméra placée au dessus, la larve en position normale apparaît nettement contrastée sauf au niveau du sommet de la tête et les niveaux de gris s'étalent entre 0 et 210. Lorsque la larve est couchée sur le flanc (suite à un stress par exemple), la gamme de niveaux de gris s'étale au maximum (0 à 255); certaines parties du corps sont donc parfaitement transparentes à la lumière. Le contour du muscle caudal ressort cependant grâce à un filet dorsal et ventral de mélanophores. La partie antérieure du corps ainsi que la vessie natatoire sont également

bien contrastées. La pigmentation des tissus externes ne sera complète que dans la 5ème semaine de vie du danio zébré. La prise en compte de ces caractéristiques va permettre la conception d'un dispositif d'observation adapté et le choix des traitements d'images à effectuer.

### **2.6.2- Etalonnage**

Il est nécessaire d'étalonner le système d'exploitation des images en vue des mensurations. Cette opération a été faite à l'aide de petits disques de contour parfaitement circulaire et dont le diamètre a été mesuré au micromètre avec une précision de 0,01mm. Ces étalons ont été retenus car la différence de maillage des points image entre la caméra et le système d'exploitation oblige à procéder à une calibration sur les deux axes perpendiculaires de l'image et il est difficile d'aligner un étalon carré (papier millimétré par exemple) sur les axes du repère du système d'exploitation.

### **2.6.3- Récipients utilisés**

Le premier récipient utilisé pour prendre des images de danio zébré a été une petite boîte de pétri. La lentille d'eau dans laquelle évolue les poissons a deux faces parallèles sauf au niveau du bord où le ménisque dessine un arc de cercle; l'image est déformée à ce niveau et ce phénomène est dénommé "l'effet bord".

Ce récipient peut donc convenir si on a la patience d'attendre qu'aucun poisson ne soit près du bord de la boîte ce qui est un événement assez rare car les poissons séjournent souvent dans les zones limites d'un nouvel espace.

Ceci m'a conduit à utiliser un verre de montre qui assure une parfaite planéité de la surface de l'eau qu'il contient. Les calculs ont cependant mis en évidence que les objets sont plus ou moins grands selon leur position dans ce récipient. En effet, il existe une corrélation positive entre la taille d'une larve et sa distance par rapport au centre du verre de montre. Ceci est dû à la diffraction lumineuse que produit la courbure du verre de montre et aux indices de réfraction différents des milieux air, verre et eau traversés par les rayons lumineux dans notre configuration de rétro-éclairage.

Différents essais ont permis la mise au point d'un dispositif d'observation présenté sur la figure 18 et baptisée "plaque de conditionnement", évitant les inconvénients des autres récipients évoqués ci-dessus.

Ce dispositif est composé d'une plaque support en verre soutenant une plaque en plexiglas percée de manière à former des cavités. Plusieurs larves vivantes sont déposées dans chaque cavité qui est recouverte d'une lame couvre objet en ajustant le volume d'eau des cavités (à l'aide d'une micropipette) de manière à éviter la présence de bulles d'air. Cette configuration inclut le volume d'eau entre deux faces planes et parallèles (espacées de 1,5mm) ce qui

apporte une reproductibilité satisfaisante des mesures sur l'analyseur d'images tout en laissant un espace suffisant aux poissons.

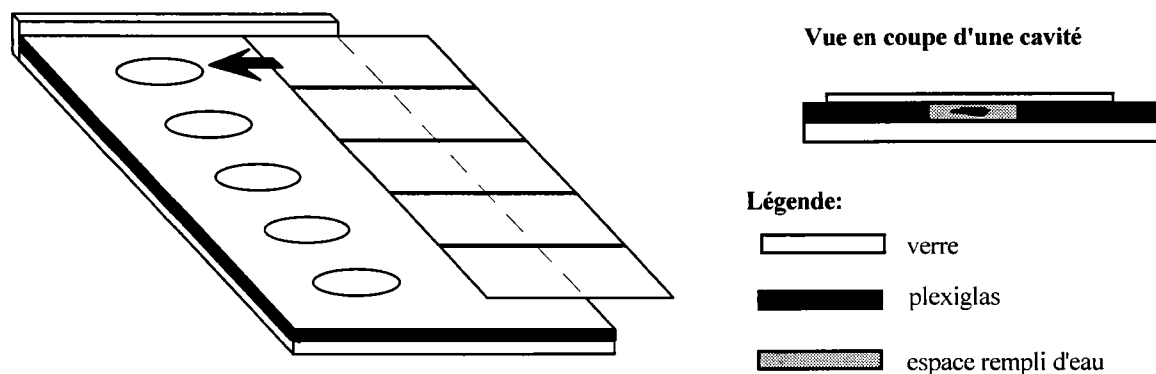


Figure 18: Plaque de conditionnement utilisée pour la mensuration des larves

Les résultats de taille d'une larve dont l'image a été saisie à huit reprises dans différents récipients sont résumés dans le tableau suivant.

Tableau 34: Reproductibilité des mesures d'alevins disposés dans différents contenants.

nature du contenant	diamètre du contenant (mm)	C.V.% sur la taille
boîte de pétri	50	2,8
verre de montre	60	10,0
plaque de conditionnement	20	1,8

Etant donné la mobilité des larves et le temps d'exposition retenu (cf. § suivant), six larves au maximum peuvent être regroupées dans une même cavité lors de la saisie d'une image. Le faible diamètre des cavités n'est pas un inconvénient car leur volume suffit au séjour de ces six larves durant au moins 20 minutes sans entraîner de condition d'hypoxie. Ce dispositif sera donc utilisé pour toutes les prises d'images de larves.

Les inconvénients liés aux récipients utilisés ne sont pas mentionnés dans la littérature mais Foster et al. (1994) précisent que la hauteur d'eau dans les récipients d'observation est réduite au minimum pour améliorer la netteté de toutes les larves. En plus de cette précaution, Charlon et al. (1994) prennent plusieurs images de la partie centrale de leur récipient pour éviter "l'effet bord" et se contentent de la mesure des larves qui passent dans le champ de la caméra lors de quatre saisies d'image successives. Cette technique d'échantillonnage est certainement suffisante pour le suivi de la croissance de larves en pisciculture mais nous a semblé inadaptée lors d'essais de toxicologie où la mobilité des larves peut être réduite et hétérogène. La probabilité d'obtenir les mesures d'un échantillon représentatif du lot de larves

est donc plus faible et nous a conduit à effectuer une mesure de tous les poissons présents dans les récipients.

#### **2.6.4- Conditions de prise d'images**

Les paramètres de prise d'images ont été choisis après de nombreux essais compte tenu de la pigmentation de nos larves et de leur comportement de nage saccadée, comme il a été détaillé au § B.2.6.1.

Le temps d'exposition du capteur retenu est de 1/25ème de seconde (1/50ème par trame) et le déclenchement de la saisie de l'image se fait au moment où les larves sont immobiles. Un flou apparaîtra si un des poissons se met en mouvement à ce moment précis. Deux poissons peuvent également se toucher, se chevaucher lors de la saisie ou toucher le bord de la cavité. Dans ces trois cas, la prise d'image doit être refaite. Le développement d'un algorithme spécifique devrait permettre d'identifier le contour des larves dans tous ces cas de figure pour diminuer le temps de saisie des images.

#### **2.6.5- Opérations retenues pour le traitement des images**

Les images saisies sont analysées par étapes dans le but de ne conserver que les objets désirés pour les opérations de mesures. Ce traitement des images consiste en une suite d'opérations qui doivent être choisies et enchaînées dans un ordre précis. Pour nos images, la cascade de fonctions retenues est la suivante:

- le prétraitement en niveau de gris (rehaussement de contraste),
- la binarisation,
- l'analyse: les objets indésirables (impuretés, bulles) sont éliminées par tri sur les critères de surface, de forme et de gamme de niveaux de gris,
- les mesures: détermination des surfaces, périmètres, coordonnées des points du contour.

Au moment de la binarisation, les seuils sont fixés pour chaque série d'images et seront figés pour le traitement de toute la série; les conditions de prise de vue étant identiques. Ces seuils peuvent varier légèrement en fonction de l'âge des larves et du grossissement choisi au niveau de l'objectif.

Pour la reconnaissance des poissons, leur forme a d'abord été exploitée. Il existe un indice appelé "facteur de forme" qui est calculé à partir du périmètre et de la surface de l'objet considéré. La plage de ce facteur est assez étalée pour nos poissons et englobe beaucoup d'autres objets. Il a été possible de séparer efficacement nos poissons des objets indésirables en conjuguant au facteur de forme, un critère portant sur l'écart entre le niveau de gris minimal et maximal des poissons. Cette gamme de contraste est particulièrement large pour nos larves comparée à celle des impuretés habituellement rencontrées; il est ainsi possible de les isoler aisément.

Lors de l'opération de binarisation, une attention particulière doit être portée afin de prendre en compte la longueur standard des larves (du sommet de la tête à l'extrémité du muscle caudal). Comme l'illustre la figure 17, la pigmentation latérale des larves est discontinue au niveau de l'extrémité de la queue. Lorsque le poisson se tient normalement (plan de symétrie vertical), cette discontinuité de pigmentation se traduit par une interruption de contraste et peut être interprétée comme une séparation entre deux objets. Pour y remédier, les seuils de la binarisation doivent être choisis avec précaution et une opération de fermeture doit être réalisée (cf. fig. 10).

D'autre part, le nombre important d'images prises durant un essai embryo-larvaire (90 images regroupant environ 540 larves) nécessite un temps d'exploitation et de mesure important si toutes les opérations de traitement d'images sont effectuées manuellement image après image. Ainsi, la possibilité offerte par le logiciel d'intégrer un sous-programme exécutable (en langage "C"), a paru intéressante pour automatiser le traitement d'une série d'images et stocker les résultats sous le format ASCII récupérable ultérieurement sur un tableur.

### **2.6.6- Mesures et détections possibles**

L'outil d'analyse d'images permet un suivi précis et rapide à différents niveaux de l'essai embryo-larvaire. Dans l'ordre chronologique de sa réalisation, il est possible dès 24h. après la fécondation de distinguer les oeufs blancs des embryons vivants. L'avantage de l'analyse d'images pour cette distinction n'est pourtant pas évident en terme de temps de manipulation. Par contre, après l'éclosion, le comptage quotidien des larves d'un récipient essai est facilité surtout lorsqu'elles deviennent très mobiles. Au cours de l'essai et à son terme, la mesure des larves est réalisable en terme de taille, de surface, et il est possible de détecter des larves malformées (cf. § B.2.6.12). Il est également envisageable de mettre au point la mesure de mobilité des larves; critère de toxicité qui peut se révéler pertinent (Rand, 1985).

### **2.6.7- Résolution de la caméra**

Pour le comptage des larves, le grossissement utilisé permet une séparation d'objets espacés de 0,32mm au minimum (capacité de résolution de la caméra). Lors de la mesure des larves, effectuée avec un grossissement supérieur, la résolution passe à 0,038mm. Il est donc possible de différencier des larves même si elles sont très rapprochées ou à proximité immédiate des bords des cavités. Ces deux valeurs ont été déterminées grâce à une mire utilisée pour les photocopieuses Rank Xerox.

### **2.6.8- Développement d'un algorithme pour les mesures de taille**

#### **2.6.8.1- Palliatif aux limites du logiciel**

Le logiciel Visilog propose, pour chaque objet de l'image, la détermination d'une multitude de critères (e.g. surface, périmètre, facteur de forme, moyenne des niveaux de gris), mais les

dimensions de leurs axes principaux ne sont pas mesurables directement. Pour un poisson orienté de façon quelconque (cf. figure 19), seules les longueurs projetées sur l'axe des abscisses  $[x(B) - x(A)]$  et sur l'axe des ordonnées  $[y(B) - y(A)]$  peuvent être obtenues.

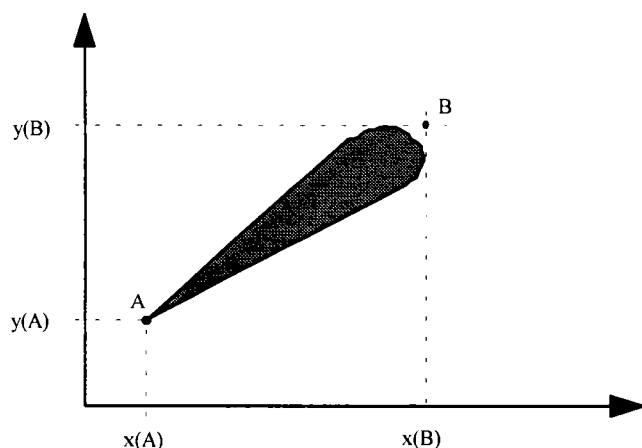


Figure 19: Calcul de la taille des objets par le logiciel Visilog 4

La longueur du poisson recalculée grâce au théorème de Pythagore, correspondant au segment  $[AB]$  surestime cependant la longueur réelle du poisson. Pour pallier cette limite du logiciel, un algorithme de calcul de taille a été intégré au sous-programme exécutable. Pour cela, les coordonnées du contour de chaque poisson sont extraites et utilisées pour déterminer les coordonnées du centre de gravité  $G$  ainsi que celles du point du contour  $E$  qui en est le plus éloigné (cf. fig. 20). Enfin un deuxième point du contour  $F$ , le plus éloigné de  $E$  est localisé. La longueur du poisson est alors décrite par le segment  $[EF]$  et sera calculée grâce au théorème de Pythagore en tenant compte de l'étalonnage préalable.

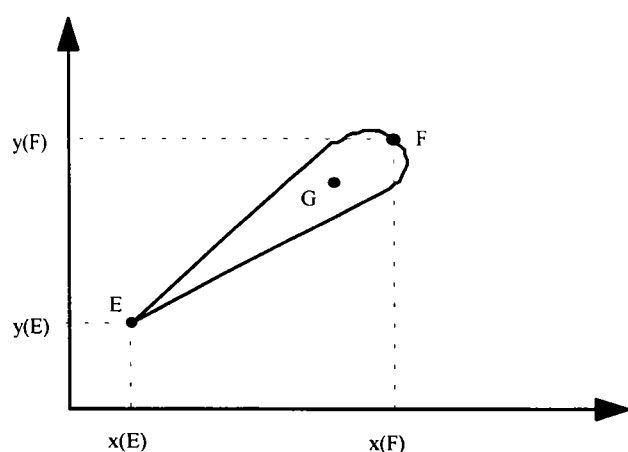


Figure 20: Calcul de taille des objets par un algorithme adapté

### 2.6.8.2- Reproductibilité des mesures de taille

Pour apprécier la reproductibilité des mesures de taille grâce à cet algorithme, trois expérimentateurs ont mesuré à 10 reprises la taille d'une larve de danio zébré sacrifiée à l'aide d'un lecteur de microfiches. La mesure a été également faite 10 fois par analyse d'images à partir d'une larve vivante disposée dans la plaque de conditionnement (cf. tableau 35). Les moyennes de taille des larves n'ont pas été reportées dans le tableau car les mesures ont été faites sur des larves différentes mais de même âge.

Tableau 35: Reproductibilité des mesures de taille de larves

	lecteur de microfiches			
expérimentateur	A	B	C	analyse d'images
écart-type (mm)	0,02	0,04	0,02	0,08

La reproductibilité de la mesure de taille par analyse d'images paraît donc moins bonne que celle obtenue par le lecteur de microfiches. Le coefficient de variation pour les mesures par analyse d'images est néanmoins de 1,9%, ce qui reste acceptable.

Rappelons que la précision des mesures obtenues par ces deux techniques a déjà été comparée (cf. § B.2.5.3) à l'aide d'étalon en métal et qu'elle avait semblé équivalente. La différence constatée ici a pour origine l'observation, en différents points du champ de la caméra, d'un matériel biologique de contraste irrégulier. Avec le lecteur de microfiches, les larves sacrifiées sont observées par leur face latérale ce qui permet une bonne appréciation des contours du poisson et notamment de l'extrémité du muscle caudal. Dans le cas de l'analyse d'images, les larves sont vivantes et observées par leur face dorsale et des zones de discontinuité de contraste peuvent apparaître au niveau de l'extrémité caudale (cf. fig. 17). Il en résulte une légère imprécision des mesures de taille lorsque l'on procède à des mensurations en série pour lesquels les seuils de binarisation sont fixés au départ. A cela s'ajoute la distorsion géométrique de l'image par l'objectif de la caméra évoquée au § B.2.5.1. Cette distorsion existe certainement sur le lecteur de microfiches mais avec une moindre amplitude car la focale est fixe. De plus, l'opérateur va positionner l'objet à observer où il le souhaite (au centre du champ le plus souvent) alors que pour l'analyse d'images, les larves vont se déplacer dans tout le champ de la caméra.

Ces constatations nous conduisent à considérer les résultats de taille obtenus par analyse d'images avec une précision au dixième de millimètre.

### 2.6.9- Variabilité des mesures de taille et de surface

La mensuration d'un grand nombre de larves âgées de 10 jours a fait apparaître une variabilité intra-lot plus importante des mesures de surface que celles des tailles. Sur 10 lots témoins de



30 larves mesurées avec la plaque de conditionnement, les coefficients de variation s'échelonnent entre 6,3 et 15,1% pour la taille et entre 16,7 et 31,6% pour la surface. Il s'agit plutôt de différences individuelles que d'une variation de volume des poissons liée à la quantité de nourriture ingérée avant la saisie de l'image car les larves ne sont pas nourries pendant 12h. avant la mesure. Notons que la variabilité intra-lot plus élevée des surfaces est préjudiciable à la puissance de discrimination des tests statistiques utilisés pour analyser ces données.

### **2.6.10- Corrélations entre la taille, la surface et le poids sec**

Le critère de toxicité que l'on veut mesurer par analyse d'images est en fait la variation de croissance de larves exposées à des toxiques purs (ou effluents) par rapport aux larves témoins. La mesure qui intègre le mieux la croissance consiste en une détermination de la biomasse des organismes par mesure de leur poids sec par exemple.

Cependant la mesure directe du poids de nos organismes oblige à suivre un protocole assez long et impose de grouper une quinzaine de larves au minimum étant donné leur poids sec individuel infime. Par contre, les mesures indirectes (taille et surface) s'obtiennent rapidement par analyse d'images et autorisent les mesures individuelles (poisson par poisson) ce qui permet d'exploiter les informations de croissance même sur un échantillon réduit.

Ainsi, il a paru important de vérifier la corrélation des différentes mesures relatives à la croissance afin de choisir un ou plusieurs critères représentatifs de la biomasse qui ne soient pas redondants.

Au terme de deux essais embryo-larvaires de 10 jours, ces corrélations ont été déterminées sur des larves témoins mesurées par analyse d'images (taille et surface) avant leur sacrifice. Des classes de taille d'environ 0,3mm ont alors été constituées de manière à regrouper une quinzaine d'individus de taille voisine. Ces groupes de larves ont été séchés à l'étuve à 60°C pendant 24 heures puis pesés après un séjour de 2h. au dessiccateur selon les recommandations de l'OCDE (1992). Les coefficients de corrélation ( $r$ ) entre les valeurs moyennes obtenues sont regroupés dans le tableau 36.

En plus du calcul de corrélation sur les grandeurs de taille, surface et poids sec, ce coefficient a également été déterminé pour leur logarithme ainsi que le carré et le cube de la taille. En effet, deux travaux sur la croissance de différents poissons ont permis d'établir les relations suivantes (Balon, 1985; Poxton et Goldworthy, 1986):

$$(a) \text{ surface} = f(p \times \text{taille}^2)$$

$$(b) \text{ poids} = f(q \times \text{taille}^3)$$

$$(c) \text{ Log (poids)} = f(\text{Log}(\text{taille}))$$

Précisons que  $p$  et  $q$  sont deux constantes dépendantes de la forme du poisson pour  $p$ , de la densité spécifique du poisson et du volume occupé par sa forme pour  $q$ .

Il ressort de ce tableau que l'essai n°2 a donné globalement de meilleures corrélations entre les différentes grandeurs que le premier essai sans raison évidente si ce n'est une différence de protocole de nourrissage entre les deux essais (cf. § B.1.5.2.6.). Toutefois les coefficients concordent pour avancer que la surface est un peu mieux corrélée au poids que la taille et cela reste vrai lorsqu'on exprime ces grandeurs sous forme de leur logarithme. Par ailleurs, mise à part la relation (b), les relations (a) et (c) n'ont pas été vérifiées à défaut de mesures échelonnées dans le temps sur des populations plus importantes.

Tableau 36: Corrélation entre les différentes mesures extraites au cours de deux essais embryon-larvaires (exprimé par la valeur de  $r$ )

<b>Essai n°1 (120 larves)</b>						
taille <sup>2</sup>	ne					
taille <sup>3</sup>	ne	ne				
Log taille	ne	ne	ne			
surface	0,909	0,914	0,920	0,902		
Log surface	0,910	0,915	0,921	0,903	ne	
poids	0,925	0,931	0,936	0,918	0,931	0,928
Log poids	0,928	0,933	0,937	0,922	0,925	0,923
	taille	taille <sup>2</sup>	taille <sup>3</sup>	Log taille	surface	Log surface

<b>Essai n°2 (75 larves)</b>						
taille <sup>2</sup>	ne					
taille <sup>3</sup>	ne	ne				
Log taille	ne	ne	ne			
surface	0,991	0,994	0,995	0,986		
Log surface	0,994	0,992	0,988	0,993	ne	
poids	0,950	0,954	0,956	0,944	0,962	0,955
Log poids	0,948	0,950	0,949	0,945	0,957	0,955
	taille	taille <sup>2</sup>	taille <sup>3</sup>	Log taille	surface	Log surface

ne: corrélation non exploitée car elle n'apporte rien

N.B.: le terme Log désigne le logarithme de base 10

L'objectif ici était surtout de déterminer les corrélations de la taille et de la surface par rapport à la biomasse au terme de l'essai SEL. Les tendances obtenues ajoutées aux aspects techniques évoqués en début de ce chapitre sont en faveur de l'exploitation de la surface des larves comme critère de croissance pouvant se substituer à la mesure de biomasse.

Cependant, si la détermination de la surface ne pose pas de problème sur une larve non perturbée (qui nage avec son plan de symétrie vertical), elle devient tout autre si la larve ne peut plus maintenir son équilibre en réponse à une intoxication ou un stress. En effet, la larve de danio zébré n'a pas une section moyenne circulaire (comme c'est à peu près le cas pour

l'anguille). Ainsi, avec la caméra placée au dessus, sa surface est moindre lorsqu'elle se tient normalement que lorsqu'elle est couchée sur le coté. Les résultats du tableau 37, calculés à partir d'une larve progressivement anesthésiée le confirment.

Ainsi, dans le cas d'essais d'exposition à des toxiques, l'exploitation des mesures de surface des larves n'est donc pas recommandée et bien que la taille soit moins bien corrélée à la biomasse que la surface, ce critère de croissance a été préféré à la mesure des surfaces pour plusieurs raisons. Tout d'abord, si certaines larves ne peuvent plus maintenir leur équilibre en réponse à une intoxication ou un stress, la prise en compte de la longueur reste exacte quelle que soit la position de la larve en raison de la pigmentation très contrastée du contour du muscle caudal (cf. fig. 17). De plus, nous avons vu que la variabilité intra-lot des mesures de taille est inférieure à celle de la surface ce qui favorise la détection de différences significatives entre les lots.

Tableau 37: Surface et taille d'une même larve dans différentes positions

mesure	Position de la larve		
	normale	3/4	couchée
surface (mm <sup>2</sup> )	0,9	1,1	1,2
taille (mm)	3,8	3,8	3,8

Par ailleurs, une corrélation des mesures de taille et de poids sec a été faite par Foster et al. (1994) à l'occasion d'essais embryo-larvaires sur le vairon tête-de-boule. Les données recueillies au terme de sept essais sur différents effluents ont permis d'établir une bonne corrélation entre ces deux critères ( $r$  compris entre 0,82 et 0,98) ce qui rejoint nos conclusions sur les deux séries de lots témoins. Les auteurs ont également constaté une sensibilité supérieure ou égale du critère de taille par rapport au poids sec avec parfois une information d'inhibition de croissance avant la fin du test.

### 2.6.11- Mesures séquentielles

Les mesures non destructives par analyse d'images permettent de mesurer les larves au cours du test pour surveiller leur croissance.

A titre indicatif, nous avons suivi la croissance de douze prolarves témoins (élevées isolément) qui ont été mesurées à intervalles réguliers comme le présente le tableau suivant.

Tableau 38: Croissance des prolarves de danio zébré pendant 13 jours (moyenne +/- écart-type; case ombrée si différence significative / taille à 4 jrs.)

jour post-fécondation	4	6	7	8	9	10	13
taille (mm)	3,3	3,5	3,7	3,8	4,0	4,3	5,2
	± 0,4	± 0,4	± 0,3	± 0,4	± 0,3	± 0,6	± 0,7

Les résultats indiquent qu'une croissance significative est mesurable dès le 8ème jour et sur un nombre réduit de larves. Lors des essais SEL, nous mesureront une trentaine de larves par réplicat dans les lots témoins. Pour plus de sécurité, nous avons préféré prolonger nos essais jusqu'au 10ème jour de manière à observer sur six jours complets la survie larvaire et l'apparition d'éventuelles malformations.

Les écart-types obtenus indiquent une dispersion croissante de la taille des larves au cours du temps. Celle-ci n'est pas liée à un phénomène de compétition par rapport à la nourriture (les larves ayant été élevées isolément) mais indique un comportement alimentaire plus ou moins précoce et peut être une prise de nourriture différente d'une larve à l'autre.

Des mesures régulières de taille sont recommandées pour des suivis particuliers visant à identifier les phases où la croissance est ralentie ou pour vérifier la qualité nutritive d'un régime alimentaire. Concernant les essais qui seront détaillés dans la suite de l'exposé, seul une mesure au terme du test a été réalisée car la saisie des images d'environ 500 larves nécessite un temps de manipulation important.

## **2.6.12- Paramétrage des déformations**

### **2.6.12.1- Introduction**

La reconnaissance et le comptage de larves malformées apparaissant à l'occasion des essais SEL s'est fait jusqu'à maintenant de façon qualitative. Il a semblé intéressant de mettre à profit les capacités morphométriques de l'analyse d'images pour reconnaître les larves anormales sur des critères précis.

Une étude a donc été initiée en collaboration avec une équipe de l'INRA (St. Pée-sur-Nivelle) travaillant sur une problématique analogue sur des larves de carpe commune. Ce travail conjoint a permis une mise en commun de nos compétences et le développement d'une méthode performante de tri sans se cantonner au cas particulier d'une espèce. Le concours d'un informaticien du Cemagref a permis de développer un algorithme spécifique de paramétrage des déformations. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication soumise à la revue "Aquatic Living Resources" jointe en annexe 4.

Des anomalies du développement des stades larvaires du danio zébré et de la carpe ont été constatées dans nos deux laboratoires. L'intérêt de détecter ces anomalies est lié à l'utilisation de ces deux espèces lors d'études de toxicologie durant lesquels l'apparition d'effets tératogènes représente une information importante. Par ailleurs, la production de carpes sans malformations est un objectif important en pisciculture et des anomalies de développement d'origine nutritionnelle peuvent apparaître de façon précoce, après seulement deux semaines d'alimentation. Chez le danio zébré, des déformations peuvent être observées dès le troisième jour (après l'éclosion) après exposition des embryons à une substance tératogène (phtalate) ou à la suite de stress physico-chimiques (exposition au NaCl, stress thermique et hypoxique).

Lors d'une étude antérieure réalisée à l'INRA, la recherche de larves de carpe déformées a été faite après anesthésie et étalement de larves sorties de l'eau sur une surface plane (Geurden et al., sous presse). Nous avons souhaité prolonger ce travail en observant les larves de deux espèces directement dans leur milieu de manière à diminuer le temps de manipulation et le stress subi par les larves. De plus, l'identification des larves anormales s'est orientée sur l'exploitation de descripteurs morphométriques disponibles sur la plupart des logiciels d'analyse d'images auxquels nous avons associé un algorithme de calcul simple.

### 2.6.12.2- Matériel et méthode employés

#### □ Matériel animal

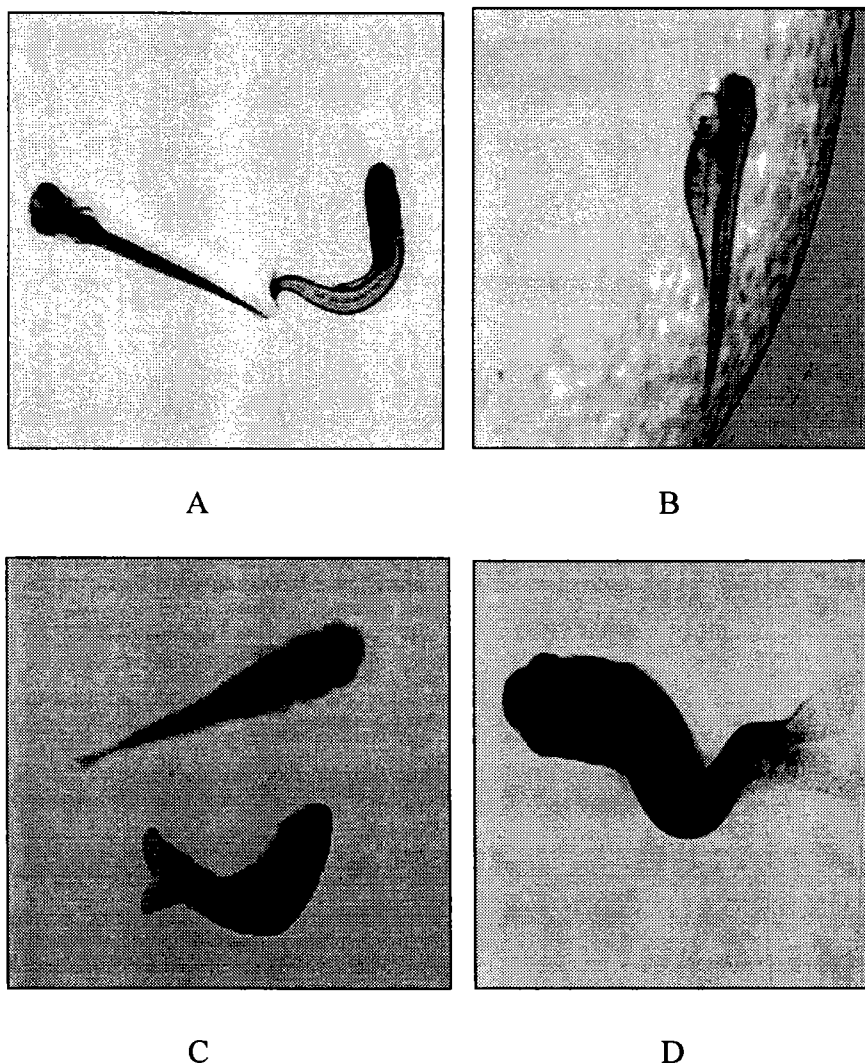


Figure 21: Exemples de larves normales et anormales de danio zébré (images A et B) et de carpe (images C et D). Image A: à gauche, larve normale en vue dorsale (longueur=3,7mm); à droite, larve déformée en vue latérale. Image B: larve anormale gonflée en vue latérale. Image C: en haut, larve normale en vue dorsale (longueur=15mm); en bas, larve déformée en vue latérale. Image D: larve avec scoliose prononcée en vue dorsale.

Lors d'une série d'expérimentations, nous avons retenu les images de larves anormales auxquels nous avons associé les images de larves ne présentant aucune déformation après un examen visuel approfondi. Les anomalies observées concernent essentiellement des déformations vertébrales et/ou des gonflements de la cavité péritonéale (cf. fig. 21).

L'échantillonnage de larves de danio zébré (âgées de 6 à 8 jours) et de carpe (âgées de 20 jours) que nous avons pu regrouper (cf. tableau 39) n'est pas homogène mais cela ne devrait pas compromettre son exploitation.

Tableau 39: Effectifs des échantillons analysés de chaque catégorie de larves.

Espèce	danio zébré			carpe		
	normale	déformée	anormale gonflée	normale	déformée	anormale gonflée
Vue dorsale	21	14	3	19	4	2
Vue latérale	7	3	18	4	9	-

Les larves sont placées dans un récipient transparent contenant de l'eau. La saisie des images des larves immobiles est faite par dessus et la définition des contours et des contrastes est optimisée grâce à un rétro-éclairage (cf. § B.2.4.1). Les larves sont vues soit dorsalement lorsqu'elles se tiennent normalement soit latéralement lorsqu'elles sont sur le flanc ou bien couchées sur le fond du récipient. Dans le cas d'un contact entre deux larves (ou de leur recouvrement), la prise d'image est renouvelée.

#### ▣ **Matériel et traitement des images**

Cette étude a été réalisée avec le matériel présenté au chapitre B.2.4. Pour le traitement des images, nous avons suivi la procédure décrite dans le chapitre B.2.6.5 en utilisant conjointement les logiciels Visilog 4 et Optimas 4 (Bioscan, USA) pour les mesures effectuées dans le laboratoire de l'INRA. La concordance des résultats apportés par les deux logiciels a été vérifiée dans un premier temps. Les mesures extraites ont concerné:

- la surface et le périmètre des larves,
- les coordonnées des points du contour des larves,
- la longueur et largeur du rectangle minimum d'encadrement (RME)\* des larves.

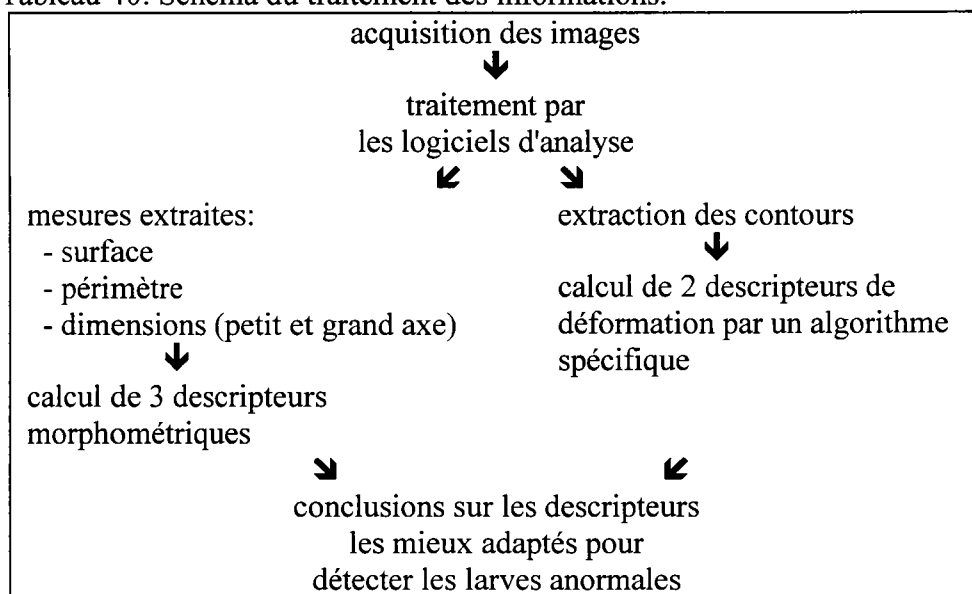
Nous n'avons effectué aucune rotation d'objet, ni mesure d'angle de déformation qui nécessite l'usage d'une caméra à réseau carré de points image. La reproductibilité de nos mesures a également été vérifiée. Ainsi, les mensurations d'une même larve dont l'image a été faite à dix reprises a fourni un coefficient de variation de 0,5% pour la surface et de 2,2% pour le périmètre.

---

\* le RME entoure l'objet parallèlement à ses axes principaux

L'organisation du traitement des images est résumée dans le tableau 40.

Tableau 40: Schéma du traitement des informations.



### □ Descripteurs utilisés

Les mesures extraites permettent le calcul des trois descripteurs morphométriques suivants:

- le facteur de forme (ou circularité) =  $\text{périmètre}^2 / \text{surface}$
- la rectangularité =  $\text{surface de l'objet} / \text{surface du RME}$
- l'élongation =  $\text{longueur du RME} / \text{largeur du RME}$

Deux autres descripteurs de déformation sont calculés grâce à un algorithme spécifique:

- le rapport entre la taille du squelette et la taille minimum,
- la position de la cassure.

L'algorithme utilise le fichier des points du contour des larves fourni par Visilog (cf. fig. 22).

Le centre de gravité (CDG) est d'abord calculé. L'extrémité de la queue (Q) est déterminée en recherchant le point du contour le plus éloigné du CDG. L'extrémité de la tête (T) correspond au point le plus éloigné du point Q. La taille "minimum" ( $T_m$ ) de la larve est définie comme étant la distance entre les points T et Q.

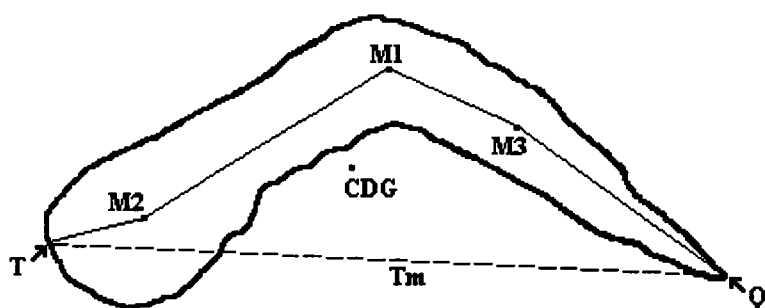


Figure 22: Illustration des descripteurs obtenus par l'algorithme spécifique.

Il est alors procédé à un balayage du contour selon une droite perpendiculaire à la droite TQ. A chaque couple de point du contour rencontré, il sera associé un point moyen à égale distance des deux points du contour. L'ensemble de ces points moyens va constituer le squelette mathématique de chaque larve. Le point de l'axe médian le plus éloigné de la droite TQ est ensuite déterminé (M1), puis les points intermédiaires M2 et M3, respectivement les plus éloignés des droites TM1 et M1Q. Le squelette mathématique de chaque larve a été évalué par quatre segments de droite TM2, M2M1, M1M3 et M3Q dont la longueur totale fournit une mesure de la taille du squelette (Ts). Le premier descripteur de déformation est le rapport des deux tailles calculées  $T_s / T_m$ , qui est d'autant plus grand que la larve est plus déformée. Le second descripteur est basé sur le niveau de cassure et correspond au rapport des longueurs  $[TM1]/([TM1]+[M1Q])$  exprimé en %.

#### □ **Analyse des données**

Les valeurs des cinq descripteurs correspondant aux 104 larves ont fait l'objet d'une analyse en composantes principales, effectuée grâce au logiciel ADE à partir des données centrées réduites (Chessel et Doledec, 1992). L'objectif de cette approche qualitative était de faire ressortir les capacités discriminantes ainsi que la redondance éventuelle des descripteurs utilisés avant de procéder à l'examen détaillé des valeurs numériques.

Les traitements statistiques ultérieurs sont effectués à l'aide du logiciel Toxstat 3.0 (Gulley et al., 1989). La normalité des données et l'homogénéité des variances sont tout d'abord vérifiées à l'aide des tests du Khi-deux et de Bartlett respectivement. Si ces deux conditions sont vérifiées, les différences significatives entre les moyennes sont alors calculées à l'aide des tests paramétriques de Dunnett ou du test T avec ajustement de Bonferroni selon le nombre de réplicats par lot. Dans le cas où les conditions relatives à la normalité et à la variance ne sont pas remplies, les tests de comparaison de rang de Steel ou de Wilcoxon sont mis en oeuvre.

### **2.6.12.3- Résultats**

Avant de présenter les résultats des analyses en composantes principales et du traitement approfondi des données, le tableau 41 résume les valeurs des descripteurs pour chaque groupe sans aucune distinction relative à la vue d'observation des larves (dorsale ou latérale).



Tableau 41: Valeurs des descripteurs pour les différents groupes analysés.  
Les résultats sont exprimés sous forme des moyennes suivies de l'écart-type.

descripteur	groupe			
	danio normal	danio anormal	carpe normale	carpe anormale
facteur de forme	57,36 ± 7,38	37,39 ± 9,76	48,78 ± 9,24	42,86 ± 8,03
rectangularité	0,50 ± 0,05	0,48 ± 0,10	0,54 ± 0,05	0,47 ± 0,05
élongation	5,87 ± 0,34	2,84 ± 1,10	5,19 ± 0,71	3,26 ± 1,07
rapport de taille Ts / Tm	1,002 ± 0,004	1,100 ± 0,103	1,003 ± 0,006	1,061 ± 0,057
niveau de cassure (%)	40,04 ± 25,11	51,97 ± 16,32	53,50 ± 24,48	45,55 ± 21,31

#### □ Analyse en composantes principales (ACP)

Cette analyse a pris en compte les valeurs des cinq descripteurs en regroupant les données des deux espèces. Ceci était destiné à mettre en évidence des descripteurs prépondérants et exploitables quelque soit l'espèce observée.

Au cours de cette analyse, il s'est avéré que les axes F1 et F2 expliquent plus de 74% de la variabilité du nuage de points. L'histogramme des valeurs propres est présenté dans la figure 23.

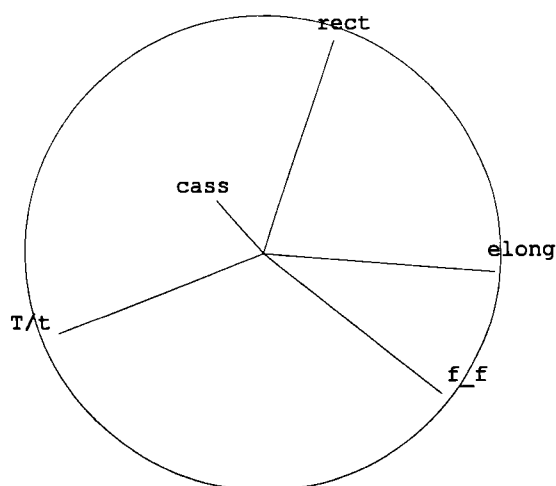
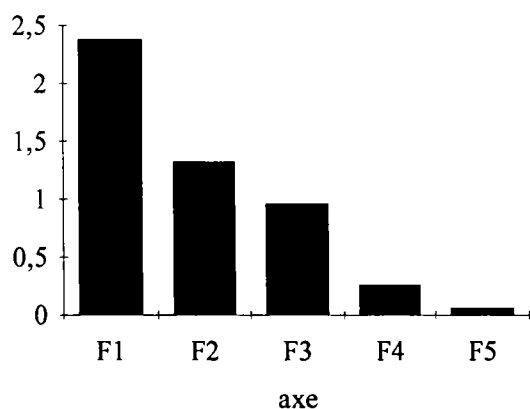


Figure 23: Histogramme des valeurs propres

Figure 24: Cercle de corrélation pour les axes F1 et F2.

Le cercle des corrélations pour les axes F1 et F2 (cf. fig. 24) indique une corrélation importante des variables "élongation (elong)" et "facteur de forme (f\_f)" avec l'axe F1. La

variable "rapport de taille (T/t)" présente aussi une corrélation importante mais négative avec cet axe. Par ailleurs, l'axe F2 semble corrélé essentiellement avec la variable "rectangularité (rect)". Ces quatre variables semblent donc à considérer en priorité pour la caractérisation de l'état des larves.

La figure 25 montre les coordonnées factorielles des individus appartenant aux quatre groupes constitués par les larves normales et anormales des deux espèces, sans faire de distinction entre vue dorsale et vue latérale. Cette figure illustre la dispersion plus importante des individus anormaux, le chevauchement des nuages ainsi que la répartition relative des groupes dans le plan considéré. Une séparation appropriée des groupes de larves normales et anormales de chaque espèce semble donc à envisager préférentiellement avec les variables corrélées à l'axe F1.

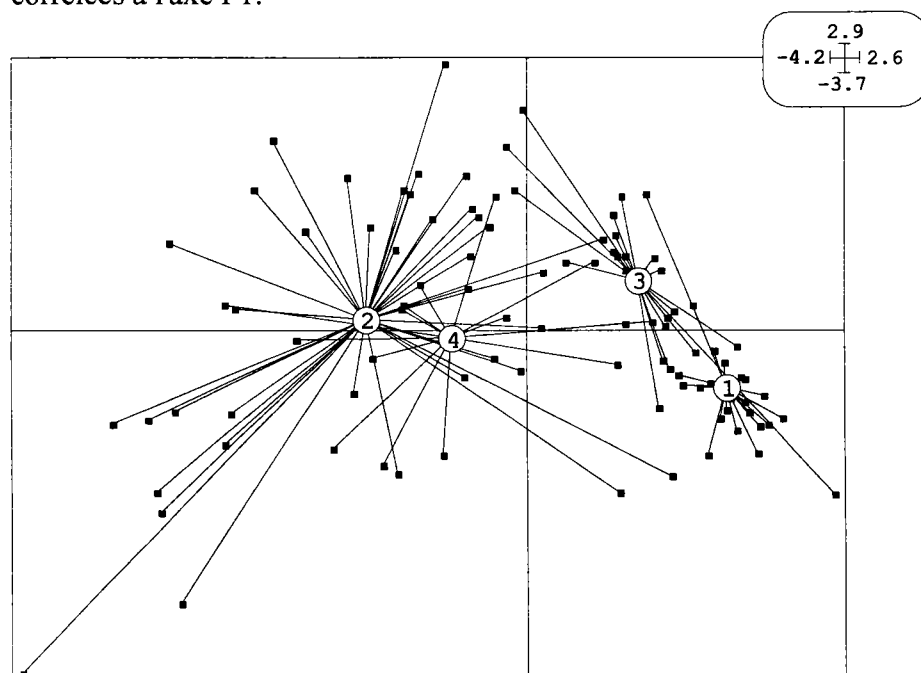


Figure 25: Représentation des coordonnées factorielles des individus (carrés pleins) dans le plan (F1, F2). Les larves d'un même groupe sont reliées à leur centre de gravité (cercles numérotés) 1: danios zébrés normaux, 2: danios zébrés anormaux, 3: carpes normales, 4: carpes anormales.

### □ Traitement des données des larves de chaque espèce

Pour la suite de l'exploitation des données, nous avons choisi d'étudier nos données par espèce avant d'envisager une séparation globale des larves.

#### □□ Séparation des larves de danio zébré normales et anormales

Parmi les cinq descripteurs, seuls le facteur de forme, l'élongation et le rapport de taille (qui ont montré une corrélation avec l'axe F1 lors de l'ACP) permettent une distinction entre les groupes de larves normales et anormales à l'aide de tests de comparaison de moyenne.

Pour caractériser la population de larves normales, nous avons alors choisi de retenir le descripteur d'élongation dont les valeurs vérifient la loi normale  $\mathcal{N}$ . L'intervalle qui regroupe

95% des données peut alors se définir par la moyenne  $\pm (1,96 * \text{écart-type})$  soit [5,19 - 6,54]. Si nous décidons de prendre comme limites les bornes (5,1 - 6,6) pour ce descripteur et que nous trions toutes les larves de danio zébré, seules deux larves déformées sont classées parmi les larves normales. L'erreur de 2/66 est donc tout à fait satisfaisante.

Une distinction plus avancée du type d'anomalie (déformation vertébrale ou gonflement) n'est cependant possible avec aucun des cinq descripteurs. Par contre, une séparation des larves normales en fonction de leur vue d'observation (vue dorsale ou vue latérale) est réalisable. L'intérêt de cette distinction consiste à pouvoir repérer les larves couchées sur le flanc qui traduisent des conditions stressantes (variation de température, hypoxie, présence de substance toxique) au cours des expérimentations.

Suivant le même procédé de traitement des données que nous avons adopté précédemment, un test de comparaison de moyenne a révélé une différence significative entre les moyennes des deux sous-groupes de larves (vue dorsale / vue latérale) d'après les valeurs de facteur de forme et de rectangularité. Rappelons que lors de l'ACP, ces deux descripteurs ont montré une bonne corrélation avec respectivement l'axe F1 et F2. Les valeurs de ces deux descripteurs pour les larves en vue dorsale présentant une distribution  $\mathcal{N}$ , nous les avons retenus tous deux pour la suite du tri qui est présenté dans le tableau 42.

Tableau 42: Caractérisation des larves de danio zébré normales (vue dorsale)

	descripteur	
	facteur de forme	rectangularité
intervalle (moy. $\pm 1,96 * \text{écart-type}$ )	54,16 - 68,02	0,44 - 0,52
intervalle retenu	54 - 69	0,4 - 0,6
erreur lors du tri (vue dorsale / vue latérale)	0 / 28	5 / 28

Avec l'intervalle de rectangularité retenu, cinq larves vues par leur face latérale sont mal classées alors que l'intervalle de facteur de forme choisi conduit à un classement parfait des larves.

Le tableau suivant reprend les niveaux de tri possible sur les larves de danio zébré ainsi que le taux d'erreur obtenu sur notre échantillonnage.

Tableau 43: Schéma de séparation des groupes de larves de danio zébré

			erreur
élongation > 5,1 ↓ oui ↓	→ non →	larves anormales	2 / 66
facteur de forme < 54 ↓	→ non →	larve normale en vue dorsal	0 / 28
	→ oui →	larve normale en vue latérale	

### □ Séparation des larves de carpes normales et anormales

Pour les larves de cette espèce, des tests de comparaison de moyenne sur les descripteurs de rectangularité, d'élongation et de rapport de taille ont permis la distinction des groupes de larves normales et anormales.

Seules les valeurs de rectangularité montrent une distribution  $\mathcal{N}$  pour les larves normales mais le tri de toutes les larves à partir de l'intervalle qui regroupe 95% des données n'est pas satisfaisant du fait du recouvrement important des valeurs de ces deux groupes.

Le fait de ne pas avoir de distribution  $\mathcal{N}$  pour les valeurs d'élongation et de rapport de taille pour les larves normales suggère que ce groupe peut rassembler deux populations de larves. En effet, en scindant le groupe de larves normales en deux sous-populations (vue dorsale et vue latérale), celles-ci montrent une distribution  $\mathcal{N}$  pour le descripteur d'élongation comme l'illustre la figure 26.

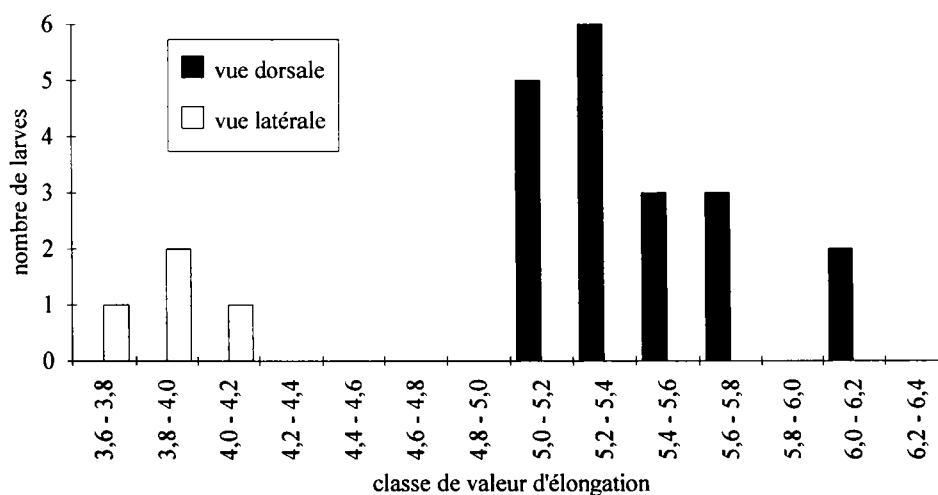


Figure 26: Distribution des valeurs d'élongation pour les larves normales de carpes

Si l'on caractérise la population de larves normales en vue dorsale à l'aide de ce descripteur, l'intervalle qui regroupe 95% des données est: 4,66 - 6,26. Si l'on retient les bornes (4,6 - 6,3), on obtient une séparation des larves normales (vue dorsale) et des larves anormales

confondues avec les larves normales en vue latérale; deux larves anormales étant cependant classées parmi les larves normales.

D'après les tests de comparaison de moyenne, le groupe de larves anormales peut être distingué des larves normales en vue latérale en exploitant les valeurs de rectangularité. Etant donné les différences d'effectifs, nous calculerons cette fois l'intervalle qui regroupe 95% des données à partir des larves anormales dont les valeurs de rectangularité suivent une distribution  $\mathcal{N}$ . A partir de l'intervalle calculé [0,37 - 0,58], le tri effectué selon les bornes (0,3 - 0,6) conduit à deux erreurs de classement (larves normales classées parmi les larves anormales). Il est certain que l'échantillon de larves normales en vue latérale, limité à quatre individus, rend difficile le calcul d'un réel taux d'erreur.

Le tableau 44 va reprendre les niveaux de tri possible sur les larves de carpes.

Tableau 44: Schéma de séparation des groupes de larves de carpes

			erreur
élongation > 4,6	→ oui →	larves normales en vue dorsale	2 / 38
↓ non ↓			
rectangularité > 0,6	→ oui →	larve normale en vue latérale	2 / 19
	↘ non →	larve anormale	

#### 2.6.12.4- Discussion

Pour la détection de larves de carpes atypiques observées après anesthésie en vue latérale, Geurden et al. (sous presse) ont utilisé un index calculé à partir de la largeur du rectangle minimum d'encadrement et de la surface des larves. Ce descripteur n'a pu être mis à profit dans ce travail du fait de la prise en compte simultanée de larves vues par leur face dorsale ou latérale.

Par ailleurs, nous avons choisi de travailler sur la phase larvaire de ces deux espèces car elle est propice à la détection de malformations. Il est certain que la détection d'individus anormaux à des stades de développement différents nécessiterait vraisemblablement une exploitation différente des descripteurs ou l'adaptation de leurs seuils.

Dans un premiers temps, l'analyse d'un nouvel échantillon de larves de carpe et de danio zébré est important à réaliser pour valider notre méthode. Celle-ci a surtout fait ressortir la capacité discriminatoire des descripteurs d'élongation, de facteur de forme et de rectangularité. Par contre, les descripteurs obtenus par l'algorithme se sont avérés moins adaptés pour la détection de larves anormales.

### **2.6.12.5- Conclusion**

Cette étude a montré l'intérêt de l'analyse d'images pour la détection des larves anormales applicable au suivi du développement de larves de danio au cours d'expériences toxicologiques ou de larves de carpe soumises à différents régimes alimentaires. Le repérage de larves anormales a été réalisé avec un taux d'erreur plus réduit pour le danio zébré compte tenu des différences morphologiques entre ces deux espèces.

Dans le cas du danio zébré, nous avons même pu obtenir une information sur l'orientation du plan de symétrie des larves normales sous la caméra. Dans le cadre des essais SEL, la détection de larves vivantes mais couchées sur le flanc peut s'ajouter aux observations faites habituellement. Rappelons aussi que parmi les formes de danio zébré anormales, il n'a pas été possible de pousser plus loin la distinction des larves déformées ou gonflées ou bien simultanément déformées et gonflées. Ces déformations pouvant avoir une signification toxicologique particulière.

Un prolongement de ce travail va d'ailleurs consister à améliorer le paramétrage morphométrique des déformations par une recherche d'autres descripteurs de forme. Cette démarche devrait également permettre de définir le degré de "gravité" des déformations identifiées. L'exploitation des angles de déformation est également en projet grâce à l'utilisation d'une caméra à réseau carré de points image.

Une étape supplémentaire consistera à valider notre méthode pour le tri des larves d'autres espèces de poisson. Une combinaison différente des descripteurs sera certainement nécessaire étant donné les différences morphologiques inter-spécifiques.

### **2.6.13- Discussion et conclusion sur les apports de l'analyse d'images aux essais SEL**

La prise en compte des caractéristiques et des limites de notre système d'analyse d'images ont donc permis le développement d'outils et de procédures adaptées au suivi des essais embryolairaires en terme de comptage des larves et pour la mesure de leur taille. Celle-ci est réalisée avec une précision satisfaisante et s'est révélée plus adaptée que la mesure de surface pour le suivi de la croissance.

Après avoir mis au point un protocole de prise de vues et de traitement des images, cette technique a été appliquée à la mensuration des larves à la fin des essais SEL. Auparavant, cette information était obtenue par mesure directe "visuelle" sur l'écran d'un lecteur de microfiches utilisé pour ses propriétés agrandissantes. La reproductibilité des mesures par cette technique est légèrement meilleure que celle obtenue par analyse d'images qui n'apporte, par ailleurs, pas de gain de temps important du fait de la nécessité de préparer les échantillons (inclusion dans la plaque de conditionnement).

D'autre part, lors des essais visant à évaluer la toxicité sublétales d'effluents, une limite des mesures par analyse d'images pourrait apparaître avec des échantillons contenant des pigments

qui induiraient une coloration différente des poissons selon les concentrations testées. En particulier, les tissus sans cellules pigmentaires au stade larvaire, comme les rayons de la nageoire caudale, pourraient être colorés et provoquer une erreur dans la mesure de taille. Dans de tels cas, il faudrait "surcolorer" toutes les larves, après euthanasie, à l'aide d'un colorant (bleu de méthylène, rose Bengale,..) ou bien recourir au lecteur de microfiche pour effectuer la mesure de taille. Toutefois, au terme d'un bon nombre d'essais embryo-larvaires appliqués à des effluents urbains et industriels (dont un provenait d'une teinturerie), aucune coloration des larves n'a été observée.

L'analyse d'images s'est révélée surtout intéressante pour le comptage des larves et pour les analyses morphométriques. Elles ont permis le repérage de larves présentant des malformations différentes et nous appliquerons cette méthode lors de notre étude sur la tératogenèse.

### 3- Domaines de tolérance des stades embry-larvaires du danio zébré

#### 3.1- Introduction

Cette partie de notre travail a eu pour objectif une meilleure connaissance de la sensibilité des stades embry-larvaires du danio zébré aux paramètres physico-chimiques du milieu. Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, les poissons présentent des différences de tolérance aux caractéristiques physico-chimiques de l'eau (e.g. température, pH, O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>) selon les espèces. En plus d'une perturbation directe des organismes au delà de certaines limites, des paramètres tels que le pH ou la dureté peuvent conditionner la biodisponibilité de composés toxiques. Certains effluents industriels possèdent par exemple des pH acides ou basiques. Dans le cas des effluents urbains, des teneurs élevées en ammoniac et des concentrations réduites en oxygène dissous ont été mesurées et il s'est révélé important d'évaluer leur contribution à la toxicité observée au cours d'essais SEL.

#### 3.2- Dispositif expérimental

De manière à assurer une stabilité acceptable des paramètres testés au cours de l'essai, un dispositif de dilution proportionnelle adapté de Benoit et al. (1982) a été utilisé (cf. fig. 27) pour les essais sur la température, le pH, la salinité et la dureté de l'eau.

La relation récurrente qui lie les concentrations de la substance d'un étage à l'autre est la suivante:

$$C_n = \frac{(C_{n-1}) \times \left( \sum_{i=0}^{n-1} D_i - \sum_{i=0}^{n-1} d_i \right)}{\left( \sum_{i=0}^{n-1} D_i - \sum_{i=0}^{n-1} d_i \right) + D_n}$$

avec

$C_n$ : concentration de la solution à l'étage  $n$

$D_i$ : débit de l'eau de dilution à l'étage  $i$

$d_i$ : débit d'apport aux récipients essai issus de l'étage  $i$

La solution mère, apportée au premier étage à la concentration  $C_0$  et avec un débit  $D_0$  constitue la première concentration testée. Cette concentration est diluée progressivement avec de l'eau de dilution apporté selon les débits  $D_1$  à  $D_5$  réglables en agissant sur la combinaison des facteurs de dénivellation et de diamètre du capillaire. Chaque concentration est apportée aux récipients d'essai selon un débit "d" de préférence uniforme de manière à avoir le même renouvellement des solutions pour toutes les dilutions testées.

Lors de nos essais, les débits "d" ont été réglés de façon uniforme à 6ml/mn (répartis en 3 branches) et les récipients d'essai, en triplicats, ont été maintenus dans un bain-marie régulé à  $26 \pm 1^\circ\text{C}$ . Les récipients en verre utilisés (cf. § B.1.5) permettent l'évacuation des solutions apportées en continu.



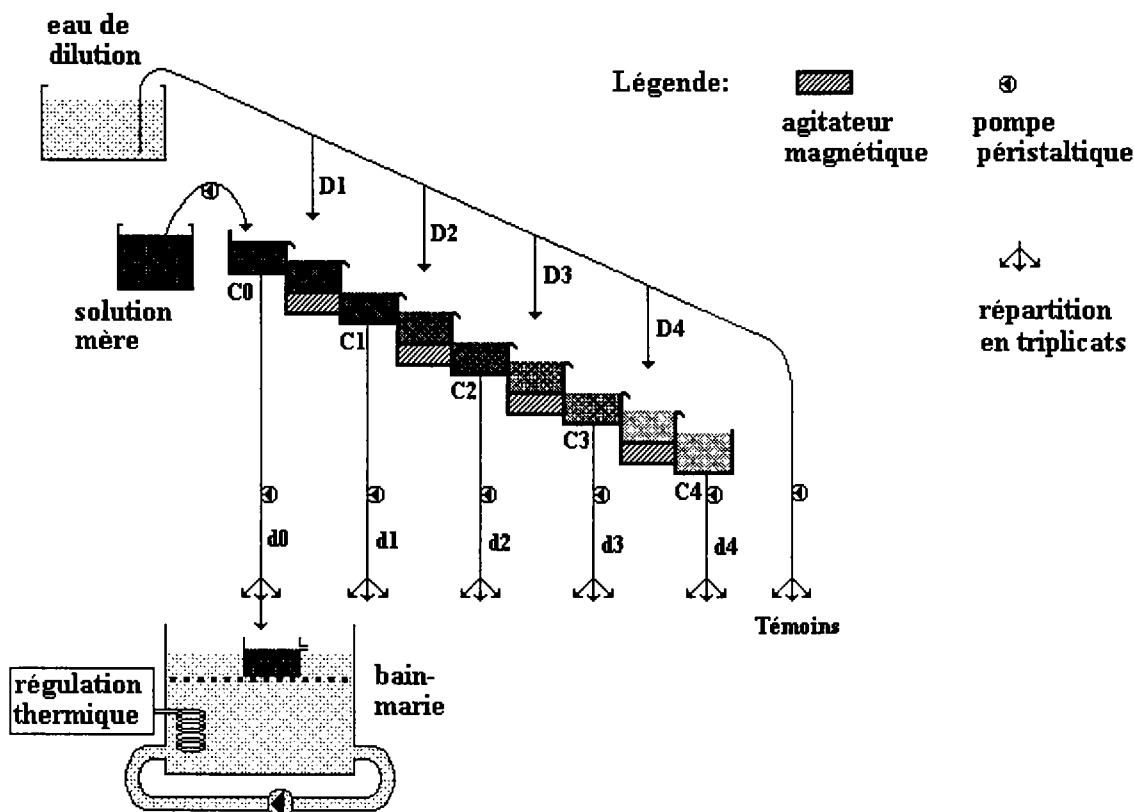


Figure 27: Schéma de fonctionnement du diluteur en cascade utilisé pour les essais avec renouvellement continu des milieux.

### 3.3- Tolérance des stades embryon-larvaires à la température

Deux études relevées dans la littérature concernent la sensibilité thermique des stades embryonnaires du danio zébré (Schirone et Gross, 1968; Bremiller et al., 1993) mais aucune information n'est disponible sur le stade larvaire qui est pourtant une autre phase critique du développement. Une étude a été initiée pour éclaircir cet aspect sur une gamme de température comprise entre 19 et 26°C. Alors que la tolérance embryonnaire est comprise entre 23 et 34°C, le choix de cette gamme de température inférieure à 26°C vient du fait que cet essai avait aussi pour objectif une mise au point de l'essai sur sédiment qui sera présenté au chapitre B.7.

#### □ déroulement de l'essai

L'essai a porté sur une durée de 10 jours dans des conditions de renouvellement continu des milieux en utilisant le diluteur en cascade (cf. fig. 27). Au lieu de la solution mère, une eau de dilution à 19°C a été apportée "diluée" par de l'eau à 26°C. Trois réplicats ont été mis en oeuvre dans chaque condition de température. En raison des différences de temps d'éclosion et d'acquisition de mobilité entre les lots, les récipients d'essai ont été observés deux fois par jour.

Comme pour l'ensemble des résultats qui seront donnés dans ce chapitre, une indication sur les variations des paramètres suivis en particulier sera donné dans un tableau préliminaire, les autres caractéristiques physico-chimiques des milieux restant conformes aux conditions

d'essai décrites dans le chapitre B.1.5. Dans le tableau principal, les résultats indiqués concerneront la plupart du temps le nombre d'oeufs blancs observés après 24h., le nombre total d'embryons ayant réussi à éclore, le nombre de larves survivantes au terme de l'essai et leur taille. Lorsqu'elles présentent un intérêt, des informations seront ajoutées concernant le temps d'éclosion, le délai d'acquisition de mobilité ou bien l'apparition de larves anormales.

Tableau 45: Résultats de l'essai SEL sur les effets de la température (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents des lots spécifiés)

paramètre suivi en particulier	température (°C)
fréquence de suivi	2 fois / jr.
écart max. / consigne	$\pm 0,2$

critère de toxicité	température (°C)							
	19,1	20	21	21,4	22,6	23,5	25,4	25,9
oeufs blancs / 50 à 24 h.	7 $\pm 1,7$	8,3 $\pm 3,5$	4,7 $\pm 1,5$	7 $\pm 0$	5,3 $\pm 1,2$	5,3 $\pm 0,6$	5,7 $\pm 1,2$	3 $\pm 2,7$
nbre. total d'éclos / 30	5* $\pm 1,7$	11,7* $\pm 0,6$	29,3 $\pm 0,6$	30 $\pm 0$	29,7 $\pm 0,6$	29,3 $\pm 0,6$	30 $\pm 0$	29 $\pm 1$
nbre. de larves survivantes à J10	3,3* $\pm 0,6$	10* $\pm 0$	29,3 $\pm 0,6$	29,5 $\pm 0,7$	29 $\pm 1$	29,3 $\pm 0,6$	29 $\pm 1$	28 $\pm 2$
nbre. de larves anormales à J6	0,3 $\pm 0,6$	2,3* $\pm 0,6$	0,7 $\pm 0,6$	1 $\pm 0$	0,3 $\pm 0,6$	0,7 $\pm 1,2$	0	0
taille (mm)	nd	nd	nd	3,5** $\pm 0,1$	3,5** $\pm 0,1$	3,6** $\pm 0,2$	3,8 $\pm 0,2$	3,8 $\pm 0,2$
temps moyen d'éclosion (h)	120,8 $\pm 20,1$	164,3 $\pm 3,3$	130,2 $\pm 1,6$	126,1 $\pm 0,6$	98,4 $\pm 0,9$	86,3 $\pm 4,4$	69,9 $\pm 4,8$	74,6 $\pm 0,6$
temps de début de mobilité (h.)#	264	264	168	192	166	144	120	120

# temps à partir duquel plus de 95% des larves sont mobiles

\* résultat significativement différent des valeurs obtenues entre 21 et 25,9°C

\*\* résultat significativement différent des valeurs obtenues à 25,4 et 25,9°C

nd: non déterminé

L'intolérance des embryons et larves de danio zébré à des températures décroissantes inférieures à 26°C se manifeste à partir de 20°C au niveau du nombre de prolarves écloses et de leur survie au 10ème jour. Par ailleurs, une inhibition de la croissance des larves est décelable pour des température inférieures ou égales à 23,5°C. Ce ralentissement de croissance a très certainement pour origine des activités motrices (quête de nourriture) et métaboliques (assimilation) retardées et même ralenties par rapport aux larves se développant

à 25,4 et 25,9°C. En effet, plus la température d'incubation est faible, plus les étapes du développement (embryogenèse, éclosion, mobilité..) sont retardées.

La figure 28 illustre la chronologie des étapes d'éclosion et de mobilité aux différentes températures étudiées. On observe une évolution quasi-linéaire des temps d'éclosion et des temps de début de mobilité entre 21 et 25,9°C. A des températures inférieures, ces critères n'obéissent plus à cette tendance ce qui pourrait révéler un signe de perturbation.

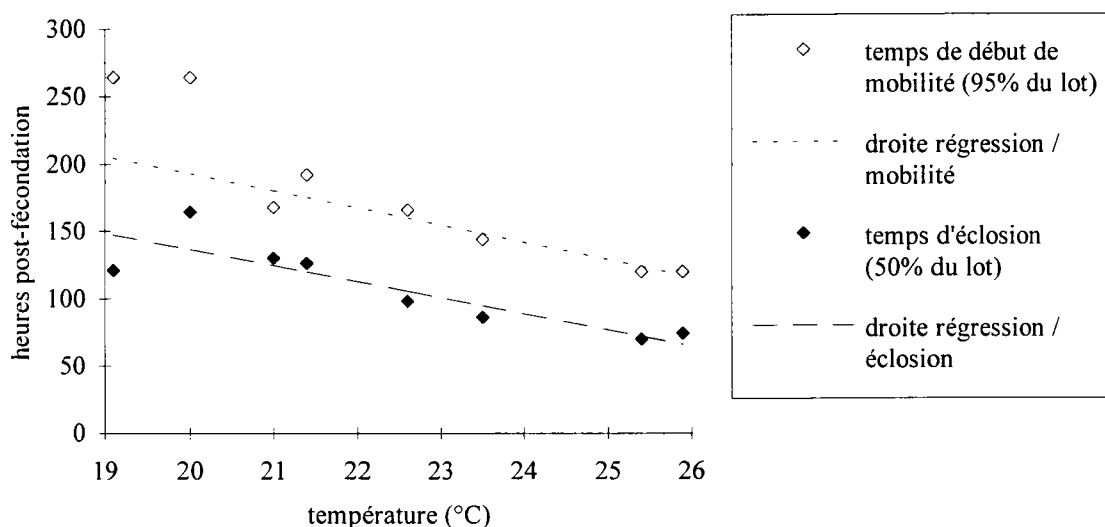


Figure 28: Influence de la température sur la chronologie de deux étapes du développement (éclosion, mobilité); les droites de régression ont été calculées à partir des données entre 21 et 25,9°C

Autre indice de perturbation: il est apparu un nombre significatif de larves anormales à 20°C ce qui constitue un autre indice de stress. Leur fréquence d'apparition est difficile à apprécier à 19,1°C étant donné le très faible taux d'éclosion à cette température. Une étude plus approfondie sur l'apparition des anomalies du développement et leurs symptômes sera détaillée dans un chapitre ultérieur.

Selon les travaux de Schirone et Gross (1968), le développement embryonnaire complet du danio zébré n'est possible que pour des températures comprises entre 23 et 34°C ce qui n'est pas en accord avec nos résultats. Le détail du protocole utilisé par les auteurs a montré que les oeufs étaient incubés à la température désirée juste après la ponte avant la première division du blastodisque. Cette indication confirme l'importance du stade de développement des embryons au début des essais. En effet, nos essais ont été initiés selon le protocole habituel du laboratoire, utilisant en majorité des embryons âgés de 2h.30 à 3h. post-fécondation dont le développement a atteint le stade de la "blastula haute avancée" (cf. annexe 1). En accord avec les résultats de Jaoul et Roubaud (1982) sur le modèle de la carpe, la sensibilité des embryons de danio zébré à un stress thermique semble donc plus grande quand la perturbation intervient sur les premiers stades du développement embryonnaire. Nos résultats indiquent que l'on peut s'attendre à des différences de taux de croissance larvaire à l'intérieur de la plage de température compatible avec l'embryogenèse indiquée par Schirone et Gross (1968).

### **3.4- Tolérance des stades embryo-larvaires au pH**

Bien que Dave (1984) se soit penché sur la sensibilité des embryons et larves du danio zébré à l'acidité du milieu, deux essais ont cependant été entrepris pour vérifier ces plages de tolérance en renouvelant les milieux en continu de manière à ne pas avoir à utiliser de solutions tampons. Lors d'une série d'essais sur la sensibilité des stades embryo-larvaires, Dave (1984) et Ghillebaert (1991) ont en effet constaté qu'avec cette méthode, il est difficile de distinguer les perturbations propres des tampons utilisés de celles du pH.

L'objectif de ces essais a été également d'étudier la croissance des larves dans différentes conditions d'acidité du milieu.

#### **3.4.1- Essai préliminaire**

Un premier essai a dû être arrêté au bout de 6 jours en raison d'un incident technique lié au renouvellement continu des milieux. Il apporte cependant certaines informations intéressantes.

##### **▣ déroulement de l'essai**

Deux réplicats ont été mis en oeuvre dans chaque condition de pH. Cet essai a été réalisé dans des conditions de renouvellement continu des milieux en utilisant le diluteur en cascade (cf. fig. 27). Celui-ci a été scindé en deux pour obtenir les pH acides et basiques et en rajoutant un étage de manière à tester sept conditions simultanément. Des solutions mères de soude et d'acide sulfurique diluées ont été utilisées. Cet acide a été choisi car l'ion sulfate est moins toxique pour les poissons que les ions chlorures ou nitriques; de plus, il apporte deux protons pour un ion sulfate. Dans les conditions les plus acides testées (pH=3), des concentrations en ion sulfate comprises entre 110 et 120mg/l ont été mesurées soit presque le double de la teneur de cet ion dans l'eau de dilution (67mg/l). Une perturbation propre de cet ion à pH=3 n'est pas à exclure car le seuil de 100mg/l semble être la limite tolérée par les populations de cyprinidés (ITSV, 1973). L'impact de l'ion sodium au pH le plus élevé semble moins préoccupant car il ne s'est produit qu'une augmentation moyenne de 10% de la concentration de cet ion.

Tableau 46: Résultats de l'essai SEL préliminaire sur le pH après 6 jours (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents des lots spécifiés)

paramètres suivis en particulier	température	pH
fréquence de suivi	1 fois / jr.	2 fois / jr.
écart max. / consigne	$\pm 0,3$	$\pm 0,2$

critère de toxicité	pH						
	3	4	6,4	7,7	8,4	9,3	10,1
oeufs blancs / 50 à 24 h.	48,5* $\pm 0,7$	3,5 $\pm 0,7$	2 $\pm 0$	3 $\pm 1,4$	1,5 $\pm 0,7$	2 $\pm 1,4$	5 $\pm 2,8$
nbre. total d'éclos / 30	0**	12** $\pm 7,7$	29,5 $\pm 0,7$	30 $\pm 0$	30 $\pm 0$	28,5 $\pm 2,1$	16,5** $\pm 0,7$
nbre. de larves survivantes à J6		12** $\pm 7,7$	29,5 $\pm 0,7$	30 $\pm 0$	29,7 $\pm 0,6$	28,5 $\pm 2,1$	0**

\* résultats significativement différents des valeurs obtenues entre les pH4 et 10,1

\*\* résultats significativement différents des valeurs obtenues entre les pH6,4 et 9,3

Un développement embryonnaire et une survie larvaire du danio zébré se révèlent possibles dans la gamme de pH=6,4 à 9,3. En dehors de cet intervalle de pH, on constate une mortalité embryonnaire totale à pH=3 et une diminution du taux d'éclosion pour les pH=4 et 10,1. Les embryons qui ont réussi à éclore à pH=4 parviennent à survivre (jusqu'au 6ème jour au moins) alors qu'à pH=10, ils meurent rapidement.

### 3.4.2- Essai définitif

Une deuxième expérience (cf. tableau 47) a été menée pour vérifier l'incidence de la gamme de pH précédemment retenue sur la survie et la croissance larvaire. Cet essai a été conduit pendant dix jours en condition de renouvellement continu des milieux après quelques améliorations techniques.

Tableau 47: Résultats de l'essai SEL définitif sur le pH (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents d'autres lots)

paramètres suivis en particulier	température	pH
fréquence de suivi	1 fois / jr.	2 fois / jr.
écart max. / consigne	$\pm 0,3$	$\pm 0,2$

	pH			
critère de toxicité	6,6	7,2	8,1	9,4
oeufs blancs / 50 à 24 h.	5,7 $\pm 0,6$	5 $\pm 3$	7 $\pm 1$	7,3 $\pm 1,5$
nbre. total d'éclos / 30	29,7 $\pm 0,6$	30 $\pm 0$	29,7 $\pm 0,6$	27,7 $\pm 0,6$
nbre. de larves survivantes à J10	29,3 $\pm 0,6$	29,3 $\pm 0,6$	29 $\pm 1$	27,7 $\pm 0,6$
taille (mm)	4,1 $\pm 0,4$	4,0 $\pm 0,3$	4,0 $\pm 0,4$	4,0 $\pm 0,4$

Aucun effet significatif n'a pu être mesuré pour les pH testés quel que soit le critère mesuré. Ceci confirme la tolérance des stades embryo-larvaires du danio zébré pour la gamme de pH déterminée lors de l'essai préliminaire.

Ainsi, bien que portant sur un critère supplémentaire et en évitant l'emploi d'agents tampons, nos résultats sont en accord avec ceux de Dave (1984). En utilisant des critères de temps d'éclosion et de survie larvaire (sans nourrissage), cet auteur n'a constaté aucun effet sur la gamme de pH allant de 6 à 9. Notons que sur le critère de croissance de larves de carpe au cours d'un essai SEL, Ghillebaert (1991) aboutit à une gamme de pH légèrement plus resserrée (6,8 - 9).

### 3.5- Tolérance des stades embryo-larvaires à la salinité

Un essai sur la sensibilité de notre modèle à la salinité du milieu a été entrepris pour pouvoir décider des dilutions à effectuer dans le cas où un échantillon (effluent ou sédiment) serait prélevé en milieu salé ou saumâtre.

#### ▣ déroulement de l'essai

Cet essai a porté sur une durée de 10 jours dans des conditions de renouvellement continu des milieux (cf. dispositif expérimental décrit au § B.3.2). Trois réplicats ont été mis en oeuvre dans chaque condition de salinité. La salinité a été suivie par mesure de la conductivité après avoir réalisé une courbe de correspondance.

Tableau 48: Résultats de l'essai SEL sur la salinité (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents du témoin)

paramètres suivis en particulier	température	[NaCl]
fréquence de suivi	1 fois / jr.	2 fois / jr.
écart max. / consigne	$\pm 0,3$	$\pm 0,1$ g/l

critère de toxicité	[NaCl] (g/l)					
	0,06 témoin	0,4	0,7	1,3	2,7	9,5
oeufs blancs / 50 à 24 h.	1,7 $\pm 1,5$	3 $\pm 2,8$	4 $\pm 2,7$	5,7 $\pm 1,2$	3 $\pm 2$	14,7 $\pm 9$
nbre. total d'éclos / 30	30 $\pm 0$	29 $\pm 1,7$	29,7 $\pm 0,6$	28 $\pm 1,7$	29 $\pm 1,7$	0,7 $\pm 1,2$
nbre. de larves survivantes à J10	28,7 $\pm 1,5$	27,7 $\pm 3,2$	29 $\pm 1$	21 $\pm 5,2$	5 $\pm 2$	0
taille (mm)	4,1 $\pm 0,9$	4,0 $\pm 0,9$	3,8 $\pm 0,8$	3,6 $\pm 0,5$	3,6 $\pm 0,5$	

La nocivité du chlorure de sodium a été observée dès le comptage des oeufs blancs, en nombre significativement plus élevé à 9,5g/l. Sur le cumul des trois réplicats, seuls 15 embryons sont parvenus à éclore à cette concentration le 5ème jour, les autres finissant par mourir à l'intérieur du chorion après quelques jours. D'autre part, la survie ainsi que la croissance des larves est perturbée à partir de 1,3g/l de NaCl.

Cet essai embryo-larvaire a révélé l'extrême sensibilité de notre modèle au chlorure de sodium. En effet, en terme de taux d'éclosion, de survie larvaire et de croissance, le maximum tolérable semble se situer entre 0,7 et 1,3g/l. Si on y ajoute le critère de comportement, la limite se situe à moins de 0,4g/l, concentration au delà de laquelle apparaissent des phénomènes de tremblement, de perte d'équilibre et d'hyperactivité.

Pour des échantillons prélevés en milieu marin ([NaCl]=20g/l), une dilution minimum d'un facteur 100 est donc nécessaire ce qui compromet l'intérêt de notre modèle pour l'évaluation de la toxicité de ce type d'échantillon. Des espèces marines comme le "sheepshead minnow" sont d'ailleurs recommandées dans de pareils cas par l'OCDE (1992).

Il est cependant difficile de savoir si notre modèle a une sensibilité particulière au chlorure de sodium car ce sel n'a pas fait l'objet de nombreux essais sur des espèces d'eau douce. Pour le vairon tête-de-boule, les CL50(96h.) embryonnaire et adulte sont respectivement de 4,6 et 7,7g/l (EPA, 1988) alors que pour le gambusia (Poecilidé), la CL50(24h.) est de 16g/l mais certains représentants de cette famille sont euryhalins (Newman et Aplin, 1992).

### 3.6- Tolérance des stades embryo-larvaires à la dureté

Les danios zébrés adultes tolèrent des eaux de dureté très différentes (de 10 à 700mg/l de CaCO<sub>3</sub>) et leur reproduction est possible dans des eaux très dures (Eaton et Farley, 1974b). Nous avons souhaité connaître la gamme de tolérance des stades embryo-larvaires du danio zébré par rapport à la dureté ainsi que son incidence sur la toxicité aiguë d'un détergent anionique qui fera l'objet d'un essai SEL au chapitre B.4.4.4.

#### 3.6.1- Essai préliminaire

L'essai a porté sur une durée de 10 jours dans des conditions de renouvellement continu des milieux (à l'aide du diluteur en cascade représenté sur la fig. 27). Trois réplicats ont été mis en oeuvre dans chaque condition de dureté. Le suivi de la dureté a été fait par mesure de la conductivité après avoir établi une courbe de correspondance.

Tableau 49: Résultats de l'essai SEL préliminaire relatif aux effets de trois conditions de dureté (moyenne ± écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents du lot spécifié)

paramètres suivis en particulier	température (°C)	dureté ([CaCO <sub>3</sub> ] en mg/l)
fréquence de suivi	1 fois / jr.	2 fois / jr.
écart max. / consigne	± 0,2	± 3

critère de toxicité	[CaCO <sub>3</sub> ] (mg/l)		
	19	67	546
oeufs blancs / 50 à 24 h.	7,3 ± 4,7	7 ± 3,5	7,3 ± 1,5
nbre. total d'éclos / 30	29,3 ± 1,2	29,7 ± 0,6	29,7 ± 0,6
nbre. de larves survivantes à J10	28,3 ± 1,5	29,3 ± 0,6	29 ± 1
taille (mm)	4,2* ± 0,6	4,4 ± 0,7	4,3 ± 0,4

\* résultats significativement différents des valeurs obtenues à la dureté de 67mg/l de CaCO<sub>3</sub>

Les embryons et larves de danio zébré semblent accepter une large gamme de dureté d'eau car aucun effet n'est observé au niveau du nombre d'oeufs blancs, du taux d'éclosion et de survie larvaire. Cependant, à la plus faible dureté, la croissance des larves a été significativement plus faible que dans les conditions de dureté intermédiaire ([CaCO<sub>3</sub>] = 67,2 mg/l). Une trop faible teneur du milieu en calcium est peut être la cause de cette inhibition de croissance;



notons que les surfaces des larves# à la plus faible dureté sont également significativement plus faibles que celles mesurées dans les conditions de dureté intermédiaire. L'inhibition de croissance est donc réelle et il ne s'est pas produit de croissance pondérale sans augmentation de taille.

### 3.6.2- Essai définitif

Une gamme de dureté plus complète a été mise en oeuvre lors d'un deuxième essai (cf. tableau 50) mais en utilisant que deux réplicats. Les tendances observées durant la première expérience se confirment ici car on n'observe aucun effet perturbateur quelle que soit la dureté si ce n'est une inhibition de taille à la plus faible dureté testée ( $[\text{CaCO}_3] = 31 \text{ mg/l}$ ). L'optimum de croissance s'obtiendrait aux environs de  $200 \text{ mg/l}$  de  $\text{CaCO}_3$ . La tolérance des stades embryo-larvaire à des eaux de forte dureté est également confirmée.

Tableau 50: Résultats de l'essai SEL définitif relatif aux effets de la dureté (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents du lot spécifié)

critère de toxicité	[CaCO <sub>3</sub> ] (mg/l)					
	31	46	62	100	199	474
oeufs blancs / 50 à 24 h.	7,5 $\pm 2,1$	13 $\pm 2,8$	12 $\pm 1,4$	7 $\pm 2,8$	13,5 $\pm 5$	10 $\pm 2,8$
nbre. total d'éclos / 30	30 $\pm 0$	29,5 $\pm 0,7$	29,5 $\pm 0,7$	30 $\pm 0$	29 $\pm 1,4$	29,5 $\pm 0,7$
nbre. de larves survivantes à J10	30 $\pm 0$	29,5 $\pm 0,7$	29 $\pm 1,4$	29 $\pm 1,4$	28 $\pm 1,4$	27,5 $\pm 0,7$
taille (mm)	4,3* $\pm 0,9$	4,5 $\pm 0,9$	4,7 $\pm 0,9$	4,7 $\pm 0,9$	4,8 $\pm 0,8$	4,5 $\pm 0,8$

\* résultats significativement différents des valeurs obtenues à la dureté de  $199 \text{ mg/l}$  de  $\text{CaCO}_3$

Ces essais indiquent une tolérance des premiers stades de vie du danio zébré à des conditions de dureté comprises entre 46 et  $474 \text{ mg/l}$  de  $\text{CaCO}_3$ . Des essais supplémentaires permettraient d'évaluer les effets d'eau de dureté supérieure bien que de telles conditions soient rarement mesurées dans le milieu naturel.

### 3.7- Interaction entre dureté et la toxicité d'un détergent anionique

La dureté conditionne la toxicité de certains ions métalliques vis-à-vis de nombreux organismes aquatiques (Calamari et al., 1980; Markich et Jeffree, 1994). En effet, ces ions sont complexés en eau dure et deviennent alors moins biodisponibles pour les organismes, donc moins toxiques. Dans le cas de certains détergents, plusieurs études montrent un

# ces larves nageant toutes avec leur axe de symétrie vertical

phénomène inverse (Hokanson et Smith, 1971; Tovell et al., 1974) et nous avons voulu vérifier ces résultats sur un détergent anionique par des essais de toxicité aiguë sur des larves de danio zébré âgées de 10 jours. Le détergent employé est l'alkylbenzène sulfonate linéaire (LAS) qui fera l'objet d'un essai SEL au chapitre B.4.4.4. La longueur moyenne du groupement alkyl est de 11,8 atomes de carbone.

#### □ déroulement des essais

Ces essais ont porté sur une durée de 24h. (condition statique) avec un décompte des mortalités selon un pas de temps géométrique. Pour chaque condition d'essai, un seul échantillon composé de 10 larves (âgées de 10 jours) a été mis en oeuvre et le calcul des temps moyens de survie a été réalisé par interpolation linéaire.

Le premier essai a porté sur l'évaluation de la sensibilité des larves au LAS en conservant les mêmes conditions de dureté durant l'acclimatation et l'essai de toxicité (cf. tableau 51).

Tableau 51: Temps moyens de survie (TL50) exprimés en minutes

	[CaCO <sub>3</sub> ] (mg/l)		
[LAS] (mg/l)	145	265	545
5,4	> 1440	606	286,1
9	218,1	68,6	19,1
15	18,3	8,5	6,6

Les résultats de temps de survie indiquent que la toxicité de ce détergent anionique s'exerce de manière beaucoup plus forte lorsque le milieu a une dureté élevée que lorsque celle-ci est faible ce qui est en accord avec les indications de Hokanson et Smith (1971) sur le crapet arlequin. Bien que travaillant sur un autre détergent et une autre espèce, Tovell et al. (1974) a proposé comme hypothèse explicative une interaction physico-chimique entre les ions calcium, magnésium et le détergent qui le rendrait plus ou moins apte à franchir les membranes biologiques. De plus, l'auteur a avancé que les membranes branchiales de poissons acclimatés à des eaux de dureté différentes auraient une perméabilité différente aux molécules de détergent quelle que soit la dureté du milieu au moment de l'essai de toxicité. Une vérification de cette indication a été faite à l'aide de notre modèle et dans les mêmes conditions que celles de l'essai précédent.

Ainsi, nous avons mesuré la sensibilité des larves au LAS en modifiant les conditions de dureté entre l'acclimatation et l'essai de toxicité (cf. tableau 52).

Tableau 52: Temps moyens de survie exprimés en minutes pour une seule concentration en LAS (9 mg/l).

[CaCO <sub>3</sub> ] lors de l'acclimatation	[CaCO <sub>3</sub> ] lors de l'essai		
	145	265	545
145	218,1	88	18
265	154	68,6	23
545	115,7	51,6	19,1

NB: les concentrations en CaCO<sub>3</sub> sont exprimées en mg/l

Les temps de survie diminuent lorsque la dureté du milieu de test augmente quelle que soit la dureté du milieu d'acclimatation. Les tendances observées lors du paragraphe précédent sont donc confirmées.

Lorsque l'on observe les résultats en fonction des conditions d'acclimatation, les temps de survie sont d'autant plus faibles que la dureté de l'eau d'acclimatation est élevée, du moins pour les duretés d'essai de 145 et 265 mg/l de CaCO<sub>3</sub>. Ceci rejoindrait les indications de Tovell et al. (1974) mais une confirmation de cette tendance aurait cependant nécessité la mise en oeuvre de triplicats pour une exploitation statistique des résultats.

Un essai supplémentaire de contrôle a été mené sans détergent en reproduisant les conditions de dureté du tableau croisé précédent pour vérifier si les changements de dureté imposés aux larves n'ont pas constitué un choc pouvant influencer leur survie en présence de détergent. Aucune mortalité ou comportement de stress n'a été observé durant cet essai de vérification.

### 3.8- Tolérance des stades embryo-larvaires à l'ammoniac (NH<sub>3</sub>)

Le choix d'étudier les effets de l'ammoniac a été fait suite aux premières analyses physico-chimiques des échantillons d'effluents urbains que nous avons étudié (cf. § B.4.4.2). Celles-ci ont montré des teneurs importantes en ammoniac susceptibles de contribuer en grande partie à la toxicité des échantillons.

#### 3.8.1- Dispositif expérimental

Etant donné l'influence du pH et de la température sur le rapport ammoniac (NH<sub>3</sub>) / ion ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), il a été indispensable de disposer de conditions stables pour ces deux paramètres. Ceci a été rendu possible grâce à un réacteur muni d'une double paroi (avec circulation d'eau thermorégulée) et équipé d'un chémostat pour la régulation du pH (cf. fig. 29). Les solutions d'acide (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et de base (NaOH) sont très concentrées de manière à ne pas diluer la solution de chlorure d'ammonium (NH<sub>4</sub>Cl) apportée en continu. Les dosages des ions sulfate et sodium des milieux ont indiqué une augmentation limitée de ces concentrations (<10%). En effet, la rectification du pH a été réduite car nous avons travaillé à un pH neutre sans injection d'air étant donné qu'un taux d'oxygénation suffisant des milieux a été assuré par

l'agitation en continue. Le seul inconvénient de ce dispositif est qu'il ne permet de tester qu'une concentration d'ammoniac à la fois.

La proportion d'ammoniac s'obtient par la formule suivante:

$$[NH_3] = \frac{([NH_3] + [NH_4^+])}{10^{pKa - pH} + 1} \quad \text{avec } pKa = 0,09018 + 2729,92 / (\text{température en } ^\circ K)$$

La concentration en ion ammonium est mesurée par la méthode spectrophotométrique au bleu d'indophénol (NFT 90-015) en milieu acide de manière à obtenir la totalité de l'azote ammoniacal sous la forme ionique ( $NH_4^+$ ).

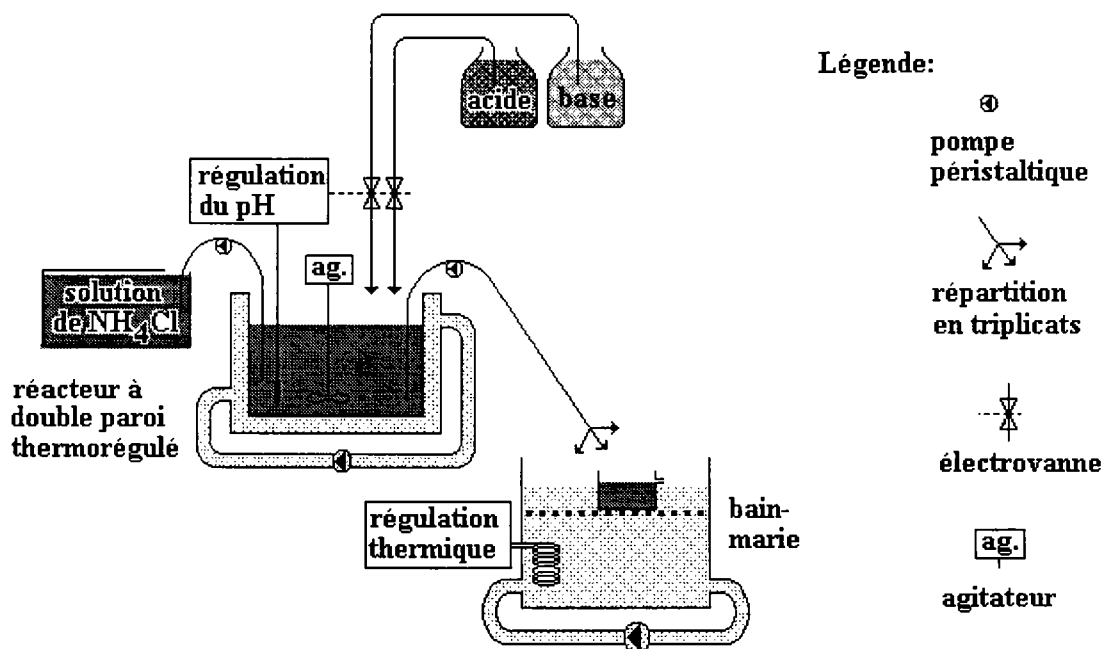


Figure 29: Schéma du dispositif expérimental utilisé pour les essais sur l'ammoniac

### α 3.8.2- Résultats des essais

Les essais ont porté sur une durée de 10 jours dans des conditions de renouvellement continu des milieux. Trois réplicats ont été mis en oeuvre pour chaque concentration en ammoniac complétés par trois récipients témoins alimentés avec de l'eau de dilution de façon continue.

Seule la concentration en ammoniac de 0,1mg/l a permis d'exploiter des résultats en triplicat car avec les deux autres concentrations (1,5 et 2,1mg/l), un réplicat n'a pas été pris en considération étant donné une augmentation importante de la concentration en nitrites jusqu'à 6mg/l. Ceci est due à la température élevée des milieux et à l'abondance d'ammoniac qui favorise le développement de *Nitrosomonas sp.*, bactéries spécialisées dans l'oxydation de l'ammoniac en nitrites. La présence de ce composé est à éviter dans les milieux du fait de sa toxicité pour les poissons; la CL50(96h.) étant de 7,6mg/l pour le vairon tête-de-boule adulte (Thurston et al., 1986). De manière à limiter les risques d'augmentation de la teneur en nitrites, une stérilisation du matériel à l'eau de Javel a été effectuée à la fin de chaque expérience (y compris pour le matériel des témoins). Une mesure quotidienne des nitrites a été faite selon la méthode NFT 90-013.

Les résultats des trois essais sont présentés dans le tableau 53.

Tableau 53: Résultats des essais SEL relatifs à l'ammoniac (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents du témoin respectif)

paramètres suivis en particulier	température (°C)	pH	[NH <sub>3</sub> ] (mg/l)	[NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> ] (mg/l)
fréquence de suivi	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.
écart max.	$\pm 0,2$	$\pm 0,2$	$\pm 0,3$	< 1,5

critère de toxicité	[NH <sub>3</sub> ] (mg/l)					
	témoin	0,1	témoin	1,5	témoin	2,1
oeufs blancs / 50 à 24 h.	8,7 $\pm 2,5$	7,5 $\pm 0,7$	8,3 $\pm 1,5$	10 $\pm 2,8$	13 $\pm 2,7$	16,5 $\pm 0,7$
nbre. total d'éclos / 30	29,3 $\pm 1,2$	30 $\pm 1,4$	29 $\pm 1$	28,5 $\pm 2,1$	29 $\pm 1,7$	15 $\pm 0$
nbre. de larves survivantes à J10	27,7 $\pm 1,5$	27 $\pm 1,4$	28,7 $\pm 0,6$	27 $\pm 0$	27,7 $\pm 2,5$	10 $\pm 1,4$
taille (mm)	3,9 $\pm 0,4$	3,8 $\pm 0,3$	3,7 $\pm 0,4$	3,5 $\pm 0,3$	4,0 $\pm 0,5$	3,3 $\pm 0,4$

NB: dans les lots témoins, la concentration en NH<sub>3</sub> est restée inférieure à  $2 \cdot 10^{-3}$  mg/l.

A la concentration de 2,1mg/l, l'éclosion des larves est diminuée de moitié et un effet significatif est également observé sur leur survie ainsi que sur leur croissance. De plus, les larves survivantes à cette concentration sont immobiles et accusent un retard de résorption de la vésicule vitelline.

La valeur de la CSEO de 1,5mg/l de NH<sub>3</sub> est à considérer comme ordre de grandeur et mériterait d'être affinée par des essais portant sur des concentrations en NH<sub>3</sub> comprises entre 1,5 et 2,1mg/l.

Il n'existe pas d'informations sur des essais comparables sur d'autres cyprinidés dans la littérature et les résultats des essais SEL de 30 jours sur la truite arc-en-ciel indiquent que la CSEO est inférieure à 0,027mg/l (Solbé et Shurben, 1989) soit à un niveau environ 50 fois plus faible que celui que nous avons obtenu. Cette différence n'est pas surprenante étant donné qu'en terme de toxicité aiguë, les rapports des CL50(96h.) entre deux cyprinidés (crapet arlequin et barbus de rivière) et deux salmonidés (truite arc-en-ciel et saumon rosé) peuvent aller de 3 à 22 (Russo, 1985).

### 3.9- Tolérance des stades embryo-larvaires à l'hypoxie

Cette étude a été motivée par une première série de résultats sur la toxicité sublétales d'effluents urbains. Ceux-ci se caractérisent par une forte demande en oxygène qui est d'ailleurs augmentée par la dégradation des restes de nourriture durant la phase de nourrissage des larves. Il s'est donc avéré nécessaire de connaître les exigences minimum en oxygène des embryons et des larves de notre modèle.

#### 3.9.1- Dispositifs expérimental

Ces essais ont été réalisés grâce aux installations du laboratoire décrites par Magaud et al. (sous presse) comprenant une enceinte thermorégulée équipée d'un dispositif de contrôle informatisé de la concentration en oxygène dissous (cf. fig. 30). De l'azote est injecté en permanence afin de faire chuter le taux d'oxygène dissous par augmentation de la pression partielle en azote. De l'air est injecté par intermittence, pendant une durée calculée par un programme de régulation afin de compenser cet abaissement et maintenir constante la concentration en oxygène dissous. Ce dispositif permet une régulation relativement précise car l'écart-type des teneurs en oxygène sur quatre jours déterminé à l'aide d'un oxymètre est inférieur ou égal à 0,02mg/l. Cependant comme pour les essais sur l'ammoniac, une seule concentration en oxygène dissous peut être testée à la fois.

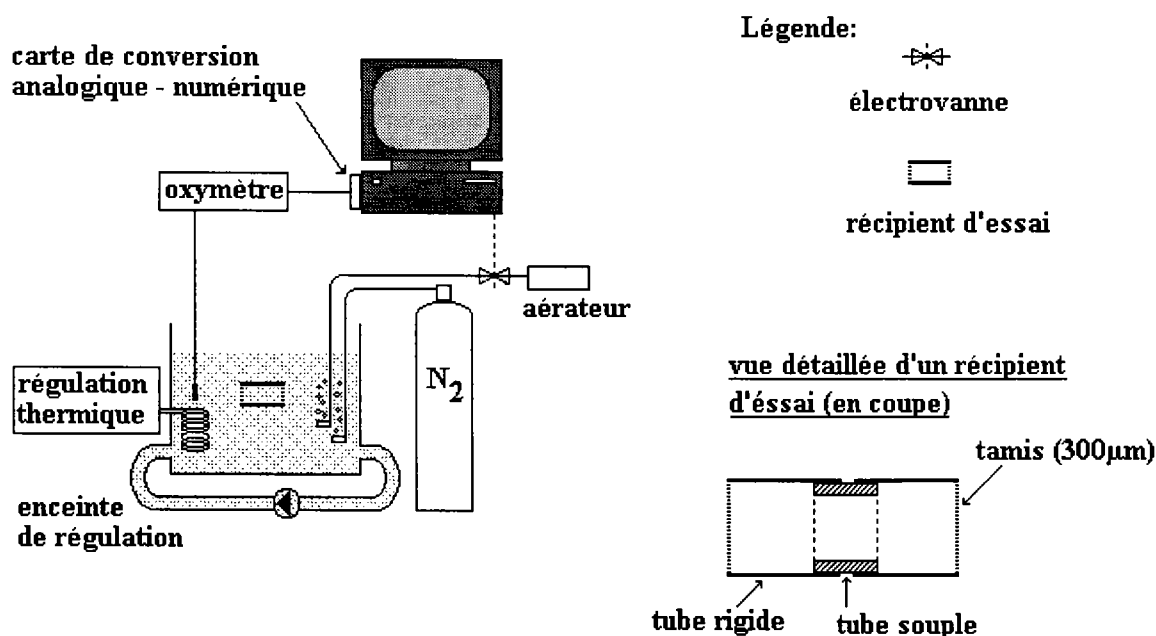


Figure 30: Dispositif expérimental pour les essais sur l'hypoxie

Etant donné l'injection permanente d'azote dans l'enceinte, nous avons observé une légère alcalinisation des milieux d'essai (par déplacement de l'équilibre carbonique) mais le pH s'est rapidement stabilisé à une valeur ne dépassant pas 8,6.

De manière à avoir une bonne homogénéité entre la concentration en oxygène dissous de l'enceinte et l'intérieur des récipients essai, nous avons choisi d'enfermer les oeufs dans des

tubes obturés aux deux extrémités par un tamis comme il est représenté sur le figure 30. Les tubes sont maintenus dans le courant d'eau de telle sorte qu'un flux d'eau modéré transite en permanence au travers de ces récipients d'essai. Ces récipients sont composés de deux demi-tubes emboîtables ce qui permet l'introduction des oeufs et la récupération des larves.

### 3.9.2- Résultats des essais

Les essais sont limités à une durée de sept jours car il est impossible de nourrir les larves dans ces conditions expérimentales de renouvellement des milieux. Etant donné la durée réduite de ces essais, nous n'avons pas procédé à des mesures de taille. Trois réplicats sont mis en oeuvre pour chaque concentration en oxygène et trois récipients témoins ont été suivis en parallèle avec une aération permanente. Les récipients sont ouverts brièvement après 24h. pour extraire les oeufs blancs et ramener le nombre d'embryons à 15.

La première concentration testée a été choisie après détermination de la CL50(24h.) vis-à-vis de danios zébrés adultes (0,73mg/l).

Tableau 54: Résultats des essais SEL relatifs à l'hypoxie (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents du témoin respectif)

paramètres suivis en particulier	température (°C)	[O <sub>2</sub> ]
fréquence de suivi	1 fois / jr.	toutes les 10 sec.
écart maximum	$\pm 0,2$	$\pm 0,02$

critère de toxicité	[O <sub>2</sub> ] (mg/l)					
	7 témoin	0,9	7,5	1,5	7,6	3,0
oeufs blancs / 20 à 24 h.	1,3 $\pm 1,2$	1,3 $\pm 0,6$	1 $\pm 1$	0,7 $\pm 0,6$	0,7 $\pm 0,6$	1,3 $\pm 0,6$
nbre. total d'éclos / 15	14,7 $\pm 0,6$	12 $\pm 3$	15 $\pm 0$	14,7 $\pm 0,6$	14,7 $\pm 0,6$	14,7 $\pm 0,6$
nbre. de larves survivantes à J7	14,7 $\pm 0,6$	10,3 $\pm 5$	14,7 $\pm 0,6$	14,3 $\pm 0,6$	14,7 $\pm 0,6$	14,3 $\pm 0,6$
nbre. de larves mobiles à J7	14,7 $\pm 0,6$	0	14,7 $\pm 0,6$	11 $\pm 2$	14,7 $\pm 0,6$	14 $\pm 1$

Ces résultats indiquent que l'éclosion et la survie des larves est possible à des valeurs aussi faibles que 0,9mg/l d'oxygène bien que le développement embryonnaire soit retardé. Par contre, une immobilité significative des prolarves a été constatée à des concentrations en oxygène égale à 1,5 et surtout à 0,9mg/l. Ceci correspond vraisemblablement aux exigences en oxygène pour permettre une activité motrice qui ne sont pas couvertes à ces concentrations. Ainsi nous considéreront la concentration de 3mg/l d'oxygène comme seuil à respecter lors

des essais SEL en dessous duquel les conditions d'hypoxie peuvent affecter le développement des larves.

Une série d'essais complémentaires a été menée sur la sensibilité de larves de sept jours aux conditions d'hypoxie. En effet, les relevés chimiques d'essais SEL sur effluents ont montré une baisse des concentrations en oxygène plus prononcée à partir du moment où les organismes sont nourris (nourriture sèche + nauplies d'artémia) du fait de la dégradation des restes de nourriture. De plus, les résultats de Skidmore (1967) suggèrent que c'est à ce moment du développement que les exigences en oxygène sont les plus importantes. Nous avons donc entrepris des essais aigus (24h.) sur des groupes de 10 larves en utilisant le même dispositif expérimental. Comme tous les lots témoins ont survécu et n'ont pas montré d'inhibition de mobilité, ils n'ont été reportés qu'une seule fois dans le tableau suivant.

Tableau 55: Résultats des essais courts relatifs à l'hypoxie sur des larves de 7 jours (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si les résultats sont significativement différents du témoin)

critère de toxicité	[O <sub>2</sub> ] (mg/l)				
	7,2 témoin	0,9	1,0	1,1	1,5
nbre. de larves survivantes	10 $\pm 0$	2 $\pm 1$	5,7 $\pm 2,3$	9,7 $\pm 0,6$	10 $\pm 0$
nbre. de larves mobiles	10 $\pm 0$	0	0	3,3 $\pm 2,9$	10 $\pm 0$

Il est intéressant de noter qu'une adaptation des stades embryo-larvaires semble se produire à des niveaux très bas en oxygène (0,9mg/l) car les larves non acclimatées ne survivent pas 24h. à ces conditions et des mortalités significatives sont même observées à 1,0mg/l. A la concentration de 1,5mg/l, aucun effet n'est décelé que ce soit sur la survie ou la mobilité mais il se peut que les larves puisent dans leur réserves énergétiques pour continuer à se mouvoir.

La CSEO de 3mg/l d'oxygène dissous obtenue lors des essais SEL n'est pas surprenante d'après les informations recueillies sur les stades embryo-larvaires du cristivomer (salmonidé) et du brochet (esocidé); les CSEO étant respectivement de 6 et 4,9mg/l. En effet, les espèces d'eau froide ont généralement des exigences supérieures en terme d'oxygène dissous.

### 3.10- Conclusion

Les résultats des essais exposés dans ce chapitre sont repris dans le tableau 56. Ces domaines de tolérance sont à prendre en considération lors des essais SEL utilisant le danio zébré notamment pour évaluer les effets d'effluents industriels et urbains. En accord avec les recommandations de l'EPA (1989c) sur un essai embryo-larvaire sur le vairon tête-de-boule, les paramètres tels que le pH, la concentration en oxygène dissous ou la teneur en ammoniac au delà des limites de tolérance sont susceptibles d'interférer avec les effets de micropolluants.



Des recommandations complémentaires seront indiquées à la fin du chapitre suivant à la lumière des résultats d'essai sur plusieurs effluents.

Tableau 56: Domaine de tolérance des stades embryo-larvaires du danio zébré à différents paramètres physico-chimiques de l'eau

<b>paramètre du milieu</b>	<b>domaine de tolérance</b>
pH	[ 6,4 - 9,4 ]
salinité	< 0,4 g/l
dureté	≥ 46 mg/l de CaCO <sub>3</sub> - la dureté maximale tolérée reste à déterminer
ammoniac	[ 0 - 1,5 mg/l ]
oxygène dissous	≥ 3 mg/l
température	≥ 25,4°C - la température maximale tolérée reste à déterminer

A l'exception du pH, nous n'avons pas trouvé de données sur les domaines de tolérance d'autres cyprinidés aux paramètres que nous avons étudié. Pour le danio zébré, des essais supplémentaires sont nécessaires afin de compléter et confirmer les limites de tolérance.

## 4- Essais embryo-larvaires sur effluents

### 4.1- Introduction

L'évaluation de la toxicité d'effluents grâce aux réponses des stades embryo-larvaires du danio zébré nécessite un certain nombre de précautions méthodologiques. Celles-ci ont été abordées lors de plusieurs essais sur des effluents industriels et urbains en s'appuyant notamment sur les domaines de tolérance établis au chapitre précédent. La contribution de paramètres tels que le pH, la concentration en oxygène dissous et la teneur en ammoniac aux effets toxiques constatés a été considérée à cette occasion de manière à différencier certains types de perturbation en cause. La toxicité d'un effluent est, en effet, souvent difficile à cerner et l'analyse de ses constituants ne permet généralement pas d'expliquer les effets toxiques observés (Schroder et al., 1991).

L'analyse des résultats obtenus sur différents échantillons d'effluent permettra également d'évaluer la sensibilité du critère de croissance par rapport aux autres réponses exploitées.

### 4.2- Essai sur un effluent de papeterie

En plus des informations de toxicité recueillies sur un effluent de ce secteur industriel, cet essai SEL a permis de comparer plusieurs méthodes de conservation des échantillons en terme de maintien de leurs caractéristiques toxiques. Celles-ci ont tendance à évoluer rapidement une fois le prélèvement effectué en raison de processus (photo)chimiques et biologiques (Lenore et al., 1989).

Les paramètres physico-chimiques de l'effluent prélevé révèlent une très forte teneur en matière en suspension et une charge organique très élevée (cf. tableau 57). De plus, il est acide ce qui implique un suivi particulier du pH durant l'essai.

Tableau 57: Analyse physico-chimique d'un effluent de papeterie

pH	3,3
conductivité	1520 $\mu$ S/cm
MeS (matière en suspension)	580 mg/l
DBO5 (demande biochimique en oxygène sur 5 jours)	165 mg/l
COD (carbone organique dissous)	215 mg/l

#### □ déroulement de l'essai

Le volume d'effluent prélevé a été réparti en sous-échantillons d'un litre conservé à une température inférieure à  $-17^{\circ}\text{C}$ . Pour la préparation des milieux, un sous-échantillon est décongelé quotidiennement.

L'essai a porté sur une durée de 10 jours dans des conditions semi-statiques (renouvellement des milieux une fois par jour). Trois réplicats ont été mis en oeuvre pour chaque concentration d'effluent.

Les teneurs en ammoniac et nitrites mesurées au 7ème jour ont révélé des valeurs en dessous des seuils limites à savoir  $[\text{NH}_3] \leq 1,5 \text{ mg/l}$  et  $[\text{NO}_2^-] < 1,5 \text{ mg/l}$ . Les concentrations en oxygène dissous mesurées quotidiennement sont restées supérieures ou égales à  $4 \text{ mg/l}$  donc compatibles avec les tolérances des premiers stades de vie de notre modèle. Notons également que malgré la forte acidité de l'effluent, les dilutions utilisées ont permis de tamponner suffisamment les solutions d'essai.

Tableau 58: Effets d'un effluent de papeterie sur les stades embryo-larvaires du danio zébré (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si le résultat est significativement différent du lot témoin)

paramètres suivis en particulier	température (°C)	pH	O <sub>2</sub> (mg/l)	NH <sub>3</sub> et NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>
fréquence de suivi	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois au 7ème jr.
écart maximum	25,3 - 26,2	7,5 - 8,4	4,1 - 8	

critère de toxicité	[effluent] en % (v/v)					
	0	0,6	1,6	4	10	25
oeufs blancs / 50 à 24 h.	5,7 $\pm 1,5$	8,3 $\pm 1,5$	7 $\pm 1$	9 $\pm 2$	8 $\pm 1$	7 $\pm 1,7$
nbre. total d'éclos / 30	30 $\pm 0$	30 $\pm 0$	29,7 $\pm 0,6$	30 $\pm 0$	30 $\pm 0$	2 $\pm 2,7$
nbre. de larves survivantes à J10	29,7 $\pm 0,6$	29,3 $\pm 0,6$	29,3 $\pm 0,6$	29 $\pm 1$	4 $\pm 2,7$	0
taille (mm)	4,3 $\pm 0,5$	4,6 $\pm 0,4$	4,5 $\pm 0,5$	4,6 $\pm 0,5$	4,3 $\pm 0,7$	

Des effets significatifs ont été observés à 25% d'effluent au niveau de l'éclosion des embryons et à partir de 10% pour la survie des larves à 10 jours. Dans les deux cas, la mortalité des organismes a été brutale d'une concentration à la suivante. Par contre, le nombre d'oeufs blancs n'a pas augmenté significativement sur la gamme testée et nous n'avons pas mesuré d'inhibition de croissance des larves pour les concentrations testées. Même sur un très petit nombre de larves survivantes à 10% d'effluent, aucune différence de croissance n'a été constatée ce qui illustre bien les recommandations du projet de directive OCDE (1994). Celui-ci préconise de ne pas tenir compte des effets sur la croissance lorsqu'il se produit un effet significatif sur la survie. En effet, on peut imaginer que les toxiques présents puissent affecter plutôt les individus les plus faibles, généralement les plus petits.

Malgré la concentration élevée de matière en suspension, seule une très faible décantation de particules a été observée au bout de quelques heures. Nous avons choisi de ne pas filtrer les échantillons de manière à prendre en compte la toxicité globale de l'effluent. Une toxicité mécanique des particules vis-à-vis des larves à 10% d'effluent n'est donc pas à exclure.

### □ étude complémentaire sur les techniques de conservation des échantillons

L'essai décrit précédemment a fait partie d'une étude décrite par Naudin et al. (1995) destinée à évaluer les avantages respectifs de la réfrigération, de la congélation et de la lyophilisation pour la conservation des caractéristiques toxiques d'échantillons d'un effluent de papeterie. Cette évaluation s'est faite grâce à la réalisation d'un essai de toxicité aiguë (test de bioluminescence sur la bactérie *Photobacterium phosphoreum* ou test Microtox), d'un essai de toxicité sublétales (essai SEL sur le danio zébré), de deux essais chroniques (essai sur la reproduction du microcrustacé *Ceriodaphnia dubia* et essai sur la croissance de l'algue *Selenastrum capricornutum*) ainsi que deux essais de toxicité spécifique (test Ames permettant la détection de composés mutagènes sur une souche de bactérie *Salmonella thyphimurium* et un essai d'induction d'une enzyme de détoxification sur des truites *Oncorhynchus mykiss*).

Cette batterie de bioessais a été mise en oeuvre sur des sous-échantillons ramenés à la température d'essai tous les jours ou "repréparés" à partir des échantillons lyophilisés. Cette dernière technique de conservation s'est révélée la moins propice au maintien de la toxicité de l'effluent.

Pour des durées de conservation prolongées, la congélation s'est montrée plus adaptée que la réfrigération comme l'illustrent les résultats de deux essais. Les premiers résultats ont été obtenus par le test de toxicité aiguë (test Microtox) et sont réunis dans le tableau ci-dessous.

Tableau 59: Evolution au cours du temps de la toxicité aiguë d'échantillons d'effluent conservés selon deux techniques différentes; les résultats du test Microtox sont exprimés en CE50 (5 min.)

jours	0	7	14	21	30
effluent réfrigéré (% v/v)	4,5	11,8	15,9	19,7	nd
effluent congelé (% v/v)	nd	nd	nd	nd	6,7

nd: non déterminé

Il y a bien une perte de toxicité par congélation au bout de 30 jours mais d'une ampleur beaucoup plus faible que celle qui est mesurable même à sept jours sur l'effluent réfrigéré.

Pour compléter ces informations à l'échelle d'un essai de toxicité sublétales, les résultats des essais embryo-larvaires sur l'échantillon congelé (détaillé précédemment) et réfrigéré ont été comparés.

Tableau 60: Effets d'un effluent de papeterie sur les stades embryo-larvaires du danio zébré selon la méthode de conservation des échantillons (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si le résultat est significativement différent du lot témoin)

		[effluent] en % (v/v)			
échantillon	critère de toxicité	0	4	10	25
réfrigéré	nbre. total	29,7	29,7	30	30
	d'éclos / 30	$\pm 0,6$	$\pm 0,6$	$\pm 0$	$\pm 0$
	nbre. de larves	29,3	29,3	17,7	0
	survivantes à J10	$\pm 0,6$	$\pm 0,6$	$\pm 2,5$	
congelé	nbre. total	30	30	30	2
	d'éclos / 30	$\pm 0$	$\pm 0$	$\pm 0$	$\pm 2,7$
	nbre. de larves	29,7	29	4	0
	survivantes à J10	$\pm 0,6$	$\pm 1$	$\pm 2,7$	

La moindre toxicité de l'effluent réfrigéré est donc confirmée par ces essais durant lesquels l'éclosion n'a été affectée que par l'effluent congelé (à 25% d'effluent). De plus, avec ce dernier mode de conservation, la mortalité larvaire à 10% d'effluent est bien supérieure.

Pour évaluer les effets toxiques de cet effluent de papeterie, la congélation est donc préférable à la réfrigération et à la lyophilisation. Par ailleurs, des essais de toxicité aiguë sur la daphnie (*Daphnia magna*) appliqués à des effluents urbains ou mixtes (urbains et industriels) effectués au laboratoire ont indiqué également un meilleur maintien des caractéristiques toxiques des échantillons par congélation. De plus, celle-ci ne conduit qu'à une modification physico-chimique limitée des échantillons (e.g faible diminution de la DCO et des concentrations en hydrogénocarbonates). Ainsi, nous avons utilisé cette méthode pour la conservation de tous les effluents dont nous parlerons dans la suite de ce travail.

### 4.3- Essai sur un effluent de teinturerie

Un essai SEL a été réalisé sur un effluent d'un autre secteur industriel présentant une teneur très forte en pigments. L'échantillon a été prélevé au niveau du rejet d'une teinturerie de Thaon (Vosges) et se caractérise par un pH basique, une faible teneur en oxygène dissous et une forte conductivité (cf. tableau 61). Il contient également des niveaux très élevés en carbone organique dissous et en ammoniac (du fait du pH basique).

Tableau 61: Analyse physico-chimique d'un effluent de teinturerie

pH	12,3
O <sub>2</sub>	3,1 mg/l
conductivité	3350 µS/cm
MeS	35 mg/l
COD	1140 mg/l
Cl <sup>-</sup>	15 mg/l
SO <sub>4</sub> <sup>=</sup>	67 mg/l
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	9,7 mg/l
NH <sub>3</sub> à 20°C	9,7 mg/l

L'essai a porté sur une durée de 10 jours dans des conditions semi-statiques (renouvellement des milieux une fois par jour). Pour chaque concentration d'effluent, trois réplicats ont été mis en oeuvre.

Tableau 62: Effets d'un effluent de teinturerie sur les stades embryon-larvaires du danio zébré (moyenne ± écart-type; la case est ombrée si le résultat est significativement différent du lot témoin)

paramètres suivis en particulier	température (°C)	pH	O <sub>2</sub> (mg/l)	NH <sub>3</sub> (mg/l)
fréquence de suivi	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.	2 fois
écart maximum	25,7 - 26,3	7,5 - 8,6	5 - 8,5	

critère de toxicité	[effluent] en % (v/v)					
	0	0,5	1,2	2,7	6,1	14
oeufs blancs / 50 à 24 h.	3,7 ± 1,5	4,7 ± 1,5	4,3 ± 1,5	6,7 ± 2,9	5,7 ± 0,6	26,3 ± 0,6
nbre. total d'éclos / 30	30 ± 0	30 ± 0	30 ± 0	28,3 ± 0,6	21,7 ± 2,3	0
nbre. de larves survivantes à J10	29 ± 1	28 ± 2,7	28 ± 0	26,7 ± 2,3	2,3 ± 2,5	
taille (mm)	4,5 ± 0,4	4,6 ± 0,3	4,7 ± 0,5	4,4 ± 0,4	4,1 ± 0,9	

Les teneurs en ammoniac ont été mesurées dans tous les récipients à deux reprises au cours de l'essai. Pour la plus forte concentration en effluent testée, le niveau maximal atteint a été de 1,2mg/l ce qui, considéré isolément, ne représente pas de menace pour la survie des embryons et des larves (cf. § B.3.8). Nous n'avons pas mesuré les concentrations en nitrites au cours de cet essai. Les dilutions de l'effluent testées ont permis de ramener le pH dans la gamme de

tolérance de notre modèle. De même, les concentrations en oxygène dissous mesurées au cours de l'essai n'ont représenté aucune menace directe pour le développement des embryons et la survie des larves.

Une augmentation significative du nombre d'oeufs blancs a été observée à la plus forte concentration testée et il s'agit là du seul cas d'embryotoxicité précoce que nous ayons rencontré sur un effluent. Néanmoins, comme pour l'essai précédent, l'apparition des oeufs blancs semble être le critère le moins sensible. Au niveau du taux d'éclosion, de la survie et de la croissance larvaire, des réponses significatives ont été obtenues à partir de 6,1% d'effluent. Pour la mensuration des larves par analyse d'images, la présence de substances colorantes dans cet effluent n'a provoqué aucune pigmentation artificielle des larves dans la gamme de concentrations testée.

Aux premières concentrations de cet effluent et du rejet de papeterie, il semble s'être produit une meilleure croissance des larves en comparaison aux témoins. Ces observations pourraient révéler qu'à ces dilutions, les larves profitent d'éléments nutritifs (matière organique, micro-organismes) qui favorisent leur croissance. Ce phénomène a également été observé avec des différences de taille significatives lors d'essais préliminaires appliqués aux rejets de station d'épuration, mettant en évidence une nutrition insuffisante des larves témoins. Un apport de nauplies d'artémia et de paramécies dès le début de la phase d'alimentation des larves a permis de pallier cette insuffisance (cf. § B.1.5.2.6).

#### **4.4- Essais sur effluents de station d'épuration**

La deuxième partie des essais SEL a porté sur des rejets urbains dont les caractéristiques ont nécessité des précautions particulières. La présence de concentrations importantes de détergent anionique (LAS) et la mise en évidence de composés plastifiants (phtalates) a également conduit à vérifier le potentiel toxique de ces composés.

Ces essais se sont inscrits dans un programme de recherche pluridisciplinaire destiné à caractériser les effluents liquides urbains sur le plan physico-chimique et à étudier leur impact sur les milieux aquatiques (d'eau douce et d'eau de mer). Ce "Grand Programme Qualité - Epuration des Eaux" sous la tutelle du ministère de l'Environnement et de la Recherche a réuni les compétences de plusieurs organismes de recherche privés et public dont le Cemagref. Les essais SEL ont été réalisés au laboratoire en parallèle à des essais sur la reproduction de la cériodaphnie ce qui nous a permis de comparer la sensibilité de ces modèles.

Ces bioessais ont été appliqués à des prélèvements moyens "24h." de deux effluents traités des stations d'épuration urbaine (traitement secondaire biologique par boues activées) de Saint Fons dans le Rhône ( $7.10^5$  équivalents/habitants) et de Chatillon sur Chalaronne dans l'Ain ( $10^4$  équivalents/habitants), deux sites qui reçoivent des apports industriels plus ou moins importants en plus des eaux usées domestiques.

#### 4.4.1- Caractéristiques physico-chimiques

L'analyse physico-chimique des effluents de ces deux sites a montré des variations de composition des échantillons mis à part le pH qui ne s'écarte que légèrement de la neutralité (cf. tableau 63). Au niveau des effluents de Saint Fons, on remarque surtout des teneurs importantes en MeS et des DCO dépassant les normes européennes (Journal Officiel des Communautés Européennes, 1991). Cette STEP rejette également des concentrations élevées en azote organique (N Kjeldahl) et en ammoniac qui amènent à s'interroger sur son fonctionnement. Au niveau de ces paramètres, les rejets de la station de Chatillon montrent des teneurs globalement plus faibles mais il ressort pour l'échantillon C1 des concentrations élevées en cuivre, plomb et zinc (6,1mg/l). Les teneurs en métaux des autres échantillons ne dépassant pas 260µg/l.

Le dosage de micropolluants organiques a mis en évidence des agents complexants (NTA et EDTA) mais à des concentrations inférieures au seuil de toxicité chronique pour la daphnie *Daphnia magna* (Biesinger et al., 1974). Par contre, les concentrations en détergent anionique LAS retrouvées dans les échantillons de St. Fons sont bien au delà de la CMEO à 0,3mg/l déterminée au laboratoire sur la reproduction de la cériodaphnie (*Ceriodaphnia dubia*).



Tableau 63: Analyse physico-chimique de deux effluents de station d'épuration échantillonnés à différents moments

paramètres physico-chimiques	échantillon				
	SF1 St Fons	SF2 St Fons	SF3 St Fons	C1 Chatillon	C2 Chatillon
pH	7,5	7,9	7,5	7,9	7,9
conductivité $\mu\text{S/cm}$	975	732	960	730	615
O <sub>2</sub> mg/l	nd	6,0	3,5	nd	nd
MeS mg/l	61	66	88	18	5
DCO (mg O <sub>2</sub> /l)	195	145	210	35	55
N Kj mg/l	39,2	24,7	47,6	16,5	8,9
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> mg/l	0,02	0,23	0,03	0,16	0,7
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> mg/l	< 0,2	1,9	< 0,4	< 0,4	< 0,4
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> mg/l	38,1	20,1	38,8	19,1	8,1
NH <sub>3</sub> mg/l (à 20°C)	0,5	0,6	0,5	0,6	0,2
P total mg/l	4,9	3,05	6,88	8,10	nd
PO <sub>4</sub> <sup>=</sup> mg/l	14,4	3,1	12,9	22,1	16,9
LAS $\mu\text{g/l}$	1020	1200	1600	10	5
NTA $\mu\text{g/l}$	317	157	45	4	2
EDTA $\mu\text{g/l}$	236	131	21	150	85
Cr $\mu\text{g/l}$	nd	< 20	70	< 20	< 20
Cu $\mu\text{g/l}$	nd	20	70	2000	< 20
Cd $\mu\text{g/l}$	nd	< 20	< 20	20	< 20
Ni $\mu\text{g/l}$	nd	< 20	20	250	< 20
Pb $\mu\text{g/l}$	nd	< 10	< 10	1350	< 10
Zn $\mu\text{g/l}$	nd	200	260	6100	40

nd: non déterminé

Une liste complémentaire des micropolluants organiques détectés dans ces échantillons est fournie dans le tableau 64 et certaines substances parmi les solvants halogénés, les hydrocarbures aromatiques et les phtalates sont considérées comme des contaminants à risque (Nguyen, 1995). Les concentrations de ces molécules ont été fluctuantes entre les échantillons, ne dépassant pas quelques microgrammes par litre. La toxicité de tous ces composés n'est pas toujours documentée dans la littérature et pour les composés référencés, les concentrations mesurées étaient inférieures aux seuils de toxicité (Garric et al., sous presse).

Tableau 64: Liste des micropolluants organiques identifiés dans tous les échantillons d'effluent urbain

<b>Composés oxygénés</b>	coprostanol	<b>Composés halogénés</b>
acide butanoïque	cholesterol	trichloroéthane
acide valérique	coprostanone	trichloroéthylène
acide tétradecanoïque	sitosterol	tétrachloroéthylène
acide hexadecanoïque	stigmasterol	chloroforme
acide octadecanoïque		
acide benzoïque	<b>Hydrocarbures</b>	<b>Composés sulfurés et</b>
acides méthyl- et	alkanes de C <sub>10</sub> à C <sub>15</sub>	<b>nitrogénés</b>
éthylbenzoïque	toluène	diméthyl sulfide
méthanol- et éthanolbenzene	alkylbenzenes de $\phi$ C <sub>2</sub> to $\phi$ C <sub>4</sub>	diméthyl disulfide
4-méthyl-2,6-ditertbutylphénol	alkylbenzenes de $\phi$ C <sub>10</sub> to $\phi$ C <sub>13</sub>	diméthyl trisulfide
tributylphosphate	styrène, méthyl- et diméthylstyrène	indole
triméthylpentandiol diiso-	naphthalène, méthyl- et dimethyl	méthylindole
butyrate	naphthalène	Cafféine
diethyl phtalate		
dibutyl phtalate	<b>Terpènes</b>	
dioctyl phtalate	Pinène	
nonylphenolpolyethoxylates	limonène, camphre	

#### 4.4.2- Essais SEL sur deux effluents de station d'épuration

Parmi les essais embryo-larvaires réalisés sur le danio zébré, nous décrivons les résultats obtenus à partir d'un échantillon d'effluent de la STEP de Chatillon (C1) et de celle de St Fons (SF2).

Pour les deux effluents de STEP dont nous avons évalué la toxicité, nous avons constaté la présence de floccs de boues activées décantables rapidement. Des essais préliminaires ont permis de montrer que les dépôts formés conduisaient à une asphyxie des embryons. Pour la suite des essais, seul le surnageant (après 1h. de décantation) a été employé. Une discussion plus globale sera apportée dans le chapitre B.4.5 concernant ce choix méthodologique.

Les essais SEL ont porté sur une durée de 10 jours dans des conditions semi-statiques (renouvellement des milieux une fois par jour). Trois réplicats ont été mis en oeuvre pour chaque concentration d'effluent. Les résultats de l'essai portant sur l'échantillon C1 sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau 65: Effets de l'effluent de STEP C1 sur les stades embryo-larvaires du danio zébré (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si le résultat est significativement différent du lot témoin)

paramètres suivis en particulier	température (°C)	pH	O <sub>2</sub> (mg/l)	NH <sub>3</sub> (mg/l)
fréquence de suivi	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois
écart maximum	25,4 - 26,2	7,6 - 8,3	4,4 - 7,5	

critère de toxicité	[effluent] en % (v/v)					
	0	2	10	33	60	90
oeufs blancs / 50 à 24 h.	3,3 $\pm 1,5$	6 $\pm 2$	5,3 $\pm 1,2$	3,7 $\pm 2,3$	3,3 $\pm 0,6$	2 $\pm 1$
nbre. total d'éclos / 30	29,7 $\pm 0,6$	30 $\pm 0$	29,3 $\pm 0,6$	29,7 $\pm 0,6$	30 $\pm 0$	28,7 $\pm 1,5$
nbre. de larves survivantes à J10	29 $\pm 1$	28,3 $\pm 1,2$	28,3 $\pm 0,6$	27,3 $\pm 1,2$	28,7 $\pm 0,6$	0,7 $\pm 1,2$
taille (mm)	4,5 $\pm 0,6$	4,6 $\pm 0,5$	4,4 $\pm 0,7$	4,3 $\pm 0,4$	4,1 $\pm 0,4$	

Aucun effet n'a été constaté sur l'apparition d'oeufs blancs ou sur le taux d'éclosion. Par contre, une perturbation significative a été mesurée sur la survie des larves à 90% d'effluent et sur leur croissance à 60%. Dans le cas de cet effluent, la sensibilité du critère de croissance s'est donc montrée supérieure à celle du critère de survie.

Par ailleurs, une concentration moyenne de 3,0mg/l d'ammoniac a été mesurée le 4<sup>ème</sup> jour de l'essai dans les récipients contenant 90% d'effluent. Etant donné la toxicité de ce composé à la concentration de 2,1mg/l (cf. § B.3.8), les mortalités importantes constatées à la concentration maximale de l'effluent ne sont pas surprenantes.

Dans le tableau 66 reprenant les résultats relatifs à l'échantillon SF2, les concentrations en ammoniac mesurées au 4<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour sont indiquées.

Les effets significatifs observés ont concerné la survie et la croissance des larves pour des concentrations supérieures ou égales à 60% d'effluent.

Les teneurs des milieux d'essai en ammoniac au 10<sup>ème</sup> jour suggèrent que les rejets d'urée des poissons, la dégradation des fèces et de l'excès de nourriture (distribuée à partir du 6<sup>ème</sup> jour) ont vraisemblablement contribué à augmenter ces teneurs.

Une partie des mortalités observées est certainement attribuable aux concentrations en ammoniac mesurées en fin d'essai. Par exemple, la mortalité des larves d'un des réplicats contenant 90% d'effluent a été totale au 4<sup>ème</sup> jour du test alors que la concentration en ammoniac était de 1,43mg/l. Elles étaient de 1,08 et 1,05mg/l pour les deux autres réplicats et les mortalités se sont étalées entre le 5<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour. A l'effet de l'ammoniac s'ajoute

très certainement la toxicité des micropolluants de cet effluent, mais les teneurs en ammoniac incriminées se rapprochent de la concentration critique évaluée au § B.3.8.

Tableau 66: Effets de l'effluent de STEP SF2 sur les stades embryo-larvaires du danio zébré (moyenne  $\pm$  écart-type; la case est ombrée si le résultat est significativement différent du lot témoin)

paramètres suivis en particulier	température (°C)	pH	O <sub>2</sub> (mg/l)	NH <sub>3</sub> (mg/l)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)
fréquence de suivi	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.
écart maximum	25,3 - 25,8	7,5 - 8,3	4,8 - 7,7	0,008 - 1,43	< 1,0

critère de toxicité ou mesure	[effluent] en % (v/v)					
	0	2	10	33	60	90
oeufs blancs / 50 à 24 h.	4 $\pm 1,7$	3,7 $\pm 1,5$	2 $\pm 1,7$	3,7 $\pm 2,9$	3,7 $\pm 4,0$	2 $\pm 1$
nbre. total d'éclos / 30	29,7 $\pm 0,6$	29,7 $\pm 0,6$	30 $\pm 0$	29,7 $\pm 0,6$	29,7 $\pm 0,6$	27 $\pm 3$
nbre. de larves survivantes à J10	28,7 $\pm 1,2$	28,3 $\pm 0,6$	27,3 $\pm 0,6$	26 $\pm 3$	18 $\pm 6,1$	0
taille (mm)	4,0 $\pm 0,3$	4,0 $\pm 0,3$	3,9 $\pm 0,2$	3,8 $\pm 0,2$	3,7 $\pm 0,1$	
[NH <sub>3</sub> ] à J4 (mg/l)	0,02	0,035	0,11	0,37	0,66	1,2
[NH <sub>3</sub> ] à J10 (mg/l)	0,18	0,22	0,37	0,52	0,73	nd

#### 4.4.3- Vérification de la contribution de l'ammoniac à la toxicité des échantillons

De manière à vérifier les hypothèses précédentes, nous avons choisi d'utiliser une technique de l'EPA (1993) basée sur "l'évaluation et l'identification de la toxicité". L'ajustement des milieux d'essai à différents pH grâce à un agent tampon a permis de faire varier les ratios NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> dans plusieurs dilutions d'effluent. Les mortalités observées lors d'essais de toxicité aiguë réalisés sur ces différentes solutions permettent alors de préciser la part de l'ammoniac dans la toxicité de l'effluent analysé. Cependant, lors de l'interprétation des résultats, l'effet possible des variations de pH sur la biodisponibilité de certaines substances contenues dans les échantillons d'effluent ne devra pas être écarté.

##### □ déroulement de l'essai

Un essai de toxicité aiguë a été réalisé pendant 48h. sur 60 larves de 5 jours, réparties en triplicat, exposées à deux concentrations d'effluent en ajustant séparément les pH à 6,8 et 7,8 à

l'aide d'une solution tampon "Hepes\* ". L'ajout de cette solution a été pris en compte dans la concentration en effluent reportée dans le tableau des résultats ci-dessous. L'innocuité de la concentration finale en Hepes (0,5mM) a été vérifiée préalablement sur des larves de même âge.

Tableau 67: Vérification de la contribution de l'ammoniac à la toxicité aiguë du deuxième effluent de STEP (SF2) par modification des conditions de pH

mesure	[effluent] en % (v/v)					
	0#	0#	60	60	90	90
pH ajusté à t = 0	6,8	7,4	6,8	7,7	6,8	7,8
[NH <sub>3</sub> ] à t = 0 (mg/l)	< 0,01	< 0,01	0,07	0,63	0,12	1,15
pH à t = 48h.	7,5	8,2	7,5	8,2	7,7	8,1 (24h.)
[NH <sub>3</sub> ] à t = 48h. (mg/l)	0,01	0,03	0,52	2,16	1,34	2,57 (24h.)
nbre. de larves survivantes (%)	100	100	95	30	98	0 (24h.)

# témoin avec 0,5mM d'Hepes

Malgré les dérives de pH, ces résultats confirment les observations précédentes montrant que les mortalités observées paraissent en grande partie attribuables à des concentrations en ammoniac plutôt qu'aux dilutions de l'effluent.

Des essais menés en parallèle sur la céridaphnie ont révélé que la diminution du rapport [NH<sub>3</sub>]/[NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] de l'effluent ne suffisait pas à réduire l'effet toxique aux fortes concentrations. Cet organisme serait donc plus sensible aux composés toxiques autres que l'ammoniac. La tolérance supérieure des invertébrés à ce composé est d'ailleurs confirmée par Arthur et al. (1987).

#### 4.4.4- Essai sur un détergent anionique: l'alkylbenzène sulfonate linéaire ou LAS

Parmi les micropolluants identifiés dans les échantillons présentés dans le tableau 63, le détergent LAS a été détecté à des concentrations importantes allant de 1,02 à 1,6mg/l dans les effluents de la STEP de St Fons. L'abattement des teneurs en LAS entre l'entrée et la sortie de cette station est seulement de 24% ce qui souligne son mauvais fonctionnement ou sa surcharge. En effet, ce composé peut être éliminé avec un taux de 95% au niveau du traitement par boues activées des stations d'épuration (McAvoy et al., 1993).

Nous avons souhaité connaître la toxicité sublétales spécifique de cette molécule vis-à-vis des stades embryo-larvaires du danio zébré afin d'évaluer sa contribution à la toxicité de ces effluents.

\* acide N-2-hydroxyéthyl piperazine-N'-2-éthanosulfonique

### □ déroulement de l'essai

Nous avons utilisé une formulation commerciale qui contient 30% de matière active et possède la composition suivante: 30% de matière active, 0,75% de sulfates, 0,75% d'insulfonés et 68,5% d'eau déminéralisée. La distribution moléculaire de l'alkylat linéaire est la suivante: 5 à 15% de C<sub>10</sub>, 25 à 45% de C<sub>11</sub>, 25 à 45% de C<sub>12</sub>, 12 à 30% de C<sub>13</sub> et environ 4% de C<sub>14</sub>; la longueur moyenne du groupement alkyl étant de 11,8 atomes de carbone.

L'essai a porté sur une durée de 10 jours dans des conditions semi-statiques (renouvellement des milieux une fois par jour). Trois réplicats ont été mis en oeuvre pour chaque concentration de détergent.

Des dosages ont été effectués par colorimétrie après réaction au bleu de méthylène et extraction au chloroforme selon la norme NFT 90-039 (limite de détection = 0,05 mg/l). Bien que cette méthode ne soit pas d'une spécificité optimale, elle a permis de contrôler les concentrations réelles testées ainsi que l'ampleur du phénomène de biodégradation dans les conditions d'essai. Nguyen (1995) préconise cependant une méthode de dosage par méthylation du LAS en présence de diazométhane qui serait plus sélective.

Tableau 68: Résultats de l'essai SEL sur le LAS (moyenne ± écart-type; la case est ombrée si le résultat est significativement différent du lot témoin)

paramètres suivis en particulier	température (°C)	O <sub>2</sub> (mg/l)	pH
fréquence de suivi	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.
écart maximum	25,5 - 26,2	5 - 8	7,1 - 8,2

critère de toxicité	[LAS] nominale (mg/l)					
	0	1,5	2,2	3,2	4,8	6,4
oeufs blancs / 50 à 24 h.	11 ± 2,7	13,7 ± 1,2	14,3 ± 2,5	13,3 ± 1,2	14,3 ± 3,1	15 ± 2,7
nbre. total d'éclos / 30	29,3 ± 0,6	29,7 ± 0,6	29 ± 1	29,7 ± 0,6	27,7 ± 1,2	12,3 ± 5,9
nbre. de larves survivantes à J10	28,6 ± 0,6	29,3 ± 0,6	28 ± 2	28,3 ± 1,5	15,3 ± 1,2	0
taille (mm)	4,9 ± 0,3	4,9 ± 0,4	4,8 ± 0,4	4,9 ± 0,3	4,3 ± 0,4	

L'éclosion des embryons est perturbée de façon significative à la dernière concentration testée. Une dissolution du chorion par le détergent à cette concentration ne semble pourtant pas avoir eu lieu car aucune augmentation significative du nombre d'oeufs blancs n'a été constatée après 24h. d'exposition. Au terme de l'essai, un effet a été mesuré au niveau de la survie et de la croissance des larves à 4,8mg/l.

La biodégradation du LAS dans nos conditions expérimentales a été mesurée par échantillonnage des solutions nouvellement préparées et après 24h.

Tableau 69: Dosage du détergent LAS dans les différents lots à 24h. d'intervalle (résultats exprimés en mg/l)

[LAS] à t=0	1,5	2,2	3,2	4,8	6,4
[LAS] à t=24 h.	0,6	0,76	0,72	1,21	nd

nd: non dosé

La dégradation du détergent paraît d'autant plus forte que la concentration est importante et avec une ampleur qui est en rapport avec les indications de Steinberg et Kettrup (1992) qui indiquent une minéralisation de la molécule à un taux de 80% en 33 heures. L'abattement important mesuré signifie que les larves sont exposées à des concentrations fluctuantes au rythme des renouvellements de milieu. Pour remédier à ces variations, il conviendrait de renouveler les solutions toutes les 12h. ou d'utiliser un système de renouvellement continu des milieux.

Il est donc difficile de proposer une CMEO que l'on peut seulement estimer à une valeur comprise entre 1,2 et 4,8mg/l de LAS. La toxicité de l'échantillon SF2 observée dès la concentration de 60% (v/v) ne paraît donc pas attribuable essentiellement à sa teneur en LAS (1,2mg/l).

#### 4.5- Discussion sur le déroulement des essais SEL sur effluents

La connaissance des domaines de tolérance des premiers stades de vie du danio zébré a permis une appréciation plus juste des contributions de paramètres chimiques du milieu ( $O_2$ , pH et  $NH_3$ ) à la toxicité constatée. Même aux concentrations les plus fortes des effluents étudiés, il s'est avéré que les niveaux de pH et d'oxygène dissous ont été suffisamment tamponnés par l'eau de dilution apportée pour ne pas perturber directement le développement des organismes d'essai.

Notre "stratégie" pour la réalisation de l'essai SEL consiste à évaluer les niveaux des paramètres  $O_2$ , pH à la plus forte concentration que nous allons tester. S'ils sont en dehors des domaines de tolérance (au moment de la préparation et après 24h.), on procédera à un ajustement des échantillons (par ajout d'acide ou de base et par oxygénation) pour ramener ces paramètres à l'intérieur des domaines de tolérance. Nous préférons, en effet, ne pas effectuer ces réajustements de façon systématique car les rectifications de pH peuvent conditionner la biodisponibilité de certains composés. De même, une aération peut conduire à l'oxydation ou à la volatilisation de certaines substances organiques comme nous l'avons précisé dans le chapitre A.5.2.6. En cas de teneur importante en ammoniac, sa contribution à la toxicité des échantillons pourra être évaluée par une des méthodes décrites par l'EPA (1993). Celle que nous avons mis en oeuvre consiste à faire varier le rapport  $NH_3/NH_4^+$  grâce à une

modification du pH obtenue par ajout d'un agent tampon. Une autre méthode consiste à volatiliser l'ammoniac  $\text{NH}_3$  par injection d'air dans les échantillons à pH basique ( $\geq 9$ ). Il est également possible de faire passer les échantillons à tester au travers d'une colonne échangeuse de cation pour éliminer la plus grande partie des ions  $\text{NH}_4^+$ . Cette dernière méthode semble préférable car elle évite l'ajout de réactif et l'ajustement du pH qui peuvent constituer une cause de toxicité par eux-mêmes ou par interaction avec certains constituants des échantillons.

Concernant, la matière en suspension (MeS), nous avons constaté que cette mesure ne reflète pas la perturbation subie par les stades embryo-larvaires du danio zébré. En effet, une concentration de 58mg/l en MeS de l'effluent de papeterie (à 10%) n'a pas gêné le déroulement de l'embryogenèse alors que 7mg/l de MeS de l'effluent de STEP SF2 a suffi pour asphyxier les embryons lors d'un essai préliminaire. Le dépôt floconneux en cause a certainement pour origine une décantation insuffisante des boues au niveau de la STEP et a conduit vraisemblablement à une déplétion importante en oxygène du milieu aqueux entourant les oeufs. En plus d'une quantification des MeS, une mesure de la consommation d'oxygène de ces matières serait donc un complément d'information pertinent pour la réalisation de notre essai.

#### 4.6- Pertinence des essais SEL pour l'évaluation de la toxicité sublétales des effluents

Parmi les essais embryo-larvaires sur le danio zébré décrits précédemment, plusieurs ont été complétés par un essai chronique portant sur la reproduction de la cériodaphnie (*Ceriodaphnia dubia*). La comparaison des CMEOs obtenues sur les mêmes échantillons permet d'évaluer les différences de sensibilité des deux essais.

Tableau 70: Comparaison des seuils de sensibilité de deux organismes à différents effluents

essai (critères de toxicité)	échantillon				
	effluent de papeterie	effluent de teinturerie	effluent de STEP C1	effluent de STEP SF2	effluent de STEP SF3
essai SEL sur le danio zébré (E = éclosion; S = survie; C = croissance)	10 % (S)	6,1 % (E, S, C)	60 % (C)	60 % (S, C)	2 % (S)
essai chronique sur la cériodaphnie (reproduction)	4 %	1,2 %	2 %	33 %	33 %
CM #	nc	0,7 %	20-25 %	0,6 %	0,6 %

# concentration maximale de l'effluent dans le milieu récepteur à partir de débits d'étiages calculés (sur 5 ans) des cours d'eau concernés.

nc: non communiqué



Les concentrations en effluent qui affectent les stades embryo-larvaires du danio zébré sont généralement supérieures (avec un facteur maximum de 30 pour C1) à celles qui entraînent une inhibition de la reproduction de la céridaphnie. Une exception existe pour le dernier effluent de SF3 où la mortalité larvaire observée dès 2% d'effluent est vraisemblablement liée à des niveaux importants en ammoniac.

Si l'on confronte les CMEO obtenues et la concentration maximale de l'effluent dans le milieu récepteur (CM), il ressort que l'effluent C1, une fois rejeté, est susceptible d'entraîner une toxicité comme l'ont montré les résultats concernant la reproduction de la céridaphnie.

Pour les autres échantillons, le rapport entre les CMEO et les CM s'échelonne de 8,7 à 100 pour le modèle poisson et de 1,7 à 55 pour le modèle microcrustacé. Etant donné le manque d'information que nous possédons sur la composition\* des différents effluents au fil du temps, leur impact toxique dans le milieu récepteur n'est pas à exclure compte tenu des teneurs de certains composés (e.g. détergent, métaux). Ces résultats permettent également de classer les risques à court terme de ces rejets sur le milieu récepteur et donne une indication sur les sites prioritaires si un programme de réduction d'impact est élaboré.

La toxicité de l'échantillon C1 vis-à-vis de la céridaphnie pourrait être liée aux teneurs élevées en métaux lourds qu'il renferme (Cu:2mg/l; Pb:1,35mg/l; Zn:6,1mg/l). Ces concentrations soulèvent d'ailleurs des interrogations face à la CMEO élevée obtenue avec le modèle embryo-larvaire du danio zébré pour cet échantillon connaissant les données de référence sur cette espèce réunies dans le tableau suivant. Bien que la toxicité du cuivre ait été évaluée sur des adultes, la concentration plus que 10 fois supérieure de ce métal dans l'effluent suggère que la biodisponibilité du cuivre contenu était réduite.

Tableau 71: Indications sur la toxicité du cuivre et du zinc vis-à-vis du danio zébré.

<b>métal</b>	<b>essai (critère)</b>	<b>toxicité (mg/l)</b>	<b>auteur</b>
cuivre	test aigu sur adulte durant 96h. (survie)	CL50 = 0,149	Fogels (1977)
zinc	essai SEL sur 15 jours (survie)	CSEO = 11,4	Dave (1987)

D'une façon plus générale, l'intérêt de ces bioessais est surtout l'estimation des effets nocifs des rejets qui doivent être suivis de façon régulière pour en évaluer les fluctuations de toxicité. En complément d'un suivi physico-chimique, cette démarche est à adopter lorsqu'un projet de réduction d'impact est entrepris. La mise en oeuvre d'une batterie de bioessais est alors particulièrement recommandée pour apprécier les effets d'un effluent sur des organismes représentant plusieurs niveaux trophiques. De plus, un rejet estimé de faible toxicité ne doit

\* notamment le caractère rémanent et bioaccumulable de leurs constituants

pas faire oublier la résultante toxique possible de rejets multiples sur la biocénose d'un cours d'eau.

Concernant plus spécifiquement l'essai SEL sur le danio zébré, le tableau 70 permet de comparer la sensibilité des critères de toxicité sur les différents échantillons d'effluent. Il en ressort que dans quatre cas sur cinq, des mortalités apparaissent à des concentrations d'effluent inférieures ou égales à celles qui perturbent l'éclosion ou la croissance. Seul pour l'échantillon C1, la CME0 est de 60% pour la croissance contre 90% pour la survie mais aucune concentration intermédiaire n'a été testée.

#### **4.7- Conclusion**

Les quatre essais effectués sur différents effluents ont illustré la possibilité d'appliquer l'essai SEL sur le danio zébré à ce type d'échantillon. Leurs caractéristiques physico-chimiques et les réponses obtenues dans certains cas nous ont cependant conduit à vérifier la part de certains constituants ( $\text{NH}_3$ , détergent LAS) à la toxicité globale des échantillons. Des essais supplémentaires sont cependant nécessaires pour définir une stratégie vis-à-vis de la matière en suspension dont l'impact est encore difficile à évaluer.

Concernant les réponses obtenues au terme des essais SEL, le critère de survie des larves a montré une sensibilité comparable et souvent meilleure à celle apportée par les autres critères de toxicité.

D'autre part, la sensibilité des stades embryo-larvaires du danio zébré est apparue inférieure à celle de la cériodaphnie (sur le critère de la reproduction) mais sa mise en oeuvre dans le cadre d'une batterie de bioessais est importante. En effet, ce modèle poisson peut présenter une sensibilité spécifique à certains composés comme cela s'est révélé avec l'ammoniac.

## **5- Pertinence des mesures de croissance**

Nous avons évoqué dans la discussion précédente, la sensibilité relative des différents critères de toxicité pris en compte lors des essais SEL sur effluents. Comme nous n'utiliserons plus le critère de croissance dans le reste du travail, il est opportun de faire une autre évaluation de cette mesure sous forme d'un bilan de l'homogénéité des tailles mesurées à la fin des essais SEL dans les lots témoins.

Nous intégrerons également, dans la conclusion de ce chapitre, un tableau de synthèse des valeurs "témoins" concernant les autres critères de toxicité.

### **5.1- Reproductibilité des taux de croissance dans les lots témoins**

#### **5.1.1- Introduction**

Le protocole de l'essai larvaire sur le vairon tête-de-boule (EPA, 1989b) fait état d'un taux de croissance minimum pour le lot témoin (en terme de biomasse) comme condition de validité du test. Ce taux dépend de plusieurs paramètres (e.g. quantité et qualité de la nourriture distribuée, variations thermiques) et peut conditionner la mise en évidence de phénomènes d'inhibition. Une croissance de 10% par exemple du poids des larves témoins entre le début et la fin de l'essai est, en effet, plus à même de révéler une perturbation qu'une croissance qui ne serait que de 4%.

Dans le seul protocole où la mesure de croissance des larves de danio zébré figure dans la liste des critères de toxicité (norme 210; OCDE, 1992), il n'est pas fait mention d'une clause de validité sur la croissance des témoins.

Dans le cadre des essais suivis, nous avons voulu analyser la dispersion des résultats de croissance dans les lots témoins. La recherche d'une condition de validité sur ce critère en terme de taille moyenne des larves à la fin des essais pourra être un prolongement de cette étude.

#### **5.1.2- Choix des lots témoins pour l'analyse**

Sur l'ensemble des lots témoins dont la croissance a été mesurée au cours de ce travail, nous avons observé un étalement des moyennes de taille au terme de l'essai allant de 3,8 à 4,9mm avec des écart-types compris entre 0,2 et 0,8mm; la dispersion intra-lot des données n'étant pas plus forte lorsque la croissance est plus importante.

Pour une analyse plus précise des données de taille, nous avons retenu les lots témoins des essais portant sur:

- l'effluent de papeterie et de teinturerie et sur le détergent LAS. Pour ces essais, un échantillon aléatoire de vingt larves sur trente a été mesuré au lecteur de microfiches dans les trois réplicats.
- l'ammoniac (trois essais dénommé NH3\_1, NH3\_2, NH3\_3). Lors de ces essais successifs, l'ensemble des larves a été mesuré par analyse d'images dans les trois réplicats. Cette technique de mesure n'était pas opérationnelle lors des premiers essais.

Cette restriction de notre analyse de données à six essais tient au fait que pour plusieurs essais, nous n'avons mesuré qu'un échantillon aléatoire de vingt larves sur trente dans deux réplicats. En effet, la mesure de toutes les larves d'un essai SEL ( $\approx 540$  larves) exige un temps de manipulation important quelle que soit la méthode utilisée. Pour réaliser une analyse plus représentative, nous avons souhaité traiter la dispersion de lots de larves témoins répartis en triplicats.

Par ailleurs, la distribution de paramécies et la quantification plus précise des apports de nourriture sèche (cf. § B.1.5.2.6) n'étaient pas opérationnelles pour les trois premiers essais inclus dans notre analyse; la distribution étant faite de façon approximative à l'aide d'une spatule. La comparaison de tous ces lots permettra donc également d'évaluer les avantages de ce changement de méthode de nourrissage des larves.

Une synthèse des données qui seront traitées est donnée dans le tableau 72; les données brutes figurant en annexe 8.

Tableau 72: Croissance des larves témoins au terme de six essais SEL (N correspond au nombre de larves mesurées par réplicat)

essai	réplicat	N	moyenne (mm)	écart -type	essai	réplicat	N	moyenne (mm)	écart -type
<b>A</b> effluent papeterie	1	20	4,5	0,5	<b>D</b> NH3_1	1	23	3,9	0,4
	2	20	4,0	0,4		2	28	3,9	0,4
	3	18	4,6	0,5		3	28	3,8	0,4
	1+2+3	58	4,3	0,5		1+2+3	79	3,9	0,4
<b>B</b> effluent teinturerie	1	20	4,4	0,5	<b>E</b> NH3_2	1	28	3,8	0,5
	2	20	4,5	0,4		2	28	3,7	0,5
	3	20	4,5	0,4		3	27	3,6	0,3
	1+2+3	60	4,5	0,4		1+2+3	83	3,7	0,4
<b>C</b> détergent LAS	1	21	4,9	0,3	<b>F</b> NH3_3	1	25	4,0	0,4
	2	17	5,0	0,3		2	29	3,9	0,6
	3	20	5,0	0,4		3	28	4,0	0,6
	1+2+3	58	4,9	0,3		1+2+3	82	4,0	0,5

Pour éviter toute confusion entre l'analyse des larves témoins et celles ayant été exposées à un effluent ou une substance, nous utiliserons dorénavant des codes de lettres pour la dénomination des différents lots témoins.

Une première observation des données indique des moyennes de taille sensiblement plus élevées pour les essais A, B et C et une différence importante entre les réplicats du lot A.

Une analyse statistique des données brutes a consisté en une vérification de la distribution des données et de l'homogénéité des variances. Nous avons ensuite procédé à une analyse de

variance et un test de comparaison de moyennes. Ces traitements ont été réalisés à l'aide du logiciel Toxstat 3.0 (Gulley et al., 1989) dont nous avons déjà parlé dans le chapitre B.1.5.3.

### 5.1.3- Vérification de la distribution des données et de l'homogénéité des variances

Ce préalable au choix du test de comparaison de moyennes a été réalisé grâce au test du Khi-deux ( $\chi^2$ ) pour la vérification de la distribution des données selon la loi Normale. D'autre part, le test de Bartlett a permis de s'assurer de l'homogénéité des variances.

Tableau 73: Résultats des tests de vérification de la distribution des tailles et de l'homogénéité des variances dans les différents lots (p = probabilité)

		normalité		variance			normalité		variance
essai	réplicat	$\chi^2$	p	p	essai	réplicat	$\chi^2$	p	p
A	1	3,65	0,161	0,486	D	1	3,37	0,339	0,780
	2	0,46	0,928			2	3,77	0,438	
	3	0,83	0,659			3	4,12	0,249	
B	1	3,93	0,269	0,820	E	1	7,51	0,057	0,282
	2	2,65	0,449			2	2,77	0,597	
	3	15,24	<b>0,002</b>			3	4,10	0,392	
C	1	4,38	0,112	0,521	F	1	0,57	0,966	0,350
	2	4,09	0,096			2	9,47	0,092	
	3	3,86	0,277			3	14,06	<b>0,007</b>	

Pour un des réplicats dans les lots B et F (valeur en gras), la distribution des données n'a pas obéi à la loi Normale car la probabilité que les données vérifient cette loi est inférieure au seuil d'erreur de 5%. Par contre, la probabilité d'avoir des variances homogènes entre les réplicats a été satisfaisante pour tous les lots.

### 5.1.4- Analyse de variance

Cette analyse est destinée à évaluer la différence entre les réplicats compte tenu de la variabilité des tailles au sein de chaque réplicat. Le résultat de l'analyse de variance (F) a été comparé à la valeur F-critique (loi de Snedecor). Si F est supérieur à F-critique, l'hypothèse nulle, selon laquelle tous les réplicats sont égaux, sera rejetée.

Pour les lots B et F qui comportent des réplicats ne vérifiant pas les conditions de Normalité, une analyse de variance par rang a été utilisée et le paramètre H calculé a été comparé à la valeur H-critique déterminée à l'aide du test de Kruskal-Wallis. Si H est supérieur à H-critique, l'hypothèse nulle sera rejetée. Les résultats de ces analyses sont consignés dans le tableau 74.

Tableau 74: Résultats des analyses de variance

essai	F	F-critique	essai	H	H-critique
A	8,23	3,23	B	0,33	5,99
C	0,12	3,23	F	2,05	5,99
D	0,80	3,15			
E	0,12	3,15			

Les informations obtenues indiquent que seuls les données des réplicats du lot A ne sont pas directement comparables. Un test paramétrique de comparaison de moyennes (test de Tukey) a permis de montrer l'existence d'une différence significative des valeurs du réplicat n°2 par rapport aux réplicats n°1 et 3 de ce lot.

### 5.1.5- Comparaison des moyennes

Etant donné la distribution non Normale des données de certains réplicats des lots B et F, un test de comparaison de moyenne non paramétrique de Kruskal-Wallis a été réalisé. Le réplicat du lot A qui s'est révélé significativement différent des deux autres n'a pas été inclus dans les comparaisons de moyenne dont les résultats figurent dans le tableau suivant.

Tableau 75: Comparaison des moyennes des différents lots; le signe \* atteste d'une différence significative avec un risque d'erreur de 5%

B					
C	*	*			
D	*	*	*		
E	*	*	*		
F	*	*	*		
	A	B	C	D	E

Ces résultats permettent de distinguer trois populations de larves appartenant aux lots:

- C,
- A et B,
- D, E et F.

Ce dernier groupe sous-entend une certaine homogénéité du taux de croissance moyen des larves après le changement de méthode de nourrissage des larves.

La figure 31 illustre cependant que la variabilité des tailles au sein de ces lots n'a pas été améliorée par cette méthode.

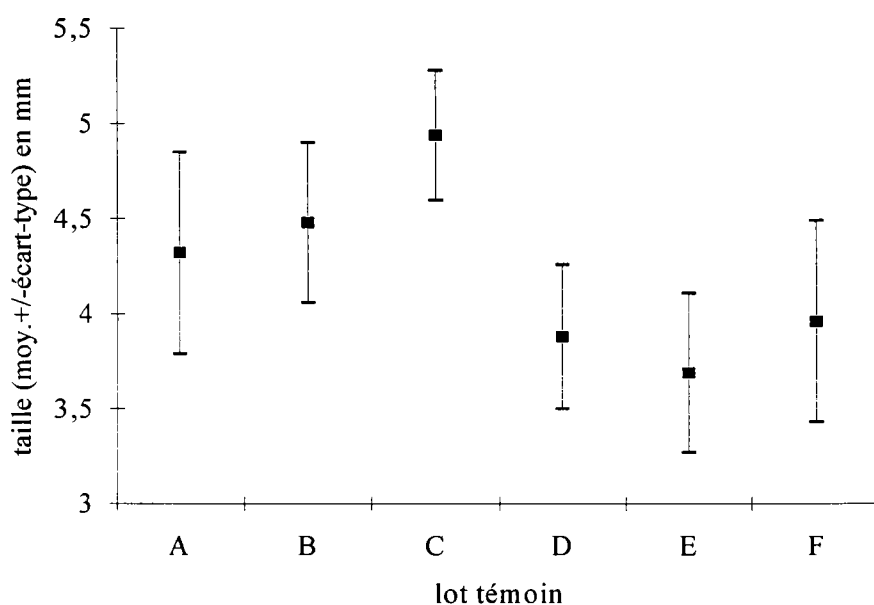


Figure 31: Répartition des mesures de taille des larves au sein de chaque lot

La croissance significativement plus faible des larves des lots D, E et F en comparaison aux lots A, B et C suggère également que ce nouveau protocole de nourrissage semble restreindre la croissance "potentielle" des larves. La ration (par jour et par larve) de 0,5mg de nourriture sèche préconisée par Dalverny (1993) que nous avons respecté de façon relativement précise avec notre dispositif de distribution (cf. annexe 6) sous-estime vraisemblablement la quantité assimilable par les larves.

En contrepartie, la distribution de rations plus importantes peut conduire à une élévation préjudiciables des teneurs en ammoniac lors des essais sur effluent de STEP (aux plus fortes concentrations testées) par dégradation des restes de nourriture. Des essais complémentaires pourraient tenter d'optimiser les quantités à distribuer et évaluer la possibilité technique de répartir les rations en plusieurs distributions au cours de la journée.

### 5.1.6- Conclusion

Au niveau des lots de larves témoins considérés, les analyses effectuées indiquent une meilleure homogénéité des taux de croissance moyens lorsque la nourriture est distribuée de façon plus précise. Au sein des trois lots concernés, nous n'avons pas constaté de différence entre les réplicats et le coefficient de variation sur la taille des larves pour un même lot est compris entre 10,3 et 12,5%. A titre de comparaison, il est intéressant de considérer la variabilité de la reproduction de lots de dix céridaphnies (*Ceriodaphnia dubia*) témoins lors de quinze essais successifs réalisés au laboratoire. Les coefficients de variation calculés sur le nombre de jeunes produit par mère en sept jours se répartissent entre 7,7 et 40,6%. Même si ces deux critères (croissance et reproduction) sont difficilement comparables en raison des processus de régulation mis en jeu, cette comparaison permet de relativiser les disparités de taille des larves témoins au terme des essais SEL sur le danio zébré.

## **5.2- Contribution du critère de croissance à la sensibilité des essais SEL**

Parmi les critères de toxicité exploités lors des essais SEL, la survie des larves a été affectée le plus souvent à des concentrations plus faibles que celles qui ont perturbé la survie embryonnaire (sur 24h.) ou le taux d'éclosion. Les résultats de Dalverny (1993) obtenus lors d'essais SEL appliqué au chrome (VI) et au cadmium indiquent également cette différence de sensibilité.

La contribution du critère de croissance à la sensibilité des essais par rapport au critère de survie est plus délicate à évaluer et nous analyserons le cas d'essais sur des échantillons de nature différente.

### **▣ essais sur substances ou paramètres physico-chimiques**

Sur cinq essais de ce type décrits précédemment, nous avons constaté une sensibilité supérieure du critère de croissance à deux reprises. Lors d'un seul essai, la survie a été affectée à la concentration la plus faible. Au terme des deux essais restants, les deux critères ont montré une sensibilité identique. De même, Dalverny (1993) a observé une sensibilité supérieure du critère de croissance vis-à-vis de la survie lors d'essais sur le cadmium et l'atrazine après 10 jours d'essai.

### **▣ essais sur effluents**

Au terme de cinq essais réalisés sur des effluents, nous avons obtenu une répartition des critères exactement symétrique à la situation précédente. Le critère de survie a montré une plus grande sensibilité que la croissance lors de deux essais alors que l'inverse ne s'est vérifié qu'une seule fois. Pour les deux autres essais, les CMEQ auxquels ces deux critères ont abouti sont identiques.

## **5.3- Conclusion**

L'intérêt des mesures de croissance a été confirmé lors de cette analyse en raison de la contribution du critère de croissance à la sensibilité de plusieurs essais réalisés. De plus, la taille des larves témoins s'est révélée comparable d'un essai à l'autre suite à l'amélioration de la méthode de nourrissage.

Ainsi malgré la durée de manipulation importante que nécessite cette mesure et les recoupements de ce critère avec les informations sur la survie larvaire dans certains cas, nous préconisons un suivi de la croissance des larves au terme de tous les essais SEL.

De plus, une amélioration de notre protocole de nourrissage est envisageable et pourrait accroître la sensibilité de ce critère.

Nous profitons de ce bilan sur le critère de croissance pour présenter la dispersion des valeurs "témoins" des autres critères de toxicité relevés lors des essais SEL (cf. tableau 76).



Tableau 76: Dispersion des valeurs "témoins" des critères de toxicité relevés lors de 15 essais SEL

critère	nbre. d'oeufs blancs /50 à 24h.	nbre. total d'éclos / 30	nbre. de larves survivantes au 10ème jour
moyenne	5,9	29,6	28,8
[min. - max.]	1 - 15	27 - 30	25 - 30

Une disparité importante apparaît au niveau de l'apparition d'oeufs blancs après 24h. d'incubation. La valeur élevée correspond à un essai au début de notre travail initié avec des oeufs produits par des géniteurs "âgés". Par la suite, nous n'avons utilisé que les oeufs de poissons âgés de 4 à 15 mois et le nombre maximum d'oeufs blancs que nous avons observé a été de 8/50.

Après extraction de ces oeufs et la conservation de 30 embryons, le nombre d'embryons parvenant à éclore et de larves survivant jusqu'à la fin de l'essai se révèle optimal.

Un autre critère de toxicité est le nombre de larves malformées apparaissant au cours de l'essai. Sur l'ensemble des essais effectués, la fréquence de ces anomalies du développement s'est élevée à 0,3% au sein des larves témoins. Nous traiterons d'ailleurs de la susceptibilité des stades embryo-larvaires du danio zébré aux effets d'une substance tératogène dans le prochain chapitre.

## **6- Intérêt des stades embryo-larvaires du danio zébré comme modèle de tératogénèse**

### **6.1- Introduction**

La présence de phtalates dans les échantillons d'effluents étudiés à des concentrations allant de 60 à 290 $\mu$ g/l ( $\Sigma$  alkylphtalates) a retenu notre attention en raison de leur potentiel tératogène et de leur caractère bioaccumulable, plusieurs substances de cette famille sont considérées comme substances à risque pour l'EPA (Nguyen, 1995).

L'absence de symptômes de malformation au niveau des larves lors des essais SEL sur ces échantillons, nous a conduit à réaliser un essai sur une des molécules identifiées: le dibutylphtalate de manière à évaluer l'aptitude de notre modèle embryo-larvaire à mettre en évidence la présence de substances tératogènes.

### **6.2- Précautions relatives à la dissolution du dibutylphtalate**

Le dibutylphtalate (DBP) a une solubilité dans l'eau de 10 ou 400mg/l (à 25°C) selon les auteurs (Montgomery, 1993; Vershueren, 1983).

Des essais de dissolution de ce produit ont montré que la qualité de l'eau a une influence importante. Or, la qualité de l'eau disponible au laboratoire, issu d'un forage, présente de légères fluctuations de dureté et de pH au cours du temps dont les causes ne sont pas élucidées. Il a donc été décidé de préparer la solution mère dans une eau de caractéristiques constantes afin d'obtenir une dissolution reproductible du DBP. Après plusieurs essais avec de l'eau ultrapure ou osmosée, c'est une eau de forage réajustée en dureté ( $[\text{CaCO}_3]=200$  mg/l) et à pH=9 qui a donné les meilleurs résultats; la solution étant agitée pendant 1h.30, puis laissée à reposer pendant 20 minutes avant son utilisation. La reproductibilité de ce protocole a été vérifiée sur trois solutions mères préparées à 10,4mg/l à quelques jours d'intervalle. La concentration réelle mesurée a été de  $1,8\pm 0,1$ mg/l ce qui indique une dissolution reproductible ainsi qu'un rapport d'environ 5 entre la concentration nominale et la concentration réelle obtenue. Le dosage du DBP a été réalisé par chromatographie HPLC (détecteur UV à 230nm) avec une limite de détection à 0,05mg/l.

Signalons que les concentrations indiquées dans le tableau des résultats correspondent au dosage des solutions nouvellement préparées. La biodégradation du DBP dans nos milieux a été vérifiée au cours de l'essai et s'est révélée assez rapide à 25°C. Dans la gamme des concentrations testées, plusieurs dosages ont montré qu'en présence de larves, le DBP n'est plus détectable après 24 heures, alors qu'en leur absence, il reste environ 60% de la concentration initiale. Un renouvellement des milieux en continu ou toutes les 12h. aurait donc été plus adapté.

### 6.3- Résultats de l'essai embryo-larvaire

L'essai a porté sur une durée de 10 jours dans des conditions semi-statiques (renouvellement des milieux une fois par jour). Trois réplicats ont été mis en oeuvre pour chaque concentration de DBP. Pour éviter tout risque de contamination, les solutions d'essai n'ont été en contact avec aucun objet en matière plastique. Notons que l'évolution du pH et de la concentration en oxygène dissous n'a pas montré de dérives hors des domaines de tolérance de notre modèle.

Tableau 77: Effets du dibutylphtalate sur les stades embryo-larvaires du danio zébré (moyenne  $\pm$ écart-type; case ombrée si résultat significatif / témoin)

paramètres suivis en particulier	température	pH	O <sub>2</sub> (mg/l)	[DBP]
fréquence de suivi	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois pour chaque conc.
écart maximum	25,4 - 26,1	7,4 - 8,2	5,8 - 8,8	

critère de toxicité	[DBP] (mg/l)					
	0	0,10	0,16	0,24	0,37	0,56
oeufs blancs / 50 à 24 h.	1,7 $\pm 1,2$	1,7 $\pm 1,5$	1,3 $\pm 1,2$	2 $\pm 1$	2 $\pm 1$	5,3 $\pm 2,1$
nbre. total d'éclos / 30	30 $\pm 0$	30 $\pm 0$	30 $\pm 0$	21 $\pm 3,6$	8,7 $\pm 2,1$	0
nbre. de larves survivantes à J10	29,7 $\pm 0,6$	29,3 $\pm 0,6$	27,3 $\pm 0,6$	15 $\pm 2,7$	1,3 $\pm 0,6$	
nbre. de larves anormales à J6	0	0,3 $\pm 0,6$	2,3 $\pm 1,5$	12,3 $\pm 3,1$	7 $\pm 3$	

NB: les concentrations en DBP indiquées correspondent aux résultats du dosage sur des solutions juste après leur préparation

Les résultats indiquent que le critère d'apparition d'oeufs blancs est le moins sensible et qu'il s'est produit un effet significatif par rapport aux témoins sur les critères d'éclosion, de survie et de malformation aux concentrations supérieures ou égales à 0,24mg/l. Des larves anormales sont apparues au 5ème et 6ème jour de l'essai et avec des symptômes très caractéristiques. Elles présentent un gonflement anormal au niveau de l'abdomen et du péricarde. Ces larves sont complètement immobiles, ne réagissant que faiblement aux stimuli. Leur survie est limitée au 7ème ou 8ème jour de l'essai. Pour la plupart d'entre elles, l'extrémité de la queue est tronquée et la tête est difforme (cf. fig 32).



Figure 32: Vue latérale d'une larve malformée après exposition des stades embryonnaires au dibutylphthalate

Nous avons observé que les concentrations croissantes en DBP n'ont pas d'effet aggravant sur les malformations mais touchent une proportion de plus en plus grande de larves comme le montre le tableau 78. Par ailleurs, aucun effet n'a été mis en évidence sur la croissance des larves exposées au DBP ayant une apparence normale.

Tableau 78: Proportion de larve anormales le 6ème jour de l'essai en fonction de la concentration en dibutylphthalate (moyenne  $\pm$  écart-type; case ombrée si résultat significatif / témoin)

	[DBP] (mg/l)				
	0	0,10	0,16	0,24	0,37
$\% \frac{\text{larves\_anormales}}{\text{larves\_vivantes}}$	0	1,1	7,8	60,7	80,3
		$\pm 1,9$	$\pm 5,1$	$\pm 20,5$	$\pm 26,6$

Comme dans le tableau 77, il apparaît une dispersion inter-réplicats du taux de larves anormales d'autant plus grande que les concentrations en phtalate sont élevées.

#### 6.4- Recherche de la phase sensible du développement

Suite aux résultats du premier essai, nous avons voulu identifier la phase de la période embryo-larvaire où le DBP perturbe l'évolution normale du processus de développement. Pour cela, des expositions au dibutylphthalate ont été faites:

- au stade embryonnaire uniquement; après l'éclosion, les larves ont été remises en eau propre (0-4ème jour),
- à partir de l'éclosion (4-10ème jour),
- à partir du 7ème jour, lorsque les larves ont résorbé leur vésicule vitelline et qu'elles commencent à se nourrir (7-10ème jour).

Toujours en triplicats, il a également été suivi un témoin négatif (sans DBP) et un témoin positif (exposition continue au DBP : 0-10ème jour).

Pour pouvoir comparer les effets observés, une seule concentration (0,17mg/l) a été utilisée. Nous souhaitions tester une concentration plus élevée étant donné les résultats précédents mais la dissolution du DBP s'est avérée inférieure à nos prévisions. Compte tenu des quatre semaines qui ont séparés ces deux essais, une modification des caractéristiques de l'eau du laboratoire autres que la dureté et le pH n'est pas à exclure, ni ses effets sur la dissolution de notre substance.

Tableau 79: Mise en évidence de la phase embryo-larvaire susceptible aux effets tératogènes du dibuthylphtalate (moyenne  $\pm$  écart-type; case ombrée si résultat significatif / témoin)

paramètres suivis en particulier	température	pH	O <sub>2</sub>	[DBP]
fréquence de suivi	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois / jr.	1 fois dans chaque lot
écart maximum	25,6 - 26,3	7,3 - 8,0	5,2 - 8,1	0,16 - 0,18 #

critères de toxicité	phase d'exposition (jrs.)				
	témoin sans DBP	0 - 10	0 - 4 embryon	4 - 10 (pro)larve	7 - 10 larve
oeufs blancs / 50 à 24 h.	3,3 $\pm$ 1,5	4,7 $\pm$ 4	8,3 $\pm$ 5,5	4,3 $\pm$ 1,2	4 $\pm$ 2
nbre. total d'éclos / 30	30 $\pm$ 0	29,7 $\pm$ 0,6	30 $\pm$ 0	30 $\pm$ 0	30 $\pm$ 0
nbre. de larves survivantes à J10	30 $\pm$ 0	25,3 $\pm$ 2,1	24,3 $\pm$ 5,1	29,3 $\pm$ 0,6	30 $\pm$ 0
nbre. de larves anormales à J6	0	10,7 $\pm$ 4,5	9,33 $\pm$ 9,1	0	0

# l'intervalle de concentrations en DBP correspond aux résultats du dosage des solutions au moment d'un renouvellement des milieux

On note une mortalité larvaire significative lorsque l'exposition au DBP s'est faite au stade embryonnaire. Pour cette exposition ainsi que l'exposition continue, un nombre significatif de larves malformées a été noté le 6ème jour de l'essai avec une variabilité importante entre les réplicats. L'absence d'anomalies du développement pour les deux autres expositions, ayant lieu après l'éclosion (4-10 et 7-10 jours), indique que le DBP agit au stade embryonnaire, mais les effets tératogènes ne sont visibles macroscopiquement qu'au stade larvaire.

Signalons aussi que le taux de larves malformées est plus élevé que celui relevé lors du premier essai à une concentration voisine mais la dégradation du DBP rend difficile toute comparaison d'un essai à l'autre.

## 6.5- Etude histologique

En collaboration avec le laboratoire d'histologie de l'Université Catholique de Lyon (Prof. Exbrayat), une recherche des effets au niveau histologique a été entreprise sur les larves exposées au DBP qu'elles soient malformées ou d'allure normale.

L'observation des coupes histologiques des larves témoins et des larves malformées montrent de grandes différences (cf. figure 33). La cavité péritonéale des larves malformées est remplie de liquide ce qui provoque une distension abdominale importante et un bouleversement de la disposition des organes. Ces symptômes font penser à un dysfonctionnement de l'osmorégulation car tout le corps semble présenter des oedèmes.

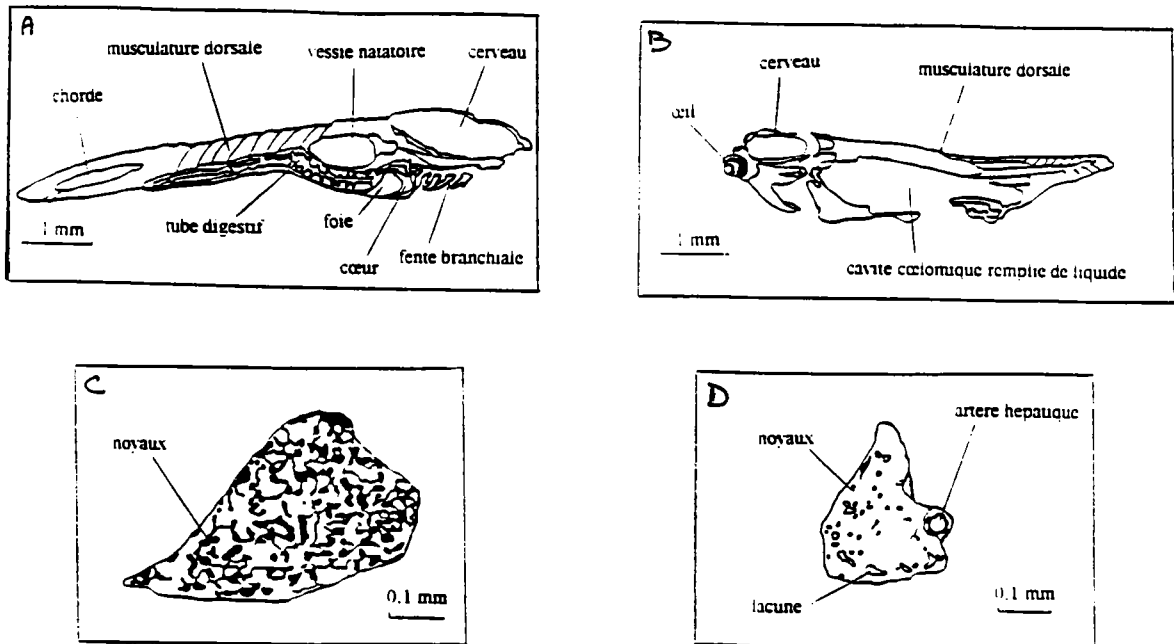


Figure 33: A: coupe longitudinale d'une larve témoin; B: coupe longitudinale d'une larve malformée exposée à 0,24 mg/l de DBP; C: coupe du foie d'une larve témoin; D: coupe du foie d'une larve exposée à 0,24 mg/l de DBP

Tous les tissus semblent être atteints, et en particulier le foie. Les hépatocytes des larves de danio zébré témoins sont des cellules polyédriques de 40µm de diamètre moyen avec un gros noyau central. Leur cytoplasme est homogène et finement granuleux. Dans le cas de larves exposées au DBP, qu'elles soient malformées ou d'aspect normal, la taille des hépatocytes est de 10-15µm et les granulations cytoplasmiques sont regroupées en amas, donnant un aspect beaucoup plus dense à la structure générale du foie.

L'étude histologique permet donc de déceler des altérations histologiques communes chez les larves (exposées depuis le stade embryonnaire) qu'elles manifestent ou non des symptômes de tératogénèse.

## **6.6- Discussion et conclusion**

Les manifestations tératogènes observées après l'exposition des embryons au DBP correspondent en de nombreux points aux symptômes courants de tératogénèse chez les poissons recensés au chapitre A.6.1.

Il est pourtant difficile de juger la sensibilité du danio zébré aux effets tératogènes du DBP étant donné que nous n'avons pas d'informations précises sur les concentrations en DBP au cours de nos essais. La susceptibilité de notre modèle embryo-larvaire à cette substance a cependant été montrée.

D'autres travaux portant sur le zinc et deux xénobiotiques organiques ont fait ressortir une sensibilité moyenne des stades embryo-larvaires du danio zébré aux composés tératogènes comparée à la truite arc-en-ciel (Van Leeuwen, 1990). Cependant, la facilité d'élevage du danio zébré et la simplicité de l'essai SEL font que Dawson et al. (1988) recommandent son intégration dans une batterie de bioessais pour l'évaluation d'effets tératogènes.

Une précision importante concerne la qualification de tératogène à une substance qui provoque des anomalies du développement. Cette attribution au terme d'un essai doit tenir compte de la fréquence d'apparition de faux positifs. Sur quinze essais réalisés (environ 1300 larves), nous avons évalué cette fréquence à 0,3% dans les lots témoins ce qui est faible mais tout de même 15 fois plus élevé que le taux d'apparition trouvé par Landner et al. (1985) sur la même espèce. Ces auteurs ne précisent cependant pas le nombre d'embryons et de larves pris en compte pour faire ce calcul.

En plus de la fréquence "naturelle" d'individus malformés, il faut signaler que ces anomalies du développement peuvent survenir suite à l'exposition des embryons à des stress thermiques ou hypoxiques (Von Westernhagen, 1988). Lors des essais sur les domaines de tolérance des stades embryo-larvaires de notre modèle à la température, l'oxygène dissous et le chlorure de sodium, nous avons également observé un faible pourcentage de larves malformées et il n'a pas été observé de relation entre l'intensité du stress et le taux de larves anormales comme le montre le tableau suivant.

Tableau 80: Observations de larves malformées au cours de trois essais SEL

Condition (gamme testée)	fréquence d'apparition maximum	type d'anomalie des larves
NaCl (0,4 - 9,5 g/l)	3,3 % à 0,4 g/l 3,3 % à 0,7 g/l	gonflement général ou déformation vertébrale
température (19,1 - 25,9°C)	1,6 % à 19,1°C 11,7 % à 20°C 3,3 % à 21°C 3,3 % à 21,4°C 1,6 % à 22,6°C 3,3 % à 23,5°C	gonflement général ou déformation vertébrale
oxygène dissous (0,87 - 2,99 mg/l)	2,2 % à 0,87 mg/l	gonflement général

Le protocole de l'essai SEL prévoit que de telles conditions de température et d'hypoxie ne doivent pas exister si bien que seule l'occurrence naturelle des larves malformées est à considérer pour l'interprétation des observations effectuées. Comme nous l'avons déjà indiqué, cette occurrence est limitée mais étant donnée la variabilité inter-réplicats notée lors des essais sur le DBP, il semble prudent de se baser sur une apparition significative et dose dépendante d'individus malformés avant de qualifier une substance de tératogène.

Les observations histologiques peuvent apporter un complément d'information intéressant au niveau des tissus atteints et permettent parfois de déceler des anomalies de tissus "durs" invisibles macroscopiquement comme la fusion de vertèbres (Davis, 1988).

Nous recommandons également l'observation précise (à la loupe binoculaire) des embryons morts ou présentant un retard d'éclosion durant les essais. En effet, certaines malformations peuvent empêcher le processus d'éclosion et il convient de noter ces manifestations embryotoxiques particulières.

Ces essais ont également souligné l'intérêt de l'exposition de la phase embryonnaire afin de mettre en évidence les perturbations précoces subies par le danio zébré.



## **7- Essais embryo-larvaires sur sédiments**

### **7.1- Introduction**

Un travail méthodologique a porté sur un autre compartiment du milieu aquatique: le sédiment, reconnu pour son pouvoir de concentration, d'accumulation des éléments dissous de la colonne d'eau et en particulier des micropolluants. Le degré de contamination de ce substrat n'est pour autant pas aisé à évaluer par des bioessais de part la multitude de facteurs physico-chimiques intrinsèques et extrinsèques qui conditionnent la biodisponibilité des éléments toxiques.

De nombreux protocoles décrivent comment exposer les organismes d'essai au sédiment entier, à l'eau interstitielle qu'il renferme ainsi qu'à des extraits aqueux ou organiques sans qu'une méthode ne prévale clairement sur les autres. Par ailleurs, les batteries de bioessais préconisées comprennent le plus souvent un ou plusieurs organismes benthiques ou épibenthiques en plus des organismes plus couramment cités pour les essais de toxicité sur des échantillons aqueux (e.g. bactérie, algue, daphnie).

Etant donné que les premiers stades de vie de nombreux poissons se déroulent au contact du sédiment, des protocoles d'essais embryo-larvaires sur le vairon tête-de-boule (Dawson et al., 1988), le poisson rouge (Francis et al., 1984) et le modaka (Cooper et al., 1993) ont été développés. Ajoutés aux batteries habituellement proposées, ces essais permettent de prendre en compte la sensibilité d'un vertébré aquatique et de révéler des perturbations tissulaires ainsi que des effets tératogènes (Burton, 1991).

Des essais préliminaires ont permis de dégager une méthodologie adaptée à l'exposition d'embryons et de larves de danio zébré à des échantillons de sédiments. Il s'est avéré également intéressant d'associer un organisme d'essai épibenthique: la daphnie (*Daphnia magna*) pour pouvoir comparer leurs réponses.

Ce travail s'est prolongé par une application de cet essai avec différentes méthodes d'exposition en collaboration avec deux autres laboratoires d'écotoxicologie.

Il est important de préciser que ce travail méthodologique est essentiellement prospectif et s'est penché sur la faisabilité et la sensibilité d'un essai. Ainsi, nous ne nous sommes pas investi dans la stratégie d'échantillonnage du sédiment qui constituera un éventuel prolongement de cette étude.

### **7.2- Projet de protocole**

#### **7.2.1- Principe**

Cet essai consiste à exposer simultanément de jeunes daphnies et des oeufs de danio zébré à différentes concentrations de sédiment sans renouveler le milieu surnageant (condition statique). Les critères de toxicité relevés sont l'éclosion, la survie des larves de danio zébré après sept jours ainsi que la survie et le taux de croissance des daphnies au bout de 72 heures d'exposition.

Des essais préliminaires ont permis de vérifier que:

- le développement des embryons du danio zébré se déroule normalement sur des sédiments de différentes granulométries,
- la coexistence de ces deux organismes ne nuit pas à leur développement et qu'il n'y a pas de prédation réciproque. Toutefois, après 72h. d'exposition, les daphnies sont retirées pour éviter tout risque de perturbation lorsque les larves commencent à se déplacer.

### **7.2.2- Prélèvement, stockage des échantillons**

Des échantillons de sédiment superficiel (1 à 2cm) sont prélevés et conditionnés en flacon de verre, protégé de l'air par une pellicule d'eau. Ces récipients sont ensuite fermés hermétiquement et ramenés au laboratoire dans une glacière maintenue à basse température. De cette manière, la modification des caractéristiques toxiques des échantillons par oxydation, photolyse et biodégradation est limitée.

Au laboratoire, les échantillons sont tamisés à 2mm, homogénéisés puis reconditionnés en flacon de verre et enfin conservés à environ 4°C et à l'obscurité. Dans ces conditions, le stockage est limité à deux semaines au maximum avant la réalisation des essais. La congélation des sédiments est déconseillée car elle peut modifier la biodisponibilité de micropolluants organiques (Schuytema et al., 1989). Leur conservation entre 2 et 4°C est préférée mais limitée à une durée maximum de deux mois (Burton, 1991).

Une aliquote de chaque échantillon est prélevée pour les analyses physico-chimiques.

Le tamisage à 2mm permet d'éliminer les grosses particules ou débris végétaux ainsi que les larves de certains insectes (e.g. odonates, trichoptères, éphémères) qui peuvent exercer une prédation sur les oeufs de poisson. Ce tamisage peut cependant laisser passer des vers tubifex (*oligochète tubificidae*) ou leurs larves mais ceux-ci ne semble pas perturber les organismes d'essai.

### **7.2.3- Préparation des solutions à tester**

Un poids de sédiment humide déterminé selon une progression géométrique (e.g. 3; 6; 12g.) est introduit dans les récipients d'essai (en triplicats) puis complété avec 100ml d'eau de dilution, homogénéisé légèrement à la main puis laissé à décanter pendant 12h. dans une enceinte thermostatée à 26±1°C.

L'eau de dilution possède les caractéristiques décrites dans le chapitre B.1.5.2.2. et convient également au développement des daphnies.

Lors du mélange sédiment / eau, il faut veiller à ne pas produire de vortex créant un "dôme" de sédiment au centre des récipients. Les oeufs de danio zébré déposés le lendemain (après décantation) auront alors tendance à rouler vers le bord des récipients en se stabilisant dans les zones où il y a peu ou pas de sédiment; situation à éviter si l'on veut favoriser leur contact.

Signalons que si le sédiment à tester est très réducteur, une oxydation importante va avoir lieu lors du mélange sédiment / eau ce qui va abaisser la teneur en oxygène de la phase aqueuse (Workshop on sediment toxicity assessment, 1993). Cette déplétion en oxygène ralentit le développement embryonnaire des poissons et peut augmenter la susceptibilité des larves à des éléments toxiques. Ceci étant, le caractère réducteur d'un échantillon de sédiment peut représenter un risque pour la faune aquatique lors d'épisodes de remise en suspension (e.g. crue et vidange de barrage) et constitue une des composantes de la toxicité d'un sédiment.

#### **7.2.4- Mise en place de l'essai**

Trente oeufs (fécondés depuis moins de 2h.30) et dix daphnies (âgées de moins de 24h.) sont introduits dans chaque récipient, alors disposé dans une enceinte thermostatée à  $26\pm 1^\circ\text{C}$  avec une photopériode de 14h. de lumière et 10h. d'obscurité.

Les jeunes daphnies sont habituellement élevées à  $20^\circ\text{C}$  mais se développent correctement à  $26^\circ\text{C}$ . La température d'incubation des embryons de danio zébré aurait pu être abaissée jusqu'à  $21^\circ\text{C}$  mais leur développement semble se dérouler dans de meilleures conditions à  $26^\circ\text{C}$  (cf. § B.3.3). La température des milieux durant les essais a donc été régulée à  $26\pm 1^\circ\text{C}$ .

Par ailleurs, des embryons de danio zébré témoins ont été maintenus dans 100ml d'eau sans sédiment, accompagnés de daphnies nourries quotidiennement avec des chlorelles (*Chlorella vulgaris*) de manière à obtenir une concentration de  $10^5$  cellules / ml.

#### **7.2.5- Suivi de l'essai**

Les organismes morts ainsi que les oeufs "blancs" sont comptés quotidiennement et éliminés. Au terme de 72h. d'exposition, les daphnies survivantes sont récupérées et mesurées individuellement (du sommet de la tête à la base de l'épine caudale) grâce à un système optique d'agrandissement constitué par un lecteur de microfiches modifié.

Le 7ème jour de l'essai, les larves normales et anormales ainsi que celles présentant un comportement atypique sont comptabilisées.

Dans nos conditions d'essai statique, les larves ne sont pas nourries pour ne pas entraîner de mortalité causée par l'élévation du taux d'ammoniac et de nitrites et/ou la diminution d'oxygène dissous; évolution chimique liée à la dégradation de l'excès de nourriture. Les daphnies ne reçoivent pas d'algues ce qui les conduit à absorber des particules à la surface du sédiment ou en suspension.

Le développement des embryons de danio zébré se déroule normalement au contact de sédiments propres à condition que les particules ne soient pas remises en suspension. Un dépôt de fines particules sur les oeufs va entraîner leur asphyxie, vraisemblablement par une modification du transfert de gaz au travers du chorion. Par ailleurs, nous avons étudié la tolérance des embryons et surtout des larves à des échantillons de différentes granulométries et il s'est avéré que le sédiment à tester doit avoir une granulométrie minimum de  $10\mu\text{m}$  ce qui

exclut les limons très fins et les argiles. En effet, durant 48h. après l'éclosion, les larves restent souvent posées sur le fond et se limitent à de petits déplacements rapides. Au contact de particules d'argile ou de limon très fin, elles succombent rapidement probablement en raison de la toxicité mécanique de ces particules.

### **7.2.6- Mesures physico-chimiques**

Les conditions statiques de l'essai impliquent de mesurer régulièrement le pH, le taux d'ammoniac, de nitrites et la concentration en oxygène dissous des milieux surnageants.

Une analyse des micropolluants, du taux de matière organique de la phase solide et de sa granulométrie peut contribuer à l'explication de différences d'effets toxiques entre plusieurs échantillons (Pardos et al., 1991).

### **7.2.7- Expression des résultats**

Les critères de toxicité relevés sont l'éclosion, la survie des larves de danio zébré en sept jours ainsi que la survie et la taille des daphnies au bout de 72 heures d'exposition. Les résultats sont exprimés en concentration de sédiment sec par litre de milieu afin de pouvoir comparer les résultats obtenus sur des sédiments renfermant des quantités d'eau différentes. Pour obtenir le poids sec des échantillons, une aliquote de chaque sédiment est séchée à l'étuve (24h. à 105°C) puis entreposée dans un dessiccateur durant deux heures avant la pesée.

## **7.3- Validité de l'essai développé**

### **7.3.1- Introduction**

Dans la continuité de ce travail méthodologique, le souci de connaître la sensibilité et la capacité de discrimination de cet essai nous a conduit à élaborer un projet d'étude associant les laboratoires d'écotoxicologie de l'IFREMER de Brest et de l'Institut FOREL de Genève. Il a ainsi été procédé à l'analyse de quatre échantillons de sédiment d'un cours d'eau de la région Bretonne grâce à une batterie de bioessais (Naudin et al., 1995).

Le site d'étude correspond au vallon du Stang Alar localisé à l'Est de la commune de Brest (figures 34 et 35). Ce petit cours d'eau possède avec son affluent le Keravilin, un bassin versant de 650 hectares, composé d'une zone très urbanisée au Nord-ouest, une zone industrielle au Nord, une zone agricole à l'Est et une zone pavillonnaire au Sud-ouest.

Un bilan initial de la qualité des eaux du Stang Alar a été effectué en 1993, à la fois au niveau physico-chimique et bactériologique; complété par un diagnostic des communautés d'invertébrés *in situ*. D'après cette étude, une importante perturbation d'origine chimique et bactériologique s'exerce sur le Stang Alar du fait de problèmes d'assainissement (eaux domestiques et pluviales) et à cause de ruissellements liés aux pratiques agricoles, aux activités industrielles et à la circulation automobile (Bernier, 1993; Patris et al., 1995). A

l'échelle régionale, le cas de ce ruisseau s'ajoute aux apports contaminés d'autres cours d'eau qui contribuent à altérer l'écosystème marin de la rade de Brest.

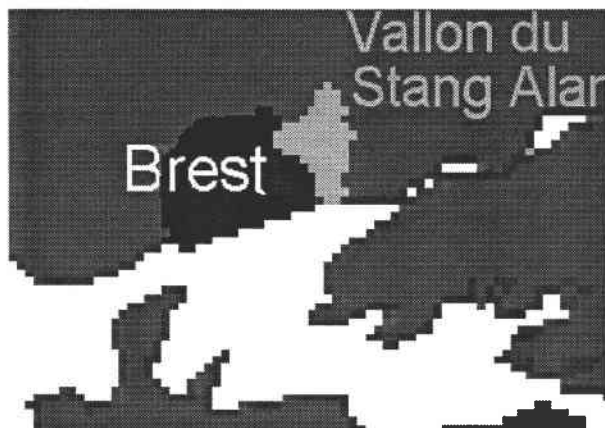


Figure 34: Localisation de la zone d'étude

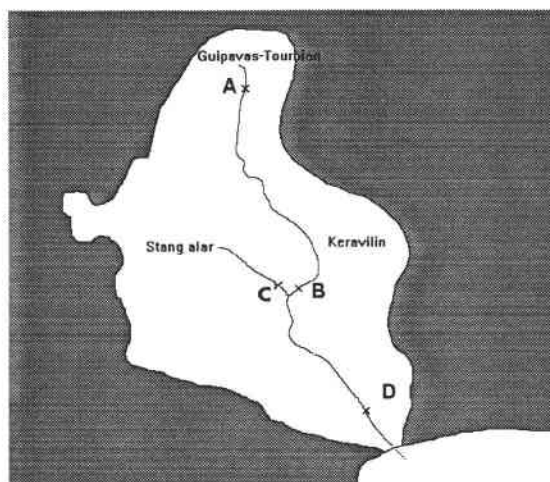


Figure 35: Emplacement des sites prélevés

### 7.3.2- Méthodes

Nous avons effectué une analyse chimique et biologique des sédiments prélevés en quatre sites (A, B, C et D) sur le ruisseau du Stang Alar et son affluent, le Keravilin. L'organisation de cette étude est illustré par la figure 36.

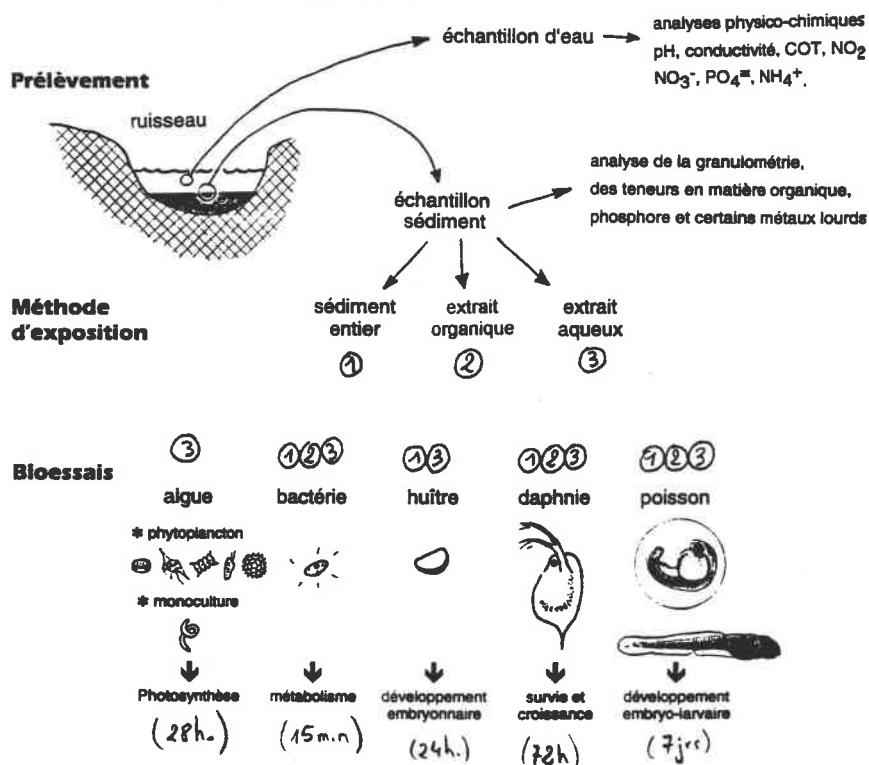


Figure 36: Méthodologie employée lors de l'évaluation de la toxicité de différents échantillons de sédiment par une batterie de bioessais.

Le choix des espèces bioindicatrices que nous avons utilisées a été guidé par les considérations suivantes (Pardos et al., 1994):

- la nécessité d'utiliser des organismes de niveaux d'organisation différents, pour favoriser la mise en évidence de composés toxiques ayant des mécanismes d'action spécifiques (inhibition de la photosynthèse par exemple),
- le souhait de prendre en compte plusieurs voies d'exposition des organismes aux substances toxiques potentielles: contact avec le sédiment, ingestion du sédiment, exposition à l'eau (eau surnageante ou extrait aqueux),
- la nécessité de mettre en évidence un impact écotoxicologique aigu (comme le test bactérien) et subchronique (l'essai sur l'éclosion et la survie d'un poisson par exemple),
- la nécessité de travailler avec des tests standardisés pour permettre une comparaison avec les données de la littérature.

Les tests en eau douce ont porté sur l'activité photosynthétique d'une culture d'algue *Selenastrum capricornutum* et d'une communauté de phytoplancton du lac Léman, la survie du cladocère *Daphnia magna*, le développement embryo-larvaire du danio zébré. En eau de mer, l'activité bioluminescente de la bactérie *Photobacterium phosphoreum* (test Microtox) a été suivie, ainsi que le développement embryonnaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas*.

Trois méthodes d'exposition ont été adoptées: le contact direct des organismes avec le sédiment (sauf pour les essais sur algues) et leur exposition à un extrait aqueux, afin de préciser le potentiel toxique en relation avec le relargage de contaminants dans le cas d'une remise en suspension des sédiments (lors d'une crue par exemple). Enfin, une exposition de trois organismes d'essai (bactérie, daphnie, poisson) aux extraits organiques des échantillons a été réalisée de manière à évaluer leur contamination par des micropolluants organiques. Bien que sa signification écologique soit discutable, cette méthode d'exposition contribue avec les autres méthodes à une compréhension de la nature des contaminants présents dans les échantillons (Pardos et al., 1994).

Toutes les méthodes utilisées sont décrites par Naudin et al. (1995) et ne seront pas exposées car elles sont consultables en annexe 3 mais nous indiquerons les protocoles de préparation des extraits ainsi que certains détails techniques indispensables à l'interprétation des résultats. Les extraits aqueux sont préparés à partir d'eau minérale "Volvic" qui possède des caractéristiques minérales compatibles avec les exigences de nos organismes d'essai d'eau douce. La méthode d'extraction consiste à mélanger une part volumétrique de sédiment humide avec quatre parts d'eau de Volvic. Le mélange est agité pendant une heure puis laissé à décanter pendant 2h. Le surnageant est alors centrifugé à 2000g pendant 20 minutes. Le nouveau surnageant obtenu est filtré à 0,45µm et employé tout de suite ou conservé à environ 4°C quelques heures jusqu'à la mise en oeuvre des bioessais (EPA/Corp. of Engineers, 1977). Cet extrait est alors dilué en proportions variables avec les milieux utilisés pour chaque essai.

Concernant la réalisation des extraits organiques, nous avons utilisé le protocole décrit par Pardos et al. (1994) qui consiste à agiter 20g. de sédiment humide pendant 6 heures en présence de 200ml de dichlorométhane et 100g de sulfate de sodium permettant de piéger l'eau des échantillons. Ce mélange est ensuite filtré puis évaporé sous vide à 40°C. Le résidu est alors repris dans 18ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) et sera conservé à température ambiante jusqu'à la mise en oeuvre des bioessais.

L'utilisation des extraits organiques a nécessité la détermination de la toxicité propre de ce solvant au cours d'un essai préliminaire. Les CSEO correspondantes à la survie des daphnies (72h.) et au développement embryo-larvaire du danio zébré sur sept jours sont respectivement de 10 et 3ml/l; la concentration maximale d'extrait testée a donc été de 3ml/l. Pour le test Microtox, la CSEO est de 10ml/l de DMSO et représente la concentration maximale d'extrait testé.

De manière à limiter le biais représenté par des concentrations en DMSO différentes dans les dilutions finales (extrait + eau de dilution) soumises aux organismes d'essai, les extraits ont tout d'abord été dilués dans du DMSO pur en proportions différentes. Un même volume de ces solutions "filles" a été rajouté aux milieux d'essais. Les solutions finales contiennent donc un même volume de DMSO mais des proportions d'extrait différentes.

Les essais sur la survie et la croissance de la daphnie (*Daphnia magna*) et sur le développement embryo-larvaire du danio zébré sont réalisés selon le protocole détaillé dans le chapitre B.6.2. Lors des essais sur les extraits aqueux ou organiques, les organismes sont exposés à plusieurs dilutions de ces extraits. A la différence des essais sur sédiment entier, nous avons choisi de nourrir quotidiennement les daphnies par un apport de chlorelles (*Chlorella vulgaris*) de manière à obtenir une densité de  $10^5$  cellules / ml.

Il est nécessaire d'ajouter quelques précisions sur le critère de toxicité exploité lors de l'essai sur le développement embryonnaire de l'huître creuse. La toxicité de sédiments ou de leur extrait aqueux est évaluée par ce test en déterminant le pourcentage de larves "D" anormales obtenues après une incubation d'oeufs fécondés dans les milieux à tester durant 24 heures. Une larve est normale lorsque sa coquille a la forme régulière d'un "D" et qu'elle peut contenir l'animal entier lors de la fermeture des valves. Les résultats sont exprimés en Pourcentage Net d'Anomalies (PNA).

$$\text{PNA} = \frac{\% \text{ larves anormales dans essai} - \% \text{ larves anormales dans témoin}}{100 - \% \text{ larves anormales dans témoin}} \times 100$$

Rappelons que de manière à pouvoir comparer tous les résultats, ceux-ci ont été exprimés en gramme de sédiment sec par litre. Pour les essais sur extraits, ces résultats tiennent compte de la quantité de sédiment extraite et du pourcentage d'extrait ajouté.

A titre indicatif, le tableau suivant présente les gammes de concentration qui ont été théoriquement testées (en triplicats) pour chaque bioessai lors des différentes méthodes d'exposition. Etant donné que la teneur en eau est différente d'un échantillon à l'autre, les concentrations effectivement testées peuvent être sensiblement différentes que les valeurs fournies dans ce tableau.

Tableau 81: Gamme indicative des concentrations de sédiment testées au cours des différents bioessais et selon les méthodes d'exposition

<b>exposition</b>	<b>essai</b>	<b>gamme testée<sup>#</sup></b>	<b>n</b>
sédiment entier	bactérie	0,05 - 50	4
	huître	0,1 - 10	4
	daphnie	5 - 50	4
	poisson	5 - 50	4
extrait aqueux	bactérie	5 - 50	4
	huître	0,1 - 10	5
	daphnie	25 - 75	3
	poisson	25 - 75	3
	monoculture algale	10 - 100	4
	phytoplancton	5 - 35	4
extrait organique	bactérie	0,01 - 1,5	4
	daphnie	0,015 - 1,5	5
	poisson	0,015 - 1,5	5

<sup>#</sup> exprimées en gramme de sédiment sec par litre

n: nombre de concentrations testées

### 7.3.3- Résultats et discussion

#### 7.3.3.1- Analyse physico-chimiques

##### □ analyse de l'eau superficielle

L'analyse des eaux de surface (tableau 82) indique une qualité relativement bonne. On observe néanmoins des teneurs importantes en nitrate et en carbone organique total (COT). Celle-ci peut avoir pour origine la présence d'algues à l'époque du prélèvement (mi-juin) ou bien une teneur élevée en acides humiques. Le prélèvement d'eau a été effectué après une période relativement sèche ce qui peut expliquer la quasi uniformité des valeurs mesurées sur les différents sites.



Tableau 82: Analyses physico-chimiques des eaux de surface prélevées sur les différents sites

paramètre	site			
	A	B	C	D
pH	7,7	6,4	6,4	7,3
conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	250	306	301	314
COT (mg/l)	6,80	5,65	5,25	5,95
$\text{PO}_4^{\equiv}$ (mg/l)	0,06	0,06	0,06	0,06
$\text{NO}_2^-$ (mg/l)	0,03	0,07	0,07	0,30
$\text{NO}_3^-$ (mg/l)	31,5	36,0	29,0	45,0
$\text{NH}_4^+$ (mg/l)	0,02	0,03	< 0,02	0,02
$\text{NH}_3$ (mg/l)	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01

### □ analyse du sédiment

La distribution granulométrique des différents sédiments est relativement proche (tableau 83).

Les particules les plus fines sont trouvées en D et les plus grossières en B.

Les teneurs en matière organique sont homogènes entre les sédiments avec un maximum de 11,4% pour le site C.

Il sera donc possible de comparer directement les toxicités et les contaminations mesurées sur les différentes stations échantillonnées, sans tenir compte de l'influence de la granulométrie et de la teneur en matière organique.

Tableau 83: Granulométrie et teneurs en matière organique des sédiments

mesure	site			
	A	B	C	D
moyenne ( $\mu\text{m}$ )	42,1	45,3	39,1	31,7
int. conf. 95% ( $\mu\text{m}$ ) #	32,4 - 54,7	34,4 - 59,6	29,9 - 51,2	24,4 - 41,3
médiane ( $\mu\text{m}$ )	47,2	51,8	42,8	34,9
matière organique %	9,0	9,8	11,4	9,2

# intervalle de confiance 95%

Les résultats du tableau 84 indiquent que les sédiments les plus contaminés en métaux (C et D) sont également les plus riches en phosphore. La fraction biodisponible de ce nutriment

(PINA) va de 41,4 à 43,7% du phosphore total pour les sites A, B et C et est de 57,3% pour le site D.

Tableau 84: Teneurs en métaux lourds et phosphore des sédiments étudiés (exprimées en mg/kg par rapport au poids sec)

élément	site				Valeur réf.
	A	B	C	D	
Cu	24	32	<b>180</b>	70	20
Pb	47	79	<b>395</b>	<b>138</b>	20
Zn	212	260	<b>1294</b>	<b>497</b>	75
Ni	30	27	43	30	10
Cr	38	39	57	38	25
P tot. #	556	848	1791	1248	-
PINA ##	230	367	783	715	-

Valeur réf.: valeurs de référence pour les sédiments d'après l'Office International de l'Eau (1993)

# phosphore total

## phosphore inorganique non apatitique

D'après les valeurs de référence en métaux des sédiments (Office International de l'Eau, 1993), les sédiments montrant un facteur de contamination (valeur mesurée / valeur référence) supérieur à 6 sont:

- le site C pour le Pb (19,8), le Zn (17,3) et le Cu (9),
- le site D pour le Pb (6,9) et le Zn (6,6).

Ces niveaux de contamination élevés, particulièrement pour le plomb, le zinc et le cuivre, sont à mettre en rapport avec les concentrations métalliques de la colonne d'eau lors d'épisodes pluvieux. Par exemple, Patris et al. (1995) ont mesuré des concentrations en zinc de 3200µg/l, en plomb de 141µg/l et en cuivre de 134µg/l lors d'un événement pluvieux le 6/12/94.

Ces analyses permettent de classer les sédiments selon un ordre de contamination croissant de la façon suivante:  $A \approx B < D < C$

### 7.3.3.2- Résultats des bioessais

L'amplitude des réponses mesurées au terme des différents essais a été inférieure à 50% dans la plupart des cas. Ce critère (50% d'effet) n'a donc pas pu être retenu. Les résultats des essais sur daphnie et poisson ont été exprimés sous forme de CMEO (Concentration Minimale avec Effet Observé) soit la plus faible concentration en sédiment qui provoque un effet inhibiteur significatif par rapport au témoin (déterminé statistiquement).

Pour les autres essais et en considérant la variabilité naturelle des réponses mesurées, une toxicité potentielle a été attribuée pour les niveaux d'effet suivants:

- bactérie (Microtox): si inhibition de la bioluminescence  $\geq 15\%$
- monoculture algale et phytoplancton: si inhibition de la photosynthèse  $\geq 10\%$
- huître: si pourcentage net d'anomalies (PNA)  $\geq 10\%$

Tableau 85: Résultats de toxicité des différents échantillons d'après les réponses des organismes d'essai selon les méthodes d'exposition (résultats exprimés en g. de sédiment sec / litre)

exposition	essai	site			
		A	B	C	D
sédiment entier	bactérie	48,7	5,1	1,2	0,6
	huître	1,6	1,4	1,2	0,1
	daphnie	> 55,6	> 44,2	> 60,7	> 54,8
	poisson	> 55,6	> 44,2	15,17	> 54,8
extrait aqueux	bactérie	34,7	32,3	27,6	27,8
	huître	> 11,6	> 10,8	2,3	> 9,3
	daphnie	> 83,1	nd	> 73,6	> 68,4
	poisson	> 83,1	nd	> 73,6	> 68,4
	monoculture algale	> 89,5	> 76,4	60,7	> 44,4
	phytoplancton	> 42,6	> 36,4	28,9	31,7

nd: non déterminé

Ces informations montrent que lorsque les organismes sont en contact direct avec les sédiments, les effets qu'ils subissent apparaissent plus importants que lorsqu'ils sont exposés aux extraits aqueux des échantillons. Pour le test Microtox, ces résultats sont confirmés par Brouwer et al. (1990) qui préconise la méthode d'exposition directe au sédiment entier; les composés hydrophobes n'étant solubilisés que dans une faible proportion lors de l'extraction aqueuse. L'extraction aqueuse permet néanmoins d'évaluer la charge des sédiments en substances toxiques susceptibles d'être solubilisées lors d'une remise en suspension des particules.

Les niveaux de réponse sont très différents d'un essai à l'autre avec parfois des réponses pour un ou deux sites seulement et à des concentrations en sédiment importantes (essais sur les poissons en contact direct ou sur les algues exposées aux extraits aqueux). Aucun effet n'est mis en évidence pour les daphnies (dans la gamme de concentration testée) quel que soit le type d'exposition employé.

Par contre, les bactéries et les huîtres ont été perturbées à de faibles teneurs en contact direct des sédiments.

La sensibilité des bioessais est une qualité nécessaire mais pas suffisante pour l'évaluation du degré de nocivité des échantillons. L'aptitude à différencier des niveaux de toxicité relativement proches est aussi indispensable pour toute analyse. Sur sédiment entier, les huîtres apportent les réponses les plus sensibles mais avec une moins bonne discrimination que les bactéries du système Microtox. Sur extrait aqueux, les bioessais paraissent, dans l'ensemble, moins discriminants.

La faible discrimination entre les sites, obtenue par la mesure de l'activité photosynthétique des algues, peut correspondre à la présence de teneurs importantes de phosphore biodisponible, particulièrement pour les sites C et D. Ce nutriment a pu agir sur les algues de façon antagoniste aux éléments toxiques présents. Par ailleurs, l'essai embryo-larvaire sur le danio zébré a révélé la toxicité du site C lors de l'exposition au sédiment entier mais ne permet pas de discriminer les sites A, B et D.

L'analyse globale des résultats regroupés dans le tableau 85 fait ressortir deux groupes de sites: C et D présentant une toxicité supérieure à A et B.

Il est intéressant de constater que cet ordre est quasiment le même que celui obtenu sur la base du degré de contamination de ces échantillons par certains métaux lourds et le phosphore. Les dosages de micropolluants organiques sur ces échantillons font toutefois défaut et il n'est donc pas possible de proposer une interprétation sûre des causes de toxicité.

Une autre méthode d'évaluation a apporté des résultats que l'on peut confronter à ceux de nos bioessais: il s'agit de l'analyse *in situ* des peuplements d'invertébrés effectuée en 1993 sur les sites B, C et D (Bernier, 1993). Cette étude classait les sites par ordre de perturbation croissante:  $B < C \leq D$  ce qui rejoint notre constat.

#### ▣ **résultats apportés par les essais sur les extraits organiques**

L'intérêt de l'utilisation d'extraits organiques de sédiments a été évalué à l'aide du test Microtox et des bioessais sur la daphnie et sur les stades embryo-larvaires du danio zébré.

L'utilisation de ces extraits n'est bien évidemment pas représentative des effets d'éventuels contaminants dans le milieu naturel mais permet de connaître la toxicité intrinsèque des composés organiques contenus dans ces échantillons. L'interprétation des résultats nécessite cependant certaines précautions du fait de la présence d'un solvant dans les milieux d'essai. Selon Burton (1991), cette méthode peut apporter des compléments d'informations intéressants dans une démarche de comparaison de la contamination organique d'une série d'échantillons. Pour ces raisons, nous avons choisi d'analyser séparément les informations fournies par ce type d'exposition pour éviter de faire des rapprochements entre les niveaux de toxicité obtenus par les trois méthodes d'exposition.

Tableau 86: Réponses de trois bioessais après exposition aux extraits organiques des sédiments (niveau de toxicité exprimés en g. de sédiment sec / litre)

	site			
essai	A	B	C	D
bactérie	1,0	1,3	0,09	0,05
daphnie	1,5	> 1,2	1,7	1,5
poisson	> 1,5	> 1,2	> 1,7	> 1,5

NB: les résultats des essais sur daphnie et poisson ont été exprimés sous forme de CMEQ; pour le test Microtox, une toxicité potentielle a été attribuée en cas d'inhibition de la bioluminescence supérieure ou égale à 15%.

Les réponses du test Microtox indiquent une séparation nette entre la toxicité des sites A, B et C, D d'autre part. Cette distinction entre la toxicité des sites correspond d'ailleurs à la synthèse des résultats de la batterie d'essai mis en oeuvre sur sédiment entier et extrait aqueux.

Il est également intéressant de noter que le rapport entre la toxicité des sites A et B déterminé par le test Microtox sur sédiment entier est proche de 10 alors qu'il est voisin de 1 sur les deux types d'extrait. Une famille de composés difficiles à solubiliser comme les métaux pourrait constituer une explication mais le rapport entre les concentrations en métaux lourds de ces deux sites est au maximum de 1,7 pour le plomb. Le dosage d'autres métaux lourds (e.g. Cd, Hg) aurait apporté d'autres éléments de réflexion.

Concernant les deux autres essais, des mortalités de daphnies ont ainsi été observées au plus fortes concentrations testées pour les sites A, C et D alors qu'aucune perturbation n'a été observée au niveau des embryons et larves de danio zébré. La concentration maximale testée pour le site B (1,2g/l) rend pourtant difficile toute comparaison avec les tendances relevées au niveau du tableau 85.

La réalisation des autres bioessais sur ces extraits et le dosage de composés organiques qui sont actuellement en cours devraient permettre d'évaluer la contamination des différents sites par des composés hydrophobes et d'identifier les substances toxiques dominantes, autres que les métaux.

La toxicité du tiers-solvant utilisé constitue une limite de cette méthode d'exposition pour les essais sur la daphnie et surtout sur le danio zébré car elle restreint la quantité d'extrait utilisable. Une réduction du volume de reprise des extraits n'est pourtant pas recommandée car elle conduit souvent à la formation d'un précipité.

### **7.3.4- Conclusion sur la toxicité des sédiments révélée par la batterie de bioessais**

En complément des analyses physico-chimiques des sédiments (teneur en matière organique, métaux lourds et phosphore), la batterie de bioessais mise en place a permis de mettre en évidence le degré de contamination et la toxicité des sédiments du Stang Alar, supérieur à

ceux de son affluent, le Keravilin. Cette contamination est due aux métaux lourds (surtout le zinc et le plomb), à des produits organiques vraisemblablement (Patris et al., 1995) et aux nutriments; le phosphore en particulier faisant peser un risque d'eutrophisation sur les deux ruisseaux. Même si par temps sec l'eau circulante peut être de qualité correcte (sauf au niveau bactériologique), les sédiments gardent la trace de fortes concentrations de contaminants qui sont véhiculés par temps de pluie. Cette situation n'est pas surprenante étant donné les types de milieux traversés par les deux cours d'eau et les problèmes d'assainissements qui touchent surtout le Stang Alar. Une amélioration du réseau d'assainissement, le traitement des exutoires et des eaux pluviales devraient permettre de diminuer le flux de micropolluants, de réduire la toxicité des sédiments du Stang Alar, et également de limiter les apports vers le milieu marin. Dans le cadre d'une étude pilote orientée sur l'analyse de l'efficacité de l'épuration des eaux pluviales, un suivi écotoxicologique serait un complément tout à fait approprié. Un diagnostic régulier des sites, à l'aide d'une batterie de bioessais réduite, permettrait de rendre compte de l'évolution de la toxicité des polluants biodisponibles présents dans les sédiments du Stang Alar. Cette batterie pourrait reposer sur le test Microtox sur sédiment entier et la mesure de la photosynthèse algale sur extrait aqueux. Ces mesures permettraient d'évaluer la charge toxique et eutrophisante contenue dans les sédiments.

### **7.3.5- Apport des bioessais sur le danio zébré et la daphnie**

Ces essais se sont révélés les moins sensibles de la batterie mise en oeuvre. Dans la gamme des concentrations testées, seul l'échantillon C à partir de 15,2g/l a perturbé la survie des larves de danio zébré. Un des sites les plus toxiques a donc été mis en évidence par cet essai. Pour l'échantillon concerné, les concentrations en oxygène dissous sont restées supérieures à 4mg/l durant tout l'essai. Ces niveaux ne peuvent donc pas expliquer les mortalités larvaires observées qui pourraient être attribuables à la forte contamination métallique mesurée sur cet échantillon. Nous ignorons cependant les concentrations de micropolluants organiques des échantillons étudiés.

Toujours à propos de l'essai embryo-larvaire sur le danio zébré, quelques larves malformées ont été observées sur plusieurs échantillons et à des taux proches de 4% pour l'échantillon C sans qu'il y ait de tendance significative. Ces malformations pourraient être l'expression toxique du zinc (en forte concentration pour le site C) car ce métal est connu pour entraîner des malformations sur le vairon tête-de-boule et l'amphibien (*Xenopus laevis*) exposés au stade embryonnaire (Dawson et al., 1988).

## **7.4- Conclusion sur l'intérêt des essais SEL sur sédiment**

L'exposition des stades embryo-larvaires du danio zébré à des sédiments contaminés n'a nécessité de précautions techniques que pour l'exposition au sédiment entier. La sensibilité de ce modèle s'est révélée faible par rapport à la plupart des autres organismes d'essai quelle que

soit la méthode d'exposition (sédiment entier ou extraits). Sur des critères de sensibilité et de discrimination, le test Microtox apporte les meilleurs résultats lorsque les bactéries sont exposées directement au sédiment ou à leur extrait organique. De plus, tous les autres tests donnent une information sur une durée réduite (15min. pour la bactérie, 24h. pour l'huître) comparé aux sept jours nécessaires à la réalisation de l'essai SEL.

Ainsi, malgré les informations sublétales complémentaires que cet essai peut apporter (en particulier sur la tératogénèse), il est difficile de recommander son intégration dans une batterie de bioessais sur sédiments. Des essais sur des sédiments avec des profils de contamination différents pourront peut être contredire cette idée. Une étude comparative avec le modèle du vairon tête-de-boule serait également intéressante à réaliser pour apprécier la sensibilité relative de ces deux cyprinidés.

## Conclusion générale

Un des volets de la protection du milieu aquatique consiste à contrôler l'impact des apports liés aux activités humaines. Ce contrôle peut s'effectuer directement dans le milieu (étude biocénotique) ou par analyse du degré de contamination et de la toxicité d'échantillons (eau, effluent, sédiment) ramenés au laboratoire; ces trois approches étant d'ailleurs complémentaires.

Les essais de toxicité permettent d'intégrer dans des conditions précises, contrôlées et reproductibles, de nombreux paramètres de l'environnement et constituent un moyen irremplaçable pour l'estimation de la biodisponibilité et de la toxicité de micropolluants présents dans un échantillon. La pertinence des résultats de ces bioessais dépend de l'échelle de temps durant laquelle les réponses des organismes d'essai sont observées et du (ou des) niveaux trophiques auxquels ils appartiennent.

Parmi les essais existant sur les poissons, des tests sublétaux ont été développés pour estimer la toxicité chronique d'une substance en exposant une espèce durant une des phases les plus sensibles de son cycle de vie: le développement embryo-larvaire (McKim, 1977; Stephan, 1989). La capacité des poissons à se reproduire est également une étape critique et pertinente en terme de dynamique des populations (Bresh, 1982; Dalverny, 1993) mais ce type d'essai, plus long à réaliser, est mal adapté à l'analyse d'échantillons d'effluent par exemple.

Pour l'analyse de substances pures, des protocoles normalisés (OCDE, 1992) ou standards (Environnement Canada, 1992a) existent pour les essais sur stades embryo-larvaires (SEL) et la norme ISO (1988) porte spécifiquement sur le danio zébré (*Brachydanio rerio*), espèce appartenant à la famille des cyprinidés.

La sensibilité toxicologique de cette espèce d'eau douce ainsi que sa facilité d'élevage fait qu'elle est utilisée dans plusieurs pays (Suède, Norvège, Pays-Bas, Finlande) pour la réalisation d'essais SEL.

Ce travail a porté sur l'évaluation des capacités de ce modèle à mesurer la toxicité d'échantillons complexes (effluents et sédiments).

Aux Etats-Unis et au Canada, des protocoles d'essai SEL existent déjà pour de tels échantillons en mettant à profit la sensibilité d'un autre cyprinidé: le vairon tête-de-boule (Dawson et al., 1988, EPA, 1989c; Environnement Canada, 1992a).

Nous avons pris en compte les recommandations de ces protocoles pour la réalisation de nos essais mais trois développements méthodologiques nous ont paru essentiels avant leur mise en oeuvre.



Concernant notre **protocole d'essai**, l'obtention d'oeufs en quantité et en qualité suffisante pour la réalisation régulière d'essais embryo-larvaires requiert des géniteurs âgés de 4 à 15 mois. Par ailleurs, la croissance des larves est plus homogène d'un essai à l'autre lorsque la nourriture sèche est distribuée de façon précise, complétée par un apport de nourriture vivante (paramécies) dès le début du nourrissage des larves.

La détermination des **domaines de tolérance** des stades embryo-larvaires du danio zébré à différents paramètres physico-chimiques de l'eau s'est également révélée indispensable pour la réalisation d'essais sur des échantillons d'effluent et de sédiment en sachant évaluer la contribution de ces paramètres aux effets (sub)létaux observés. Au cours des essais SEL, des niveaux ou des évolutions de pH, d'oxygène dissous ou d'ammoniac en dehors des limites résumées dans le tableau suivant sont susceptibles d'interférer avec les effets de micropolluants ce qui peut conduire à une mauvaise interprétation des résultats (EPA, 1989c).

paramètre du milieu	domaine de tolérance
pH	[ 6,4 - 9,4 ]
ammoniac (NH <sub>3</sub> )	[ 0 - 1,5 mg/l ]
oxygène dissous	≥ 3 mg/l

De plus, nous avons évalué les avantages de **l'analyse d'images** pour le suivi de notre essai. Après une vérification des performances de notre matériel (distorsion, précision), cette technique s'est avérée intéressante pour le comptage des larves au cours de l'essai. La mesure de la taille des larves au terme des essais est une mesure indirecte pertinente de la biomasse des organismes d'essai. Cette mensuration nécessite cependant un dispositif d'observation particulier et l'intégration d'un algorithme au traitement des images lorsque les axes principaux des objets ne sont pas calculés directement par le logiciel. En terme de précision et de rapidité, les avantages de l'analyse d'images sont discutables pour la mensuration des tailles comparés à l'utilisation d'un agrandisseur optique (lecteur de microfiches modifié). L'intérêt de la vision informatisée réside plutôt dans la possibilité de répéter les prises d'images au cours de l'essai (mesure non stressante et surtout non destructive) et de conserver les images des larves pour la recherche de critères de toxicité de façon rétroactive. L'apport le plus manifeste de l'analyse d'images réside dans les capacités morphométriques de cette technique qui a rendu possible la détection de larves malformées ou stressées (couchées sur le flanc) à la fin des essais.

Ces mises au point effectuées, l'essai embryo-larvaire a été mis en oeuvre pour l'estimation de la **toxicité de plusieurs échantillons d'effluents industriels et urbains**. Des essais préliminaires ont conduit à adopter la congélation pour la conservation des caractéristiques toxiques de nos échantillons. Nous avons également décidé d'utiliser les surnageants des effluents urbains (après une heure de décantation) car les matières en suspension qu'ils peuvent contenir entraînent une asphyxie rapide des embryons. La toxicité de ces matières est donc à considérer séparément des effets des micropolluants en solution dans les échantillons.

Malgré les pH acides ou basiques, la faible teneur en oxygène dissous des effluents industriels étudiés, ces paramètres n'ont pas perturbé le développement des embryons et des larves en raison de l'effet tampon qu'a exercé l'eau de dilution même à la plus forte concentration en effluent testée.

Par contre, lors des essais sur les effluents urbains, nous avons constaté des concentrations en ammoniac proches des seuils de tolérance et la contribution de ce composé aux mortalités constatées a pu être confirmée.

Au terme des essais embryo-larvaires appliqués aux différents échantillons d'effluent, le critère de survie larvaire s'est révélé être de sensibilité supérieure ou égale aux critères d'éclosion et de croissance. La survie embryonnaire (après 24h. d'incubation) s'est montrée, au contraire, la moins affectée par les échantillons testés. Concernant le critère de croissance, la comparaison des niveaux de toxicité obtenus au terme des essais SEL sur les effluents par simple observation des mortalités n'encourage pas à poursuivre cette mesure, fastidieuse à obtenir. Le choix de la durée de nos essais (10 jours) effectué pour des raisons techniques (conservation des échantillons) et pratiques (effort de réalisation) ne favorise pas la mise en évidence d'effets sublétaux sur la croissance des larves comme le suggèrent Mayes et al. (1988).

Par ailleurs, les fortes teneurs en détergent anionique (LAS) et la présence de molécules plastifiantes à potentialité tératogène (phtalates) dans les échantillons issus d'une station d'épuration, nous ont conduit à réaliser des essais complémentaires. Le renouvellement quotidien des milieux employé lors de ces essais n'a cependant pas été adapté pour l'obtention de "concentrations sans effet observé" étant donné la dégradation rapide de ces molécules une fois en solution dans l'eau. La susceptibilité de la phase embryonnaire de nos organismes à l'effet tératogène d'un phtalate a cependant été mise en évidence d'un point de vue macroscopique et histologique. Bien que la sensibilité des premiers stades de vie du danio zébré soit modérée en comparaison à d'autres espèces (Van Leeuwen, 1990), l'occurrence réduite de faux positifs autorise une mise en rapport des larves malformées avec la présence de substances tératogènes.

Le développement d'un protocole d'essai destiné à **l'analyse de la contamination de sédiments** s'est inspiré d'une méthode existant sur le vairon tête-de-boule (Dawson et al., 1988) et des recommandations du "Workshop on sediment toxicity assessment" en 1993.

Nous avons constaté une sensibilité modérée de notre modèle lors de la participation à une batterie de bioessais (algue, bactérie, microcrustacé, bivalve) appliquée aux sédiments d'un cours d'eau montrant un gradient de contamination. Parmi les méthodes d'exposition utilisées (sédiment entier, extrait aqueux et organique), seule l'exposition directe des stades embryolairaux aux sédiments a permis de révéler un des sites les plus contaminés. La durée de cet essai (7 jours) ajoutée à sa faible sensibilité pour ce type d'échantillon ne font donc pas de l'essai SEL sur le danio zébré un bon candidat pour la mesure de la charge toxique de sédiments si ce n'est pour rechercher des effets tératogènes.

Pour les essais appliqués aux effluents urbains, nous avons pu comparer nos réponses avec celles d'un test chronique portant sur la reproduction de la cériodaphnie. De même, pour un des effluents industriels étudiés, l'essai SEL a fait partie d'une batterie de bioessais (algue, bactérie, microcrustacé).

Pour ces échantillons, nous avons constaté une sensibilité plus élevée de l'algue et du microcrustacé (cériodaphnie), toutes les CMEO (Concentration Minimum avec Effet Observé) étant cependant du même ordre de grandeur.

Concernant les effluents urbains, nous avons constaté des écarts plus importants entre les CMEO (rapport de 2 à 30) avec pourtant un cas forte mortalité des larves de danio zébré à une concentration qui n'affecte pas la reproduction de la cériodaphnie. Nous attribuons cette situation à une sensibilité plus importante des larves à l'ammoniac présent dans les échantillons.

**En définitive**, l'essai embryolair sur le danio zébré paraît adapté pour la réalisation d'essais sur des effluents industriels et urbains. Comparée à des essais de toxicité chronique (croissance algale, reproduction cériodaphnie) nécessitant un "effort de réalisation" semblable, la sensibilité de notre modèle apparaît plus faible bien que les seuils de toxicité soient généralement du même ordre de grandeur. Son intégration dans une batterie de bioessais se justifie par la constance de réussite de cet essai (validité des lots témoins) et sa sensibilité spécifique à des composés comme l'ammoniac. De plus, il permet de prendre en compte l'effet d'un échantillon sur le modèle d'un poisson (de la famille des cyprinidés) représentant un niveau trophique élevé dans la biocénose du milieu aquatique. L'intérêt de l'exposition des stades embryolairaux se justifie également par la multiplicité des cibles moléculaires ou fonctionnelles qui peuvent être atteintes de façon immédiate ou différée lors des transitions de l'état de cellules embryonnaires à celui d'un organisme différencié (Lefebvre, 1990).

**Les prolongements** qui paraissent importants à apporter à ce travail concerne essentiellement une connaissance plus étendue des domaines de tolérance de notre modèle toxicologique.

Tout d'abord, la réalisation d'essais SEL appliqués aux effluents bénéficierait d'un affinage des concentrations en ammoniac et en oxygène dissous tolérées ainsi que de l'étude de leur effet synergique. La tolérance de nos organismes à la matière en suspension (de nature minérale et organique) est un domaine d'investigation qui permettrait de préciser les limites de réalisation des essais SEL. Ceci s'ajouterait à notre stratégie de réalisation des essais qui vise à identifier et séparer les causes de toxicité.

Dans l'optique de la compréhension de l'impact de substances en mélange contenues dans les effluents urbains, il serait intéressant d'étudier les effets synergiques de micropolluants comme le détergent anionique (LAS) et la substance plastifiante (DBP) que nous avons étudié. La sensibilité embryonnaire à l'effet tératogène du DBP pourrait être accrue en présence de LAS par une modification de la perméabilité chorionique (Helenius et Simons, 1975).

Au niveau de l'analyse d'images, une suite à donner aux travaux réalisés dans le domaine de la détection de larves malformées consisterait à compléter les mesures morphométriques par des mesures d'angles de déformation. L'utilisation d'une caméra à réseau de points image carré permettrait de prendre en compte cette information pour une caractérisation plus complète des malformations observées. La pertinence des paramètres de détection des larves anormales devrait également être vérifiée sur un échantillon important regroupant des larves normales et des larves présentant des malformations diverses.

La mesure des "conditions énergétiques" des larves en terme de vitesse de nage ou de résistance au dévalement serait également à envisager par analyse de séquences d'images. Cette information apporterait un complément intéressant aux critères de toxicité actuellement exploités lors des essais embryo-larvaires.

## Références bibliographiques

- ABEDI Z.H., TURTON D.E., 1968, Note on the response of zebrafish larvae folpet and difolatan, J. Ass. Off. Anal. Chem., 51, 1108-1109.
- ABEL P.D., 1974, Toxicity of synthetic detergent to fish and aquatic invertebrates, J. Fish Biol., 6, 279-298.
- ANKLEY G.T., COOK P.M., CARLSON A.R., CALL D.J., SWENSON J.A., CORCORAN H.F., HOKE R.A., 1992, Bioaccumulation of PCBs from sediments by oligochaetes and fishes: comparison of laboratory and field studies, Can. J. Fish Aquat. Sci., 49, 2080-2085.
- ANSARI B.A., KUMAR K., 1982, A record of zebra danio (*Brachydanio rerio*) (cyprinidae) from Uttar Pradesh with notes on sexual dimorphism, Adv. Zool., 3, 88-89.
- ANSARI B.A., KUMAR K., 1984, Malathion toxicity: *in vivo* inhibition of acetylcholinesterase in the fish *Brachydanio rerio* (Cyprinidae), Toxicology Letters, 20, 283-287.
- ARNARSON H., BENGOTXEA K., PAU L.F., 1988, Vision applications in the fishing and fish product industries, Int. J. Pattern Recog. Artif. Intel., 2, 657-671.
- ARTHUR J.W., WEST C.W., ALLEN K.N., HEDTKE S.F., 1987, Seasonal toxicity of ammonia to five fish and nine invertebrate species, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38, 324-331.
- AUPINEL P., FOLMER J.-C., INGRAND N., MINIER F., 1994, Dénombrement automatique de virus Mamestra-Bassicae par analyse d'images *in colloque* "l'application de l'analyse d'images dans l'agro-industrie", p.13-16, Montpellier, 28 Sept. 1994, Cemagref (éds.), Gap-Diffusion, 1995.
- BALK F., 1988, Short term fish early life stage test on zebrafish, Rapport du Water Quality Institute, Draft protocole, 29p.
- BALON E.K., 1975, Terminology of intervals in fish development, J. Fish. Res. Bd. Can., 32, 1663-1670.
- BALON E.K., 1985, The theory of saltatory ontogeny and life history models revisited, in Early life histories of fishes, p. 18, E. K. BALON (éd.), Dr w. Junk, Dordrecht.
- BANTLE J.A., FORT D.J., JAMES B.L., 1989, Identification of developmental toxicants using the Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX), Hydrobiologia, 188/189: 577-585.
- BATTLE H.I., HISAOKA K.K., 1952, Effects of ethyl carbamate (urethan) on the early development of the teleost *Brachydanio rerio*, Cancer Res., 12, 334-340.
- BENDER M.E., 1969, The toxicity of the hydrolysis and breakdown products of malathion to the fathead minnow (*Pimephales promelas* R.), Water Res., 3, 571-582.
- BENGTSSON A., 1991, Effects of bleached pulp mill effluents on vertebral defects in fourhorn sculpin (*Myoxocephalus quadricornis* L.) in the gulf of Bothnia, Arch. Hydrobiol., 121, 373-384.
- BENGTSSON B.-E., RENBERG L., 1986, The use of chemical and biological parameters to characterize complex industrial effluents, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 6, 238-247.
- BENOIT D.A., 1976, Toxic effects of hexavalent chromium on brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Water Res., 10, 497-500.
- BENOIT D.A., HOLCOMBE G.W., 1978, Toxic effects of zinc on fathead in soft water, J. Fish. Biol., 13, 701-708.
- BENOIT D.A., MATTSON V.R., OLSON D.L., 1982, A continuous-flow mini-diluter system for toxicity testing, Water Res., 16, 457-464.

- BERCKMANS D., AERTS J.-M., BLOEMEN H., Van HOOFF F., SLUYTS H., 1994, Daphnia-monitor for continuous detection of water quality based on image analysis *in* colloque "Le recours biologique pour la surveillance en continu de la qualité des eaux", p.113-121, Nancy, 13-14 Oct. 1994, Actes du colloque organisé par le Centre International de l'Eau.
- BERNARDINI G., VISMARA C., BORACCHI P., CAMATINI M., 1994, Lethality, teratogenicity and growth inhibition of heptanol in *Xenopus* assayed by a modified Frog Embryo Teratogenesis Assay-*Xenopus* (FETAX) procedure, Sc. Tot. Environ., **151**, 1-8.
- BERNIER J.O., 1993, Etude de la qualité des eaux du Stangalard, Rapport de l'Institut Universitaire de Technologie de Brest - Département Biologie Appliquée, Univ. Bretagne Ouest, 20p
- BIESINGER K.E., ANDREW R.W., ARTHUR J.W., 1974, Chronic toxicity of NTA (Nitrilotriacetate) and metal-NTA complexes to *Daphnia magna*, J. Fish. Res. Bd. Can., **31**, 486-490.
- BINDER R.L., STEGEMAN J.J., 1983, Basal levels and induction of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase activity during the embryonic period of development in brook trout, Biochem. Pharmac., **32**, 1324-1327.
- BIRGE W.J., BLACK J.A., WESTERMAN A.G., 1985, Short-term fish and amphibian embryo-larval tests for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents, Environ. Toxicol. Chem., **4**, 807-821.
- BIRGE W.J., BLACK J.A., WESTERMAN A.G., RAMEY B.A., 1983, Fish and amphibian Embryos - a model system for evaluating teratogenicity, Fund. Appl. Toxicol., **3**, 237-242.
- BIRGE W.J., BLACK J.A., SHORT T.M., WESTERMAN A.G., 1989, A comparative ecological and toxicological investigation of a secondary wastewater treatment plant and its receiving stream, Environmental Toxicology and Chemistry, **8**, 437-450.
- BLAXTER J.H.S., 1988, Pattern and variety in development *in* Fish physiology; vol. XI: The physiology of developing fish; Part A: Eggs and larvae, pp1-48, HOAR W.S., RANDALL D.J. (éds), Academic Press, INC, San Diego.
- BOUCHE, M.L., 1993, Rapport de stage de 6ème année "Industrie", Agence de l'eau Rhin-Meuse - Groupe Ecotoxicologie, 93 p.
- BOUDRY M.-A., 1991, Les stades embryon-larvaires de poissons en écotoxicologie, Mémoire de DEA "Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques", Univ. Lyon I, 26 p.
- BOXALL A.B.A., MALTBY L., 1995, The characterization and toxicity of sediment contaminated with road runoff, Wat. Res., **29**, 2043-2050.
- BREMILLER R., FROST D., KIMMEL C., 1993, The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*), Monte Westerfield, University of Oregon press, 170p.
- BREMOND R., PERRODON C., 1979, Paramètres de la qualité des eaux, Ministère de l'Environnement et du Cadre de Vie, 2ème édition, 259 p.
- BRESH H., 1982, Investigation of long-term action of xenobiotics on fish with special regard to reproduction, Ecotox. Environ. Saf., **6**, 102-112.
- BROUWER H., MURPHY T., Mc ARDLE L.A., 1990, A sediment-contact bioassay with *P. phosphoreum*, Environ. Toxicol. Chem., **9**, 1353-1358.
- BROWN V.M., 1968, The calculation of the acute toxicity of mixtures of poisons to rainbow trout, Water Res., **2**, 723-733.
- BURKHALTER D.E., KAYA C.M., 1977, Effects of prolonged exposure to ammonia on fertilized eggs and sac fry of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Trans. Am. Fish Soc., **106**, 470-475.

- BURKHARD L.P., JENSON J.J., 1993, Identification of ammonia, chlorine and diazinon toxicants in a municipal effluent, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **25**, 506-515.
- BURTON D.T., KLAUDA R.J., HALL L.W., JEPSON M.A., 1984, An evaluation of the potential toxicity of treated bleached kraft mill effluent to striped bass (*Morone saxatilis* W.) larvae exposed through metamorphosis to the juvenile stage, Water Res., **18**, 1365-1376.
- BURTON G.A., 1989, A multitrophic level evaluation of sediment toxicity in Waukegan and Indiana harbors, Environ. Toxicol. Chem., **8**, 1057-1066.
- BURTON G.A., 1991, Assessing the toxicity of freshwater sediments, Environ. Toxicol. Chem., **10**, 1585-1627.
- CAIRNS J., LOOS J.J., 1967, Changed feeding rate of *Brachydanio rerio* resulting from exposure to sublethal concentrations of zinc, potassium dichromate and alkyl benzene sulfonate (ABS) detergent, Proc. Am. Acad. Sci. Proc., **40**, 47-52.
- CALAMARI D., MARCHETTI R., VAILATI G., 1980, Influence of water hardness on cadmium toxicity, Water Res., **14**, 1421-1426.
- CARLSON A.R., SHIEFERT R.E., 1974, Effects of reduced oxygen on the embryos and larvae of lake trout (*Salvelinus namaycush*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*), J. Fish. Res. Bd. Can., **31**, 1393-1396.
- CASTIGNOLLES N., 1995, Automatisation du comptage et de la reconnaissance des espèces dans les passes à poisson par analyse de séquences d'images, Thèse Doct., INPT Toulouse, 172 p.
- CECPI, 1984, Critères de qualité des eaux pour les poissons d'eau douce européens: rapport sur les nitrites et les poissons d'eau douce, Document technique de la CECPI, 46, 21 p.
- CEE, 1978, Directive du conseil concernant la qualité des eaux douces ayant besoin d'être protégées ou améliorées pour être aptes à la vie des poissons, J.O.C.E., n°L/211/1, p.2730.
- CEN, 1995, Committee draft: water analysis - general guidance for the biotesting of water and waste water - sampling, pretreatment, performance and evaluation, document CEN/TC230/WG2/TG2N24/ISO/TC147/SC6/12.
- CHAPMAN G.A., SHUMWAY D.L., 1978, Effects of sodium pentachlorophenate on survival, energy metabolism and larval growth of steelhead trout in Pentachlorophenol, 285-299, RANGA RAO (éds.), New-York.
- CHAPMAN P.M., 1986, Sediment quality criteria from the sediment quality triad: an example, Environ. Toxicol. Chem., **5**, 957-964.
- CHAPMAN P.M., MORGAN J.D., 1983, Sediment bioassays with oysters larvae, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **31**, 438-444.
- CHARLON N., FOLMER J.-C., LABORDE P., 1994, Application de l'analyse d'image à l'étude de la croissance des larves de poisson *in colloque "l'application de l'analyse d'images dans l'agro-industrie"*, p.17-24, Montpellier, 28 Sept. 1994, Cemagref (éds.), Gap-Diffusion, 1995.
- CHAROY C.P., JANSSEN C.R., PERSOONE G., CLEMENT P., 1995, The swimming behaviour of *Brachyonus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. The use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals, Aquatic Toxicol., **32**, 271-282.
- CHEN T.T., REID P.C., BENEDEN R.V., SONSTEGARD R.A., 1986, Effect of Aroclor 1254 and Mirex on estradiol-induced vitellogenin production in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Can. J. Fish Aquat. Sci., **43**, 169-173.
- CHENEVAL J.-P., 1993, La toxicité des lessives, La Recherche, **24**, 18-25.
- CHESEL D., DOLEDEC S., 1992, Software multivariate analyses and graphical display for environmental data (version 3.4), Université Lyon I, 523pp.

- CHILTON E.W., 1991, System for maintaining sediment suspensions during larval fish studies, The Progressive Fish-Culturist, **53**, 28-33.
- CHORUS I., 1987, Literatur und Auswertung zur Notwendigkeit chronischer Tests, insbesondere des Reproduktionstest am Fish für die Stufe II nach dem Chemikaliengesetz, Studie I4.1.9731617, Umweltbundesamt, Berlin.
- COLLINS T.F.X., 1987, Teratological research using in vitro systems v. nonmammalian model systems, Environmental Health Perspectives, **72**, 237-249.
- COOK P.M., BATTERMAN A.R., BUTTERWORTH B.C., BERINI C., LIBAL J.J., HUFNAGLE L.C., PETERSON R.E., 1994, Translocation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin from adult female lake trout (*Salvelinus namaycush*) to oocytes: effects on early life stage development and sac fry survival, Can. J. Fish Aquat. Sci., **51**, 1410-1419.
- COOPER K.R., SCHELL J., UMBREIT T., GALLO M., 1993, Fish-embryo toxicity associated with exposure to soils and sediments contaminated with varying concentrations of dioxins and furan, Marine Environ. Res., **35**, 177-180.
- COSTAN G., BERMINGHAM N., BLAISE C., FERARD J.-F., 1993, Potential Ecotoxic Effect Probe (PEEP): a novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents, Environ. Toxicol. Water Qual., **8**, 115-140.
- COSTELLO M.J., GAMBLE J.C., 1992, Effects of sewage sludge on marine fish embryos and larvae, Marine Environ. Res., **33**, 49-74.
- COSTER M., CHERMANT J.L., 1989, Précis d'analyse d'images, Collection CNRS Plus, Presses du CNRS, 560 pp.
- CRAIG J.F., FLETCHER J.M., 1984, Growth and mortality of zebrafish, *Brachydanio rerio* (H.-B.), maintained at two temperatures and on two diets, J. Fish Biol., **25**, 43-55.
- DALVERNY E., 1993, Mise au point d'un protocole d'essai de toxicité chronique basé sur la mesure du taux intrinsèque d'accroissement de la reproduction du *Brachydanio rerio*, Thèse Doct., INSA Lyon, 196 p.
- DAMERVAL T., 1992, Des stations intégrées pour l'analyse d'images, Biofutur, Déc., 37-41
- DAVE G., 1984, Effect of pH on pentachlorophenol toxicity to embryos and larvae of zebrafish (*Brachydanio rerio*), Bull. Environ. Contam. Toxicol., **33**, 621-630.
- DAVE G., DAMGAARD B., GRANDE M., MARTELIN J.E., ROSANDER B., VIKTOR T., 1987, Ring test of an embryo-larval toxicity test with zebrafish (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants, Environ. Toxicol. Chem., **6**, 61-71.
- DAVE G., XIU R., 1991, Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **21**, 126-134.
- DAVIS J.C., 1975, Minimal dissolved oxygen requirements of aquatic life with emphasis on Canadian species: a review, J. Fish. Res. Bd. Can., **32**, 2295-2332.
- DAVIS W.P., 1988, Reproductive and developmental responses in the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus*, induced by the plasticizer, di-n-butylphthalate, Environ. Biol. Fishes, **21**, 81-90.
- DAWSON D.A., 1994, Joint actions of carboxylic acid binary mixtures on *Xenopus* embryo development: comparison of joint actions for malformation types, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **27**, 243-249.
- DAWSON D.A., STEBLER E.F., BURKS S.L., BANTLE J.A., 1988, Evaluation of the developmental toxicity of metal-contaminated sediments using short-term fathead minnow and frog embryo-larval assays, Environ. Toxicol. Chem., **7**, 27-34.
- De FLORA S., BAGNASCO M., ZANACCHI P., 1991, Genotoxic, carcinogenic, and teratogenic hazards in the marine environment, with special reference to the Mediterranean sea, Mutation Research, **258**, 285-320.
- De PONTUAL H., PROUZET P., 1988, Numerical analysis of scale morphology to discriminate between atlantic salmon stocks, Aquat. Living Resour., **1**, 17-27.



- DEBEAUPUIS J.P., MARCHE C., LAFONT P., 1984, Embryotoxicité et tératogénicité de l'ochratoxine A vis-à-vis du poisson zèbre, *Brachydanio rerio* H.-B., Microbiologie - Aliments - Nutrition, 2, 257-269.
- DEBEY M.P., SOBEL M.A., 1992, Biologie cellulaire, Ecole polytechnique, département de biologie, 186 p.
- DODSON S.I., HANAZATO T., GORSKI P.R., 1995, Behavioral responses of *Daphnia pulex* exposed to carbaryl and *Chaoborus* Kairomone, Environ. Toxicol. Chem., 14, 43-50.
- DORN P.B., RODGERS J.H., JOP K.M., RAIJA J.C., DICKSON K.L., 1987, Hexavalent chromium as reference toxicant in effluent toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 6, 435-444.
- DOUDOROFF P., SHUMWAY D.L., 1970, Dissolved oxygen requirements of freshwater fishes, FAO Fish Technical Paper. n°86, 291p.
- DOUGLAS G.R., NESTMANN E.R., McKAGUE A.B., KAMRA O.P., LEE E.G.-H., ELLENTON J.A., BELL R., KOWBEL D., LIU V., POOLEY J., 1983, Mutagenicity of pulp and paper mill effluent: a comprehensive study of complexe mixtures, Environ. Science research, 27, 431-459.
- EATON R.C., FARLEY R.D., 1974a, Growth and reduction of depensation of zebrafish, *Brachydanio rerio*, reared in the laboratory, Copeia, 1, 204-209.
- EATON R.C., FARLEY R.D., 1974b, Spawning cycle and egg production of zebrafish, *Brachydanio rerio*, reared in laboratory, Copeia, 1, 195-203.
- EATON J.G., McKIM J.M., HOLCOMBE G.W., 1978, Metal toxicity to embryos and larvae of seven freshwater fish species - I. Cadmium, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 19, 45-103.
- EIFAC, 1973, Water quality criteria for european freshwater fish, Report on ammonia and inland fisheries, Water Res., 7, 1011-1022.
- ENGELHARDT G., WALLNOFFER P.R., HUTZINGER O., 1975, The microbial metabolism of di-n-butyl phthalate and related dialkyl phthalates. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 3, 342-346.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1981, Evaluation de la toxicité des effluents de la station d'épuration de l'usine de produits chimiques de la NSM (Pays-Bas), Rapport EPS 4/WP/81/2F, 28 p.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1992a, Méthodologie d'essai biologique: essais de toxicité sur les salmonidés aux premiers stades de leur cycle biologique (truite arc-en-ciel, saumon coho ou saumon de l'Atlantique), Série de la protection de l'environnement, Rapport SPE 1/RM/28, 87 p.
- ENVIRONNEMENT CANADA, 1992b, Méthodologie d'essai biologique: essai de croissance et de survie sur des larves de tête-de-boule, Série de la protection de l'environnement, Rapport SPE 1/RM/22, 72 p.
- EPA/Corp. of Engineers, 1977, Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean waters, United States Environmental Protection Agency/U. S. Army Corp. of Engineers, Technical Committe for Dredged and Fill material, Vicksburg, Mississippi.
- EPA, 1988, Methods for aquatic toxicity Identification evaluations, Phase I toxicity characterization procedures, EPA/600/3-88/034.
- EPA, 1989a, Effluent and receiving water sampling and sample handling in Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 27-30, EPA/600/4-89/001, 2ème édition.
- EPA, 1989b, Fathead minnow, *Pimephales promelas*, larval survival and growth test, method 1000.0 in Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 33- 74, EPA/600/4-89/001, 2ème édition.

- EPA, 1989c, Fathead minnow, *Pimephales promelas*, embryo-larval survival and teratogenicity test, method 1001.0 in Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms, 75-104, EPA/600/4-89/001, 2ème édition.
- EPA, 1993, Methods for aquatic toxicity identification evaluation, Phase II: toxicity identification procedures for samples exhibiting acute and chronic toxicity, EPA/600/R-92/080).
- ESPOURTEILLE F.A., GREAVES J., HUGGETT R.J., 1993, Measurement of tributyltin contamination of sediments and crassostrea virginica in the southern Chesapeake bay, Environ. Toxicol. Chem., 12, 305-314.
- EVERS E.H.G., KLAMER H.J.C., LAANE W.P.M., GOVERS H.A.J., 1993, Polychlorinated dibenzo-p-dioxin and dibenzofuran residues in estuarine and coastal north sea sediments: source and distribution, Environ. Toxicol. Chem., 12, 1583-1598.
- FAUSTMAN E.M., 1988, Short-term tests for teratogens, Mutation Research, 205, 355-384.
- FENT K., LOOSER P.W., 1995, Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: influence of pH and humic acids, Water Res., 29, 1631-1637.
- FENT K., MEIER W., 1992, Tributyltin-induced effects on early life stages of minnow *Phoxinus phoxinus*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 22, 428-438.
- FOGELS A., SPRAGUE J.B., 1977, Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish, and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants, Water Res., 11, 811-817.
- FOSTER S.C., BURKS S.L., FORT D.J., STOVER E.L., MATLOCK M.D., 1994, Development and evaluation of a nondestructive measure of fish growth and sublethal toxicity assessment, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 53, 85-90.
- FOUCHIER J., BILLET M., EPSTEIN H., 1970, Dictionnaire de chimie, Netherlands University Press N.V., Nijmegen, 3ème édition, 477 p.
- FRANCIS P.C., BIRGE W.J., BLACK J.A., 1984, Effects of cadmium-enriched sediment on fish and amphibian embryo-larval stages, Ecotox. Environ. Saf., 8, 378-387.
- FU H., STEINEBACH O.M., Van Der HAMER C.J.A., BALM P.H.M., LOCK R.A.C., 1990, Involvement of cortisol and metallothionein-like proteins in the physiological responses of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to sublethal cadmium stress, Aquatic Toxicol., 16, 257-270.
- GARRIC J., 1987, Toxicité de l'azote ammoniacal pour la faune aquatique dans les eaux continentales, Rapport Cemagref, Laboratoire d'Ecotoxicologie, 6 p.
- GARRIC J., DALVERNY E., BRAY M., MIGEON B., VINDIMIAN E., 1990a, Mise au point d'un essai de toxicité létale et sublétales à moyen terme sur le poisson zèbre *Brachydanio rerio*, Rapport final recherche SRETIE n° 87325, 63 p.
- GARRIC J., MIGEON B., VINDIMIAN E., 1990b, Lethal effects of draining on brown trout. A predictive model based on field and laboratory studies, Water Res., 24, 59-65.
- GARRIC J., BRAY M., 1991, Etude de la variabilité des réponses biologiques mesurées au cours d'essais de toxicité embryon-larvaire sur le *Brachydanio rerio*, Rapport final recherche SRETIE n° 90079, 12p.
- GARRIC J., VINDIMIAN E., FERARD J.-F., 1993, Ecotoxicology and waste water: some practical applications, The Science of the Total Environment, Supplement 1993, 1085-1103.
- GARRIC J., VOLLAT B., NGUYEN D.K., BRAY M., MIGEON B., KOSMALA A., Ecotoxicological and chemical characterization of municipal wastewater treatment plant effluents, Water Science and Technology (sous presse).

- GASITH A., JOP K.M., DICKSON K.L., PARKERSON T.F., KACZMAREK S.A., 1988, Protocol for the identification of toxic fractions in industrial wastewater effluents *in Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 10th volume*, ASTM STP 971, p. 204-215, ADAMS W.J., CHAPMAN G.A., LANDIS W.G. (éds) American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- GEURDEN I., CHARLON N., MARION D., BERGOT P., Dietary phospholipids and body deformities in carp (*Cyprinus carpio* L.) larvae, European Aquaculture Society. Spec. Publ. (sous presse).
- GHILLEBAERT F., 1991, Méthodologie d'un test embryotoxicologique chez l'embryon de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.), Mémoire de DEA de Toxicologie de l'Environnement, Univ. Metz, 48p.
- GIAM C.S., ATLAS E.L., 1980, Accumulation of phthalate ester plasticizers in Lake Constance sediments, Naturwissenschaften, 67, 508-510.
- GIAM C.S., CHAN H.S., NEFF G.S., ATLAS E.L., 1978, Phthalate ester plasticizers : a new class of pollutant, Science, 199, 419-421.
- GIESY J.P., HOKE R.A., 1989, Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design, Journal of Great Lakes Research, 15, 539-569.
- GILLET C., ROUBAUD P., 1983, Influence sur la survie jusqu'à l'éclosion des embryons de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) après traitement, pendant la fécondation et le développement précoce, par le carbendazyme, un fongicide antimitotique de synthèse, Water Res., 17, 1343-1348.
- GINGERICH W.H., ELSBURY R.M., STEINGRAEBER M.T., 1988, Effects of cadmium on hatching success, growth and osteological development of larval brook trout (*salvelinus fontinalis*) in soft, acidic waters, Aquatic Toxicol., 13, 404-405.
- GOLTERMAN, H.L., SLY, P.G., THOMAS, R.L., 1983, Technical Papers in Hydrology n°26, UNESCO, p. 231.
- GOODRICH M.S., LECH J.J., 1990, A behavioral screening assay for *Daphnia magna*: a method to assess the effects of xenobiotics on spatial orientation, Environ. Toxicol. Chem., 9, 21-30.
- GORGE G., NAGEL R., 1990, Kinetics and metabolism of 14C-Lindane and 14C-Atrazine in early life stages of zebrafish (*Brachydanio rerio*), Chemosphere, 21, 1125-1137.
- GROTH G., SCHREEB K., HERDT V., FREUNDT K.J., 1993, Toxicity studies in fertilized zebrafish eggs treated with N-methylamine, N,N-dimethylamine, 2-aminoéthanol, isopropylamine, aniline, N-methylaniline, N,N-dimethylaniline, quinone, chloroacetaldehyde, or cyclohexanol, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 50, 878-882.
- GUIZARD C., BELLON V. & SEVILA F., 1992 Vision artificielle dans les industries agro-alimentaires, Edition Cemagref-Dicova, Antony, 279 p.
- GULLEY D.D., BOELTER A.M., BERGMAN H.L., 1989, Toxstat Release 3.0, Fish physiology and toxicology laboratory, Department of zoology and physiology, Univ. Wyoming (U.S.A.).
- HANSEN P.D., 1985, Chlorinated hydrocarbons and hatching success in baltic herring spring spawners, Marine Environ. Res., 15, 59-76.
- HARKEY G.A., LANDRUM P.F., KLAINE S.J., 1994, Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays, Environ. Toxicol. Chem., 13, 1315-1329.
- HEATH A.G., 1987, Water pollution and fish physiology, CRC press, Boca Raton, 245 p.
- HELENIUS A., SIMONS K., 1975, Solubilization of membranes by detergents, Biochem. Biophys. Acta., 415, 29-79.
- HELMSTETTER M.F., ALDEN R.W., 1995, Passive trans-chorionic transport of toxicants in topically treated japanses medaka (*Oryzias latipes*) eggs, Aquatic Toxicol., 32, 1-13.

- HENDERSON C., PICKERING Q.H., COHEN J.M., 1959, The toxicity of synthetic detergents and soaps to fish, Sewage Industrial Waste, 31, 295-306.
- HERZIG A., WINKLER H., 1986, The influence of temperature on the embryonic development of three cyprinid fishes, *Abramis brama*, *Chalcalburnus chalcoides mento* et *Vimba Vimba*, J. Fish Biol., 28, 171-181.
- HICKS D.B., De WIIT J.W., 1971, Effects of dissolved oxygen on kraft pulp mill effluent toxicity, Water Res., 5, 693-701.
- HINDAR A., HENRIKSEN A., TORSETH K., SEMB A., 1994, Acid water and fish death, Nature, 372, 24.
- HISAOKA K.K., BATTLE H.I., 1958, The normal developmental stages of the zebrafish, *Brachydanio rerio* (Hamilton-Buchanan), Journal of Morphology, 102, 311-327.
- HODSON P.V., SPRAGUE J.B., 1975, Temperature-induced changes in acute toxicity of zinc to Atlantic salmon (*Salmo salar*), J. Fish Res. Bd. Can., 32, 1-10.
- HOKANSON K.E.F., SMITH L.L., 1971, Some factors influencing toxicity of linear alkylate sulfonate (LAS) to the bluegill, Trans. Am. Fish Soc., 100, 1-12.
- HOLMAN W.F., MACEK K.J., 1980, An aquatic safety assessment of linear alkylbenzene sulfonate (LAS): chronic effects on fathead minnows, Trans. Am. Fish. Soc., 109, 122-131.
- HOLDWAY D.A., DIXON D.G., 1986, Impact of pulse exposure to methoxychlor on flagfish (*Jordanella floridae*) over one reproductive cycle, Can. J. Fish Aquat. Sci., 43, 1410-1415.
- HOWE G.E., MARKING L.L., BILLS T.D., BOOGAARD M.A., MAYER F.L., 1994, Effects of water temperature on the toxicity of 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to developing rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Env. Toxicol. Chem., 13, 79-84.
- HUEBERT D.B., SHAY J.M., 1992, The effect of EDTA on cadmium and zinc uptake and toxicity in *Lemna trisulca*, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 22, 313-318.
- HUGHES M.M., HEBER M.A., MORRISON G.E., SCHIMMEL S.C., BERRY W.J., 1989, An evaluation of short-term chronic effluent toxicity test using sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larvae, Environ. Poll., 60, 1-14.
- HUTCHINSON N.J., SPRAGUE J.B., 1987, Reduced lethality of Al, Zn, and Cu mixtures to american flagfish by complexation with humic substances in acidified soft waters, Environ. Toxicol. Chem., 6, 755-765.
- HUTCHINSON T.H., WILLIAMS T.D., 1989, The use of sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) and a benthic copepod (*Tisbe battagliai*) in short-term tests for estimating the chronic toxicity of industrial effluents, Hydrobiologia, 188/189, 567-572.
- ISO, 1988, Water quality - determination of embryo-larval toxicity to freshwater fish - semistatic procedure, Document ISO/TC/147/SC5/WG3/N85.
- ITSV (Information Technique des Services Vétérinaires), 1973, Valeurs normales, douteuses et dangereuses des facteurs physico-chimiques pour les salmonidés et les autres familles de poissons d'eau douce, 43-44, p40.
- JAOUUL A., ROUBAUD P., 1982, Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) à des chocs thermique froids et chaud, J. Can. Zool., 60, 3409-3419.
- JOHANSEN P.H., MATERS R.A.S., BROWN J.A., COLGAN P.W., 1985, Mortality of early life stages of largemouth bass, *Micropterus salmoides* due to pentachlorophenol exposure, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 34, 377-384.
- JOHANSSON N., KIHLESTRÖM J.E., WAHLBERG A., 1973, Low pH values shown to affect developing fish eggs (*Brachydanio rerio* H.-B.), Ambio, 1-2, 42-43.
- JOHNSON B.T., LULVES W., 1975, Biodegradation of di-n-butylphthalate and di-2-ethylhexylphthalate in freshwater hydrosol, J. Fish Res. Bd. Can., 32, 333-339.

- JOP K.M., KENDALL T.Z., ASKEW A.M., FOSTER R.B., 1991, Use of fractionation procedures and extensive chemical analysis for toxicity identification of a chemical plant effluent, Environ. Toxicol. Chem., **10**, 981-990.
- Journal Officiel des Communautés Européennes, 1991, Normes de qualité applicables aux rejets de stations d'épurations urbaines, n° L135/48 du 30/5/91.
- KAUR K., TOOR H.S., 1980, Role of abiotic factors in the embryonic development of scale carp, Proc. Indian Nat. Sci. Acad., **46**, 136-148.
- KAUR K., DHAWAN A., 1993, Variable sensitivity of *Cyprinus carpio* eggs, larvae, and fry to pesticides, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **50**, 593-599.
- KAUR K., DHAWAN A., TOOR S., 1993, Toxic effects of industrial effluents on hatchability and viability of *Cyprinus carpio* eggs, Bull. Environ. Contam. Toxicol., **50**, 640-645.
- KAUSHIK S.J., DABROWSKI K., LUQUET P., 1982, Patterns of nitrogen excretion and oxygen consumption during ontogenesis of common carp (*Cyprinus carpio*), Can. J. Fish. Aquat. Sci., **39**, 1095-1105.
- KEITH L.H., TEILLARD W.A., 1979, Priority pollutants: a perspective view, Environ. Sci. Technol., **13**, 416-423.
- KOCAN R.M., LANDOLT M.L., 1984, Uptake and excretion of Benzo(a)pyrene by trout embryos and sac fry, Marine Environ. Res., **14**, 433-436.
- KOKUREWICZ B., 1970, The effects of temperature on embryonic development of *Tinca tinca* and *Rutilus rutilus*, Zool. pol., **20**, 317-337.
- KRANTZBERG G., BOYD D., 1992, The biological significance of contaminants in sediment from Hamilton harbour, lake Ontario, Environ. Toxicol. Chem., **11**, 1527-1540.
- KRISTENSEN P., 1990, Evaluation of the sensitivity of short term fish early life stage tests in relation to others FELS test methods, Rapport du Water Quality Institute n°305019, 44p.
- LAALE H.W., 1962, The teratogenic effects of trypan blue upon the development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, Hong Kong Baptist Coll., **177**, 1-17.
- LAALE H.W., 1977, The biology and use of zebrafish, *Brachydanio rerio* in fisheries research. A literature review, J. Fish Biol., **10**, 121-173.
- LAALE H.W., LERNER W., 1981, Teratology and early fish development, Amer. Zool., **21**, 517-533.
- LANDNER L., NEILSON A.H., SÖRENSEN L., TÄRNHOLM A., VIKTOR T., 1985, Short-term test for predicting the potential of xenobiotics to impair reproductive success in fish, Ecotox. Environ. Saf., **9**, 282-293.
- LANDRUM P.F., BURTON G.A., KLAINE S.J., CRECELIUS E.A., BYL T.D., GOSSIAUX D.C., TSYMBAL V.N., CLEVELAND L., INGERSOLL C.G., SASSON-BRICKSON G., 1993, Toxicity of contaminated sediments in dilution series with control sediments, Chemosphere, **27**, 1789-1812.
- LARSON R.J., PAYNE A.G., 1981, Fate of the benzene ring of linear alkylbenzene sulfonate in natural waters, Applied and Environmental Microbiology, **41**, 621-627.
- LE DOUARIN E., 1994, Evaluation des effets létaux et tératogènes du dibutyl phtalate sur les stades embryo-lavaires d'un modèle de poisson: le *Brachydanio rerio*, ou poisson zèbre, Mémoire de DEA "Toxicologie - option Toxicologie de l'Environnement", Univ. Paris V, 25p.
- LEE E.G.-H., MUELLER J.C., WALDEN C.C., STICH H., 1991, Mutagenic properties of pulp mill effluents, Pulp and Paper Canada, **82**, 149-154.
- LEFEBVRE B., 1990, Bases méthodologiques et conceptuelles de l'embryotoxicologie des poissons, Thèse Doct., Univ. Paris VII, 159p.
- LEMLY A.D., SMITH R.J.F., 1987, Effect of chronic exposure to acidified water on chemoreception of feeding stimuli in fathead minnows (*Pimephales promelas*): mechanisms and ecological implications, Environ. Toxicol. Chem., **6**, 225-238.

- LENORE S.C. GREENBERG A.E. TRUSSEL R.R., 1989, Standard methods for the examination of water and wastewaters, APHA-AWWA-WPCF, 17ème éd..
- LETT P.F., FARMER G.J., BEAMISH F.W.H., 1976, Effect of copper on some aspects of the bioenergetics of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), J. Fish Res. Bd. Can., **33**, 1335-1342.
- LINTON T.K., MAYER F.L., SIMON T.L., MALONE J.A., MARKING L.L., 1994, Salinity and temperature effects on chronic toxicity of 2,4-dinitrophenol and 4-nitrophenol to sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*), Env. Toxicol. Chem., **13**, 85-92.
- LIPSCHUETZ M., COOPER A.L., 1961, Toxicity of 2-secondary-butyl-4,6-dinitrophenol to blacknose dace and rainbow trout, NY Fish Game Journal, **8**, 110-121.
- LLOYD R., 1961, Effect of dissolved oxygen concentrations on the toxicity of several poisons to rainbow trout (*Salmo gairdnerii* Richardson), J. Exp. Biol., **38**, 447-455.
- LLOYD R., 1965, Factors that affect the tolerance of fish to heavy metal poisoning in Biological problems in water pollution, p. 181-187, U.S. Public Health Serv. Publ 999 - WP-25.
- LLOYD R., 1989, Aquatic toxicity of complex effluents, Chemistry & Industry, **14**, 449-452.
- LONGWELL A.C., 1977, A genetic look at fish eggs and oil, Oceanus, **20**, 46-58.
- LOPES A., 1994, Eaux industrielles, faire encore mieux, Environnement & technique, **139**, 54-56.
- LOTKA A.J., 1913, A natural population norm, J. Wash. Acad. Sci., **3**, 241-248.
- MACEK K.J., BUXTON K.S., SAUTER S., GNILKA S., DEAN J.W., 1976, Chronic toxicity of atrazine to selected aquatic invertebrates and fishes, Rapport EPA-600/3/76/047, EPA - Wareham, Massachusetts, 49 p.
- MACEK K.J., SLEIGH B.H., 1977, Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazard associated with the chronic toxicity of chemicals to fishes, ASTM STP 634, p. 137-146.
- MAGAUD H., MIGEON B., MORFIN P., GARRIC J., VINDIMIAN E., Modeling fish mortality due to urban storm run-off: the interaction between hypoxia and unionized ammonia, Water Res. (sous presse).
- MANCÉ G., 1987, Pollution threat of heavy metals in aquatic environments, Elsevier Science Publisher, England, 372 p.
- MARKING L.L., 1975, Effects of pH on the toxicity of antimycin to fish, J. Fish Res. Bd. Can., **32**, 769-773.
- MARKICH S.J., JEFFREE R.A., 1994, Absorption of divalent trace metals as analogues of calcium by Australian freshwater bivalves: an explanation of how water hardness reduces metal toxicity, Aquatic Toxicol., **29**, 257-290.
- MARZIN D.R., VO PHI H., 1985, Proposition d'une stratégie pour la recherche des effets mutagènes, Ann. Pharmaceutiques Françaises, **43**, 209-221.
- MATHER-MIHAICH E., DI GIULIO R.T., 1991, Oxidant, mixed-function oxidase and peroxisomal responses in Channel Catfish exposed to bleached kraft mill effluent, Arch. Environ. Contam. Toxicol., **20**, 391-397.
- MAYER F.J., MAYER K.S., ELLERSIECK M.R., 1986, Relation of survival to other endpoints in chronic toxicity tests with fish, Environ. Toxicol. Chem., **5**, 737-748.
- MAYER F.L., Jr, SANDERS H.O., 1973, Toxicology of phthalic acid esters in aquatic organisms, Environmental health perspectives, **3**, 153-157.
- MAYES M.A., SHAFER T.J., BARRON M.G., 1988, Critical evaluation of the fathead minnow 7-day static renewal test, Chemosphere, **17**, 2243-2252.
- Mc AVOY D.C., ECKHOFF W.S., RAPAORT R.A., 1993, Fate of linear alkylbenzene sulfonate in the environment, Environ. Toxicol. Chem., **12**, 977-987.

- Mc CARTHY J.F., WHITMORE D.K., 1985, Chronic toxicity of di-n-butyl and di-n-octyl phthalate to *Daphnia magna* and the fathead minnow, Environ. Toxicol. Chem., 4, 167-179.
- Mc KIM J.M., 1977, Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long term toxicity, J. Fish Res. Bd. Can., 34, 1148-1154.
- Mc LEAY D.J., WALDEN C.C., MUNRO J.R., 1979, Influence of dilution water on the toxicity of kraft pulp and paper mill effluent, including mechanisms of effects, Water Res., 13, 151-158.
- MENARD F., 1992, Quelle eau, demain?, Document INRAP 102, S.E.D. INRAP éd., Dijon, 188p.
- MEYER C.L., SUEDEL B.C., RODGERS J.H., DORN P.B., 1993, Bioavailability of sediment-sorbed chlorinated ethers, Environ. Toxicol. Chem., 12, 493-505.
- MILLIGAN C.L., WOOD C.M., 1982, Disturbances in haematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*, J. Exp. Biol., 99, 397.
- MOMMSEN T.P. WALSH P.J., 1988, Vitellogenesis and oocyte assembly in Fish physiology; vol. XI : The physiology of developing fish ; Part A : Eggs and larvae, p.348-395, HOAR W.S., RANDALL D.J. (éds), Academic Press, INC, San Diego.
- MONTGOMERY, 1993, Agrochemicals desk reference, environmental data, p. 141
- MORITA M., NAKAMURA H., MIMURA S., 1974, Phthalic acid esters in water, Water Res., 8, 781-788.
- MOUNT D.I., STEPHAN C.E., 1967, A method for establishing acceptable limits for fish-malathion and the butoxyethanol ester of 2,4-D, Trans. Am. Fish Soc., 96, 185-193.
- MUNOZ J.-F., 1992, Méthodologie d'étude des produits phytosanitaires. Etude d'un bassin versant viticole: l'Ardière (Beaujolais). Mise au point de méthodes analytiques de pesticides, Thèse Doct., Univ. Lyon I, 175 p.
- NAUDIN S., GARRIC J., VINIMIAN E., BRAY M., MIGEON B., VOLLAT B., LENON G., 1995, Influence of the sample preservation mode to assess the chronic toxicity of an industrial effluent, Ecotox. Environ. Saf., 30, 54-62.
- NAUDIN S., PARDOS M., QUINIOU F., 1995, Toxicité des sédiments du bassin versant du Stang Alar déterminée par une batterie de bio-essais, Ingenieries: Eau - Agriculture - Territoires, n° spécial "Rade de Brest", 67-74.
- NEBEKER A.V., MILLER C.E., 1988, Use of the amphipode crustacean *Hyalella azteca* in freshwater and estuarine sediment toxicity tests, Environ. Toxicol. Chem., 7, 1027-1033.
- NEWMAN M.C., APLIN M.S., 1992, Enhancing toxicity data interpretation and prediction of ecological risk with survival time modeling: an illustration using sodium chloride toxicity to mosquitofish (*Gambusia holbrooki*), Aquatic Toxicol., 23, 85-96.
- NEWSOME C.S., PIRON R.D., 1982, Aetiology of skeletal deformities in the zebra Danio fish (*Brachydanio rerio* H.-B.), J. Fish Biol., 21, 231-237.
- NGUYEN D.-K., 1995, Caractérisation des polluants organiques de faibles masses moléculaires (< 600 daltons) dans les eaux usées urbaines, Thèse Doct., Institut National Agronomique de Paris-Grignon, 171 p.
- NORBERG T.J., MOUNT D.I., 1985, A new fathead minnow (*Pimephales promelas*) subchronic toxicity test, Environ. Toxicol. Chem., 4, 711-718.
- NORBERG-KING T.J., 1989, An evaluation of the fathead minnow seven-day subchronic test for estimating chronic toxicity, Environ. Toxicol. Chem., 8, 1075-1089.
- OCDE, 1981, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques: Poisson, essais de toxicité aiguë, Directive 203, 8 p.
- OCDE, 1984, Lignes directrices pour les essais de produits chimiques: Poisson, toxicité prolongée: étude sur 14 jours, Directive 204, 11 p.

- OCDE, 1987, Monographie sur l'environnement. Utilisation des tests biologiques pour l'évaluation et le contrôle de la pollution de l'eau.
- OCDE, 1992, Ligne directrice pour les essais de produits chimiques: Poisson, essai de toxicité aux premiers stades de la vie, Directive 210, 18 p.
- OCDE, 1994, Guideline for testing of chemicals Proposal for fish, toxicity test on egg and sac-fry stages, Paris, Organisation de Coopération et de Développement Economique, document 215, 18 p.
- Office International de l'Eau, 1993, Carte de la pollution par les métaux lourds, d'après les données du Ministère de l'Environnement, Direction de l'Eau.
- OIKARI A., NIITTYLÄ J., 1985, Subacute physiological effects of bleached kraft mill effluent (BKME) on the liver of Trout, *Salmo gairdneri*, Ecotox. Environ. Saf., **10**, 159-172.
- OTTO D.M.E., LINDSTRÖM-SEPPA P., SEN C.K., 1994, Cytochrome P450-dependent enzymes and oxidat mediated responses in rainbow trout exposed to contaminated sediments, Ecotox. Environ. Saf., **27**, 265-280.
- OWENS J.W., 1991, The hazard assessment of pulp and paper effluents in the aquatic environment: a review, Environ. Toxicol. Chem., **10**, 1511-1540.
- PARDOS M., SANTIAGO S., ROSSEL D., 1991, Toxicité des contaminants liés aux sédiments de la rivière Venoge évaluée par trois biotests, CILEF, **3**, 167-170.
- PARDOS, M., BENNINGHOFF, C., THOMAS, R., 1994, Caractérisation écotoxicologique des affluents à leur embouchure, Rapp. Comm. Int. Prot. Eaux Léman contre Pollut., 171-189.
- PATRIS T., LEFEBVRE M., TROADEC L., LAPLANCHE A., 1995, Pollution chimique et bactérienne véhiculée par les eaux de ruissellement pluvial sur le bassin versant du Stang Alar in "3ièmes Rencontres Internationales du Projet de la rade de Brest", 205-221, Brest, 14-16 mars 1995, Communauté urbaine de Brest.
- PICKERING Q.H., 1968, Some effects of dissolved oxygen concentrations upon the toxicity of zinc to the bluegill *Lepomis macrochirus* Raf., Water Res., **2**, 187-194.
- PICKERING Q.H., 1980, Chronic toxicity of hexavalent chromium to the fathead minnow (*Pimephales promelas*), Arch. Environ. Contam. Toxicol., **9**, 405-413.
- PICKERING Q.H., 1988, Evaluation and comparison of two short-term fathead minnow tests for estimating chronic toxicity, Water Res., **22**, 883-893.
- PICKERING Q.H., GAST M.H., 1972, Acute and chronic toxicity of cadmium to the fathead minnow (*Pimephales promelas*), J. Fish. Res. Bd. Can., **29**, 1099-1106.
- PICKERING Q.H., HENDERSON C., 1966a, Acute toxicity of some important petrochemicals to fish, J. Water Pollut. Control Fed., **38**, 1419-1429.
- PICKERING Q.H., HENDERSON C., 1966b, The acute toxicity of some heavy metals to different species of warm-water fishes, Int. J. Air Water Pollut., **10**, 453-463.
- PICKERING Q.H., HENDERSON C., LEMKE A.E., 1962, The toxicity of organic phosphorus insecticides to different species of warmwater fishes, Trans. Am. Fisch Soc., **91**, 175-184
- POUPARD C.J., 1979, Thérapeutique des maladies du poisson in Pathologie du poisson, p.267-274, ROBERTS R.J. (éd.), Maloine Edition, Paris, 317pp.
- POXTON M.G., GOLDSWORTHY G.T., 1986, The remote estimation of weight and growth in turbot using image analysis in Automation, data processing in aquaculture, p.163-170, J.G. Balchen (éd.).
- QUINIOU F., TOULARASTEL F., 1991, Mesure de l'effet biologique de la qualité d'un milieu par le bio-essai embryon de bivalve marin, CIEM. CM. 1991/E/26/K, 8p.
- RAMADE F., 1993, Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement, Ediscience International, 822 p.



- RANA K.J., 1990, Influence of incubation temperature on *Oreochromis niloticus* eggs and fry I. gross embryology, temperature tolerance and rate of embryonic development, Aquaculture, **87**, 165-181.
- RAND G.M., 1985, Behavior in Fundamentals of Aquatic Toxicology, p.221-263, RAND G.M. et PETROCELLI S.R. (éds.), Hemisphere publishing corporation, New York, 1ère édition.
- RAND G.M., PETROCELLI S.R., 1985, Introduction in Fundamentals of Aquatic Toxicology, p.1-28, RAND G.M. et PETROCELLI S.R. (éds.), Hemisphere publishing corporation, New York, 1ère édition.
- RAO P.S.C., HORNSBY A.G., JESSUP R.E., 1985, Indices for ranking the potential for pesticide contamination of groundwater, Soil and Crop Science Society of Florida Proceedings, **44**, 1-8.
- RAPPAPORT S.M., RICHARD M.G., HOLLSTEIN M.C., TALCOTT R.E., 1979, Mutagenic activity in organic wastewater concentrates, American Chemical Society, **13**, 957.
- REYNOLDSON T.B., DAY K.E., 1993, Freshwater sediments in Handbook of Ecotoxicology - vol.1, p.83-100, CALOW P. (éd.), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- REZNITCHENKO P.N., 1985, Ecological and physiological bases of the thermal regime of *Cyprinus carpio* L. egg incubation, Topical Problems of Ichtyol. Trans. of the Czechoslov.-Sc, **2**, 107-132.
- ROMBOUGH P.J., 1988, Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life in Fish physiology; vol. XI: The physiology of developing fish ; Part A : Eggs and larvae, p.59-144, HOAR W.S., RANDALL D.J. (éds), Academic Press, INC, San Diego.
- ROSENTHAL H., ALDERDICE D.F., 1976, Sublethal effects of environmental stressors, natural and pollutional, on marine fish eggs and larvae, J. Fish. Res. Bd. Can., **33**, 2047.
- ROSSO A., 1995, Description de l'impact des micropolluants sur les peuplements d'Oligochètes des sédiments de cours d'eau du bassin-versant de l'III (Alsace), Thèse Doct., Université Lyon I, 196 p.
- ROUBAUD P., CHAILLOU C., SJAFFI D.S., 1985, Variations cycliques de la tolérance à un choc thermique froid appliqué au cours de la segmentation de l'embryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.), J. Can. Zool., **63**, 657-663.
- RUSSO R.C., 1985, Ammonia, nitrites and nitrate in Fundamentals of Aquatic Toxicology, p.455-471, RAND G.M. et PETROCELLI S.R. (éds.), Hemisphere publishing corporation, New York, 1ère édition.
- RUOPPA M., NAKARI T., 1988, The effects of pulp and paper industry (tervakoski oy) waste waters on the fertilized eggs and alevins of zebrafish and on the physiology of rainbow trout, Water Sc. Technol., **20**, 201-.
- SANDERS H.O., MAYER F.L., WALSH D.F., 1973, Toxicity, residue dynamics, and reproductive effects of phthalate esters in aquatic invertebrates, Environ. Res., **6**, 84-90.
- SASSON-BRICKSON G., BURTON G.A., 1991, *In situ* and laboratory sediment toxicity testing with *Ceriodaphnia dubia*, Environ. Toxicol. Chem., **10**, 201-207.
- SAUTER S., BUXTON K.S., MACEK K.J., PETROCELLI S.R., 1976, Effects of exposure to heavy metals on selected freshwater fish, rapport EPA 600/3/76/105, 12 p.
- SAYER M.D.J., READER J.P., DALZIEL T.R.K., 1993, Freshwater acidification: effects on early life stages of fish, Reviews in Fish Biology and Fisheries, **3**, 95-132.
- SCHIRONE R.C., GROSS L., 1968, Effects of temperature on early embryological development of the zebrafish, *Brachydanio rerio*, J. Exp. Zool., **169**, 43-52.
- SCHMIDT-DALLMIER M.J., ATCHISON G.J., STEINGRAEBER M.T., KNIGHTS B.C., 1992, A sediment suspension system for bioassays with small aquatic organisms, Hydrobiologia, **245**, 157-161.

- SCHREIWEIS D.O., MURRAY G.J., 1976, Cardiovascular malformations in *Oryzias latipes* embryos treated with 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), Teratology, 14, 287-290.
- SCHRODER G.D., ROSS-LEWANDOWSKI S., DAVIS E.M., 1991, Evaluation of the toxic effects of selected municipal wastewater effluents on aquatic invertebrates, Environ. Technol., 12, 757-768.
- SCHUBAUER-BERIGAN M.K., ANKLEY G.T., 1991, The contribution of ammonia, metals and nonpolar organic compounds to the toxicity of sediment interstitial water from an illinois river tributary, Environ. Toxicol. Chem., 10, 925-939.
- SCHUYTEMA G.S., NEBEKER A.V., GRIFFIS W.L., MILLER C.E., 1989, Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin, Environ. Toxicol. Chem., 8, 883-891.
- SINGH A.R., LAWRENCE W.H., AUTIAN J., 1972, Teratogenicity of phthalateesters in rats, Journal of pharmaceutical sciences, 61, 51-55.
- SKIDMORE J.F., 1965, Resistance to zinc sulphate of the zebrafish (*Brachydanio rerio* H.B.) at different phases of its life history, Ann. Appl. Biol., 56, 47-53.
- SKIDMORE J.F., 1967, Oxygen uptake by zebrafish (*Brachydanio rerio*) of different ages in relation to zinc sulfate resistance, J. Fish. Res. Bd. Can., 24, 1253-1267.
- SLOOFF W., 1982, Skeletal anomalies in fish from polluted surface waters, Aquatic Toxicol., 2, 157-173.
- SLOOFF W., CANTON J.H., HERMENS J.L.M., 1983, Comparison of the susceptibility of 22 freshwater species to 15 chemical compounds I (sub)acute toxicity tests, Aquatic Toxicol., 4, 113-128.
- SMART G.R., 1978, Investigations of the toxic mechanisms of ammonia to fish, gas exchange in rainbow trout exposed to acutely lethal concentrations, J. Fish. Biol., 12, 92-104.
- SOLBE J.F. de L.G., SHURBEN D.G., 1989, Toxicity of ammonia to early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Wat. Res., 23, 127-129.
- SOLOMON F.P., FAUSTMAN E.M., 1987, Developmental toxicity of four model alkylating agents on japanese medaka fish (*Oryzias latipes*) embryos, Environ. Toxicol. Chem., 6, 747-753.
- SPEAR P.A., PIERCE R.C., 1979, Cooper in the aquatic environment: chemistry, distribution and toxicology, Natl. res. coun. Can. Environ. Secretariat NRCC n°16454.
- SPEHAR R.L., 1967, Cadmium and zinc toxicity to flagfish, *Jordanella florida*, J. Fish Res. Bd. Can., 33, 1939-1945.
- SPEHAR R.L., CARLSON A.R., 1984, Derivation of site-specific water quality criteria for cadmium and the St. Louis river basin, Duluth, Minnesota, Environ. Toxicol. Chem., 3, 651-665.
- SPOOR W.A., 1984, Oxygen requirements of larvae of smallmouth bass, *Micropterus dolomieu* Lacepede, J. Fish. Biol., 25, 587.
- SPRAGUE J.B., 1985, Factors that modify toxicity in Fundamentals of Aquatic Toxicology, p.124-163, RAND G.M. et PETROCELLI S.R. (éds.), Hemisphere publishing corporation, New York, 1ère édition.
- STEGEMAN J.J., 1979, temperature influence on basal activity and induction of mixed function oxygenase activity in *Fundulus heteroclitus*, J. Fish Res. Bd. Can., 36, 1400-1405.
- STEINBERG C., KETTRUP A., 1992, Bewertung von tensiden (LAS) in der aquatischen umwelt über quantitative strukturwirkungsbeziehungen, Zeitschrift für Wasser und Abwasser Forshung, 24, 229-298.
- STEPHAN C.E., 1989, Topics expressing and predicting results of life cycle tests, Aquatic Toxicology and Environmental Fate, ASTM, STP 1007 G, 263-272.

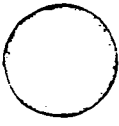









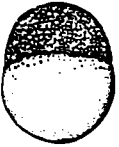

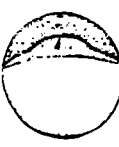


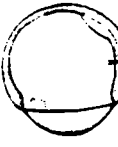



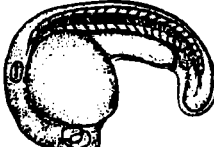
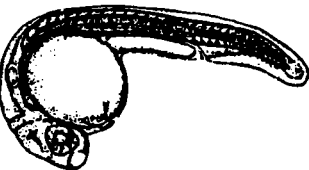
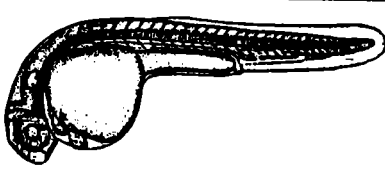
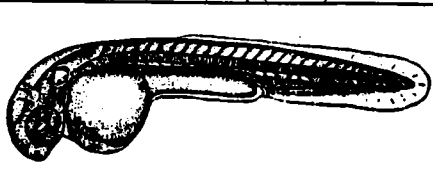
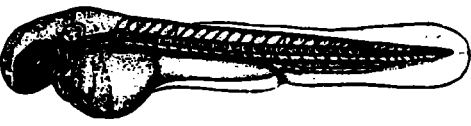

- STOUTHART A.J.H.X., SPANINGS F.A.T., LOCK R.A.C., WENDELAAR BOGA S.E., 1995, Effects of water pH on chromium toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*), Aquatic Toxicol., 32, 31-42.
- STRACHAN N.J.C., NESVADBA P., ALLEN A.R., 1990, Fish species recognition by shape analysis of images, Pattern Recognition, 23, 539-544.
- SULLIVAN J.F., ATCHINSON G.J., KOLAR D.J., Mc INTOSH A.W., 1978, Changes in the predator-prey behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*) and largemouth bass (*Micropterus salmoides*) caused by cadmium, J. Fish Res. Bd. Can., 35, 446-451.
- SUTER G.W., ROSEN A.E., LINDER E., PARKHURST D.F., 1987, Endpoints for responses of fish to chronic toxic exposures, Environ. Toxicol. Chem., 6, 793-809.
- SWISHER R.D., O'ROURKE J.T., TOMLINSON H.D., 1964, Fish bioassays of linear alkylate sulfonates (LAS) and intermediate biodegradation products, The Journal of the American Oil Chemist Society, 41, 746-752.
- TANA J., NIKUNEN E., 1986, Impact of pulp and paper mill effluent on egg hatchability of pike (*Esox lucius* L.), Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36, 738-743.
- TERVER D., 1980, Manuel d'aquariologie - vol 1: L'aquarium - eau douce - eau de mer, Réalisations Editoriales Pédagogiques, Paris, 303 p.
- THOUMELIN G., 1991, Presence et comportement dans le milieu des alkylbenzenesulfonate linéaire (LAS) et des alkylphenols éthoxyles (APE); mise au point, Environ. Technol., 12, 1037-1045.
- THURSTON R.V., 1984, Chronic toxicity of ammonia to rainbow trout, Trans. Am. Fisch. Soc., 113, 56-73.
- THURSTON R.V., PHILLIPS G.R., RUSSO R.C., 1981, Increased toxicity of ammonia to rainbow trout (*Salmo gairdnerii*) resulting from reduced concentrations of dissolved oxygen, Can. J. Fish Aquat. Sci., 38, 983-988.
- THURSTON R.V., RUSSO R.C., MEYN E.L., ZAJDEL R.K., 1986, Chronic toxicity of ammonia to fathead minnows, Trans. Am. Fisch. Soc., 115, 196-207.
- THURSTON R.V., RUSSO R.C., SMITH C.E., 1978, Acute toxicity of ammonia and nitrite to cutthroat fry, Trans. Am. Fisch. Soc., 107, 361-368.
- TOVELL P.W.A., NEWSOME C., HOWES D., 1974, Effect of water hardness on the toxicity of an anionic detergent to fish, Water Res., 8, 291-296.
- Van Der WEIDEN M.E.J., CELANDER M., SEINEN W., Van Den BERG M., GOKSOYR M., FÖRLIN L., 1993, Induction of cytochrome P450 1A in fish treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin or chemically contaminated sediment, Environ. Toxicol. Chem., 12, 989-999.
- Van Der PUTTE I., LUBBERS J., 1981, Effect of pH on the acute toxicity of hexavalent chromium to rainbow trout, Aquatic Toxicol., 1, 129-142.
- Van LEEUWEN C.J., GRIFFIOEN P.S., VERGOUW W.H.A., MAAS-DIEPEVEN J.L., 1985, Differences in susceptibility of early life stages of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants, Aquatic Toxicol., 7, 59-78.
- Van LEEUWEN C.J., GROOTELAAR E.M.M., NIEBEEK G., 1990, Fish embryos as teratogenicity screens: a comparison of embryotoxicity between fish and birds, Ecotox. Environ. Saf., 20, 42-52.
- VASSEUR P., FERARD J.-F., BABUT M., 1991, The biological aspects of the regulatory control of industrial effluents in France, Chemosphere, 22, 625-633.
- VERNIER, 1992, L'environnement, collection Que sais-je?, Presses universitaires de France éd., Paris, 2ème édition, 128p.
- VERSHUEREN K., 1983, Handbook of environmental data on organic chemicals, Van Nostrand Reinhold Company Inc., New York, 2ème édition, 1310 p.

- VICTOR B., MAHALINGAM S., SARAJINI R., 1986, Toxicity of mercury and cadmium on oocyte differentiation and vitellogenesis of the teleost, *Lepidocephalichthys termalis* (bleeker), J. Environ. Biol., 7, 209-214.
- VODICNICK M.J., PETERSON R.E., 1985, The enhancing effect of spawning on elimination of a persistent polychlorinated biphenyl from female yellow perch, Fundam. Appl. Toxicol., 5, 770-776.
- Von WESTERNHAGEN, H., 1988, Sublethal effects of pollutants on fish eggs and larvae in Fish physiology ; vol. XI : The physiology of developing fish; Part A: Eggs and larvae, p.253-346, HOAR W.S., RANDALL D.J. (éds), Academic Press, INC, San Diego.
- WANNEMACHER R., REBSTOCK A., KULZER E., SCHRENK D., BOCK K.W., 1992, Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on reproduction and oogenesis in zebrafish (*Brachydanio rerio*), Chemosphere, 24, 1361-1368.
- WARD G.S., BALLANTINE L., 1985, Acute and chronic toxicity of atrazine to estuarine fauna, Estuarine Research Fauna, 8, 22-27.
- WEIS P., WEIS J.S., 1976, Abnormal locomotion associated with skeletal malformation in the sheepshead minnow, *Cyprinodon variegatus*, exposed to malathion, Environ. Res., 12, 196-200.
- WEIS P., WEIS J.S., GREENBERG A., 1989, Treated municipal wastewaters: effects on development and growth of fishes, Marine Environ. Res., 28, 527-532.
- WESTIN D.T., OLNEY C.E., ROGERS B.A., 1983, Effects of parental and dietary PCBs on survival growth, and body burdens of larval striped bass, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30, 50-57.
- WHALE G.F., SHEPPARD A.N., JARRET F.M., LEE S.A., 1993, Application of image analysis to score oyster (*Crassostrea gigas*) embryo toxicity tests, Poster au premier congrès mondial de la SETAC (Lisbonne, 28-31 Mars 1993).
- WILLIAMS D.T., 1973, Dibutyl and di(-2-ethylhexyl)phthalate in fish, J. Agr. Food. Chem., 21, 1128-1129.
- WOLTERING D.M., 1984, The growth response in fish chronic and early life stage tests: a critical review, Aquatic toxicol., 5, 1-21.
- WONG C.K., WONG P.K., 1990, Life table evaluation on the effects of cadmium exposure on the freshwater cladoceran, *Moina macrocopa*, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 44, 134-141.
- Workshop on sediment toxicity assessment - Guidance document on sediment toxicity tests and bioassays for freshwater and marine environments, Renesse (Pays-Bas), 8 - 10 Nov. 1993, HILL I.R., MATTHIESSEN P., HEIMBACH F. (éds.), SETAC, 105 p.
- YONEZAWA Y., NAKATA K., MIYAKOZAWA Y., OCHI A., KOWATA T., FUKAWA H., SATO Y., MASUNAGA S., URUSHIGAWA Y., 1993, Distribution of butyltins in the surface sediment of Ise bay, Japan, Environ. Toxicol. Chem., 12, 1175-1184.

# Annexe 1

## Table d'identification chronologique des stades embryonnaire-larvaires du danio zébré (*Brachydanio rerio* H.B.) d'après Hisaoka et Battle (1958)

NB: - les temps indiqués correspondent au délai post-fertilisation pour une incubation à 26°C  
 - les embryons sont représentés sans leur chorion et dans un même plan à partir du stade 21

				
1 - ovule juste fécondé	2 - blastodisque, 1 cellule (25min.)	3 - 2 cellules (35min.)	4 - 4 cellules (43min.)	5 - 8 cellules (1h.11)
				
6 - 16 cellules (1h.30)	7 - 32 cellules (1h.45)	8 - clivage avancé (1h.50)	9 - blastula haute jeune (2h.11)	10 - blastula haute avancée (2h.33)
				
11 - blastula plate (3h.32)	12 - blastula avancée (4h.07)	13 - jeune gastrula, début d'épibolie (4h.56)	14 - blastoderme enveloppant 1/3 du vitellus (5h.48)	15 - blastoderme enveloppant 1/2 du vitellus (6h.45)
				
16 - blastoderme enveloppant 3/4 du vitellus (9h.42)	17 - fermeture du blastopore, 1-2 somites (10h.)	18 - vésicules optiques, 6 somites (14h.)	19 - placodes auditives, 14 somites (20h.)	20 - formation des yeux, 21 somites (24h.)
				
21 - formation des otholites, 31 somites (27h.)	22 - apparition des pigments rétiniens, 32 somites (37h.)	23 - apparition de la pigmentation du corps, 33 somites (49h.)		
				
24 - développement des xanthophores, 34 somites (72h.)	25 - larve nouvellement éclos, 34 somites (96h.)			
taille ≈ 3,3mm				

## **Annexe 2**

## Influence of the Sample Preservation Mode to Assess the Chronic Toxicity of an Industrial Effluent

STÉPHANE NAUDIN,\* JEANNE GARRIC,\* ERIC VINDIMIAN,\* MARC BRAY,\* BERNARD MIGEON,\*  
BERNARD VOLLAT,\* AND G. LENON†

\*CEMAGREF, Laboratory for Ecotoxicology, 3 bis, quai Chauveau, 69336 Lyon Cedex 09, France; and †CTP, BP 251,  
38044 Grenoble Cedex 09, France

Received January 6, 1994

To improve the preservation of effluent samples, the contribution of refrigeration, freezing, and freeze-drying techniques to maintain the toxic characteristics of the samples was evaluated. To achieve this evaluation one acute test, three long-term toxicity tests, a biochemical test (P450 induction), and a mutagenicity test (Ames test) were used on the same industrial effluent. Refrigeration and freezing demonstrated a similar capacity of preservation. However, freezing should be recommended when the delay between sampling and the start of the bioassay exceeds 48 hr. Freeze-drying did not prove to be useful in that case but this could be due to methodological problems. Nevertheless, this technique allowed the detection of mutagenic compounds because of its aptitude to concentrate effluent samples. For the toxic evaluation of the samples the advantages of the use of a battery of biotests were confirmed and it was noted that the cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) reproduction test and the algal (*Selenastrum capricornutum*) growth test had a higher sensitivity within the three tests used. © 1995 Academic Press, Inc.

### INTRODUCTION

Assessing the impact of industrial effluents on aquatic ecosystems needs the use of well-designed biotests. In addition to on-site monitoring strategies, a variety of laboratory bioassays have been increasingly used to control the toxicity of domestic, agricultural, or industrial wastewaters. Moreover, these tests using bioindicator species at different trophic levels are now considered as efficient and essential tools for predicting environmental hazards for aquatic ecosystems (OECD, 1987). However, several methodological improvements are necessary. For instance, the toxicity of the effluent samples can change rapidly after sampling. This compromises the accuracy of the results obtained through laboratory toxicity tests.

Usually, before starting bioassays, wastewater samples are taken, transferred to the control laboratory, and stored. However, during transport and storage steps, the effluent samples from different industries demonstrated a rapid change of their initial toxic properties (De Zwart

and Folkerts, 1990; Garric *et al.*, 1993). This toxicity variation can be related to (photo)chemical and biological phenomena among which Lenore *et al.* (1989) mentioned:

—adsorption of certain organic compounds to the recipient walls;

—precipitation of certain compounds due to pH, temperature, redox potential changes;

—volatilization; and

—biodegradation by microorganisms present in the samples. These toxicity changes can be of concern when chronic toxicity tests (which can last up to 15 or 30 days) are conducted.

For this reason, laboratories following U.S. EPA guidelines start their bioassays 36 hr, at the most, after sampling. A new sample is taken every 48 hr and shipped refrigerated to the laboratory (by aircraft if necessary) until the end of the test (Peltier, personal communication).

This ideal scheme is not always possible for most control laboratories. The present work was carried out to evaluate the efficiency of different preservation techniques (refrigeration, freezing, freeze-drying) for the conservation of the toxic properties of effluent samples.

Two effluent samples were taken and preserved as listed above. Relevant and sensitive biotests were carried out on the subsamples: Microtox (Vasseur *et al.*, 1984; Bulich *et al.*, 1981), *Brachydanio rerio* 11-day embryolarval stage test (Dave *et al.*, 1987; Norberg-King, 1989), *Ceriodaphnia dubia* 7-day reproduction and survival test (EPA, 1991; Mount and Norberg, 1984), *Selenastrum capricornutum* 7-day growth test (Eloranta and Laitinen, 1982), the Ames test detecting mutagenic compounds (Maron and Ames, 1983; Kamra *et al.*, 1983), and a monooxygenase (cytochrome P450-dependent) induction test (Oikari *et al.*, 1988).

Cytochrome P450 is responsible for the detoxication of xenobiotics by means of hydroxylation or deethylation of lipophilic compounds. In fish the P450IA1 isoenzyme is the only inducible form known. It has been proven to be inducible by planar aromatic compounds, PCBs, and di-

oxins (Stegeman, 1989; Andersson and Nilsson, 1989). The induction phenomenon reveals the first step of an intoxication by xenobiotics and gets an important toxicological significance. On the other hand, it can be used to detect the contamination of the environment by the micropollutants listed above and can be regarded as an "early warning system" of toxicological pollution (Payne *et al.*, 1987). This biochemical "tool" is particularly well adapted to monitor industrial wastewaters because these discharges are major sources of mixed contaminants to aquatic ecosystems (OECD, 1987; Blaise *et al.*, 1988) and are potential inducers of detoxication enzymes (Vindimian and Garric, 1989; Gagné and Blaise, 1993).

Before choosing toxicity tests several papers were reviewed to assess their relative sensitivity and ecological relevance. Several sensitivity comparisons between the Microtox test and other acute tests on invertebrates and fish point out that Microtox has a satisfactory sensitivity. In addition to its rapid response, the Microtox test often brings complementary information when the toxicity of effluents or chemicals is checked (Tarkpea and Hansson, 1989; Féraud *et al.*, 1983; Munkittrick *et al.*, 1991). However, Microtox seems to be a poor indicator of toxicity for certain effluents containing chemicals such as ammonia (Peltier, personal communication). The relevance of fish ELS tests and *Ceriodaphnia* survival and reproduction tests was demonstrated through correlations with field studies by Birge *et al.* (1989) and Eagleson *et al.* (1990), respectively. The algal growth test receives a large approval in terms of ecological relevance because of the key role of algae in the aquatic food web as primary producers. Thus, reduction of primary production through phytotoxicity can lead to major ecological disorder (Christensen and Scherfig, 1979). The three latter long-term toxicity tests are particularly valuable in this study because of their ability to detect low-level adverse effects of effluent samples.

## MATERIALS AND METHODS

### *Collection and Preservation of the Samples*

The focus was on an industrial plant known for the high level of organics present in its wastewaters. The samples were taken directly at the plant outflow (E1) and at the end of a sewage basin (E2). This sampling method allowed the checking of the efficiency of the preservation techniques on two rather different effluent samples (see global chemical characteristics in Table 3). Each sample was split into three subsamples which were stored at 4°C (refrigeration is the preservation mode generally used), frozen, or freeze-dried.

—Sample RE (refrigerated effluent) used polypropylene containers filled to the top to avoid aerobic degrada-

tion. The containers were stored at 4°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) in darkness;

—Sample FE (frozen effluent) used polyethylene bottles which were stored in a deep freezer at  $-26^\circ\text{C}$  ( $\pm 3^\circ\text{C}$ ). Before use, sample RE and FE were allowed to warm up (to assay temperature) in a water bath and agitated to resuspend solid particles. Except for the *S. capricornutum* growth test and the Ames test, the samples were not filtered prior to testing in order to take into account the potential bioavailable toxic organics adsorbed on solid particles;

—The sample FDE (freeze-dried effluent) procedure was carried out by a private firm because of the important volumes being treated. The resulting powder was packaged in plastic bags sealed under nitrogen gas atmosphere. The bags were stored at room temperature in the dark. Before use, the powdered samples were resuspended in ultrapure water and agitated for 30 min.

As soon as the effluent samples arrived at the laboratory (36 h after sampling, at the most), all tests on RE samples began, followed successively by the tests on FE, and then FDE samples. Hence, the storage time for FE sample was about 2 weeks before initiating the bioassays.

### *Acute Toxicity Test*

The acute bioassay performed was the Microtox test measuring the inhibition of bioluminescence of a marine bacteria *Photobacterium phosphoreum* after exposure to a liquid toxic sample. The test procedure followed AFNOR guidelines (AFNOR, 1991).

### *Long-Term Toxicity Tests*

*B. rerio* (zebrafish). An 11-day embryolarval stage test was carried out following the OECD test guidelines program "fish early life stage" toxicity test (OECD, 1992).

*C. dubia*. A 7-day reproduction and survival test was performed using the EPA (1991) test guidelines using M4 medium (Elenndt, 1990).

*S. capricornutum*. A 7-day growth test was carried out following the ISO (1989) test procedure.

### *Ames Test*

Mutagenic compounds were detected using the test methodology described by Ames *et al.* (1975) and Maron and Ames (1983).

### *P450 Induction Test*

The detoxification enzyme induction was measured by means of a cytochrome P450-dependent enzymatic activity of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in trout liver. The fish were first exposed to effluent by contact with the medium or through a single intraperitoneal injection.

Juvenile trouts (*Oncorhynchus mykiss*), weighing 3–5 g (6–8 cm in length), originating from a local hatchery were



allowed to acclimatize to laboratory conditions for at least 2 weeks. During that time, fish were fed *ad libitum* with pelleted food. Water temperature was maintained at 16°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ) and a 14/10 day/night photoperiod was used. The use of juveniles allows smaller effluent volume and reduces the influence of steroid hormones on the P450 induction which was demonstrated by Lindström-Seppä (1985).

**Experiments on sample RE and sample FE.** In polyethylene-coated aquaria, 5 groups of 10 trouts were exposed for 96 hr to 5% of the effluent RE and FE (renewed daily). These samples were first allowed to warm up to 16°C in a water bath.

**Experiment on sample FDE.** Five groups of 10 trouts were injected (intraperitoneally) with 100  $\mu\text{l}$  of five dilutions of effluent FDE resuspended in ultrapure water. This exposure mode allowed the use of small quantities of effluent. After injection, the trouts were kept for 4 days in polyethylene-coated aquaria, with the medium being renewed daily.

During all of these experiments, aquaria were continuously aerated. The fish density was about 12.5 g/liter, and trouts were fed with pelleted food (3% body wt/day). A positive control group of 10 trouts was added for each experiment by injection of a reference inducer:  $\beta$ -naphthoflavone (50 mg/kg) dissolved in peanut oil.

#### Preparation of Liver Homogenates

After the exposure period, trouts were sacrificed, weighed, measured, and dissected. The liver was removed, rinsed in 150 mM KCl, and homogenized in 100 mM phosphate buffer, pH 7.8, with 20% glycerol using a motor-driven Potter homogenizer. The homogenate was poured into 1.8-ml cryotubes and frozen in liquid nitrogen until all the liver samples were taken. The homogenates were then stored at  $-80^\circ\text{C}$  until the enzymatic assay.

#### Enzymatic Assay

Random samples of 32 homogenates were taken and thawed in a 4°C water bath. Each homogenate was then centrifuged at 9000 *g*, the pellet was discarded, and the supernatant (S9) was used for enzymatic assay. EROD activity was measured by a modified Pohl and Frouts (1980) procedure. The reaction mixture, 1 ml final volume, contained 100 mM phosphate buffer, 5  $\mu\text{M}$  NADPH, and 0.2  $\mu\text{M}$  ethoxyresorufine. The reaction was initiated by addition of 20  $\mu\text{l}$  S9 and stopped by addition of 2 ml acetone. The fluorescence was recorded at 547/585 nm excitation/emission wavelength by a Jobin-Yvon JY3D spectrofluorimeter calibrated with a solution of 5 ng/liter Rhodamine B. The protein content was measured by the method of Lowry *et al.* (1951) using a Sigma kit.

TABLE 1  
Microtox Test Results on Effluent 1 Sample after Several Days of Refrigeration

Day:	0	7	14	21
IC <sub>50</sub> (5 min) <sup>a</sup>	4.5%	11.8%	15.9%	19.7%
% Inhibition <sup>b</sup>	0	62.2	72	77.3

<sup>a</sup> Inhibition concentration (50%) for 5 min exposure; results are expressed in percentage of effluent in medium.

<sup>b</sup> Percentage inhibition of initial bioluminescence.

#### Data Analysis

Statistical analysis was carried out on a microcomputer using Toxstat 3.0 software (Gulley *et al.*, 1989). Hypothesis tests were used to obtain NOEC (no observable effect concentration) and LOEC (lowest observable effect concentration) values following the EPA (1991) flowchart for statistical analysis. Parametric tests (Dunnett's test and Bonferroni *T* test) and nonparametric tests (Steel's many-one rank test and Wilcoxon rank sum test with Bonferroni adjustment) were used. The underlying assumptions of the parametric or nonparametric tests were formally checked using the Shapiro-Wilk's test for normality and Bartlett's test for homogeneity of variance. If either of these tests failed, nonparametric tests were used. In each group of tests, the Bonferroni *T* test and Wilcoxon rank sum test with Bonferroni adjustment were used when the number of replicates was unequal. In addition, an IC<sub>p</sub><sup>1</sup> and IRC<sub>10</sub><sup>2</sup> estimate was calculated for each toxicity criterion (except algal growth) using a point estimation technique. For each kind of toxicity curve obtained, the most suitable theoretical model for the Bootstrap IC calculation method (Efron, 1981) was chosen. A nonlinear model derived from Hill (1910) was applied for ELS tests. Curve fitting was carried out using a laboratory-made Fortran program based on Marquardt (1963) algorithm and Bootstrap simulation (Garric *et al.*, 1990). Linear interpolation model was used for the results of both the Ceriodaphnia reproduction test and the P450 induction test. A modified Fortran program originating from the EPA was used in order to estimate confidence intervals on IC<sub>p</sub>s. Calculations were carried out using a VAX 4300 minicomputer.

## RESULTS

#### Acute Toxicity Change of Effluent Samples

Refrigerated effluent sample (RE1) was tested using Microtox on Days 0, 7, 14, and 21 after sampling. Acute

<sup>1</sup> Concentration leading to an inhibition of *p*% compared to the control level.

<sup>2</sup> Concentration leading to an induction rate of 10% (applied for the P450 induction test).

**TABLE 2**  
Microtox Results on Effluent 1 and 2 Samples

Sample	RE1	FE1	FDE1	RE2	FE2	FDE2
IC <sub>50</sub> (15 min) <sup>a</sup>	2.6	5.0	18.4	63.4	74.0	88.9

<sup>a</sup> Results are expressed in percentage of effluent in water.

toxicity results are reported in Table 1. A rapid toxicity decrease was observed mainly during the first week after sampling (62.2% drop). This result confirms previous findings concerning a fast change in toxic properties of refrigerated effluent samples.

Results on the different samples (see Table 2) indicate the following decreasing toxicity order: refrigeration > freezing > freeze-drying for both effluents. Between the two sets of samples a very different acute toxicity can be noted due to the primary treatment (sewage basin) between the two sampling sites. Table 3 reflects the influence of this treatment on the chemical characteristics of the effluent samples.

#### Long-Term Toxicity Change of Effluent Samples

*B. rerio* 11-day embryolarval stage test. Among the criteria measured by performing ELS tests (hatching rate, survival, growth), survival was the most sensitive for the effluents tested. The results are reported in Table 4.

LOEC, NOEC, and IC<sub>10</sub> results for effluent 1 are in accordance giving a similar toxicity to sample RE1 and FE1, with FDE1 being less toxic. According to IC<sub>50</sub> levels FE1 seems more toxic than RE1. This aspect will be discussed later.

All parameters for effluent 2 reveal a toxicity decrease between E1 and E2, with the average decrease factor being 5.5. LOEC and NOEC classify RE2 as being more toxic than FE2 which is as toxic as FDE2 (see Fig. 1). IC<sub>10</sub> and IC<sub>50</sub> obtained by the estimation technique make a distinction between FE2 and FDE2 toxicity indicating a decreasing toxicity order of RE2 > FE2 > FDE2.

*C. dubia* 7-day reproduction and survival test. Interpretation problems arose due to important interindividual

**TABLE 3**  
Global Chemical Characteristics of Effluent Samples

	Effluent 1	Effluent 2
pH	3.3	7.0
Conductivity $\mu$ S/cm	1520.0	1520.0
MES mg/liter	580.0	27.0
BOD mg/liter	165.0	55.0
COD mg/liter	215.0	170.0

variation for the reproduction rate. Furthermore, at the lowest effluent percentage, a reproduction stimulation was observed making IC<sub>10</sub> determination difficult. Results for this assay are reported in Table 5.

LOEC, NOEC, and IC<sub>50</sub> for effluent 1 are in accordance, giving RE1 as toxic as FE1, and both samples being more toxic than FDE1. LOEC values of RE1, derived from *B. rerio* and *C. dubia* assays are within a factor of 2 to 6.5 ratio of the LOEC values of FDE1.

An important interindividual variation for effluent 2 occurred in the control group. Only the results obtained with FE2 and FDE2 samples were considered. Their toxicity does not appear to be significantly different regarding the IC, LOEC, and NOEC values.

*S. capricornutum* 7-day growth test. The toxicity criterion used for this assay is the IC<sub>50</sub> for algal growth. Results are reported in Table 6. Effluent 1 and 2 indicated similar phytotoxicity except for the freeze-dried samples. FDE2 is much more harmful to algae than FDE1.

#### Ames Test

This test measures the mutagenic potency of toxicants using the frequency of reverse mutations observed in a bacterial colony. In Table 7 the ratios between the number of revertants observed from contaminated and control dishes are reported. A compound is considered as genotoxic when this ratio is equal to or greater than 2. For RE and FE samples, all the tests were negative except for RE1. "Concentrated" FDE samples were particularly genotoxic (i.e., the sample resuspension was made in a smaller amount of ultrapure water than the

**TABLE 4**  
Survival Impairment during Zebrafish Embryolarval Stage Test: Statistical Results on Effluent 1 and 2 Samples

Sample	RE1	FE1	FDE1	RE2	FE2	FDE2
IC <sub>10</sub>	8.2	5.9	11.6	43.6	53.5	66.8
Confidence interval	6.8-8.9	4.7-7.3	9.9-15.0	37.9-50.3	50.8-55.7	60.4-79.0
IC <sub>50</sub>	10.0	7.6	16.4	56.9	64.1	75.3
Confidence interval	9.8-10.2	6.7-8.6	14.9-19.0	53.7-59.6	61.8-65.5	67.0-86.0
LOEC	10	10	25	56	100	100
NOEC	4	4	10	32	56	56

Note. All results are expressed in percentage of effluent in water.

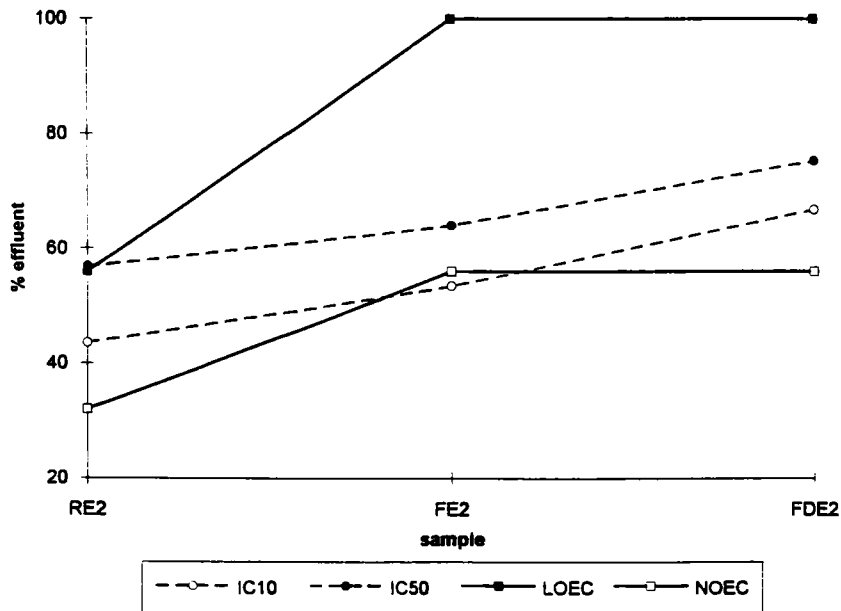


FIG. 1. Zebrafish embryolarval stage test: statistical results with effluent 2 samples.

initial sample volume leading to a 100-fold concentration).

#### P450 Induction Test

RE1, RE2, and FE2 were the only samples leading to a significant P450 enzyme induction rate. The effluent-inducing percentage was 80% for RE2 and 4% for RE1 (see Table 8). Although means of the contaminated groups were often higher than the control EROD level, statistical significance occurred for few groups because of important dispersion inside the same groups. The variation coefficients (CV%) were respectively 43 and 50.5% for the control and the contaminated groups. Such variation levels have already been found in previous studies and are lower than CV found in field studies (Vindimian *et al.*, 1991; Richert, personal communication). Concerning the FE2 result, it was not possible to freeze enough effluent to test higher than 32% (v/v). Although this percentage induced significantly EROD, care must be taken with this result ignoring the effect of 56 or 80% effluent, knowing that some effluent lead to a significant induction

at low effluent percentage in the medium which disappears at higher percentage (Gagné and Blaise, 1993).

Concerning the control groups (receiving a reference inducer injected) added to each experiment, no significant difference was observed between the EROD induction levels.

## DISCUSSION

#### Relative Sensitivity of Bioassays Carried Out

The aim of the comparison reflected in Fig. 2 is not to elect the most sensitive test. A single indicator cannot predict a toxic impact at different trophic levels of an ecosystem (Blaise *et al.*, 1987). This histogram illustrates how the different assays contribute to assess the toxicity of effluent samples depending on their preservation mode. It was decided to gather results (expressed in IC<sub>50</sub>) for Microtox, zebrafish, Ceriodaphnia, and algae tests. Both acute and long-term toxicity tests reveal similar responses for RE1 and FE1. FDE1 seems to be less toxic for all tests.

TABLE 5  
Reproduction Impairment during Ceriodaphnia Test: Statistical Results on Effluent 1 and 2 Samples

Sample	RE1	FE1	FDE1	RE2	FE2	FDE2
IC <sub>10</sub>	1.9	1.9	4.0	4.0	5.0	19.1
Confidence interval	ND	0.5–2.2	1.0–6.7	1.9–12.0	2.9–9.2	ND
IC <sub>50</sub>	2.9	3.9	13.6	20.3	25.9	26.8
Confidence interval	ND	3.4–4.9	10.5–15.3	9.5–39.8	23.5–28.0	ND
LOEC	4	4	25	56	32	32
NOEC	1.6	1.6	10	32	18	18

Note. All results are expressed in percentage of effluent in water. ND, not determined.

TABLE 6  
Algal Growth Test Results on Effluent 1 and 2 Samples

Sample	RE1	FE1	FDE1	RE2	FE2	FDE2
IC <sub>50</sub> (7 days)	7.1	9.1	21.3	7.3	9.5	6.8

Note. All results are expressed in percentage of effluent in water.

An important dispersion of the results is observable for effluent 2 samples. The most sensitive organism is the algae followed by Ceriodaphnia and finally bacteria and fish larvae with fairly similar responses.

Concerning the algae response, there does not seem to be any toxicity decrease between E1 and E2 as observed with the other tests. This indicates that algae are affected by specific phytotoxic compounds in the effluent 2 samples. As algae are primary producers, their impairment could give rise to a general impact on the ecosystem even if other species are resistant.

A review paper of Garric *et al.* (1993) demonstrated results provided by Canadian researchers concerning the toxicity of 35 industrial effluents discharging in the Saint Laurent River. The biotests used were a cladoceran (*C. dubia*) reproduction test, an algal (*S. capricornutum*) growth test, and the Microtox acute test. The sensitivity of the Ceriodaphnia test was the greatest in 45.9% of the samples followed by the algal test (37.8%) and the Microtox (16.2%). In accordance with the current study, this points out the necessity of using a battery of biotests to assess the ecotoxicity of an effluent.

#### Sample Freezing Versus Refrigeration

In a similar study, Larbaitg and Bonnefille (1988) compared the advantages of refrigeration and freezing in terms of preserving the toxic properties of nine industrial effluent samples. The toxicity after 0, 8, and 15 days of storage was determined with *Daphnia magna* acute lethality test. Their results indicate that no broad conclusions can be made and that a case-by-case investigation is necessary. However, no significant differences were observed between the two preservation modes in terms of toxicity changes. For the frozen samples, the authors noted in some cases precipitation phenomena and/or an important toxicity decrease or increase.

In this study, an investigation was made of the development of lethality during two long-term toxicity tests: zebrafish embryolarval test and Ceriodaphnia test with RE1 and FE1 in order to clarify the relative advantages of refrigeration and freezing in terms of sample conservation (Fig. 3). A stronger mortality with frozen effluents for both species can be observed. In accordance with the results obtained with Microtox and the algae growth test the assumption can be made that during refrigeration a continuous toxicity loss occurs (see Table 1), whereas the

TABLE 7  
Ames Test Results on Effluent 1 and 2 Samples

Sample	RE1	FE1	FDE1	RE2	FE2	FDE2
Revertant ratio <sup>a</sup>	2-4	ND <sup>b</sup>	>8	1	ND	1.5-2

<sup>a</sup> Number of revertants counted on contaminated dishes/number of revertants counted on control dishes.

<sup>b</sup> ND, not determined.

freezing process does reduce sample toxicity to a certain extent but this reduction is limited and does not extend with time.

Concerning other kinds of samples useful when assessing a toxic impact on the aquatic ecosystem, Schuytema *et al.* (1989) worked on sediment toxicity tests using an amphipod species (*Hyalella azteca*). They investigated the influence of sediment storage conditions (refrigeration or freezing) on the toxicity preservation of organochlorine-spiked sediment samples. Their results demonstrated a toxicity decrease when sediments were frozen for 14 days, probably due to a release of soluble organic carbon (SOC) from the sediments during freezing and thawing. The higher SOC could have led to a higher adsorption rate of organics and, therefore, to a lower toxicity.

#### Applicability of the Freeze-Drying Technique Relative to the Ames Test

The real advantage of the freeze-drying method appears mainly through this test in terms of detection capacity of potential mutagenic activities of wastewater samples by its concentration ability.

#### Meaning of the P450 Induction Results

The results obtained with FE1, FDE1, and FDE2 seem to indicate that compounds responsible for EROD induction were altered or modified by important temperature changes due to freezing or lyophilization.

Referring to the limited induction rate obtained with these samples, two remarks can be made:

—Exposing fish to effluents which are complex mixtures of organics and inorganic chemicals can produce interfering effects (antagonism, synergism) on the ex-

TABLE 8  
450 Induction Test Results on Effluent 1 and 2 Samples

Sample	RE1	FE1	FDE1	RE2	FE2	FDE2
IRC <sub>10</sub> <sup>a</sup>	3.5	ND <sup>b</sup>	ND	47.5	24.1	ND
Confidence interval	2.3-6.1	ND	ND	27.0-77.1	21.7-30.8	ND
LOEC	4	>10	>10	80	24	>80
NOEC	1.6	≥10	≥10	56	18	≥80

<sup>a</sup> Effluent concentration or percentage leading to 10% induction rate; all results are expressed in percentage of effluent.

<sup>b</sup> ND, not determined.

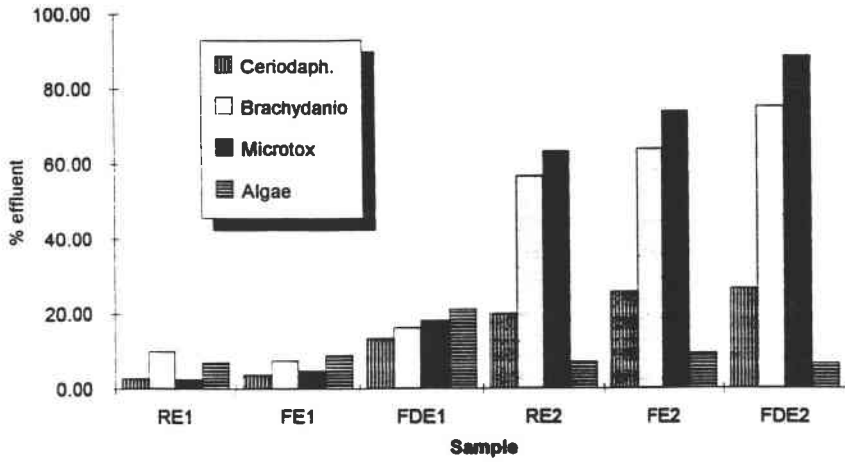


FIG. 2. Relative sensitivity of the bioassays carried out (results are expressed in IC<sub>50</sub>).

pression of specific biochemical induction responses. This was demonstrated in a previous study from this laboratory where organolead inhibited P450 induction (not published).

—No attempt was made to run time-course experiments to see whether more elevated induction rates could be obtained with longer exposure or higher effluent percentage as these optimal exposure conditions may de-

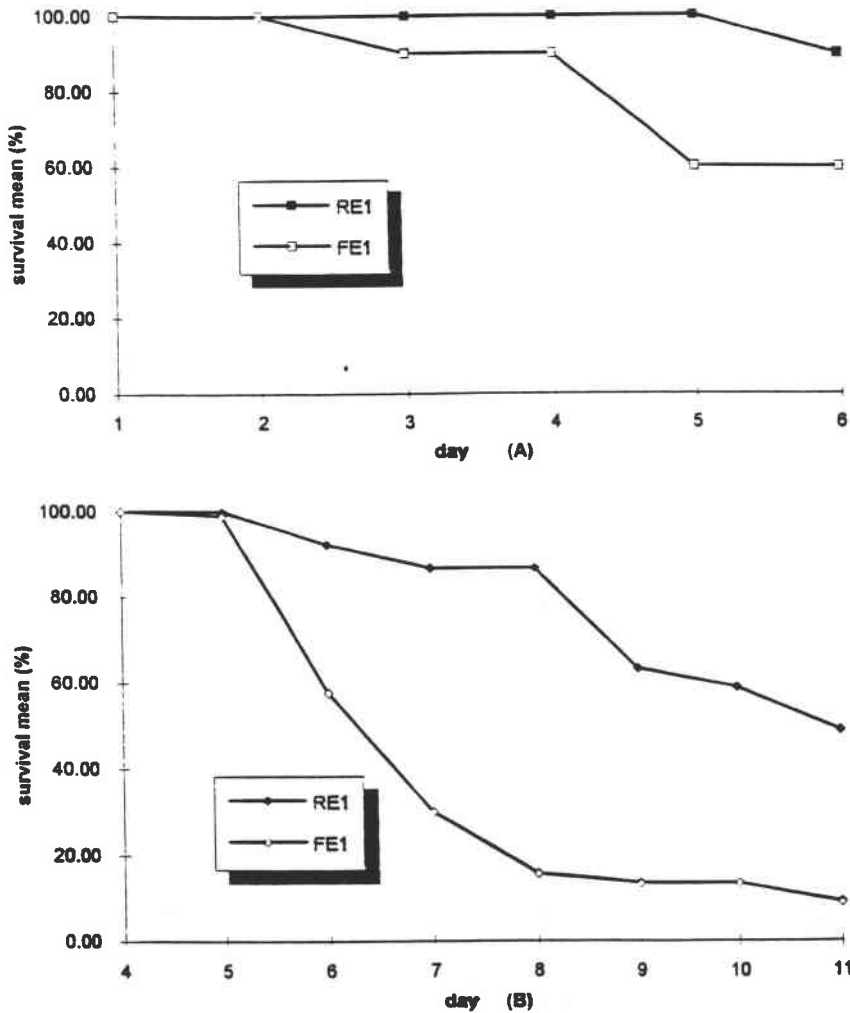


FIG. 3. Mortality during Ceriodaphnia (A) and Brachydanio (B) long-term toxicity tests with 10% RE1 and FE1 samples (v/v).

pend on the specific chemical composition of each effluent (Gagné and Blaise, 1993).

It is also important to note that these induction results cannot be directly compared to the long-term toxicity results previously obtained because P450-inducing compounds are not necessarily responsible for the observed long-term effects on zebrafish or *Ceriodaphnia*.

### CONCLUSIONS

The results of the different bioassays performed indicate that refrigeration and freezing maintain in a similar way the toxic properties of these effluent samples. However, for toxicity tests lasting 7 days or more, freezing should be preferred. The freeze-drying preservation technique did not demonstrate any advantage except for its concentration ability which allowed detection of mutagenic compounds at low level. This work confirmed the complementary information brought by a battery of biotests among which the *C. dubia* survival and reproduction test and the *S. capricornutum* growth test appeared the most sensitive to the toxic compounds found in the effluent studied.

The use of other preservation/concentration techniques (e.g., liquid-liquid extraction) or the search for better parameters of the lyophilization technique should be considered in order to find a convenient way to preserve and concentrate effluent samples. Studies of other kinds of effluents are necessary before definitive conclusions can be made.

### REFERENCES

- AFNOR (1991). *Détermination de l'inhibition de la luminescence de Photobacterium phosphoreum*. No. T90320, Paris.
- Ames, B. N., McCann, J., and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- Andersson, T., and Nilsson, E. (1989). Characterization of cytochrome P450 dependent activities in hagfish, dogfish, perch and spectacle caiman. *Comp. Biochem. Physiol. B* 94, 99-105.
- Birge, W. J., Black, J. A., Short, T. M., and Westerman, A. G. (1989). A comparative ecological and toxicological investigation of a secondary wastewater treatment plant and its receiving stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 437-450.
- Blaise, C., Van Coillie, R., Bermingham, N., and Coulombe G. (1987). Comparaison des réponses toxiques de trois indicateurs biologiques (bactéries, algues, poissons) exposés à des effluents de fabriques de pâtes et papiers. *Rev. Int. Sci. l'Eau* 3, 9-17.
- Blaise, C., Sergy, G., Wells, P., Bermingham, N., and Van Coillie, R. (1988). Biological testing—Development, application and trends in Canadian environmental protection laboratories. *Toxic. Assess.* 3, 385-406.
- Bulich, A. A., Greene, M. W., and Isenberg, D. L. (1981). Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents. In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference*. (D. R. Branson and K. L. Dickson, Eds.), ASTM STP 737, pp. 338-347. American Society for Testing and Materials.
- Christensen, E. R., and Sherfig, J. (1979). Effect of manganese, copper and lead on *Selenastrum capricornutum* and *Chlorella stigmatophora*. *Water Res.* 13, 79-82.
- Dave, G., Damgaard, B., and Grande, M. (1987). Ring test of an embryo-larval toxicity test with zebrafish (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.* 6, 61-71.
- De Zwart, D., and Folkerts, A. (1990). Monitoring the toxicity of organic compounds dissolved in Rhine water. *Hydrobiol. Bull.* 24, 5-12.
- Eagleson, K. W., Lenat, D. L., Ausley, L. W., and Winborne, F. B. (1990). Comparison of measured instream biological responses with responses predicted using the *Ceriodaphnia dubia* chronic toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1019-1028.
- Efron, B. (1981). Non-parametric estimates of standard error: The jack-knife, the bootstrap and other methods. *Biometrika* 68, 589-599.
- Elenet, B. P. (1990). Trace nutrients deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing: Effect of optimization of culture conditions on life history parameters of *Daphnia magna*. *Water Res.* 24, 1155-1167.
- Eloranta, V., and Laitinen, O. (1982). The usefulness of the *Selenastrum capricornutum* algal assay to evaluate the toxic effects of pulp and paper mill effluents in lake water. *Vatten* 3, 317-331.
- EPA (1991). *Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms*, 4th ed. EPA 600/4-90/027.
- Férard, J. F., Vasseur, P., Danoux, L., and Larbaigt, G. (1983). Application d'un test d'inhibition de luminescence bactérienne à l'étude toxicologique d'effluents complexes et de substances chimiques. *Rev. Française Sci. l'Eau* 2, 221-237.
- Gagné, F., and Blaise, C. (1993). Hepatic metallothionein level and mixed function oxidase activity in fingerling rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to pulp and paper mill effluents. *Water Res.*, in press.
- Garric, J., Migeon, B., and Vindimian, E. (1990). Lethal effects of draining on brown trout: A predictive model based on field and laboratory studies. *Water Res.* 24, 59-65.
- Garric, J., Vindimian, E., and Ferard, J. F. (1993). Ecotoxicology and wastewater: Some practical applications. *Aquat. Toxicol.*, in press.
- Gulley, D. D., Boelter, A. N., and Bergman, H. L. (1989). *Toxstat/Datasys Statistical Software, Release 3.0*. Department of Zoology and Physiology, University of Wyoming, Laramie, WY.
- Hill, A. V. (1910). The possible effects of aggregation of molecules of hemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* 40, 4-7.
- ISO (1989). *Freshwater Algal Growth Inhibition Test with Scenedesmus subspicatus and Selenastrum capricornutum*. International Standard 8692, International Organization for Standardisation, Geneva, Switzerland.
- Kamra, O. P., Nestmann, E. R., Douglas, G. R., Kowbel, D. J., and Harrington, T. R. (1983). Genotoxic activity of pulp mill effluent in Salmonella and *Saccharomyces cerevisiae* assays. *Mutat. Res.* 118, 269-276.
- Larbaigt, G., and Bonnefille, M. (1988). *Etude du mode de conservation optimal des échantillons destinés à la détermination des matières inhibitrices*. Report of the Rhône-Méditerranée-Corse Basin Agency. RT MPL 88 01.
- Lenore, S. C., Greenberg, A. E., and Trussel, R. R. (1989). *Standard methods for the examination of water and wastewaters*, 17th ed. APHA-AWWA-WPCF.
- Lindström-Seppä, P. (1985). Seasonal variation of the xenobiotic metabolizing enzyme activities in the liver of male and female vendace (*Coregonus albula* L.). *Aquat. Toxicol.* 6, 323-331.

- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 265-275.
- Maron, D. M., and Ames, B. N. (1983). Revised method for Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.* 88, 343-350.
- Marquardt, D. W. (1963). An algorithm for least squares estimation of non-linear parameters. *J. Soc. Ind. Appl. Math.* 11, 431-441.
- Mount, D. I., and Norberg, T. J. (1984). A seven-day life-cycle cladoceran toxicity test. *Environ. Toxicol. Chem.* 3, 425-434.
- Munkittrick, K. R., Power, E. A., and Sergy, G. A. (1991). The relative sensitivity of Microtox, daphnid, rainbow trout and fathead minnow acute lethality tests. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 6, 35-62.
- Norberg-King, T. J. (1989). An evaluation of the fathead minnow seven-day subchronic test for estimating chronic toxicity. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 1075-1089.
- OECD (1987). *Monographie sur l'environnement: Utilisation des tests biologiques pour l'évaluation et le contrôle de la pollution de l'eau.*
- OECD (1992). *Draft for Test Guidelines Program: Fish Early Life Stage-Toxicity Test.*
- Oikari, A., Lindström-Seppä, P., and Kukkonen, J. (1988). Subchronic metabolic effects and toxicity of a simulated pulp mill effluent on juvenile lake trout (*Salmo trutta m. lacustris*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 16, 202-218.
- Payne, J. F., Fancey, L. F., Rahimtula, A. D., and Porter, E. L. (1987). Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comp. Biochem. Physiol.* 86C, 233-245.
- Pohl, R. J., and Frousts, J. R. (1980). A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Anal. Biochem.* 107, 150-155.
- Schuyttema, G. S., Nebeker, A. V., Griffis, W. L., and Miller, C. E. (1989). Effects of freezing on toxicity of sediments contaminated with DDT and endrin. *Environ. Toxicol. Chem.* 8, 883-891.
- Stegeman, J. J. (1989). Cytochrome P450 forms in fish: Catalytic, immunological and sequence similarities. *Xenobiotica* 19, 1093-1110.
- Tarkpea, M., and Hansson, M. (1989). Comparison between two Microtox test procedures. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 18, 204-210.
- Vasseur, P., Ferard, J. F., Vial, J., and Larbaigt, G. (1984). Comparaison des tests Microtox et Daphnie pour l'évaluation de la toxicité aiguë d'effluents industriels. *Environ. Poll.* 34A, 225-235.
- Vindimian, E., and Garric, J. (1989). Freshwater fish cytochrome P450-dependent enzymatic activities: A chemical pollution indicator. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 18, 277-285.
- Vindimian, E., Namour, P., Migeon, B., and Garric, J. (1991). *In situ* pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish: Barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aquat. Toxicol.* 21, 255-266.

## **Annexe 3**



# TOXICITE DES SEDIMENTS DU BASSIN VERSANT DU STANG ALAR DETERMINEE PAR UNE BATTERIE DE BIO-ESSAIS

## TOXICITY OF SEDIMENTS FROM THE STANG ALAR WATERSHED ASSESSED BY A BATTERY OF BIOASSAYS

Stéphane NAUDIN (1), Michel PARDOS (2), Françoise QUINIOU (3)

(1) Laboratoire d'Ecotoxicologie, CEMAGREF, 3 bis quai Chauveau, 69336 Lyon Cedex 09, France (2) Institut F.-A. FOREL, 10 route de Suisse, 1290 Versoix, Suisse (3) Laboratoire d'Ecotoxicologie, IFREMER - Centre de Brest, B.P. 70, 29280 PLOUZANE, France

### RESUME

La toxicité de sédiments provenant de deux ruisseaux du bassin versant du Stang Alar, exposés à diverses contaminations, a été testée par un ensemble de bioessais aigus et chroniques en eau douce et en eau de mer. Les tests en eau douce ont porté sur l'activité photosynthétique d'une culture d'algue *Selenastrum capricornutum* et d'une communauté de phytoplancton du lac Léman, la survie du cladocère *Daphnia magna*, le développement embryon-larvaire du poisson *Brachydanio rerio*. En eau de mer, l'activité bioluminescente de la bactérie *Photobacterium phosphoreum* a été suivie, ainsi que le développement embryonnaire de l'huître *Crassostrea gigas*.

Les sédiments du ruisseau principal se révèlent plus contaminés par le plomb et le zinc et plus toxiques que ceux de son affluent (soumis à une pollution diffuse modérée). Les essais réalisés avec les sédiments entiers témoignent d'une plus forte toxicité qu'avec leurs extraits aqueux. La comparaison des réponses biologiques indique les meilleures sensibilité et discrimination du bio-essais utilisant la bactérie.

**Mots clés:** Stang Alar; batterie de bioessais; sédiment; toxicité; contamination.

### ABSTRACT

The toxicity of sediment samples taken along two streams of the Stang Alar watershed (under miscellaneous contaminations) was evaluated by several acute and chronic bioassays with freshwater and seawater organisms. Freshwater assays concerned the photosynthetic activity of an algal monoculture *Selenastrum capricornutum* and a natural phytoplankton community of lake Geneva, the survival of the cladoceran *Daphnia magna* and the embryolarval development of a fish *Brachydanio rerio*. Seawater assays were the Microtox test with the bacteria *Photobacterium phosphoreum* and an oyster *Crassostrea gigas* embryo stage test.

The sediments of the main stream showed a high contamination by lead and zinc as well as a greater toxicity compared to its tributary (under a low non-point source pollution). The toxicity was greater when the organisms were exposed to whole sediments compared to water extracts. The Microtox test lead to the better sensitivity and discriminatory ability among the different bioassays.

**Key words:** Stang Alar; battery of bioassays; sediment; toxicity; contamination.

## INTRODUCTION

Plusieurs études ont concerné, ces dernières années, la qualité des eaux du Stang Alar localisé à l'Est de la commune de Brest (figures 1 et 2). Ce petit cours d'eau possède avec son affluent le Keravilin, un bassin versant de 650 hectares, composé d'une zone très urbanisée au Nord-ouest, une zone industrielle au Nord, une zone agricole à l'Est et une zone pavillonnaire au Sud-ouest.

Un bilan initial de la qualité des eaux du Stang Alar a été effectué en 1993, à la fois au niveau physico-chimique et bactériologique; complété par un diagnostic des communautés d'invertébrés *in situ*. D'après cette étude, une importante perturbation d'origine chimique et bactériologique s'exerce sur le Stang Alar du fait de problèmes d'assainissement (eaux domestiques et pluviales) et à cause de ruissellements liés aux pratiques agricoles, aux activités industrielles et à la circulation automobile (BERNIER, 1993; PATRIS *et al.*, 1995). A l'échelle régionale, le cas de ce ruisseau s'ajoute aux apports contaminés d'autres cours d'eau qui contribuent à altérer l'écosystème marin de la rade de Brest.

Afin de contribuer au suivi de la qualité des eaux du Stang Alar, nous avons réalisé un certain nombre de bioessais sur des échantillons de sédiment en condition de laboratoire. Ce substrat est considéré comme un indicateur pertinent du degré de contamination du milieu, car il a tendance à se charger en contaminants organiques et inorganiques à partir de l'eau circulante. Ceci est lié aux propriétés fixatrices des argiles et de la matière organique (GOLTERMAN *et al.*, 1983). De cette manière, les sédiments peuvent garder les traces d'une pollution hydrique ancienne. De plus, même lorsque la pollution circulante a été maîtrisée, le lessivage des sédiments par percolation peut transférer des contaminants à la colonne d'eau et aux nappes profondes (BOUCHE, 1993).

Figure 1: localisation de la zone d'étude

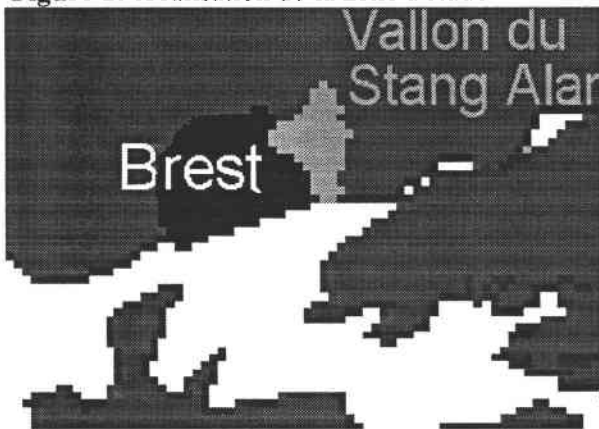
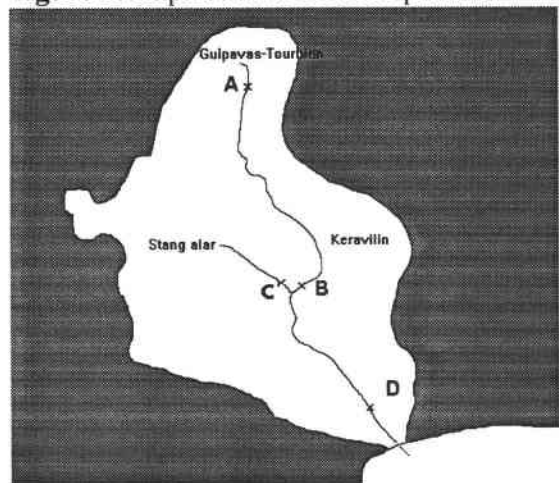


Figure 2: emplacement des sites prélevés



Nous avons effectué une analyse chimique et biologique de sédiments prélevés en quatre sites (A, B, C et D) sur le Stang Alar et le Keravilin (figure 2).

Le choix des espèces bioindicatrices que nous avons utilisées a été guidé par les considérations suivantes (PARDOS *et al.*, 1994):

- la nécessité d'utiliser des organismes de niveaux d'organisation différents, pour favoriser la mise en évidence de composés toxiques ayant des mécanismes d'action spécifiques (inhibition de la photosynthèse par exemple),
- le souhait de prendre en compte plusieurs voies d'exposition des organismes aux substances toxiques potentielles: contact avec le sédiment, ingestion du sédiment, exposition à l'eau (eau surnageante ou extrait aqueux),

- la nécessité de mettre en évidence un impact écotoxicologique aigu (comme le test bactérien) et subchronique (l'essai sur l'éclosion et la survie d'un poisson par exemple),
- la nécessité de travailler avec des tests standardisés pour permettre une comparaison avec les données de la littérature.

Les bioessais retenus ont porté sur:

- l'assimilation de carbone (activité photosynthétique) d'une monoculture algale (*Selenastrum capricornutum*) et d'une population de phytoplancton naturelle, prélevée dans le lac de Genève,
- l'inhibition de la bioluminescence de la bactérie *Photobacterium phosphoreum* (test Microtox®),
- la survie et la croissance du microcrustacé *Daphnia magna*,
- le développement embryonnaire de l'huître *Crassostrea gigas* (milieu marin),
- le développement embryo-larvaire du poisson d'eau douce *Brachydanio rerio* (ou danio zébré).

En vue d'évaluer le potentiel toxique de sédiments, les essais utilisables peuvent porter sur le sédiment entier, l'eau interstitielle, les extraits aqueux et organiques; chaque protocole ayant ses avantages et ses limites (BOUCHE, 1993).

Pour notre étude, deux approches ont été adoptées: le contact direct des organismes avec le sédiment (sauf pour les essais sur algues) et leur exposition à un extrait aqueux, afin de préciser le potentiel toxique en relation avec le relargage de contaminants dans le cas d'une remise en suspension des sédiments (lors d'une crue par exemple).

## **MATERIEL ET METHODES**

### **Echantillons**

Des échantillons de sédiment superficiel (1 à 2 cm) du Stang Alar et du Keravilin ont été prélevés au mois de Juin 1994 en quatre sites comme représenté sur la figure 2 et conditionnés en flacon de verre, protégés de l'air par une pellicule d'eau. Les récipients sont fermés hermétiquement et conservés dans une glacière maintenue à basse température. Ces précautions sont destinées à limiter les transformations chimiques (e.g. oxydation, photolyse) et la biodégradation des composés potentiellement toxiques des échantillons.

Au laboratoire, chaque échantillon est tamisé (éliminations des débris et invertébrés de taille > 2mm), homogénéisé puis reconditionné en flacon de verre et enfin conservé à environ 4°C et à l'obscurité. Dans ces conditions, le stockage est limité à une semaine pour les essais sur sédiment entier et à 15 jours pour les essais sur extraits aqueux.

L'extrait aqueux est préparé à partir d'eau minérale "Volvic" qui possède des caractéristiques minérales compatibles avec les exigences de nos organismes d'essai d'eau douce. La méthode d'extraction consiste à mélanger une part volumétrique de sédiment humide avec quatre parts d'eau de Volvic. Le mélange est agité pendant une heure puis laissé à décanter pendant 2h. Le surnageant est alors centrifugé à 2000g pendant 20 minutes. Le nouveau surnageant obtenu est filtré à 0,45µm et employé tout de suite ou conservé à environ 4°C quelques heures jusqu'à la mise en oeuvre des bioessais (U.S. EPA/CORP. OF ENGINEERS, 1977).

## **Analyses physico-chimiques**

Simultanément aux prélèvements de sédiment, des échantillons d'eau de surface sont prélevés sur chacun des sites de manière à déterminer les paramètres physico-chimiques suivants: pH, conductivité, COT, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>≡</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Sur chaque échantillon de sédiment, le poids sec est déterminé par séchage à l'étuve (24h. à 105°C). Une analyse de la matière organique par calcination (60mn. à 550°C), du phosphore total (PT) et du phosphore inorganique non apatitique (PINA, correspondant à la fraction biodisponible du phosphore) selon la méthode de WILLIAMS et *al.* (1976) sont également réalisées.

La distribution granulométrique des sédiments est mesurée à l'aide d'un granulomètre à laser. Les métaux lourds (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) sont dosés par spectrométrie d'émission atomique à couplage inductif, après minéralisation des échantillons.

## **Bioessais**

Les organismes d'essai décrits dans ce paragraphe ont été exposés à différentes dilutions d'extrait aqueux ou de sédiment (i.e. quantité variable de sédiment pour un volume fixe de milieu). Les milieux ne sont pas renouvelés au cours des essais.

### ***Essai sur l'activité photosynthétique algale***

Du phytoplancton est prélevé au niveau d'une station de référence du lac Léman en filtrant des échantillons d'eau issus d'une profondeur allant de 0 et 10 mètres. Un tamisage à 20 microns permet de ne retenir que le nanoplancton, considéré comme la fraction la plus sensible aux effets toxiques. Une culture d'algue *S. capricornutum* est également utilisée pour ce test selon les recommandations de l'U.S. EPA (1989).

L'activité photosynthétique de ces algues en présence d'extrait aqueux est mesurée par l'intermédiaire de leur assimilation de carbone-14 (FITZWATER et *al.*, 1982). Le carbone assimilé à la fin de la période d'incubation peut être évalué à partir des quantités de carbone inorganique dissous (carbone-12 disponible) et de carbone-14 ajoutée à la solution.

Les algues phytoplanctoniques sont exposées durant 4 heures à l'échantillon à tester (extrait aqueux) avant la mesure (SANTIAGO et *al.*, 1993). Pour la monoculture, le traceur est présent sur la même durée mais après 20 heures d'exposition, ceci pour compenser sa moindre sensibilité.

### ***Test Microtox***

Cet essai, développé initialement par BULICH et *al.*(1981) pour évaluer la toxicité de substances chimiques, a été adapté pour estimer la toxicité de sédiment (technique de la "phase-solide" décrite par MICROBICS CORPORATION en 1992) ou de leur extraits aqueux (SCHIEVE et *al.*,1985).

### ***Essai sur le développement embryonnaire de l'huître creuse***

Les stades précoces des bivalves marins sont bien connus pour leur très grande sensibilité aux substances toxiques, telles que les pesticides, les détergents, les métaux lourds, les phytotoxines ou les effluents industriels (DAVIS et HIDU, 1969; MARTIN et *al.*, 1981; BEIRAS et HIS, 1994).

La toxicité de sédiments ou d'extraits aqueux est évaluée en déterminant le pourcentage de larves "D" anormales obtenues après une incubation d'oeufs fécondés durant 24 heures dans les milieux à tester. Une larve est normale lorsque sa coquille a la forme régulière d'un "D" et qu'elle peut contenir l'animal entier lors de la fermeture des valves. Les résultats sont exprimés en Pourcentage Net d'Anomalies (PNA).

$$PNA = \frac{\% \text{ larves anormales dans essai} - \% \text{ larves anormales dans témoin}}{100 - \% \text{ larves anormales dans témoin}} \times 100$$

### ***Essai sur la survie et la croissance d'un microcrustacé***

Cet essai consiste à mesurer la toxicité d'un mélange eau/sédiment ou d'un extrait aqueux vis-à-vis de jeunes daphnies (âgées de moins de 24h.). Les critères de toxicité relevés sont la survie et le taux de croissance à la fin des 72 heures d'exposition. Les mortalités sont enregistrées quotidiennement. Au terme de l'essai, les daphnies survivantes sont récupérées et mesurées individuellement (du sommet de la tête à la base de l'épine caudale). Dans le cas de l'exposition au sédiment entier, aucune nourriture n'est apportée, les organismes se nourrissant à partir de particules en surface du sédiment ou en suspension. Par contre lors des essais sur extraits aqueux, des algues (chlorelles) en quantités définies sont ajoutées quotidiennement aux milieux.

### ***Essai sur le développement embryon-larvaire d'un poisson***

L'essai embryon-larvaire sur le danio zébré repose sur la mesure des taux d'éclosion et de survie larvaire (DAVE et al., 1987). Il peut être adapté à l'évaluation de la charge toxique des sédiments en s'inspirant du protocole de DAWSON et al. (1988) développé sur une autre espèce de cyprinidé: le vairon tête-de-boule. La toxicité d'un mélange eau/sédiment ou d'un extrait aqueux est évaluée à partir du stade embryonnaire sur une durée de 7 jours sans nourrissage des larves. Les oeufs "blancs" (oeufs non-fécondés ou embryons morts) qui apparaissent après 24 heures d'incubation sont comptabilisés et éliminés.

## **RESULTATS ET DISCUSSIONS**

De manière à pouvoir comparer tous les résultats, ceux-ci ont été exprimés en gramme de sédiment sec par litre. Pour les essais sur extraits aqueux, ces résultats tiennent compte du pourcentage d'extrait ajouté et de la quantité de sédiment extraite.

### **Analyse physico-chimiques**

#### ***Analyse de l'eau superficielle***

L'analyse des eaux de surface (tableau 1) indique une qualité relativement bonne. On relève néanmoins des teneurs en nitrate et en carbone organique total importantes. Ces dernières peuvent avoir pour origine la présence d'algues à l'époque du prélèvement (mi-Juin) ou bien une teneur élevée en acides humiques. Le prélèvement d'eau a été effectué après une période relativement sèche ce qui peut expliquer la quasi uniformité des valeurs mesurées sur les différents sites.

**Tableau 1:** analyses physico-chimiques des eaux de surface prélevées sur les différents sites (valeurs exprimées en mg/l)

Site	A	B	C	D
pH	7,7	6,4	6,4	7,3
Conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )	250	306	301	314
COT	6,80	5,65	5,25	5,95
$\text{PO}_4^{\equiv}$	0,06	0,06	0,06	0,06
$\text{NO}_2^-$	0,03	0,07	0,07	0,30
$\text{NO}_3^-$	31,5	36,0	29,0	45,0
$\text{NH}_4^+$	0,02	0,03	< 0,02	0,02
$\text{NH}_3$	$3,4 \times 10^{-4}$	$2,6 \times 10^{-5}$	$< 1,7 \times 10^{-5}$	$1,4 \times 10^{-4}$

### Analyse du sédiment

La distribution granulométrique des différents sédiments est relativement proche (tableau 2). Les particules les plus fines sont trouvées en D et les plus grossières en B.

Les teneurs en matière organique sont homogènes entre les sédiments avec un maximum de 11,4% pour le site C.

Il sera donc possible de comparer directement les toxicités et les contaminations mesurées sur les différentes stations échantillonnées, sans tenir compte de l'influence de la granulométrie et de la teneur en matière organique.

**Tableau 2:** granulométrie et teneurs en matière organique des sédiments

Site	A	B	C	D
Moyenne ( $\mu\text{m}$ )	42,1	45,3	39,1	31,7
Int. conf. 95% ( $\mu\text{m}$ )	32,4-54,7	34,4-59,6	29,9-51,2	24,4-41,3
Médiane ( $\mu\text{m}$ )	47,2	51,8	42,8	34,9
Mat.org. %	9,0	9,8	11,4	9,2

Int. conf. 95%: intervalle de confiance 95%

Mat. org. %: pourcentage de matière organique

Les résultats du tableau 3 indiquent que les sédiments les plus contaminés en métaux (C et D) sont également les plus riches en phosphore. La fraction biodisponible de ce nutriment (PINA) va de 41,4 à 43,7% du PT pour les sites A, B et C et est de 57,3% pour le sédiment D.

**Tableau 3:** teneurs (exprimées par rapport au poids sec) en métaux lourds et phosphore des sédiments étudiés

Site	A	B	C	D	Valeur réf.
<b>Cu</b> (mg/kg)	24	32	<b>180</b>	70	20
<b>Pb</b> (mg/kg)	47	79	<b>395</b>	<b>138</b>	20
<b>Zn</b> (mg/kg)	212	260	<b>1294</b>	<b>497</b>	75
<b>Ni</b> (mg/kg)	30	27	43	30	10
<b>Cr</b> (mg/kg)	38	39	57	38	25
<b>PT</b> (mg P/kg)	556	848	1791	1248	-
<b>PINA</b> (mg P/kg)	230	367	783	715	-

Valeur réf.: valeurs de référence pour les sédiments d'après l'Office International de l'Eau (1993)

PT: phosphore total

PINA: phosphore inorganique non apatitique

D'après les valeurs de référence en métaux des sédiments (Office International de l'Eau, 1993), les dépôts montrant un facteur de contamination (valeur mesurée / valeur référence) supérieur à 6 sont:

- le site C pour le Pb (19,8), le Zn (17,3) et le Cu (9),
- le site D pour le Pb (6,9) et le Zn (6,6).

Ces niveaux de contamination élevés, particulièrement pour le Pb, Zn et Cu sont à mettre en rapport avec les concentrations métalliques de la colonne d'eau lors d'épisodes pluvieux. Par exemple, PATRIS et al. (1995) ont mesuré des valeurs en Zn de 3200 $\mu\text{g/l}$ , en Pb de 141 $\mu\text{g/l}$  et en Cu de 134 $\mu\text{g/l}$  lors d'un événement pluvieux le 6/12/94.

Ces analyses permettent de classer les sédiments selon un ordre de contamination croissant de la façon suivante:  $A \approx B < D < C$

## Résultats des bioessais

L'amplitude des réponses mesurées au terme des différents essais a été inférieure à 50% dans la plupart des cas. Ce critère (50% d'effet) n'a donc pas pu être retenu. Les résultats des essais sur daphnie et poisson ont été exprimés sous forme de CMEO (Concentration Minimale avec Effet Observé) soit la plus faible concentration en sédiment qui provoque un effet inhibiteur significatif par rapport au témoin (déterminé statistiquement à l'aide de tests d'hypothèses).

Pour les autres essais et en considérant la variabilité naturelle des réponses mesurées, une toxicité potentielle a été attribuée aux niveau d'effet suivants:

- bactérie (Microtox): si inhibition  $\geq 15\%$
- *S. capricornutum* et phytoplancton: si inhibition  $\geq 10\%$
- huître: si PNA  $\geq 10\%$

**Tableau 4:** synthèse des résultats exprimés en g. de sédiment sec / litre

	Essai	Site			
		A	B	C	D
<b>Sédiment entier</b>	bactérie	48,7	5,1	1,2	0,58
	huître	1,6	1,35	1,15	0,12
	daphnie	> 55,6	> 44,2	> 60,7	> 54,8
	poisson	> 55,6	> 44,2	15,17	> 54,8
<b>Extrait aqueux</b>	bactérie	34,7	32,3	27,6	27,8
	huître	> 11,6	> 10,78	2,3	> 9,28
	daphnie	> 83,1	ND	> 73,6	> 68,4
	poisson	> 83,1	ND	> 73,6	> 68,4
	monoculture algale	> 89,5	> 76,4	60,7	> 44,4
	phytoplancton	> 42,6	> 36,4	28,9	31,7

Les valeurs de CMEO sont exprimées en gramme de sédiment sec par litre; rappelons que plus la CMEO est faible, plus la toxicité est importante.

ND: non déterminés

Les informations du tableau 14 montrent que lorsque les organismes sont en contact direct avec le sédiment, les effets qu'ils subissent apparaissent plus importants que lorsqu'ils sont exposés aux extraits aqueux des échantillons. Pour le test Microtox, ces résultats sont confirmés par BROUWER et *al.* (1990) qui préconise la méthode d'exposition directe au sédiment entier, plus sensible aux composés hydrophobes qui ne seraient mobilisés que dans une faible proportion lors de l'extraction aqueuse. De plus, les contaminants solubilisés sont alors généralement présents en doses beaucoup plus faibles que dans les sédiments, et peuvent ne pas être sous leur forme la plus biodisponible. Néanmoins, l'extraction aqueuse permet d'évaluer la charge des sédiments en substances toxiques susceptibles d'être solubilisées lors d'une remise en suspension des particules.

Les niveaux de réponse sont très différents d'un essai à l'autre avec parfois des réponses pour un ou deux sites seulement et à des concentrations en sédiment importantes (essais sur les poissons en contact direct ou sur les algues). Aucun effet n'est mis en évidence pour les daphnies (dans la gamme de concentration testée) quel que soit le type d'exposition employé. A l'inverse, les bactéries et les huîtres ont été perturbées à de faibles teneurs en contact direct des sédiments.

La sensibilité des bioessais est une qualité nécessaire mais pas suffisante pour l'évaluation du degré de nocivité des échantillons. L'aptitude à différencier des niveaux de toxicité relativement proches est aussi indispensable pour toute analyse. Sur sédiment entier, les huîtres apportent les réponses les plus sensibles mais avec une moins bonne discrimination que les bactéries du système Microtox. Sur extrait aqueux, les bioessais paraissent, dans l'ensemble, moins discriminants.

La faible discrimination entre les sites, obtenue avec la mesure de l'activité photosynthétique des algues, peut correspondre à la présence de teneurs importantes de phosphore biodisponible, particulièrement pour les sites C et D. Ce nutriment a pu agir sur les algues de façon antagoniste aux éléments toxiques présents.

Les essais avec embryons de poisson et sur monoculture algale, révèlent la toxicité de l'échantillon du site C, mais ne permettent pas de discriminer A, B et D.

L'analyse globale des résultats regroupés dans le tableau 14 fait ressortir deux groupes de sites: C et D présentant une toxicité supérieure à A et B.

Il est intéressant de constater que cet ordre est quasiment le même que celui obtenu sur la base du degré de contamination de ces mêmes échantillons par certains métaux lourds et le phosphore. Les dosages de micropolluants organiques sur ces échantillons font toutefois défaut et il n'est donc pas possible de proposer une interprétation sûre des causes de toxicité.

Une autre méthode d'évaluation a apporté des résultats que l'on peut confronter à celles de nos bioessais: il s'agit des résultats de l'analyse *in situ* des peuplements d'invertébrés effectuée en 1993 sur les sites B, C et D (BERNIER, 1993). Cette étude classait les sites par ordre de perturbation croissante:  $B < C \leq D$ .

## CONCLUSION

En complément des analyses physico-chimiques des sédiments (teneur en matière organique, métaux lourds et phosphore), la batterie de bioessais mise en place a permis de mettre en évidence le degré de contamination et la toxicité des sédiments du Stang Alar, supérieur à ceux de son affluent, le Keravilin. Cette contamination est due aux métaux lourds (surtout le zinc et le plomb), à des produits organiques vraisemblablement (PATRIS *et al.*, 1995) et aux nutriments; le phosphore en particulier faisant peser un risque d'eutrophisation sur les deux ruisseaux. Même si par temps sec l'eau circulante peut être de qualité correcte (sauf au niveau bactériologique), les sédiments gardent la trace des forts niveaux de contaminations (polluants, nutriments) qui sont véhiculés par temps de pluie. Cette situation n'est pas surprenante étant donné les types de milieux traversés par les deux cours d'eau et les problèmes d'assainissements qui touchent surtout le Stang Alar. Une amélioration du réseau d'assainissement, le traitement des exutoires et des eaux pluviales devraient permettre de diminuer le flux des contaminants, de réduire la toxicité des sédiments des deux cours d'eau, et également de limiter les apports vers le milieu marin.

Dans le cadre d'une étude pilote orientée sur l'analyse de l'efficacité de l'épuration des eaux pluviales, un suivi écotoxicologique serait un complément tout à fait approprié. Un diagnostic régulier des sites, à l'aide d'une batterie de bioessais réduite, permettrait de rendre compte de l'évolution de la toxicité des polluants biodisponibles présents dans les sédiments du Stang Alar. Cette batterie pourrait reposer sur le test Microtox sur sédiment entier, et la mesure de la photosynthèse algale sur extrait aqueux. Ces mesures permettraient d'évaluer la charge toxique et eutrophisante contenue dans les sédiments.

Des travaux complémentaires sont en cours, pour apprécier la contamination des différents sites à l'aide des mêmes organismes exposés à des extraits organiques des sédiments. Ce type



d'extraction permet une évaluation précise des teneurs en polluants hydrophobes. Bien que sa signification écologique soit discutable, elle contribue avec les autres méthodes d'exposition à une compréhension de la nature des contaminants présents dans les échantillons (PARDOS *et al.*, 1994).

**REMERCIEMENTS:** Nous remercions pour leur aide et leur collaboration: Jeanne GARRIC, Christophe BENNINGHOFF, Antoine JUDAS et Nicolas DAMÉE.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BEIRAS, R., HIS, E. (1994). Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 113 : 95-103.
- BERNIER, J.O. (1993). Etude de la qualité des eaux du Stangalard. Institut Universitaire de Technologie de Brest - Département Biologie Appliquée. Univ. Bretagne Ouest. : 20p +5 Annexes.
- BOUCHE, M.L. (1993). Rapport de stage de 6ème année "Industrie". Agence de l'eau Rhin-Meuse - Groupe Ecotoxicologie. 93 pages.
- BROUWER, H., MURPHY, T., MCARDLE, L. A. (1990). A sediment-contact bioassay with *P. phosphoreum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 9 : 1353-1358.
- BULICH, A. A., GREENE, D. L., ISENBERG, D.L. (1981). Reliability of the bacterial luminescence assay for determination of the toxicity of pure compounds and complex effluents; In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment* : Fourth Conference, D.R. Brabson and K.L. Dickson (eds). ASTM STP 737, American Society for Testing and Materials, Philadelphia : 338-347.
- DAVE, G., DAMGAARD, B., GRANDE, M. (1987). Ring test of an embryo-larval toxicity test with zebrafish (*Brachydanio rerio*) using chromium and zinc as toxicants. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6 : 61-71.
- DAVIS, H. C., HIDU, H. (1969). Effects of pesticides on embryonic development of clams and oysters and on survival and growth of the larvae. *Fish. Bull.U.S.*, 67(2) : 393-404.
- DAWSON, D.A., STEBLER, E.F., BURKS, S.L., BANTLE, J.A. (1988) Evaluation of the developmental toxicity of metal-contaminated sediments using short-term Fathead minnow and frog embryo-larval assays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7 : 27-34.
- FITZWATER, S. E., KNAUER, A. K., MARTIN, J. H. (1982). Metal contamination and its effects on primary production measurements. *Limnol. and Oceanog.*, 27 : 544-551.
- GOLTERMAN, H.L., SLY, P.G., THOMAS, R.L. (1983). Techn. Papers in Hydrology 26, UNESCO. p. 231.
- MARTIN, M., OSBORN, K. E., BILLIG, P., GLICKSTEIN, N. (1981). Toxicity of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, 12(9) : 305-308.
- MICROBICS CORPORATION (1992). Microtox® manual. A Toxicity Testing Handbook. Vol 2 : Detailed protocols and Vol 3 : Condensed protocols. Carsbad, A.A.
- Office International de l'Eau (1993). Carte de la pollution par les métaux lourds; d'après les données du Ministère de l'Environnement; Direction de l'Eau.
- PARDOS, M., BENNINGHOFF, C., THOMAS, R. (1994). Caractérisation écotoxicologique des affluents à leur embouchure. *Rapp. Comm. Int. Prot. Eaux Léman contre Pollut.*, 1993 : 171-189.
- PATRIS, T., LEFEBVRE, M., TROADEC, L., LAPLANCHE, A. (1995). Pollution chimique et bactérienne véhiculée par les eaux de ruissellement pluvial sur le bassin versant du Stang Alar. Communication aux 3ièmes Rencontres Internationales du Projet de la rade de Brest. 14-16 mars 1995.: 15p.

- SANTIAGO, S., THOMAS, R.L., LARBAIGT, G., ROSSEL, D., ECHEVERRIA, M.A., TARRADELAS, J., LOIZEAU, J.L., McCARTHY, L., MAYFIELD, C.I., CORVI C. (1993). Comparative ecotoxicity of suspended sediment in the lower Rhone River using algal fractionation, Microtox® and *Daphnia magna* bioassays. *Hydrobiologia*, 252 : 231-244.
- SCHIEVE, M. M., HAWK, E. G., ACTOR, D. I., KRAHN, M. M. (1985). Use of a bacterial luminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediment., *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 22, n°7 : 1244-1248.
- U. S. EPA. (1989). Algal (*Selenastrum capricornutum*) Growth Test. In: Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Environmental Monitoring Systems Laboratory, Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 147-174.
- U. S. EPA/Corp. of Engineers. (1977). Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean waters. United States Environmental Protection Agency/U. S. Army Corp. of Engineers, Technical Committee for Dredged and Fill material, Vicksburg, Mississippi.
- WILLIAMS, J. D. H., JAQUET, J. M., THOMAS, R. L. (1976). Forms of phosphorus in the surficial sediments of lake Erie. *J. Fish. Res. Board Can.*, 33 : 413-429.

## **Annexe 4**

NAUDIN S., PELLA H., CHARLON N., GARRIC J., BERGOT P., Détection de larves de poisson anormales par analyses d'images, soumis à [Aquatic Living Resources](#).

## Annexe 5

### Composition des différents aliments et techniques de culture de nauplies d'artémia et de paramécies

□ **Tetramin** (disponible dans la plupart des magasins d'aquariophilie)

protéines brutes	45 %
matières grasses brutes	5 %
cellulose	2 %
cendres brutes	11 %
humidité	6 %
vit. A	17 400 UI/kg
vit. D3	1 100 UI/kg
vit. E	58 mg/kg

□ **Nacip starter** (disponible chez PICAN; BP 13; 76750 BUCHY)

protéines brutes	50 %
matières grasses brutes	10 %
cellulose	0,2 %
cendres brutes	6 %
humidité	4 %
vit. A	50 000 UI/kg
vit. D3	30 000 UI/kg
vit. E	400 mg/kg
vit. C	1000 mg/kg

□ **Technique d'obtention de nauplies d'artémia (*Artémia salina*)**

Des cystes d'artémia sont mis à incuber dans une solution d'eau de mer reconstituée (salinité = 25‰) sous un éclairage continu. Une ampoule à décanter est utilisée pour cette incubation et une forte aération permet un brassage continu des cystes.

Au bout de 24 h., le bullage est diminué de manière à permettre une décantation des cystes vides au fond de la partie sphérique de l'ampoule. Les nauplies sont récupérées par soutirage au bas de l'ampoule, filtrées sur un tamis (60µm de maille) puis rincées avec de l'eau douce de manière à éliminer le sel. Ces organismes sont alors remis en suspension dans de l'eau de dilution (utilisé pour l'élevage ou les essais) et distribués à l'aide d'une micropipette. Malgré le choc osmotique qu'elles subissent, les nauplies parviennent à survivre environ 6 heures; même mortes elles restent cependant attractives pour les larves de danio zébré.

## **Annexe 5 (suite)**

### **▣ Technique d'obtention de paramécies**

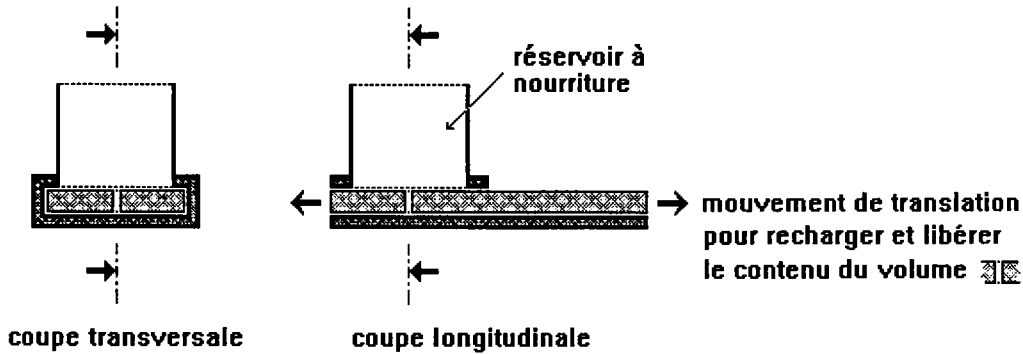
Il existe un protocole très détaillé (Eaton et Farley, 1974a) mettant à profit des techniques microbiologiques pour cultiver des paramécies (souches identifiées) en les nourrissant avec des bactéries (e.g. *E. coli*). Nous avons préféré utiliser un protocole plus simple qui consiste à faire macérer environ 10g. de foin dans deux litres d'eau de dilution utilisé pour l'élevage de danio zébré. Au bout de 48h., le foin est retiré et un aliquote de cette culture est observé ensuite régulièrement au microscope pour déterminer la densité de paramécies. Celle-ci atteint généralement son maximum entre le 7ème et 9ème jour; période favorable pour la distribution de paramécies au prolarves au début de leur phase de nourrissage.

## Annexe 6

### Dispositifs pour le nourrissage des larves et le renouvellement des milieux

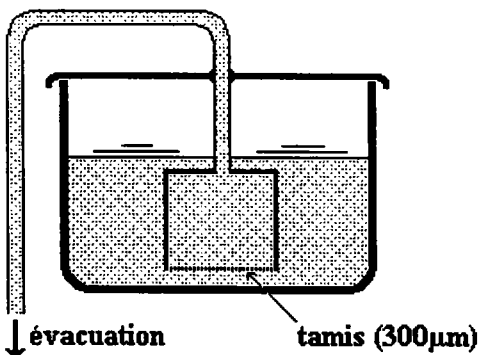
#### □ Dispositif de nourrissage

Un appareil a été conçu de manière à distribuer la nourriture de façon précise et reproductible (cf. figure ci-dessous). Le petit volume cylindrique va se remplir de nourriture déshydratée lorsqu'il se trouve sous le réservoir et son contenu sera libéré lorsque la plaquette est poussée vers l'avant au delà de la limite du corps de l'appareil. Le diamètre de ce volume cylindrique va déterminer la quantité d'aliment distribuée.



#### □ Dispositif pour le renouvellement des milieux

Pour les essais réalisés en condition semi-statique, les milieux sont siphonnés quotidiennement avant l'ajout des solutions nouvellement préparées. La partie du siphon qui plonge dans le récipient d'essai est munie d'un tamis de dimension importante de manière à limiter le flux d'eau par unité de surface du tamis (cf. figure ci-dessous). Cette configuration permet de ne pas aspirer les embryons et les larves qui peuvent nager à proximité de ce dispositif ce qui pourrait conduire à les endommager.



## Annexe 7

### Composition physico-chimique de l'eau de dilution utilisée

pH	7,1
conductivité	480 $\mu\text{S}/\text{cm}$
MeS	< 5 mg/l
$\text{HCO}_3^-$	135 mg/l
$\text{Cl}^-$	55 mg/l
$\text{SO}_4^{=}$	67 mg/l
$\text{NO}_2^-$	<0,02 mg/l
$\text{NO}_3^-$	29 mg/l
$\text{PO}_4^{\equiv}$	0,06 mg/l
$\text{Ca}^{2+}$	73 mg/l
$\text{Mg}^{2+}$	5,5 mg/l
$\text{Na}^+$	24 mg/l
$\text{K}^+$	2,0 mg/l
$\text{NH}_4^+$	0,03 mg/l

## Annexe 8

### Taille des larves témoins mesurées au terme de différents essais SEL

code	A			B			C		
essai	effluent de papeterie			effluent de teinturerie			détergent LAS		
réplicat	1	2	3	1	2	3	1	2	3
taille (mm)	4,7	3,5	5,0	4,4	4,3	3,9	4,3	5,1	5,1
	4,3	4,6	4,1	4,3	4,8	5,0	5,1	5,1	4,7
	2,9	4,0	4,0	4,5	4,0	4,0	5,1	4,7	4,8
	5,0	4,1	5,3	4,1	4,3	4,5	4,7	5,0	4,9
	4,8	4,4	4,3	5,1	3,9	4,0	4,4	5,0	4,0
	4,4	3,9	5,2	4,0	4,3	5,0	4,9	5,3	5,1
	4,6	3,3	4,0	4,9	4,5	4,5	5,0	5,4	5,1
	3,2	3,8	4,2	4,9	4,0	4,0	4,6	5,0	4,6
	4,4	3,4	4,4	4,6	5,0	5,0	5,1	5,2	4,9
	4,4	4,8	4,9	4,0	4,1	4,5	4,2	4,4	5,1
	5,1	4,4	4,2	4,4	4,8	4,4	5,2	4,6	4,5
	4,4	3,7	4,0	3,6	4,7	4,8	5,1	5,0	4,9
	4,6	3,6	4,9	4,1	5,0	5,0	5,2	4,8	5,5
	4,9	4,2	4,9	4,0	5,3	5,0	5,1	5,6	4,7
	4,2	4,2	5,2	4,1	4,4	4,4	5,2	4,6	4,9
	5,0	3,9	4,7	3,9	4,7	3,8	5,0	5,1	5,6
	4,4	3,6	4,5	4,8	4,3	4,5	4,9	4,6	4,9
	4,7	3,7	4,2	4,7	4,5	5,0	4,7		5,6
	4,4	4,3		5,1	4,8	4,2	4,9		5,3
	4,7	4,2		5,2	3,9	4,8	4,9		5,4
						5,1			



