



HAL
open science

Embryo-toxicologie des poissons : les salissures biologiques : etoxicité du Mexel® 432, un agent anti-salissure industriel, vis-à-vis du développement précoce de la carpe commune (Cyprinus carpio L.)

Latifa Arehmouch

► **To cite this version:**

Latifa Arehmouch. Embryo-toxicologie des poissons : les salissures biologiques : etoxicité du Mexel® 432, un agent anti-salissure industriel, vis-à-vis du développement précoce de la carpe commune (Cyprinus carpio L.). Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 1997. Français. NNT : 1997METZ032S . tel-01777216

HAL Id: tel-01777216

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01777216>

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

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.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

présentée devant

L'université de METZ
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

pour l'obtention du grade de
Docteur en Toxicologie de l'Environnement

par **Latifa AREHMOUCH**

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19970685
Cote	S/M3 97/32
Loc	Magasin

Embryo-Toxicologie des Poissons

Les salissures biologiques

Toxicité du Mexel[®] 432, un agent anti-salissure industriel, vis-à-vis du développement précoce de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.)

soutenue le 28 Novembre 1997

Jury:

Présidente:

Mme Paule VASSEUR, professeur à l'Université de Metz, Centre des Sciences de l'Environnement.

Membres:

M. Jean Michel JOUANY, professeur de toxicologie à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Rouen (rapporteur)

M. Michel KHALANSKI, ingénieur senior au Département Environnement à l'Electricité De France.

M. Jean Claude PIHAN, professeur à l'Université de Metz, Centre de Recherches Ecologiques.

M. Pierre ROUBAUD, ancien maître de conférences à l'Université de Paris 7, directeur de la thèse.

Rapporteur non membre du Jury: M. El-Madani BELKHADIR, recteur de l'Université Mohammed-I, Oujda. Maroc.

Remerciements

Cette thèse a été réalisée dans le Groupe d'Embryo-toxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiology et Toxicologie Cellulaire de l'Université Paris VII (Denis Diderot).

A l'occasion de ce travail, je souhaite exprimer ma sincère reconnaissance et mes plus vifs remerciements à:

- Madame Paule VASSEUR, professeur à l'Université de Metz, qui me fait l'honneur de présider le Jury de cette thèse.

- Monsieur Pierre ROUBAUD qui m'a accueilli dans son groupe et m'a encouragé malgré les difficultés rencontrées en début de thèse et dont les remarques pertinentes ont largement contribué à l'aboutissement de ce travail. Je le remercie pour les connaissances qu'il m'a apportées mais aussi pour ses qualités humaines.

- Monsieur Jean Michel JOUANY, professeur de toxicologie à la Faculté de Médecine et Pharmacie de Rouen, qui me fait l'honneur d'être rapporteur et membre de Jury de ce travail.

- Monsieur El-Madani BELKHADIR, recteur de l'Université Mohammed-I à Oujda (Maroc), qui malgré ses nombreuses responsabilités, a bien voulu être rapporteur de ce travail.

- Monsieur Michel KHALANSKI, de la Direction des Etudes et Recherches à EDF, qui s'est intéressé à mes activités de recherche et dont les remarques et les suggestions m'ont été bénéfiques. Je le remercie très sincèrement pour son aide et d'avoir accepté de faire partie des membres du Jury.

- Monsieur Jean Claude PIHAN, professeur à l'Université de Metz, pour son aide en histopathologie, et qui a bien voulu accepter d'être membre du Jury de cette thèse.

- Messieurs Didier WAZEL, Vincent MATAIX et Mesdemoiselles Anne-Sophie ALLONNIER et Christelle OGER pour l'aide apportée au cours de la réalisation des dosages à la Direction des Etudes et Recherches / Département Environnement de l'EDF sur le site de Chatou.

- Monsieur Antoine VANLAER, directeur de la Société MEXEL, pour son encouragement et l'intérêt qu'il a porté à cette étude. Je lui adresse ici mes vifs remerciements pour son aide financière.

- Messieurs Robert GUILLARD, Rick CREUZER, Michel GARET et Lionel CARPENTIER pour leur sympathie, leur contribution et leur encouragement; et surtout je n'oublierai pas Monsieur Alexandre DAMOUR qui malheureusement nous a quittés.

- Toute l'équipe de recherche du laboratoire du Professeur MAZLIAK à l'université Paris 7 qui m'a bien accueillie lors des dosages spectrophotométriques (Jolliot, Chantale, Nathalie, Madeleine, Catherine et Peter).

- Françoise ALIZARD de l'université Paris 7 qui m'a apporté une aide importante en histologie.

- L'ensemble des personnes du laboratoire d'Anatomie Comparée et plus particulièrement, Olivier BABIAR pour son humour et sa gentillesse, Marie José, Paulette et Edmundo pour leur aide et leur sympathie.

- François GHILLEBAERT pour ses critiques lors de la réalisation de ce travail.

- Madame Catherine CHAILLOU pour son soutien et je lui souhaite un bon rétablissement.

- Valérie TFIBEL pour son aide au cours de la réalisation du travail expérimental.

- Monsieur Guy SOUBRIER qui nous a fourni des données bibliographiques sur la deltaméthrine.

- Monsieur Vincent FILLOT pour son aide précieuse en informatique.

- Monsieur Olivier BARON de nous avoir fourni les géniteurs de carpe.

- Monsieur BOUZIT qui a réalisé le programme de contrôle automatique des électrovannes pour le projet de robotisation des tests en toxicologie.

- Aux équipes des professeurs MARANO et CALVAYRAC de nous avoir hébergé jusqu'à la fin de la rédaction du rapport de thèse.

- Monsieur Gérard KERAVIS pour ses conseils et son soutien durant les moments difficiles.

Je remercie plus particulièrement Jocelyne SOURIN pour son soutien et son amitié.

Enfin, je remercie vivement mon frère Ahmed et sa femme qui m'ont hébergé et n'ont pas ménagé leurs efforts pour que mon séjour en France se déroule dans les meilleures conditions. Je leur exprime toute ma gratitude ainsi qu'à mes parents et à mes soeurs.

Présentation du travail	1
1^e Partie. Salissures biologiques et traitements anti-salissures (synthèse bibliographique)	3
1.1. Introduction	3
1.1.1. Principaux effets néfastes des biosalissures	3
1.1.2. Méthode d'étude des biosalissures	4
1.1.3. Les zones d'étude	4
1.2. Les groupes dominants constituant les biosalissures	5
1.2.1. Microsalissures	5
1.2.2. Algues	7
1.2.3. Tuniciers (Ascidies)	8
1.2.4. Lophophoriens (Bryozoaires)	8
1.2.5. Cnidaires (hydroïdes)	9
1.2.6. Annélides (polychètes)	10
1.2.7. Arthropodes (Crustacés)	10
1.2.8. Mollusques	12
1.3. Cas des espèces parasites perforantes	13
1.4. Cas des espèces génératrices de corrosion ou perforant le bois	14
1.5. Recrutement	15
1.6. Biomasse et abondance spécifique	16
1.7. Dissémination des biosalissures en milieu aquatique	18
1.8. Agents anti-salissures	19
1.8.1. Agents biologiques naturels	20
1.8.2. Méthodes physiques	21
1.8.2.1. Filtres divers	21
1.8.2.2. Flux	21
1.8.2.3. Traitement thermique	21
1.8.2.4. Rayonnement ultraviolet	22
1.8.2.5. Ultrasons	22
1.8.2.6. Méthodes électriques	22
1.8.3. Méthodes mécaniques	23
1.8.4. Méthodes chimiques	23
1.8.4.1. L'ozone	23
1.8.4.2. L'acroléine	23
1.8.4.3. La chloration	23
1.8.4.4. Métaux toxiques	26
1.8.4.5. Autres agents	29
2^e Partie. Effets létaux du Mexel[®] 432, un agent anti-salissures industriel vis-à-vis du développement embryon-larvaire de la carpe: une étude expérimentale	30
1. Introduction	30
1.1. Présentation du Mexel [®] 432	30
1.1.1. Composition élémentaire du Mexel [®] 432	30
1.1.2. Composition moléculaire du Mexel [®] 432	31
1.1.3. Quelques propriétés des tensioactifs ou "surfactants"	32
1.1.3.1. Généralités, propriétés physico-chimiques	32
1.1.3.2. Phénomène de surface et adsorption	34
1.1.3.3. Micelles	34
1.1.3.4. Quelques applications	35
1.1.3.5. Toxicité, écotoxicité	36
1.1.3.6. Biodégradation	37

1.1.4. Mode d'action du Mexel [®] 432	39
1.1.5. Devenir du Mexel [®] 432 en solutions aqueuses	39
1.1.6. Toxicité du Mexel [®] 432	41
1.1.6.1. Effets sur les Mammifères	41
1.1.6.2. Effets sur les micro-organismes	42
1.1.6.3. Effets sur les Mollusques	43
1.1.6.4. Effets sur la Daphnie	43
1.1.6.5. Effets sur les Poissons	45
1.2. L'embryon de carpe: un modèle expérimental en écotoxicologie	45
1.2.1. Choix des poissons comme modèle en toxicologie	45
1.2.2. Choix des stades embryo-larvaires de poissons en toxicologie	45
1.2.3. Choix du modèle embryo de carpe (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	46

2. Toxicité du Mexel[®] 432, un agent anti-salissures, vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.).

2.1. Effets létaux du Mexel [®] , un agent anti-salissures, vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe commune (<i>Cyprinus carpio</i> L.). (<i>Ecotoxicol. Environ. Saf. soumis</i>)	47
Abstract	47
Introduction	48
Materials and methods	50
Results	53
Discussion	55
Conclusion	59
2.2. Effets létaux du Mexel [®] 432, un agent anti-salissure, vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe commune: un essai en condition d'exposition intermittente	69
Introduction	69
Matériel et méthodes	70
Résultats	70
Discussion	71
2.3. Effets du Mexel [®] 432, un agent anti-salissure industriel, vis-à-vis de la croissance embryo-larvaire de la carpe commune	73
Introduction	73
Matériel et méthodes	73
Résultats	74
Discussion	74
2.4. Effets létaux des produits constituants du Mexel [®] 432, vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe commune	78
Introduction	78
Matériel et méthodes	78
Résultats	80
Discussion	80
2.5. Effets létaux vis-à-vis des larves de la carpe commune de 4 pesticides. Influence du Mexel [®] 432, un agent anti-salissure industriel	84
Résumé	84
Introduction	85
Matériels et méthodes	86
Résultats	88
Discussion	89
2.6. Effets létaux du Mexel [®] 432 en présence d'un antigel sur le développement embryo-larvaire de la carpe commune	101
Introduction	101
Matériel et méthodes	101
Résultats	102
Discussion	103
2.7. L'inhibition du collage des oeufs: un effet toxique chez les poissons. L'exemple d'un lixiviat de cendres de charbon et du Mexel [®] 432 enrichi en antigel. Principe d'une méthode de quantification	106
Introduction	106
Matériels et méthodes	106

Résultats	109
Discussion	109
2.8. Effets histopathologiques du Mexel [®] 432 sur quelques organes sensibles de la larve de carpe (<i>Cyprinus carpio</i> L.)	115
Introduction	115
Matériel et méthodes	116
Résultats	117
Discussion	118
Toxicité du Mexel[®] 432 dans des eaux de rivière et dans des conditions physico- chimiques variées en eau synthétique (<i>Environ. Toxicol. Chem.</i> sous presse)	132
Abstract	133
Introduction	134
Materials and methods	135
Results	139
Discussion	142
Conclusion	145
Dosage du Mexel[®] 432, un agent anti-salissures et anticorrosion industrielles: seuils de détection et de mesure aux basses concentrations	161
Introduction	161
Matériels et méthodes	162
Principe (Méthode de dosage colorimétrique à l'orange de méthyle)	162
Protocole expérimental	163
Préparation de l'échantillon et dosage	164
Résultats	164
Discussion et conclusion	167
3^e Partie. Discussion et conclusion	173
1. L'embryon de carpe comme modèle en toxicologie	173
2. Principales informations concernant le Mexel [®] 432 apportées par l'utilisation du modèle embryon de carpe	176
2.1. Toxicité du Mexel [®] 432 dans une eau synthétique	176
2.2. Toxicité du Mexel [®] 432 dans des eaux de rivière	178
2.3. Dosage du Mexel [®] 432	180
Conclusion générale et perspectives	181
Bibliographie	183

RESUME

La mise sur le marché de nouvelles molécules ou procédés nécessite au préalable des essais de laboratoire permettant d'évaluer leur potentiel toxique intrinsèque et les risques liés à leur utilisation à l'échelle industrielle.

Une synthèse bibliographique expose les principales connaissances sur les biosalissures aquatiques et les traitements utilisés ou préconisés pour les contrôler en milieu industriel.

Une étude expérimentale est consacrée aux effets létaux d'un nouvel agent anti-salissures: le Mexel[®] 432 vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe commune, choisie comme modèle écotoxicologique.

Les principales caractéristiques du Mexel[®] 432 et du modèle embryon de carpe sont présentées. Dans une eau synthétique, en exposition continue depuis la fécondation, sans apport alimentaire, les CL₅₀ moyennes mesurées sur plusieurs pontes sont $1,13 \pm 0,35$ mg/L après 3 jours d'exposition, $0,88 \pm 0,36$ après 7 jours et $0,69 \pm 0,32$ après 9 jours. Les CL₅₀ (7 jours) la plus basse et la plus élevée sont 0,34 et 1,58 mg/L. En concentrations sublétales, la croissance embryo-larvaire est diminuée. Une étude histopathologique semble montrer une dégénérescence de l'épithélium branchial larvaire.

Dans des échantillons d'eau de rivières, la toxicité est immédiatement diminuée en relation avec une "demande immédiate" en Mexel[®] 432 liée à son adsorption sur les matières en suspension (argiles) ou à sa complexation avec des matières organiques dissoutes (acides humiques). La toxicité du Mexel[®] 432 est déterminée pour l'essentiel par son contenu en amines grasses. L'adjonction d'un antigel inhibe le collage des oeufs, le principe d'une méthode de quantification de cet effet étant proposé. La température, le pH et la concentration en calcium ont peu d'effets sur la toxicité du Mexel[®] 432. Celui ci a peu d'influence sur la toxicité de divers xénobiotiques de degrés d'hydrophobie variés.

L'utilisation d'une méthode standardisée par EDF (dosage colorimétrique à l'orange de méthyle en milieu acide), a permis d'atteindre en eau de laboratoire des seuils de détection et de mesure de 0,29 et 0,58 mg/L en Mexel[®] 432, la pente de la droite d'étalonnage dans la gamme de concentration 0,1 - 12,8 mg/l étant $18,02 \pm 0,22$.

Mots clés: poisson, *Cyprinus carpio*, test embryo-larvaire, biosalissures, Mexel[®] 432, létalité, dosage.

ABSTRACT

The launching of new molecules or procedures requires a laboratory tests to evaluate their intrinsic potential toxicity and hazards related to their utilization at the industrial level.

A synthetic bibliography exposes the principal knowledge on the aquatic fouling and the treatments used or recommended in the industrial domain.

An experimental study is carried out on the lethal effects of Mexel[®] 432, a new antifouling agent, on the embryolarval development of the common carp (*Cyprinus carpio* L.) which was used as an ecotoxicological model.

The principal characteristic of Mexel[®] 432 and the common carp embryolarval test are presented. In synthetic water, at continuous exposure from fertilization without feeding, the mean LC₅₀ measured were 1.13 ± 0.35 mg/L after three days of exposure, 0.88 ± 0.36 mg/L after seven days and 0.69 ± 0.32 mg/L after nine days. The lowest and highest LC₅₀ are 0.34 and 1.58 mg/L after seven days of exposure.

At sublethal concentrations, the embryolarval growth is reduced. Histopathological examination seems to show that gill epithelium could to be affected.

In natural river water samples, the toxicity of Mexel[®] 432 is immediately reduced related to an "immediate demand" of this product due to its adsorption on suspended matters (clays) or to its complexation with dissolved organic matters (humic acids). The essential of the Mexel[®] toxicity involves its fatty-amines content. The adjunction of an antifreezing interfere with the normal sticking of eggs and thus, the principle of a quantitative method of this effect is proposed. The temperature, pH and the concentration of calcium have a little effect on Mexel[®] toxicity. The latter has a little influence on the toxicity of various hydrophobic or hydrophilic xenobiotics.

The use of standardized method of EDF (colorimetric dosage by methyl-orange in acidic medium), allows to reach, in laboratory water, a thresholds of detection and measurement respectively of 0,29 and 0,58 mg/L. The slope of the calibration curve is $18,02 \pm 0,22$ in the range of concentration 0,1 - 12,8 mg/L of Mexel[®].

Key words: fish, *Cyprinus carpio*, embryo-larval test, fouling, Mexel[®] 432, lethality, dosage.

Présentation du travail

L'eau est la caractéristique première de l'écosystème terre, et la vie, des bactéries jusqu'à l'homme, n'est possible sur les continents et dans les mers que grâce à la présence de l'eau. Tous les êtres vivants n'ont pas la même place par rapport à l'homme et certains lui sont directement ou indirectement utiles dans certaines de ses activités et d'autres lui paraissent nuisibles dans des conditions similaires.

Le développement d'organismes fixés sur les parois des circuits hydrauliques industriels, agricoles ou urbains perturbe leur fonctionnement et peut entraîner leur indisponibilité. Dans certaines régions, la biomasse des bio-salissures peut atteindre plusieurs kg/m². Face à ces risques, divers procédés curatifs ou préventifs sont actuellement mis en oeuvre comme le nettoyage mécanique, les traitements par la chaleur, le chlore, le dioxyde de chlore, les sels de potassium, ou par des peintures à base de métaux lourds comme celles à base de tributylétain.

Le Mexel[®] 432 est proposé pour compléter ou remplacer ces différents procédés de lutte contre les salissures biologiques dans les eaux douces ou marines, tout en servant également d'agent préventif et curatif contre la corrosion.

Les traitements anti-salissures sont expérimentés d'abord sur les organismes dont on veut contrôler la prolifération, puis sur les organismes non cibles comme les poissons qui peuvent être présents dans les mêmes milieux que les bio-salissures ou dans les zones de rejets.

Ainsi, mon travail a été entrepris dans le but de mieux comprendre les mécanismes d'action du Mexel[®] 432, d'en optimiser l'utilisation alors que celle-ci concerne un nombre croissant de pays et une diversité grandissante d'applications. Le modèle choisi est toutefois un organisme non-cible: l'embryon de carpe, qui a déjà servi comme modèle pour l'étude de diverses molécules de référence.

La première partie de ce rapport de thèse concerne une étude bibliographique synthétique sur les salissures biologiques et les traitements utilisés ou préconisés.

Dans une seconde partie, j'ai étudié sur plusieurs pontes la réponse toxique selon le critère de mortalité, dans une eau de laboratoire reconstituée, sur parties ou totalité du développement embryon-larvaire de la carpe. Des facteurs comme le vieillissement des solutions ont été testés (AREHMOUCH *et al.*, soumis) ainsi qu'un effet subléta: la croissance. Les toxicités des molécules de base constituant le Mexel[®] 432 ont été recherchées en comparaison avec la toxicité totale du produit.

Les études examinant les effets des polluants sont souvent réalisées sur un seul produit,

alors que dans les conditions réelles de l'environnement, les polluants les plus divers se trouvent souvent mélangés, leurs effets pouvant être alors antagonistes, additifs ou synergiques. Aussi, j'ai recherché les éventuels effets toxicologiques de l'interaction du Mexel[®] 432 avec d'autres produits polluants effectifs ou potentiels du milieu aquatique.

L'étude de la toxicité du Mexel[®] 432 en présence d'un antigel m'a permis de mettre en évidence un effet toxicologique particulier: l'inhibition du collage des oeufs, je propose le principe d'une méthode de quantification de cet effet.

L'histologie est un outil sensible pour détecter les effets sublétaux des xénobiotiques en déterminant leurs cibles organiques ou fonctionnelles et leurs mécanismes d'action (Fent et Meier, 1994). Aussi, en collaboration avec le centre de recherches écologiques de l'Université de Metz, j'ai essayé de mettre en évidence, au niveau histologique et cytologique, certains effets histo-pathologiques du Mexel[®] 432 sur la larve de carpe.

D'autres part, j'ai comparé la toxicité des solutions de Mexel[®] 432 dans des eaux de rivière et dans une eau de laboratoire en relation avec le vieillissement des solutions. Dans le but d'interpréter les résultats obtenus, j'ai étudié les effets de quelques facteurs physico-chimiques: température, pH, concentrations en calcium et en acides humiques sur la toxicité du Mexel[®] 432 (AREHMOUCH *et al.*, sous presse).

Au cours de ces travaux, j'ai été conduite à rechercher une amélioration et une simplification de la technique de dosage du Mexel[®] 432. Une partie des résultats de ces essais seront exposés dans un chapitre de cette thèse.

Dans une troisième partie, je discuterai de l'ensemble de ces résultats sous l'angle de l'utilisation de l'embryon de carpe comme modèle écotoxicologique et des effets écotoxicologiques d'une utilisation industrielle du Mexel[®] 432.

L'ensemble de ces travaux sera présenté sous forme d'articles ou projets d'articles, notes brèves ou notes préliminaires destinées à des revues scientifiques ou sous forme de rapports, lorsque la confidentialité est exigée par le fabricant du Mexel[®] 432 ou par ses utilisateurs. Les publications éventuelles seront soumises à l'accord préalable de la société MEXEL et de la Direction des Etudes et Recherches / Département Environnement de l'EDF.

Le mode de présentation que j'ai choisi en accord avec mon directeur de thèse pour sa simplicité, a cependant l'inconvénient non négligeable de provoquer des redites notamment pour les matériels et méthodes et les références, se traduisant par un nombre de pages important.

Introduction

1^e Partie. Salissures biologiques et traitements anti-salissures
(Synthèse bibliographique)

1^e Partie. Salissures biologiques et traitements anti-salissures *(synthèse bibliographique)*

1.1. Introduction

Cette étude bibliographique a été réalisée à partir de résumés d'articles fournis par la base de données "Biological Abstracts en CD-ROM" de janvier 1985 à décembre 1996 avec le seul mot clé "fouling". Cette recherche a mis en évidence, à côté des études concernant les caractéristiques biosystématiques ou écologiques des biosalissures et les moyens de les combattre, des recherches plus spécialisées relatives aux salissures retrouvées dans le développement de nouvelles biotechnologies, biomedecine, filtration de produits agro-alimentaires, etc. Ces travaux spécialisés ne seront pas pris en compte dans la suite de mon exposé. Faute de temps, cette synthèse bibliographique sera loin d'être exhaustive, et il est probable que le mot "fouling" utilisé comme clé de ma recherche bibliographique n'aura pas été à lui seul susceptible d'ouvrir l'accès à la totalité des publications effectuées sur le domaine.

Comme m'y invitent l'ensemble de mes lectures, j'appellerai biosalissures ou salissures biologiques les communautés d'espèces vivantes qui se développent ou se déposent sur des supports solides et gênent par leur développement excessif certaines activités humaines. Je distinguerai en particulier les microsalsures constituées notamment de bactéries et diatomées, et les macrosalissures par exemple les moules et les balanes.

1.1.1. Principaux effets néfastes des biosalissures

Divers types d'agressions menacent les installations hydrauliques utilisant les eaux naturelles:

- l'infestation des installations côtières ou portuaires, des centrales électriques, des plateformes pétrolières, des bateaux, ...

- la corrosion : phénomène qui se présente sous divers aspects et dépend d'un grand nombre de facteurs (Hache, 1966). Divers types de corrosion ont été recensés, notamment la corrosion biologique où certaines bactéries jouent un rôle déterminant (cas des conduites en fer enterrées).

- l'entartrage : l'entartrage des parois est particulièrement important dans le cas des circuits équipés d'aéroréfrigérants dans lesquels la concentration des sels minéraux et l'élimination du gaz carbonique favorisent la précipitation des carbonates (Allonier *et al.*, en préparation).

- la destruction de mollusques en aquaculture: certaines biosalissures attaquent les coquilles des bivalves en causant parfois d'importantes mortalités (Enright *et al.*, 1984; Igic, 1984; Nair *et al.*, 1984; Je *et al.*, 1988; Ovsyannikova, 1989; Ambler et Canete, 1991; Cheung, 1991; Lodeiros et Himmelman, 1996; Dubost *et al.*, 1996).

1.1.2. Méthode d'étude des biosalissures

La méthode la plus souvent utilisée pour suivre l'installation et le développement des biosalissures consiste à placer des plateaux tests aux endroits inspectés. L'observation des plateaux tests peut être facilitée par des techniques élaborées, par exemple le comptage automatique par analyse d'images (Wright *et al.*, 1991) ou la microscopie en fluorescence (Wolfaardt et Cloete, 1992).

1.1.3. Les zones d'étude

Les lieux infestés le plus souvent étudiés sont des installations de production d'énergie comme des centrales électriques (Whitehouse *et al.*, 1985; Sakaguchi, 1986 a; Sakaguchi, 1986 b; Dempsey, 1986; Lu *et al.*, 1986; Nair *et al.*, 1988; Afanas'ev *et al.*, 1991; Moreteau et Khalanski, 1994), des plates-formes pétrolières (Zvyagintsev, 1989; Selin, 1991; Latypov, 1991; Bhat et Wagh, 1992), des milieux portuaires (Shim et Jurng, 1987; Moran et Grant, 1989; Maruthamuthu *et al.*, 1990; Moran, 1991; Moran et Grant, 1991; Pillai et Ravindran, 1992; Hurlbut, 1993; Moran et Grant, 1993; Khandeparker *et al.*, 1995), ou estuariens (Santhakumari et Nair, 1984; Santhakumaran et Sneli, 1984; Radhakrishnan *et al.*, 1987; Harms, 1990; Anil et Wagh, 1988; Ebdon *et al.*, 1988; Read et Gordon, 1991; Anderson et Underwood, 1994), des lacs (Krivenko, 1984; Yunher, 1986; Rychkova, 1986; Haag *et al.*, 1993) et des baies (Braiko et Dobrotina, 1988; Turon et Perera, 1988; Antsulevich et Chivilev, 1992; Nandakumar *et al.*, 1993) ou les parties immergées des bateaux, digues, balises flottantes (Wang et Huang, 1993); Cheng et Chen, 1994), etc.

A l'exception de l'étude de Lim *et al.* (1989), qui cite le rôle des biosalissures de type fongique dans la biodétérioration des bâtiments, je n'ai pas trouvé de données sur d'éventuelles biosalissures dans les installations urbaines ou agricoles.

1.2. Les groupes dominants constituant les biosalissures

Dans les limites de mon inventaire bibliographique, la plupart des recherches sur les biosalissures paraissent être réalisées en milieu marin. Il s'agit essentiellement d'études disparates par leurs méthodes, leur localisation biogéographique et leur durée et il est difficile d'en tirer des informations à caractère général.

1.2.1. Microsalissures

Elles sont le fait de protozoaires ou protophytes. En général, l'installation des salissures biologiques sur un support propre commence par l'installation pionnière rapide de micro-organismes. C'est sur le film biologique constitué par ces derniers que se fixent ultérieurement les macrosalissures (Wolfaardt et Cloete, 1992). Ainsi, par exemple, l'immersion des plaques dans les eaux de la mer blanche (Russie) durant 2 heures à une profondeur de 2 mètres a montré l'installation pionnière de plus de 10 variétés de bactéries (Railkin *et al.*, 1993).

La colonisation bactérienne des surfaces dépend de la vitesse des fluides et de la nature du substrat (Wolfaardt et Cloete, 1992; Devi, 1995), par exemple, des taux de colonisation élevés sont obtenus en conditions de flux nul et par ordre décroissant sur un substrat en acier inoxydable, en aluminium et en verre. En conditions expérimentales, la formation d'un film biologique dans les échangeurs thermiques dépend de la quantité de matières organiques dans l'eau (Afanas'ev *et al.*, 1991).

La formation du biofilm initial conditionne l'installation et la colonisation d'autres espèces (Neal et Yule, 1994; Cheng et Chen, 1994). Par exemple, les bactéries jouent un rôle important dans le développement des algues *Phormidium foveolarum* et *Pleurochloris pyrenoidosa* (Holmes, 1986). La colonisation par les bactéries précède toujours celle des algues et celle-ci est augmentée en présence de bactéries. L'installation ultérieure des larves planula des hydroïdes coloniaux *Gonothyrea loveni* et *Laomedea flexuosa* dépend de l'influence du film bactérien couvrant la surface alguale (Orlov *et al.*, 1994).

Selon Neal et Yule (1994), l'adhésion des bactéries *Deleya marina* au substrat joue un rôle important dans l'installation et l'adhésion des larves de balane *Elminius modestus*. Selon l'âge du biofilm, les bactéries produisent des facteurs stimulateurs ou inhibiteurs de fixation des cypris (larves de cirripèdes). Ces dernières adhèrent plus fortement aux biofilms âgés de 4 jours et moins fortement à ceux âgés d'un mois. De même, la distribution des macrosalissures

Balanus amphitrite (crustacé) et *Dexiospira sp.* (polychète) sur un bateau de pêche en bois dépend de la présence des bactéries *Tanais cavolini* (Cheng et Chen, 1994).

Une étude cytochimique de la fixation chez 17 espèces de diatomées a montré que dans la majorité des cas les substances adhésives sont des mucilages exclusivement polysaccharidiques, sauf chez *Berkeleya rutilans* où des niveaux élevés de protéines ont été détectés (Daniel *et al.*, 1987).

Les larves de l'ascidie *Ciona intestinalis* peuvent être piégées par des matières polysaccharidiques excrétées par des bactéries marines *Pseudomonas sp.* (Szewzyk *et al.*, 1991). De même, en conditions expérimentales, l'algue verte *Enteromorpha* adhère mieux sur des surfaces en polystyrène présentant au préalable un film microbiologique que sur des surfaces sans film (Dillon *et al.*, 1989).

Dans les centrales électriques, les surfaces d'échanges thermiques (tubes de condenseurs, échangeurs à plaques) se couvrent d'un film organique et minéral qui s'accroît en permanence du fait de l'activité bactérienne (Khalanski et Lutz, 1987). Ce film réduit les échanges thermiques et tend à diminuer le rendement de l'installation.

D'après Cloete *et al.* (1989), une croissance microbiologique incontrôlée dans les circuits hydrauliques se traduit par l'apparition de corrosion microbiologique. Les microsalissures sont donc des promoteurs de corrosion métallique des substrats (Cloete *et al.*, 1989; Wolfaardt et Cloete, 1992; Meenakumari *et al.*, 1993; Strittmatter *et al.*, 1993). Une augmentation progressive du taux de corrosion a été observée avec des concentrations croissantes de sulfates (Wolfaardt et Cloete, 1992). Toutefois, au dessus de 600 mg/L de sulfates, le taux de corrosion n'augmente plus de manière importante.

Les bactéries ne sont pas les seuls constituant des microsalissures: par exemple, l'immersion de substrats artificiels durant 4 mois dans une station de culture de moules, a montré la présence de 190 espèces de biosalissures dont les algues diatomées constituent le groupe principal (Vorob'eva, 1991).

Toutefois, le film bactérien n'est pas toujours nécessaire à la fixation d'autres espèces: par exemple, un film de bactéries *Alcaligenes sp.* est sans effet sur l'attachement des diatomées de l'espèce *Synedra sp.* (Kawamura *et al.*, 1988).

En résumé, l'activité des microsalissures, essentiellement les dépôts organiques d'origine bactérienne constituent le premier événement de la colonisation des surfaces propres submergées. La vitesse de colonisation bactérienne des surfaces dépend notamment de la

vitesse des flux hydriques et de la nature du substrat. Les produits du métabolisme bactérien conditionnent l'attachement d'autres espèces.

La lutte contre les biosalissures devrait donc être orientée plus vers le contrôle du film bactérien que sur le contrôle direct des autres salissures. Ainsi, Sakaguchi *et al.* (1989 a), proposent d'utiliser des bactériophages, mais cette méthode efficace sur des cultures bactériennes en phase de croissance rapide n'a que peu d'effets lorsque celles-ci sont en phase de croissance lente.

1.2.2. Algues

Dans mon inventaire bibliographique, les algues ont été citées comme biosalissures par plusieurs auteurs (Enright *et al.*, 1984; Santhakumari et Nair, 1984; Vrizer, 1986; Nandakumar *et al.*, 1993; Franz et Mohamed, 1989; Nesser et Vasquez, 1989; Vorob'eva, 1991). Les lacs et les ports sont particulièrement riches en algues (Krivenko, 1984; Shim et Jurng, 1987). De même, en condition d'eutrophisation, des dizaines espèces d'algues de différents groupes systématiques se développent de manière très importante (Krivenko, 1984).

Certaines algues, comme des algues filamenteuses peuvent s'attacher aux bateaux (Lenihan *et al.*, 1990) en constituant un support idéal pour d'autres biosalissures, par exemple les larves de moules *Mytilus edulis* (Sakaguchi, 1986) ou des larves planula d'hydroïdes coloniaux *Gonothyrea loveni* et *Laomedea flexuosa* (Orlov *et al.*, 1994).

En raison d'un accès meilleur à la lumière, l'abondance des algues est élevée vers la surface, cette règle est notamment observée au voisinage des plates-formes pétrolières (Lewbel *et al.*, 1987). Les algues bleues-vertes et vertes unicellulaires sont à la base des salissures de systèmes hydrauliques des installations métallurgiques (Ludyanskii et Solonin, 1986).

En France, des entraînements massifs d'algues dans les prises d'eau de la centrale de Flamanville ont provoqué, en 1987, des perturbations du fonctionnement (EDF, 1996). Ces arrivées d'algues sont très irrégulières: de quelques dizaines de kilogrammes à plusieurs tonnes par jour. Elles dépendent essentiellement de 4 facteurs: le coefficient de marée (risque plus élevé à fort coefficient), la direction du vent (risque plus élevé par vent d'ouest-sud-ouest), la force du vent (risque d'autant plus élevé que la vitesse est forte avec une vitesse seuil de 9 m/s) et la saison (risque plus élevé de juin à septembre, en relation avec le détachement saisonnier de certaines espèces).

1.2.3. Tuniciers (Ascidies)

Dans mon inventaire bibliographique, les ascidies ont été citées comme biosalissures par plusieurs auteurs (Santhakumaran et Sneli, 1984; Chimenz *et al.*, 1985; Nair *et al.*, 1988; Sasikumar *et al.*, 1989; Sasikumar *et al.*, 1990; Hurlbut, 1993; Nandakumar *et al.*, 1993; Maruthamuthu *et al.*, 1990; Khandeparker *et al.*, 1995). En général, elles sont associées aux mollusques, balanes et autres biosalissures. Selon Sasikumar *et al.*, 1989, les ascidies ne sont jamais les biosalissures dominantes dans les eaux côtières.

Toutes les ascidies sont marines (Grassé *et al.*, 1961) et leur présence peut être abondante dans les ports (Hurlbut, 1993). La fixation de certaines espèces comme l'ascidie *Ciona intestinalis* peut être active en utilisant des organes d'adhésion, ou passive suite au piégeage des larves par des matières polysaccharidiques excrétées par des bactéries marines du genre *Pseudomonas* (Szewzyk *et al.*, 1991).

La température de l'eau détermine l'installation et le recrutement chez l'ascidie *Pyura chilensis*. L'assaut de recrutement commence quand la température de surface dépasse plus de 14,5°C (Ambler et Canete, 1991).

Les variations de salinité, la présence de polluants et la turbidité des eaux influencent la croissance des ascidies qui sont les éléments majeurs de la biomasse dans les eaux côtières de Bombay (Swami et Karande, 1988). Selon Grassé *et al.* (1961), certaines espèces d'ascidies habitent des lagunes où la salinité subit d'amples variations. De même, selon Swami et Karande (1988), les ascidies continuent à s'installer abondamment malgré de larges fluctuations de salinité. Par contre, lors des opérations de dragage, elles sont sensibles à l'augmentation des niveaux de turbidité (Moran, 1991).

L'ascidie *Pyura chilensis* affecte la culture marine de bivalves (Ambler et Canete, 1991). Les ascidies peuvent parasiter les cultures d'huîtres en association avec d'autres groupes comme les moules et les serpules (Je *et al.*, 1988).

1.2.4. Lophophoriens (Bryozoaires)

Dans mon inventaire bibliographique, les bryozoaires sont des organismes aquatiques marins ou d'eau douce, presque toujours sédentaires et coloniaux (Grassé *et al.*, 1961). Les bryozoaires ont été cités parmi les communautés de biosalissures par plusieurs auteurs, soit dans les eaux côtières (Sasikumar *et al.*, 1989) soit en milieu portuaire (Moran et Grant, 1991; Khandeparker *et al.*, 1995).

Les bryozoaires sont inégalement sensibles aux variations de paramètres de leur environnement. En condition d'eutrophisation dans le lac Biserovo, près de Moscou (Krivenko, 1984), les bryozoaires sont le groupe dominant des biosalissures. Durant les années où sévit une prolifération "bloom" d'algues planctoniques bleues et une température d'eau élevée, ce groupe disparaît et dans ce cas la biomasse des biosalissures est réduite de plus de 10 fois.

Dans le port australien de Kembla, une pollution attribuée à des niveaux élevés de composés cyanhydriques, ammoniacaux et phénoliques a réduit le taux d'installation larvaire des espèces de bryozoaires *Bugula neritina* et *Tricellaria porteri* (Moran et Grant, 1993), mais cette pollution est restée sans effet sur la colonisation par l'espèce *Watersipora arcuata*. De même, Moran et Grant (1991) constatent que certains bryozoaires supportent leur transfert de zones non polluées vers des zones très polluées alors que d'autres espèces disparaissent dans ces conditions soit sous l'effet direct des polluants soit sous l'effet d'espèces compétitives.

Certains bryozoaires se fixent sur des bateaux (Lenihan *et al.*, 1990), ou font partie des parasites des cultures d'huîtres (Nair *et al.*, 1984; Je *et al.*, 1988). En station de pisciculture, la croissance du poisson-chat (*Ictalurus punctatus*) est gênée par l'infestation par le bryozoaire *Plumatella casmiana* (Greenland *et al.*, 1988).

1.2.5. Cnidaires (hydraires)

Les cnidaires contiennent des espèces fixées à un substrat et formant des colonies par bourgeonnement, ou des formes libres solitaires, pélagiques ou non (Grassé *et al.*, 1961).

Selon Braiko et Dobrotina (1988), les hydres constituent un important maillon dans la productivité des mers, en effet, le suivi du développement des populations chez *Obelia loveni* pendant les stades précoces durant 2 années, a montré que la production de colonies d'hydres au printemps excède 12 planulas par cm².

Les hydraires ont été citées parmi les communautés de biosalissures par plusieurs auteurs (Santhakumaran et Sneli, 1984; Krivenko, 1984; Vrizer, 1986; Oshurkov, 1986; Nair *et al.*, 1988). Dans les eaux côtières de Madras en Inde, les hydraires s'installent comme espèce pionnière suivie par les balanes et les ascidies (Sasikumar *et al.*, 1990). L'installation des larves planula des hydraires coloniaux *Gonothyrea loveni* et *Laomedea flexuosa* dépend de l'influence du film bactérien couvrant la surface algale (Orlov *et al.*, 1994).

1.2.6. Annélides (polychètes)

A quelques rares exceptions près, les annélides polychètes sont marines (Grassé *et al.*, 1961). Les polychètes ont été cités parmi les biosalissures par plusieurs auteurs (Santhakumaran et Sneli, 1984; Santhakumari et Nair, 1984; Sasikumar *et al.*, 1989; Canete et Ambler, 1990; Nandakumar *et al.*, 1993; Khandeparker *et al.*, 1995).

Dans la région de Hong Kong, les biosalissures sont essentiellement des polychètes (Wang et Huang, 1993), avec *Hydroides elegans*, *Hydroides dirampha*, *Hydroides inornata* et *Pomatoleios kraussii* comme espèces dominantes.

Chez le polychète *Pomatoleios kraussii*, l'installation est influencée par l'attraction des adultes déjà installés (Becker, 1993). Le nombre spécifique de salissures polychètes diminue avec l'instabilité du substrat (Bagaveeva, 1986).

Des polychètes, par exemple du genre *Dexiospira*, s'attachent aux bateaux de pêche en bois (Cheng et Chen, 1994). Sur ces navires, Bagaveeva (1988) a recensé 44 espèces de polychètes. La biomasse des biosalissures polychètes peut être importante: par exemple, au nord-ouest du Japon, la masse spécifique des polychètes constituée de *Hydroides elegans*, *Hydroides ezoensis*, *Polydora limicola* atteint plusieurs kg/m².

Le polychète serpule *Hydroides elegans* Haswell est l'un des organismes sédentaires majeurs qui infestent les bateaux situés aux endroits confinés et eaux polluées d'un bassin portuaire à Bombay, générant des poids pouvant atteindre 81 kg/m² (Udhayakumar et Karande, 1996). Leur tolérance résulte probablement de la disponibilité en nourriture constituée de flore riche et variée de diatomées.

Selon Read et Gordon (1991), l'apparition soudaine de certaines biosalissures (*Ficopomatus enigmaticus*, serpule polychète) est nuisible en milieu portuaire et estuarien en raison de leur développement excessif sur les bateaux de plaisance ou au niveau des prises d'eau pour les centrales électriques. De même, dans les cultures d'huîtres (*Pinctada fucata mariensii*), le polychète *Polydora ciliata* est l'organisme qui cause le plus de dommages au sud de la Corée en perçant les coquilles (Je *et al.*, 1988).

1.2.7. Arthropodes (Crustacés)

Les crustacés ont été cités comme biosalissures par plusieurs auteurs (Santhakumaran et Sneli, 1984; Santhakumaran, 1984; Santhakumari et Nair, 1984; Vraser, 1986; Nair *et al.*, 1988; Sasikumar *et al.*, 1989; Harms, 1990; Maruthamuthu *et al.*, 1990; Zvyagintsev, 1991;

Oshurkov, 1986; Sasikumar *et al.*, 1990; Ambler et Canete, 1991; Nandakumar *et al.*, 1993).

La température de l'eau détermine indirectement les taux de recrutement en affectant la taille des individus, leur fécondité et leur vie en cohorte. Elle détermine la densité et la dynamique de population de l'Amphipode *Jassa marmorata* cité parmi les biosalissures (Franz, 1989). Les fluctuations de salinité paraissent affecter l'installation dans les plateaux tests des larves de cirripèdes (Srinivas *et al.*, 1992). Pour *Balamus crenatus*, le taux de croissance diminue avec l'augmentation de la profondeur (Santhakumaran, 1984).

Selon Kashin et Kuznetsova (1985), les mécanismes et dynamiques d'installation de *Balamus* varient en fonction des substrats: la densité de colonisation de *Balamus improvisus* durant 1 mois de mise en contact est 113 000 individus/m² sur les plateaux en ciment et 156 000 sur des plateaux métalliques.

Plusieurs espèces, comprenant les balanes *Hexaminius sp.*, *Balamus amphitrite* et *Balamus variegatus*, sont recrutées en plus grand nombre sur les surfaces en béton et en contre-plaqué que sur celles de verre ou d'aluminium. Il en résulte que l'évolution des effectifs des espèces en fonction du temps dépend de la nature du substrat (Anderson et Underwood, 1994).

Selon Kashin et Kuznetsova, (1985), deux facteurs principaux déterminent les mécanismes et dynamiques d'installation de *Balamus*: la structure de la surface et la direction de flux. Malgré une meilleure adhérence de l'espèce *Balamus variegatus* sur les substrats ayant une tension superficielle élevée, les modes de colonisation ne sont pas influencés par la tension superficielle du substrat, mais semble-t-il par la compétition spatiale (Becker, 1993).

Les balanes sont sensibles à l'augmentation des niveaux de turbidité produite par les opérations de dragage (Moran, 1991). Cependant, certaines espèces comme *Balamus amphitrite* ont une grande capacité d'adaptation à la pollution organique (Igic, 1992).

Les crustacés *Ballanus amphitrite* se fixent sur les bateaux (Zvyagintsev, 1984; Zevina, 1988; Zullo, 1992; Cheng et Chen, 1994). On les retrouve en milieu portuaire avec d'autres biosalissures (Khandeparker *et al.*, 1995). Par exemple, dans le Canal de Suez (Shoukr *et al.*, 1991), 22 espèces de crustacés (amphipodes, tanaidacés et isopodes) étaient retrouvées en plus d'autres biosalissures. Les balanes font partie des macrosalissures responsables de la détérioration corrosive des piliers supportant des plates-formes pétrolières (Zvyagintsev, 1989). D'après Maruthamuthu *et al.* (1990), *Balamus tintinnabulum* est l'une des espèces produisant le plus de corrosion pour les structures métalliques dans le port Tuticorin en Inde.

Selon Nair *et al.* (1984), les balanes constituent le groupe dominant infestant les cultures de

l'huître *Crassostrea madrasensis* dans les étangs du sud-ouest de l'Inde. Il en est de même pour les cultures de coquilles *Mizuhopecten yessoensis* (Ovsyannikova, 1989) dans la mer du Japon. Au nord-ouest d'Espagne, les balanes *Elminius modestus* et *Balanus perforatus* peuvent faire partie des espèces vivant en épibiose sur les coquilles de Bivalves vivants (Sacchi, 1985).

1.2.8. Mollusques

Les mollusques ont été cités parmi les salissures biologiques (Sakaguchi, 1986 a, b; Nair *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 1990; Maruthamuthu *et al.*, 1990; Zvyagintsev, 1991; Moreteau et Khalanski, 1994; Macisaac, 1996; Schloesser *et al.*, 1996; ...) par de nombreux auteurs, le groupe des bivalves paraissant en être le plus important. Ces derniers sont fouisseurs, nageurs, fixés ou perforants (Grassé *et al.*, 1961).

La durée d'immersion des surfaces peut déterminer les faciès biologiques des biosalissures. Par exemple, ces derniers peuvent être représentés par *Mytilus galloprovincialis* en été et par des serpules dans les autres saisons (Tursi *et al.*, 1984). De plus, l'épaisseur du support semble jouer un rôle sur l'installation des mollusques, celle-ci pouvant être plus importante sur un support métallique d'épaisseur supérieure à 2,5 cm (Maruthamuthu *et al.*, 1990).

Comme la plupart des autres biosalissures, certaines espèces de Mollusques choisissent préférentiellement certaines profondeurs, mais généralement, l'importance des biosalissures diminue avec la profondeur. Par exemple le maximum de croissance de l'espèce *Psiloteredo megotara* se situent entre 3 et 15 m de profondeur, tandis que *Xylophaga dorsalis* se concentre surtout au voisinage des 30 m, la taille des coquilles et des terriers augmentant avec la profondeur jusqu'à 24-27 m puis montrant un léger déclin à 30 m (Santhakumaran, 1984).

Certaines espèces de mollusques sont responsables de la perforation de bois comme *Psiloteredo megotara*, *Xylophaga dorsalis*, *Xylophaga nidarosiensis*, *Xylophaga noradi* et *Limnoria lignorum*, et leur action combinée peut aboutir à la destruction des bois de charpente (Santhakumaran et Sneli, 1984). De même, les mollusques bivalves produisent une détérioration corrosive des piliers supportant des plates-formes pétrolières (Zvyagintsev, 1989). *Crassostrea cristagalli* est citée par Maruthamuthu *et al.* (1990) comme une des espèces produisant le plus de corrosion pour les structures métalliques en milieu marin.

Le développement abondant des mollusques est la caractéristique de la phase intermédiaire précédant la formation d'une charpente puissante de récif artificiel notamment à partir de coquilles de mollusques morts (Selin, 1991).

Mais l'une des principales sources de nuisance des mollusques est leur développement

excessif dans les circuits hydrauliques des centrales électriques. La moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (moule zébrée) cause des pertes économiques importantes en colonisant et en bloquant les prises d'eau. Les mollusques ont aussi un impact écologique important en consommant d'immenses quantités de phytoplancton (Fisher *et al.*, 1991; Macisaac, 1996; Padilla *et al.*, 1996).

En centrale électrique indienne, la moule verte *Perna viridis* domine (Nair *et al.*, 1988). Dans les systèmes de refroidissement des centrales électriques au Japon (Sakaguchi, 1986), la moule *Mytilus edulis galloprovincialis* constitue la principale espèce qui prolifère de manière importante. En Finlande, la moule *Mytilus edulis* fait partie des biosalissures citées.

En France, la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) prolifère de manière importante dans les circuits des centrales électriques (Moreteau et Khalanski, 1994). La densité larvaire est maximale entre juin et août (21-25°C), la croissance de la coquille dépendant de 3 facteurs: la taille initiale, la température et la nourriture disponible mesurée par la quantité de chlorophylle-a planctonique. Le programme biologique de suivi de l'infestation par la moule zébrée pourrait ainsi se réduire à un suivi de la fixation larvaire sur supports artificiels en PVC complété par deux analyses courantes de qualité d'eau: température et chlorophylle-a.

La composition des éléments traces dans les tissus de moules *Mytilus trossulus* récoltées dans des plateaux tests paraît dépendre de la nature chimique du substrat et peut servir d'indicateur de pollution des eaux contenant des produits de corrosion des constructions métalliques dans la mer du Japon (Koryakova et Zorina, 1989).

En résumé, les espèces constitutives des biosalissures sont très variées mais paraissent appartenir pour la plupart à un nombre restreint de groupes systématiques. Dans un milieu donné, il est très rare de trouver un seul groupe de biosalissures, des groupes différents étant associés comme balanes et mollusques ou polychètes, bryozoaires, balanes et ascidies.

Dans les limites de ma recherche bibliographique, il semble que les connaissances concernant de nombreuses régions du globe sont absentes notamment les côtes africaines.

1.3. Cas des espèces parasites perforantes

Certaines biosalissures infestent les cultures de coquillages perturbant notamment leur survie et leur croissance (Wildish *et al.*, 1988; Ovsyannikova, 1989; Morales-Alamo et Mann, 1990; Perera *et al.*, 1990; Newman *et al.*, 1993).

Les parasites peuvent être des balanes (Lake *et al.*, 1987; Ovsyannikova, 1989), des

plathelminthes polyclades du genre *Stylochus* (Littlewood et Marsbe, 1990; Newman, *et al.*, 1993), ou autres. La vitesse d'infestation est rapide, par exemple, 40 % et 74 % des huîtres sont infestées par des vers après respectivement 1 et 4 jours (Littlewood et Marsbe, 1990). Même si les vers de grande taille contribuent plus aux mortalités, il n'y a pas de corrélation significative entre la taille des vers et celle des huîtres tuées ou infestées. De même, des surfaces en acier propres exposées aux eaux de refroidissement provenant d'industrie pétrochimique dans la baie Guanabara (Brésil), montrent la présence de bactéries, microalgues et champignons après 48 heures seulement (De-Franca et Lutterbach, 1996).

En golfe persique, des cultures d'huîtres à perle *Pinctada margaritifera* et *Pinctada radiata* ont été infestées par des organismes perforants, notamment des balanes et polychètes. Dans les conditions naturelles les éponges, algues et ascidies sont les principales biosalissures dont l'éponge *Cliona* et la moule *Lithophaga* sont les plus destructives des espèces perforantes des coquillages (Doroudi, 1996).

La diversité spécifique des biosalissures vivant en épibiose sur les coquilles de mollusques vivants peut être très élevée (Sacchi, 1985). Ainsi, sur les coquilles de *Littorina obtusata* et *Littorina mariaae*, 14 espèces d'animaux épibiotiques ont été retrouvés, notamment des balanes *Elminius modestus* et *Balanus perforatus*.

1.4. Cas des espèces génératrices de corrosion ou perforant le bois

Les espèces génératrices de corrosion des structures métalliques ou attaquant le bois font partie essentiellement de deux groupes zoologiques: les mollusques bivalves comme *Crassostrea cristagalli* et les crustacés cirripèdes comme *Balanus tintinnabulum* (Santhakumari et Nair, 1984; Berg *et al.*, 1987; Radhakrishnan *et al.*, 1987; Dealteris *et al.*, 1988; Zvyagintsev, 1989; Maruthamuthu *et al.*, 1990; Ma-Shi *et al.*, 1995; Singh et Sasekumar, 1996).

Les bivalves sont des microphages, se nourrissant de micro-organismes et des particules organiques en suspension dans l'eau ambiante. Peu de bivalves suivent un régime spécialisé, toutefois quelques genres se nourrissent de bois creusant de profondes galeries dans les troncs flottés, les madriers de digues, etc. (Grassé *et al.*, 1961). Citons les tarets comme *Teredo furcifera*, les xylophages comme *Xylophaga atlantica* (Santhakumari et Nair, 1984; Dealteris *et al.*, 1988; Singh et Sasekumar, 1996). Les bivalves xylophages possèdent parmi leurs diastases digestives, une cellulase qui hydrolyse la cellulose (Grassé *et al.*, 1961).

La salinité agit sur la présence des mollusques perforants *teredinidae* comme les espèces *Lyrodus floridamus*, *Bankia fimbriatula*, *Teredo navalis*, et *Teredo furcifera*. La composition spécifique et la dominance de ces espèces sont influencées principalement par des facteurs abiotiques comme la salinité, alors que le niveau total d'infestation est associé non seulement à la salinité, mais aussi à des facteurs comme la quantité relative et la qualité des biosalissures, la présence de foyer de dispersion larvaire et la présence de substrat (Junqueira *et al.*, 1989).

D'après Strittmatter *et al.* (1993), le taux de corrosion est complètement dominé par la nature des eaux dans les systèmes hydrauliques. Le contrôle de la corrosion et le dépôt dans les surfaces des échangeurs thermiques sont déterminés par plusieurs facteurs qui traditionnellement agissent sur les biosalissures dans ces systèmes.

Auteurs	Milieu	Espèces	Nuisance
Maruthamuthu <i>et al.</i> , 1990	Port Tuticorin	<i>Balamus tintinnabulum</i> et <i>Crassostrea cristagalli</i>	corrosion
Santhakumari, et Nair, 1984	estuaire	<i>Martesia striata</i> , <i>Teredo furcifera</i> , <i>Nausitora hedleyi</i> , <i>Sphaeroma terebrans</i>	perforant le bois
Zvyagintsev, 1989	plate-forme pétrolière	balanes-mollusques	corrosion
Radhakrishnan <i>et al.</i> , 1987	estuaire	sphaeromatidés	perforant le bois
Dealteris <i>et al.</i> , 1988	casiers à homard en bois	<i>Xylophaga atlantica</i>	perforant le bois
Ellison et Farnsworth, 1990	mangroves	<i>Phycolimmoria clarkae</i> , <i>Rhizophora mangle</i>	perforant le bois
Singh et Sasekumar, 1996	aquaculture	<i>Martesia striata</i> , <i>Lyrodus pedicellatus</i> , <i>Bankia campanellata</i> , <i>Teredo furcifera</i> et <i>Teredo bartschi</i>	perforant le bois

Tableau 1. Exemples d'espèces génératrices de corrosion ou perforant le bois

1.5. Recrutement

Chez la moule marine (*Mytilus edulis galloprovincialis*), principale biosalissure dans les centrales électriques au Japon, la saison de reproduction dépend de la position géographique (Sakaguchi, 1986 b). La saison d'installation des larves commence à partir des mois de février, avril ou mai selon les régions.

Les larves mûres de *Mytilus edulis* s'installent d'abord sur des algues rouges filamenteuses

à l'écart des litières des moules adultes (installation primaire). Puis les larves pédivéligères pélagiques suivent une phase de migration au grès des courants. Enfin, lorsque leur taille atteint un seuil de 0,9 à 1,5 mm, les jeunes moules s'attachent aux litières des moules adultes (installation secondaire). Le byssus est formé de grappes de filaments et de disques adhésifs à partir de sécrétions de glandes collagènes, glandes phénoliques et glandes enzymatiques (Sakaguchi, 1986 b; Rzepecki et Waite, 1995).

Dans le Port New Mangalore (côte ouest de l'Inde), les larves de polychètes et cirripèdes sont présentes pendant toute l'année. Il en est de même des larves de bivalves dans le plancton, mais leur participation aux communautés de macrosalissures reste peu importante avec un faible taux de recrutement (Khandeparker *et al.*, 1995).

Dans la baie Hamana au Japon, la période de recrutement de balanes *Balanus amphitrite* dans les communautés de macrosalissures est courte et paraît influencée par la température, mais surtout par la salinité (Anil *et al.*, 1995). Les taux de mortalité larvaire à 15°C se situent entre 43 % et 99 % pour des salinités comprises entre 30 et 10 g/L.

Au sein du même groupe zoologique, le taux de recrutement diffère selon les espèces. Par exemple, dans le sud-est brésilien, parmi les 5 espèces d'ascidies les plus abondantes sur des plateaux tests (Rocha, 1991), deux d'entre elles *Diplosoma listerianum* et *Symplegma brakenhielmi* montrent le taux de recouvrement initial le plus élevé. L'espèce *Didemnum speciosum*, bien que recrutée en grand nombre, présente un faible recouvrement après quelques mois en raison de son faible taux de croissance. *Clavelina oblonga* est l'espèce dont l'installation est typiquement tardive avec une faible intensité de recrutement et un taux de croissance lent.

En résumé, le recrutement est influencé par plusieurs facteurs comme la densité interspécifique, la quantité de nourriture, la période de l'année, la nature du substrat, la température, la présence d'autres biosalissures, l'âge des individus, l'espèce, ... (Bros, 1987; Franz et Mohamed, 1989; Zajac *et al.*, 1989; Ambler et Canete, 1991; Anderson et Underwood, 1994).

1.6. Biomasse et abondance spécifique

En général, le terme de biomasse se réfère uniquement à de la matière vivante. La biomasse est exprimée en termes de poids sec, nombre d'individus, contenus en carbone et en azote, contenu calorifique, etc. (Frontier et Viale, 1990).

La biomasse des biosalissures dépend de nombreux facteurs notamment leur répartition géographique ou locale, leur évolution temporelle, surtout saisonnière, la profondeur, leur distribution par niveau trophique, la classe de taille, âge, la nature de leur substrat, leur nourriture, etc. (Brykov *et al.*, 1986; Bagaveeva, 1988; Nair *et al.*, 1988; Nasser et Vasquez, 1989; Ovsyannikova, 1989; Sasikumar *et al.*, 1989; Zvyagintsev, 1989; Maruthamuthu *et al.*, 1990; Wang et Huang, 1993). Dans notre échantillon bibliographique, les études mettant en évidence les effets de pollutions sur la biomasse sont peu nombreuses (Morant et Grant, 1991 et 1993).

Auteurs	Biomasse-densité	Biodiversité	Endroit
Krivenko, 1984		> 33 espèces	lac Biserovo (Moscou)
Brykov <i>et al.</i> , 1986	moules marines. 3 m (profondeur): 45,8 kg et 29 400 individus /m ² /an 12 m (profondeur): 24,8 kg et 8100 individus/m ² /an		mer du Japon
Bagaveeva, 1988	plusieurs kg/m ²	44 espèces de polychètes	navires (Japon)
Nair <i>et al.</i> , 1988	0,9 Kg/m ² /20 j en février/mars 5,1 Kg/m ² /20 j en mai		eaux côtières (Inde)
Zvyagintsev, 1989	40 kg/m ²	32 espèces	plate-forme pétrolière (Chine)
Maruthamuthu <i>et al.</i> , 1990	5 kg/m ² /an	42 espèces	port Tuticorin (Inde)
Shoukr <i>et al.</i> , 1991		22 espèces de crustacés	canal de Suez
Nandakumar <i>et al.</i> , 1993		17 espèces	baie Tomioka (Japon)
Wang et Huang, 1993	20,34 kg /m ²	70 espèces de polychètes	Hong Kong (région)
Meenakumari et Nair, 1994		67 espèces	port Cochin (Inde)
Moreteau et Khalanski, 1994	moule zébrée: 8300-68800 individus/m ²		centrale électrique (France)
Schloesser <i>et al.</i> , 1996	moule zébrée: 750000 individus/m ²		Lac Erié (Etats Unis)

Tableau 2. Exemples de biomasse et biodiversité des biosalissures

1.7. Dissémination des biosalissures en milieu aquatique

L'activité humaine incluant la commercialisation des huîtres du Pacifique et de l'Atlantique à travers le monde, et les trafics maritimes (via les organismes fixés aux navires, perforants du bois et sur les ballastes) ont été les mécanismes primordiaux de dispersion (Carlton, 1992). L'introduction d'espèces par le trafic des bateaux a été citée par plusieurs auteurs (Zvyagintsev, 1984; Thorp *et al.*, 1987; Venugopalan et Wagh, 1987; Bagaveeva, 1988; Zolotarev, 1996).

L'installation des biosalissures sur les navires est rapide (Zevina, 1988), par exemple, des navires effectuant la navette entre la mer noire et l'océan indien ont été le support d'un développement rapide d'espèces océaniques (*Lepas anatifera* et *Lepas anserifera*) et d'espèces côtières (cirripèdes des genres *Megabalamus* et *Balamus*, hydroides et polychètes sédentaires).

L'espèce *Balamus trigonus*, absente de l'océan atlantique avant 1850, a pu y être introduite au sud par des bateaux provenant des océans pacifique et indien et contournant les caps Horn et de Bonne Espérance, et plus tard disséminée dans les parties centrales et nordiques de cet océan par des baleiniers (Zullo, 1992).

Le développement de la navigation nécessite des réglementations destinées à empêcher ou limiter au maximum les bouleversements écologiques provoqués par des introductions d'espèces comme le suggèrent Zaitsev *et al.* (1988) après la découverte en mer noire de *Bolinopsis infundibulum*, un cténophore d'origine boréale.

Un autre mode de dissémination a été observé lors des 15 dernières années. Il s'agit de l'introduction dans les côtes européennes d'algues brunes comme *Undaria pinnatifida* et *Laminaria japonica* à la suite d'importation d'huîtres japonaises en ostréiculture. Les conséquences écologiques de leur dispersion restent jusqu'ici difficiles à évaluer (Rueness, 1989).

D'après Carlton, (1992), l'espèce *Littorina littorea*, mollusque marin introduit dans le Nord de l'Amérique, a eu un important impact écologique car elle a colonisé les côtes atlantiques à partir de Nova Scotia jusqu'à New Jersey sur une période de 30 ans entre 1860 et 1890, réduisant la biodiversité et l'abondance ou la distribution de plusieurs espèces animales et végétales.

D'autres part, l'introduction de la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) dans les grands lacs américains a induit des changements profonds dans la structure des communautés de

bivalves natives. Dans 3 sites inspectés du lac Erié, deux bivalves natives *Lampsilis radiata* et *Amblema plicata*, ont manifesté des mortalités importantes en réponse à l'introduction de *Dreissena polymorpha* (Haag *et al.*, 1993; Schloesser *et al.*, 1996). De même, l'introduction intentionnelle de nouvelles espèces de mollusques *Rapana thomasiana*, *Mya arenaria*, et *Scapharca inaequivalvis* est la cause des transformations modernes de certaines biocoenoses dans la mer noire. Ces mollusques ont passé les barrières naturelles suite à leur fixation aux bateaux ou aux balastes, et leur acclimatation produit des communautés ayant une densité et biomasse élevées (Zolotarev, 1996).

Selon Mills *et al.* (1993), les grands lacs laurentiens ont été envahis par de nombreuses espèces exotiques depuis l'installation des européens dans la région. Depuis 1800, 139 espèces d'organismes aquatiques non indigènes y ont été recensées: des plantes (59), poissons (25), algues (24) et mollusques (14). La plupart des espèces sont originaires d'Eurasie (55 %) et de la côte Atlantique (13 %). Cinq catégories de mécanismes d'entrée ont été identifiés: relâchements non intentionnels (29 %), incluant des échappées de culture et aquaculture, relâchements accidentels et/ou des relâchements délibérés, l'introduction relative aux bateaux (29 %) incluant eaux de ballast (63 %) ballasts solides (31 %) et biosalissures. Ainsi; tant que les activités humaines rendront possible l'introduction de nouvelles espèces dans le bassin des Grands Lacs, la plus importante ressource en eau douce du monde continuera d'être menacée par des changements écologiques de grande ampleur.

1.8. Agents anti-salissures

Pour faire face au développement excessif des biosalissures dans les installations industrielles, les exploitants utilisent des traitements chimiques divers, à l'origine d'apport de xénobiotiques responsables de perturbations des écosystèmes aquatiques (Davis et Paul, 1986; Dempsey, 1986; Short et Thrower, 1987; Ramsay *et al.*, 1988; Lenihan *et al.*, 1990; Karande *et al.*, 1993; Khalanski, 1993; Evans *et al.*, 1995 a, b).

Divers procédés de traitement anti-salissure ont été développés: traitements physiques, mécaniques et/ou chimiques (Whitehouse *et al.*, 1985; Khalanski et Lutz, 1987; Wolfaart et Cloete, 1992). Aux critères de sélection parmi ces procédés que sont leur efficacité et leur possibilité de mise en oeuvre à l'échelle industrielle, devrait s'ajouter leur innocuité à court et à long terme pour l'écosystème aquatique (Khalanski, 1993).

1.8.1. Agents biologiques naturels

Il est légitime de se demander pourquoi les surfaces présentées par les organismes de certaines espèces ne sont pas colonisées par des salissures alors qu'elles constituent apparemment des supports idéaux. Dans la nature, plusieurs de ces espèces produisent des substances ayant des propriétés répulsives (Uriz *et al.*, 1991), antibactériennes éventuellement sélectives (Walls *et al.*, 1993), antifongiques, antivirales, cytotoxiques ou antimitotiques (Tableau 3).

Auteur	Espèce	Substance répulsive	Espèce cible
Schmitt <i>et al.</i> , 1995	<i>Dictyota menstrualis</i> (algue brune)	alcools diterpene	larves du Bryozoaire <i>Bugula neritina</i>
Walker <i>et al.</i> , 1985	<i>Aplysia fistularis</i> (éponge)	métabolites	microorganismes
Bobzin et Faulkner, 1992	<i>Aplysilla glacialis</i> (éponge)	métabolites	microorganismes
Sears <i>et al.</i> , 1990	<i>Lissodendoryx isodictyalis</i> (éponge)	métabolites extraits par l'acétate d'éthyle	balane (<i>Balanus amphitrite</i>)
Goto <i>et al.</i> , 1993	<i>Phyllospongia papyracea</i> (éponge)	furospongolide	balane (<i>Balanus amphitrite</i>)
Thompson, 1985	<i>Aplysina fistularis</i> (éponge)	métabolite (inhibiteur de la métamorphose)	larves de Gastéropodes
Konig <i>et al.</i> , 1989	<i>Xenia garciae</i> (cnidaire)	xenicane diterpene	algue <i>Ceramium codii</i>
Gerhart, 1986	<i>Plexaura homomalla</i> (gorgonide)	prostaglandine A-2 (agent vomitif)	poissons
Davis, 1991	<i>Eudistoma olivaceum</i> (ascidie)	alcaloïdes eudistomines G et H	invertébrés, sans effet sur les poissons
Braiko <i>et al.</i> , 1988	<i>Botryllus schlosseri</i> (ascidie)	métabolites protéiques	larves de balanes, copépodes, moules
Willemsen, 1995	Eponges	métabolites extraits par l'acétate d'éthyle	larves de <i>Balanus amphitrite</i>

Tableau 3. Exemples de substances anti-biosalissures naturelles

Ces métabolites secondaires produits par les invertébrés marins jouent généralement un rôle dans leur survie; plusieurs sont toxiques et servent à lutter contre la prédation, l'infection, l'infestation par des biosalissures ou autres phénomènes écologiques (Jayatilake et Baker, 1996).

Des organismes marins comme certains Tuniciés ou Mollusques se défendent au moyen de sécrétions acides qui peuvent en outre les protéger contre la prédation par les Poissons (Thompson, 1988). Certains micro-organismes sécrètent des biosurfactants qui pourraient être utilisés comme agents anti-salissures (Busscher *et al.*, 1996).

D'autres part, des extraits méthanoliques d'une plante terrestre *Derris scandens* ont montré une inhibition de la croissance de biosalissures: 4 espèces de diatomées et 7 espèces de bactéries (Sawant *et al.*, 1995).

Jusqu'à présent, les potentialités anti-salissures de ces agents biologiques naturels n'ont pas été utilisées à l'échelle industrielle, peut être en raison du coût trop élevé de leur développement.

Des méthodes de lutte biologiques peuvent être aussi utilisées: par exemple, l'élimination des salissures végétales en ostréiculture par des consommateurs comme *Littorina littorea* L. (Enright *et al.*, 1984).

1.8.2. Méthodes physiques

1.8.2.1. Filtres divers

La première méthode de lutte contre les biosalissures est la filtration à l'aide de filtres rotatifs, filtres à débris ou à coquillages, qui permettent de collecter et d'évacuer les organismes et débris transitant dans l'eau, notamment les algues, les coquilles et les méduses (EDF, 1996).

1.8.2.2. Flux

Selon Wolfaardt et Cloete, (1992), les taux de colonisation bactérienne diminuent avec l'augmentation du flux de l'eau. Les larves des organismes marins ne se fixant pas à des vitesses de circulation de l'eau supérieures ou égales à 1,5 m/s, les circuits peuvent être conçus de manière à dépasser ce seuil (Whitehouse *et al.*, 1985).

1.8.2.3. Traitement thermique

Le traitement thermique peut constituer un procédé efficace. Cependant, il est souvent difficile de maintenir les températures de traitement sur la totalité des installations (Sakaguchi, 1989 b et 1992; Khalanski, 1993).

Chez la moule marine (*Mytilus edulis galloprovincialis*) de taille moyenne 50 mm, la résistance diminue avec la température de traitement: le temps nécessaire pour tuer 50 % de la population est de 110 h à 20°C, 9 h à 30°C et seulement 1 h à 40°C. En dessous de 30°C, les

moules jeunes sont plus résistantes que les moules âgées, mais ce rapport s'inverse au dessus de 40°C (Sakaguchi, 1986).

Chez la moule brune tropicale *Perna indica*, de taille 9 mm, 100 % de mortalité est atteinte à la température de 38°C en 120 min (Rajagopal *et al.*, 1995). La mortalité dépend de l'âge des moules, les jeunes étant plus sensibles. Au delà de 30°C, ces moules montrent une réduction progressive des activités physiologiques comme le taux de filtration, l'activité de nutrition et la production du byssus.

L'efficacité du traitement augmente avec la fréquence des traitements et pendant la période d'installation des moules. Le traitement affecte aussi les hydroides qui servent comme support d'installation de moules juvéniles (Sakaguchi *et al.*, 1989).

En France, le traitement thermique en centrale électrique consiste à échauffer périodiquement les circuits en maintenant une température d'au moins 40°C pendant au moins 1 heure. Une partie de l'eau chauffée est recirculée et dirigée vers la prise d'eau pour empêcher la fixation des biosalissures sur la partie du circuit située en amont du condenseur. Toutefois, ce procédé implique de lourdes dispositions constructives et des contraintes d'exploitation importantes et ne supprime pas tout recours à un traitement supplémentaire contre les dépôts organiques (Khalanski et Lutz, 1987).

1.8.2.4. Rayonnement ultraviolet

Cette méthode est utilisée pour la stérilisation des eaux potables, mais son application est fortement limitée en raison notamment de la turbidité généralement élevée des eaux industrielles (Whitehouse *et al.*, 1985) et de la difficulté de traiter en général l'intérieur des installations.

1.8.2.5. Ultrasons

Les traitements par ultrasons seraient susceptibles de détruire ou d'immobiliser les larves de moule (Khalanski et Lutz, 1987). Selon Whitehouse *et al.* (1985), un traitement à 20 KHz, 10 W/cm² durant 20 secondes réduit de 60 % la fixation des moules. Cependant, en eau de mer les ultrasons pourraient générer du chlore, déterminant alors des effets toxiques secondaires.

1.8.2.6. Méthodes électriques

Un choc électrique de 100-400V sous une fréquence de 100 Hz pendant 0,25 secondes provoque 60 % de mortalité chez des larves de moules (Whitehouse *et al.*, 1985). Les 100 %

de mortalité pourrait être atteints avec cette méthode, mais le coût élevé et la formation de chlore par électrolyse de l'eau limitent son utilisation à grande échelle.

1.8.3. Méthodes mécaniques

En centrales électriques, les salissures peuvent être éliminées en continu par le passage de boules tampons, ou par nettoyage lors des mises hors d'eau, ou grâce à l'intervention de plongeurs (Khalanski et Lutz, 1987; EDF, 1996). Toutefois, ces nettoyages sont souvent longs et coûteux et généralement difficiles à réaliser en fonctionnement (Khalanski, 1994).

1.8.4. Méthodes chimiques

1.8.4.1. L'ozone

L'ozone est un agent bactéricide utilisé dans le traitement de l'eau potable et des effluents industriels (Whitehouse *et al.*, 1985; Strittmatter *et al.*, 1993). Toutefois, il est difficile d'obtenir sa distribution uniforme dans l'eau. L'injection devrait avoir lieu à quelques mètres des circuits à protéger. En eau de mer, l'utilisation de l'ozone libère des molécules de brome. La concentration en injection continue pour lutter contre la moule marine *Mytilus edulis* est entre 0,25 et 0,5 mg/L.

Cependant en raison de son coût élevé et des difficultés de mise en oeuvre, la méthode de traitement à l'ozone n'a pu être généralisée à grande échelle.

1.8.4.2. L'acroléine

L'acroléine a été proposée comme agent anti-salissure, mais le coût élevé des traitements par rapport à la chloration et le danger toxique lié à son utilisation sont des facteurs limitants, malgré son efficacité vis-à-vis des larves de moules en tests de laboratoire (Whitehouse *et al.*, 1985).

1.8.4.3. La chloration

La chloration est le procédé le plus largement utilisé à ce jour dans le monde, en raison des avantages suivants (Khalanski et Lutz, 1987):

- * efficacité prouvée contre les macrosalissures et le film bactérien,
- * possibilité de produire à volonté *in situ* les solutions de traitement par électrolyse de l'eau de mer, ce qui évite, en bord de mer, le transport et le stockage de produits souvent dangereux, mais sans supprimer complètement les risques.
- * coût supportable.

Le contrôle du film bactérien peut être réalisé par injection de 2 à 10 mg/L de chlore pendant 10 à 20 minutes tous les 4-8 heures (Whitehouse *et al.*, 1985). Le chlore est en général utilisé pour lutter contre la prolifération des moules et la chloration continue à faible concentration permet également le contrôle du film biologique. La chloration à forte dose (>50 mg/L) est utilisée pour limiter le développement excessif de la moule zébrée (Khalanski, 1993). Toutefois et en raison de la genèse de trihalomethanes par la chloration d'eaux marines, cette technique a été parfois limitée (Ketelaars et Wagenvoort, 1995).

- Chimie du chlore dans les eaux naturelles

Le chlore actif est injecté dans les circuits d'eau sous forme d'hypochlorite de sodium (NaClO). Il est produit en continu par électrolyse de l'eau de mer dans les stations de pompage des centrales côtières. Les réactions chimiques qui suivent l'injection dans l'eau diffèrent selon la salinité du milieu (Khalanski et Lutz, 1987).

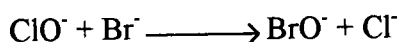
En eau douce, à pH basique (voisin de 8), le chlore injecté se trouve en proportions à peu près égales sous la forme d'acide hypochloreux (HClO) et d'ions hypochlorites (ClO⁻) constituant le "chlore libre". Le chlore libre réagit avec l'azote ammoniacal pour former des chloramines qui constituent le "chlore combiné".

Ces réactions rapides s'accompagnent d'une destruction de l'ammoniaque contenue dans l'eau. La proportion relative de chacune des espèces du chlore combiné dépend du rapport initial des concentrations en chlore et en azote ammoniacal.

Agissant comme toxique cellulaire, le chlore libre détruit les organismes fixés ou en suspension dans l'eau, les bactéries étant généralement plus sensibles que les végétaux et les animaux. Le chlore combiné participe à l'effet toxique.

Le chlore libre réagit également avec les matières organiques dissoutes. Ce type de réactions, beaucoup plus lentes que les précédentes (quelques heures), conduit à la formation de petites quantités de composés organohalogénés, principalement un trihalométhane: le chloroforme (CHCl₃) et des chlorométhanes (CH₂Cl, CH₃Cl).

En eau de mer, les ions bromure (Br⁻) présents dans ce milieu à la concentration de 60 mg/L, sont oxydés immédiatement en ions hypobromites (brome libre) par le chlore libre:



Aux réactions précédentes de chloration de l'azote ammoniacal en eau douce, se superposent dans l'eau de mer des réactions similaires qui conduisent à la formation rapide de bromamines constituant le "brome combiné" (NH₂Br, NHBr₂, NBr₃). Comme le chlore, le

brome libre produit des haloformes dont le plus abondant est le bromoforme (CHBr_3).

La chloration des eaux naturelles aboutit à la formation de composés oxydants (chlore et brome libres et combinés) regroupés sous l'appellation globale d'oxydants résiduels totaux et de composés organohalogénés (haloformes) beaucoup plus stables que les oxydants résiduels totaux.

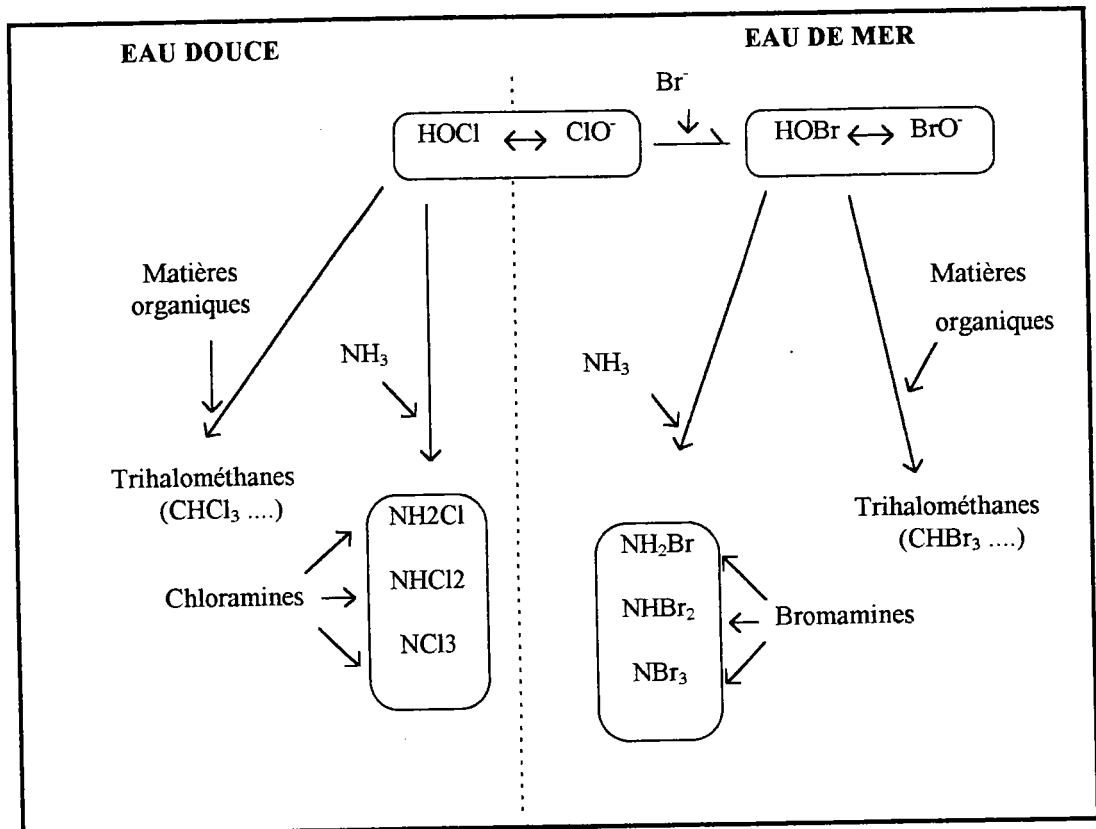


Figure 1. Schéma simplifié des réactions du chlore dans l'eau douce et l'eau de mer. Les composés oxydants sont encadrés (d'après Khalanski et Lutz, 1987).

- Impact sur le milieu aquatique

La toxicité induite par la chloration est due aux oxydants résiduels (Khalanski et Lutz, 1987). Selon ces auteurs, le passage dans le canal de rejet de la centrale de Gravelines conduit à une mortalité de 30 % au maximum pour les principaux groupes zooplanctoniques: copépodes, larves d'annélides, de cirripèdes et de crabes (10 % de mortalité par effet mécanique dû au transit dans les circuits + 10 % de mortalité du fait de l'échauffement au condenseur + 10 % de mortalité par chloration).

Chez les clams asiatiques (*Corbicula fluminea*), l'effet de la chloration dépend fortement de la température. A 20-25°C, des niveaux de 0,25-0,40 mg/L de chlore résiduel total empêchent

le développement de ces mollusques quelques soit leur taille pendant 2 à 4 semaines, alors que les effets sont minimales à 12-15°C (Belanger *et al.*, 1991). Selon Doherty *et al.* (1986), des mortalités élevées (53 %) sont obtenues à des concentrations de chlore résiduel total (TRC) comparables (0,2 à 1,0 mg/L) à des températures de plus de 18°C, et il n'y a pas de différence significative dans l'efficacité du chlore dans le contrôle des stades adultes et juvéniles. Les études de terrain montrent une influence importante de la température: au printemps, lorsque celle-ci est comprise entre 20 et 25°C, on observe 90 % de mortalités après 28 jours d'exposition à une concentration de 0,25 mg/L de TRC, contre seulement 23 % en automne avec une concentration double (0,50 mg/L), alors que les températures ont baissé de 20 à 12°C.

La chloration peut causer des effets indésirables sur des organismes non-cibles comme les poissons. Par exemple, chez les larves du milkfish (*Chanos chanos*), les concentrations nécessaires pour tuer 50 % de la population ou CL₅₀ moyennes pour une heure de traitement sont 1,3 et 1,7 mg/L respectivement pour des larves âgées de 8 et 17 jours après éclosion et la mortalité augmente avec la concentration en chlore (Chien et Chou, 1989).

Chez les larves du hareng atlantique *Clupea harengus*, la CL₅₀ (30 min) était 0,63 mg/L en concentration initiale pour 30 min d'exposition et 0,36 mg/L en concentration initiale pour 24 h d'exposition (Dempsey, 1986). D'autres espèces du zooplancton, par exemple des crustacés, peuvent être affectées dans les centrales électriques (Karas, 1992).

D'après Pfister *et al.* (1994), il existe des formulations à base de chlore comme le niclosamide (5,2'-dichloro-4'-nitrosalicylanilide) et le bayluscide (sel de 5,2'-dichloro-4'-nitrosaficylanilide - ethanol amine) dont l'application en essais de laboratoire contre l'escargot d'eau douce *Indoplanorbis exustus*, vecteur de trématodes en présence du poisson zèbre (*Brachydanio rerio*), permet 100 % de mortalité chez les escargots sans aucun effet observable sur les poissons.

Ainsi, la toxicité de la chloration change selon la nature chimique du chlore utilisé, la durée d'exposition, la température de l'eau, l'espèce cible, l'âge et il est donc difficile de donner une conclusion générale quant à l'écotoxicité de ce traitement.

1.8.4.4. Métaux toxiques

Si les métaux et leurs dérivés ne sont normalement plus utilisés dans les traitements des circuits hydrauliques, ils servent toujours comme agent anti-salissures externes notamment dans les peintures des bateaux.

- Sels et dérivés d'étain

Des peintures à base d'étain ont été utilisées depuis longtemps afin d'empêcher la fixation des biosalissures (Benitez *et al.*, 1985; Messiha et Ikladiou, 1986), notamment sur les bateaux dont elles gênent le démarrage et diminuent la vitesse (Nagatomo *et al.*, 1993). Toutefois, les étains organiques, qui assurent une excellente protection contre les biosalissures pour un coût très compétitif, sont toxiques à des concentrations extrêmement faibles pour des organismes non cibles comme certains coquillages et d'autres organismes marins (Khalanski et Lutz, 1987). Certains auteurs proposent des poisons organiques notamment l'oxyde de tributyl étain qui a un effet sur l'activité des enzymes du métabolisme glucidique dans le tissu musculaire des moules et des balanes (Shapiro et Bobkova, 1986).

Actuellement, la pollution marine causée par les matières actives des peintures anti-salissures notamment à base d'étain constitue un problème pour l'écologie marine (Nagatomo *et al.*, 1993). Par exemple, des traces d'organostanneux sont retrouvées dans des échantillons d'eau provenant de plusieurs ports, estuaires, etc. (Cleary et Stebbing, 1985; Arias *et al.*, 1986; Ebdon *et al.*, 1988; Lenihan *et al.*, 1990). Ces produits sont toxiques chez de nombreuses espèces notamment chez l'Homme (Baumann, 1991).

La contamination par le tributylétain (TBT) a diminué à la suite de l'introduction d'une législation interdisant l'utilisation des peintures à base de TBT par les navires de moins de 25 m de long (Evans *et al.*, 1995): des niveaux de pollution élevés ne sont maintenant atteints en général que dans des milieux confinés comme les ports.

L'utilisation de peintures à base de TBT pour le contrôle des biosalissures en conchyliculture est nuisible par exemple pour la croissance et la survie des juvéniles de coquilles Saint Jacques *Pecten maximus*, mais sans affecter les adultes. Elle provoque chez les huîtres *Crassostrea gigas* des taux de mortalités élevés, une réduction de la croissance et un épaissement des coquilles (Paul et Davies, 1986).

Les mollusques sont très sensibles aux dérivés d'étain, par exemple, les moules *Perna viridis* et *Mytilopsis sallei* et l'huître *Saccostrea cucullata* ont des CL₅₀ (28 jours) respectives de 0,28, 13 et 10 µg/L en présence d'oxyde du tributylétain (TBTO) (Karande *et al.*, 1993).

De plus, l'étain et ses dérivés sont réputés pour leur caractère bioaccumulatif. Pour une période d'essai de plus de 41 semaines, les huîtres *Crassostrea gigas* accumulent jusqu'à 1,41 mg/kg d'étain total (dont 0,87 mg/kg de tributylétain), mais elles en éliminent 90 % lors d'un traitement de dépuration. Les juvéniles de coquilles St Jacques *Pecten maximus*

accumulent 2,5 mg/kg d'étain total (dont 1,86 mg/kg de tributylétain), mais n'en éliminent que 20-40 % (Davies *et al.*, 1986).

L'une des caractéristiques de l'exposition à l'étain est la modification du sex-ratio au profit des mâles chez les gastéropodes (Saavedra *et al.*, 1990; Evans *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1995; etc.). Toutefois cette imposition du sexe ou "imposex", utilisée comme bioindicateur au TBT, n'est pas spécifique pour l'étain (Evans *et al.*, 1995). Selon Ellis et Pattisina (1990), la masculinisation des gastéropodes par le TBT constitue un problème mondial et pourrait servir d'indicateur des zones contaminées par ce produit.

Chez d'autres espèces comme l'algue marine *Acetabularia mediterranea*, des effets toxiques ont été détectés à des niveaux aussi bas que 2 µg/L de TBT en laboratoire (Baumann, 1991).

De même, les tuniciés sont très sensibles aux composés d'étain organique (Cooper *et al.*, 1995), par exemple chez l'espèce *Ciona intestinalis* l'activité de phagocytose est affectée *in vitro* à une concentration de 1,5 µM de TBT.

Chez des juvéniles du saumon chinook *Oncorhynchus tshawytscha* adaptés à l'eau de mer durant des essais en mode statique, les concentrations létales moyennes (CL₅₀) de TBTO sont 54, 20 et 1,5 µg de TBTO/L après 6, 12 et 96 heures respectivement. Les CL₅₀ diminuent de façon logarithmique avec le temps d'exposition entre 12 et 96 h (Short et Thrower, 1987).

Chez des rats Wistar en gestation, on observe des effets de salivation, une chute de poids et une dénutrition au dernier stade de gestation pour des doses élevées (1 à 16 mg/kg) d'acétate de tri-n-butylétain (TBTA). L'atrophie du thymus est aussi observée comme dose-dépendante au 20^e jour de gestation et l'exposition à des doses élevées augmente à la fois la mortalité des embryons et fœtus, et l'incidence des altérations tératogènes (Noda *et al.*, 1991).

Le chlorure de triphenylétain (TPTC), largement utilisé jusqu'à une date récente comme agent anti-salissures dans les filets de pêche côtière ou pour les navires, est un agent mutagène induisant des aberrations chromosomiques durant la phase G2 du cycle cellulaire (Sasaki *et al.*, 1994). Des effets clastogènes ont été observés sur des cellules CHO KL du Hamster chinois suite au traitement par des tri-n-butylétains et triphenylétains (Sasaki *et al.*, 1993).

- Le cuivre

Dans les eaux côtières marines, une diminution de la quantité de plomb et d'argent avec une augmentation des quantités de cuivre a été observée, ce qui est dû au remplacement des peintures anti-salissures riches en plomb ou en argent par des peintures riches en cuivre (Wright et Zamuda, 1991; Stephenson et Leonard, 1994). Le cuivre peut être introduit dans le

milieu à l'aide d'électrodes Cu/Al ou Cu/Fe qui libèrent des concentrations de l'ordre du $\mu\text{g/L}$ dans le système à traiter (Davenport *et al.*, 1986). Il pourrait être aussi utilement associé dans des peintures à des microcapsules d'antibiotiques comme la tétracycline (Peterson *et al.*, 1993). L'addition de complexes dans les peintures capables de relarguer du cuivre dans le milieu a également été citée (Mckay *et al.*, 1987)

L'efficacité de composés à base de cuivre contre les cellules d'algues, un des premiers maillons du système des salissures dans les circuits hydrauliques, a été citée par Ludyanskii et Solonin (1986) et Johnson (1992). Toutefois, certaines biosalissures rencontrées sur les bateaux comme la diatomée *Amphora coffeaeformis* possèdent des mécanismes de tolérance vis-à-vis du cuivre: la complexation à l'intérieur des cellules, mais aussi la fixation à la surface des cellules ou au mucus avant l'élimination (Brown *et al.*, 1988).

Dans un estuaire tropical (Anil et Wagh, 1988), une accumulation du cuivre jusqu'à une concentration de $864,7 \mu\text{g}$ de Cu/g de poids sec a pu être observée chez le cirripède *Balanus amphitrite*.

Chez les mollusques bivalves, le cuivre peut affecter la consommation d'oxygène (Rao et Balaji, 1991), mais surtout il peut être accumulé dans les tissus. Par exemple, chez *Mytilopsis sallei*, l'accumulation est directement proportionnelle à la concentration de cuivre présente dans le milieu. Pour des concentrations d'exposition allant de 120 à $1080 \mu\text{g/L}$, ce bivalve est capable d'accumuler des concentrations allant de $50-72 \mu\text{g/g}$, $58-94 \mu\text{g/g}$, $69-105 \mu\text{g/g}$ et $77-113 \mu\text{g/g}$ respectivement après 24, 48, 72 et 96 heures d'exposition (Rao et Balaji, 1990). Les coquilles Saint Jacques *Pecten maximus* et les huîtres *Crassostrea gigas* accumulent le cuivre dans leur glande digestive ou dans leur organisme en totalité jusqu'à des teneurs respectives de 280 ou 790 mg/kg (Davies et Paul, 1986).

1.8.4.5. Autres agents

Divers produits comme des amines grasses, le formol, le glutaraldéhyde et de nombreux autres biocides comme des ammoniums quaternaires, bien que n'apparaissant pas explicitement comme agents anti-salissures dans notre recherche bibliographique, sont cependant utilisés dans cet usage.

2^e Partie. Effets létaux du Mexel[®] 432, un agent anti-salissures industriel vis-à-vis du développement embryon-larvaire de la carpe: étude expérimentale

2^e Partie. Etude expérimentale

1. Introduction

1.1. Présentation du Mexel[®] 432

Effets létaux du Mexel[®] 432, un agent anti-salissures industriel vis-à-vis du développement embryon-larvaire de la carpe: une étude expérimentale

1. INTRODUCTION

1.1. Présentation du Mexel[®] 432

Le Mexel[®] 432 est un nouvel agent anti-salissures de surface, qui présente aussi des propriétés anti-corrosion et anti-tartre et qui est proposé pour remplacer ou compléter les procédés de traitements dans les circuits hydrauliques marins ou d'eaux douces.

Le Mexel[®] 432 est commercialisé par la société MEXEL dont le siège se trouve à Haubourdin, 59481, France. Il se présente sous forme d'une émulsion blanchâtre très visqueuse, dont la densité est proche de celle de l'eau. Il contient plus de 80 % d'eau, le reste étant constitué notamment d'amines grasses synthétisées à partir de produits d'origine naturelle.

1.1.1. Composition élémentaire du Mexel[®] 432

Les études réalisées chez EDF/DER (Allonier *et al.*, en préparation), font apparaître une humidité comprise entre 81 % et 85 %. L'analyse de la matière sèche montre une part déterminante des atomes oxygène, carbone, hydrogène et azote (environ 95 % de la masse totale) (Tableau 4).

Le Mexel[®] 432, dont la composition exacte n'est pas donnée pour des clauses de confidentialité, ne contient ni halogènes (chlore, brome) ni métaux, à l'exception du nickel (environ 10 mg/kg dans la fraction sèche).

	Wolff	IPL	LHRSP
Humidité	83,6 %	85 %	81,59 %
Cendre	< 0,05 %	0	-
C	17,6 %	-	17,36 %
H	11,5 %	-	11,22 %
N	2,1 %	-	1,96 %
O	67,4 %	-	63,56 %
P	-	-	0,20 %
S, F	< 0,10 %	-	-
Cl, Br, I	< 0,30 %	-	-
Ca	-	0,0002 %	-
Mg	-	< 0,0001 %	-
Al total	-	< 0,0001 %	-
Fe total	-	0,0008 %	-
Cd	-	< 0,02 mg/kg	-
As, Se	-	< 0,05 mg/kg	-
Ag, Cr total, Sn	-	< 0,1 mg/kg	-
Pb	-	< 0,2 mg/kg	-
Zn	-	0,12 mg/kg	-
Ni	-	10 mg/kg	-
Ammonium quaternaire	-	-	< 0,0008 %
Spectre infra rouge	Bandes amines et aliphatiques	-	-

Tableau 4. Composition élémentaire du Mexel[®] 432 (Allonier *et al.*, en préparation)

Wolff: laboratoire Wolff, analyses - expertises - recherches. 92110, Clichy. *IPL*: Institut Pasteur de Lille. *LHRSP*: laboratoire d'hygiène et de recherche en santé publique. 54515, Vandoeuvre-Les-Nancy.

1.1.2. Composition moléculaire du Mexel[®] 432

Le Mexel[®] 432 est constitué principalement, selon le fabricant, de trois composés ou familles de composés:

La famille A : Elle se présente sous forme d'un liquide épais, incolore qui se dissout dans l'eau en moussant. Elle est formée de diamines grasses (chaînes aliphatiques comportant une amine primaire et une amine secondaire) et possède des propriétés filmantes. Elle constitue 13,4 % en poids du Mexel[®] 432, soit 67 % du résidu sec.



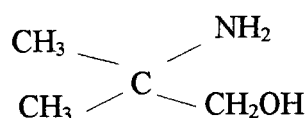
R: Chaîne saturée et monoinsaturée de 11 à 24 atomes de carbone avec majoritairement 18 atomes de carbone. L'hétérogénéité de la famille A peut être vraisemblablement attribuée à l'origine naturelle des produits de base.

La famille B : Elle joue le rôle d'un émulsifiant non ionique, peu adsorbant, qui assure la stabilité des micelles composées avec les constituants de la famille A. Elle se présente sous forme d'un liquide marron qui prend en masse au contact de l'eau, mais dont la dissolution est totale après agitation vigoureuse. Elle est constituée d'amines tertiaires de poids moléculaire élevé et représente 3,2 % en poids du Mexel[®] 432, soit 16 % du résidu sec.



R: Chaîne de 19 atomes de carbone pour la série saturée ou de 18 atomes de carbone pour la série monoinsaturée. Les composés de la famille B sont également d'origine naturelle.

Le constituant C : Il s'agit du 2-amino-2-méthyl-1-propanol jouant le rôle de solvant. C'est un liquide incolore, facilement soluble dans l'eau. Il représente 3,4 % en poids du Mexel[®] 432, soit 17 % du résidu sec.



Au total, le Mexel[®] 432 est constitué de plus de 85 composés différents, pour la plupart d'origine naturelle.

La DCO (demande chimique en oxygène) est 2604, 2104 et 1669 mg/L respectivement pour les produits A, B et C. Pour le Mexel[®] 432, la DCO est 473 mg/L (DCO calculée) et 596 mg/L (DCO mesurée).

La demande biologique en oxygène (DBO) du Mexel[®] 432 mesurée par respirométrie est nulle à partir de la concentration 3,0 mg/L en raison d'un effet bactéricide apparaissant à partir de la concentration 1 mg/L en Mexel[®] 432.

En raison de sa composition chimique, le Mexel[®] 432 présente des propriétés de tensioactif ou surfactant.

1.1.3. Quelques propriétés des tensioactifs ou "surfactants"

1.1.3.1. Généralités, propriétés physico-chimiques

Dès les années 1950, les agents de surface comme les savons naturels ont été remplacés par des surfactants synthétiques offrant de nouvelles applications et leur utilisation a augmenté de

manière importante (Malz, 1997). Les détergents deviennent des polluants universels dans les années 1950 à partir desquelles on a commencé à s'intéresser à leur toxicité. L'introduction générale de détergents rapidement biodégradables en 1965 a relancé la recherche de nouveaux produits (Abel, 1974).

Les tensioactifs ou surfactants possèdent une structure caractéristique qui consiste en la présence d'un groupement possédant une attirance très faible pour l'eau, le groupement hydrophobe, lié à un groupement possédant une attraction très forte pour l'eau, le groupement hydrophile. Le tensioactif, grâce à la présence du groupement hydrophobe, a tendance à se trouver plus concentré aux interfaces gaz/liquide, liquide/liquide et liquide/solide (van Ginkel, 1996).

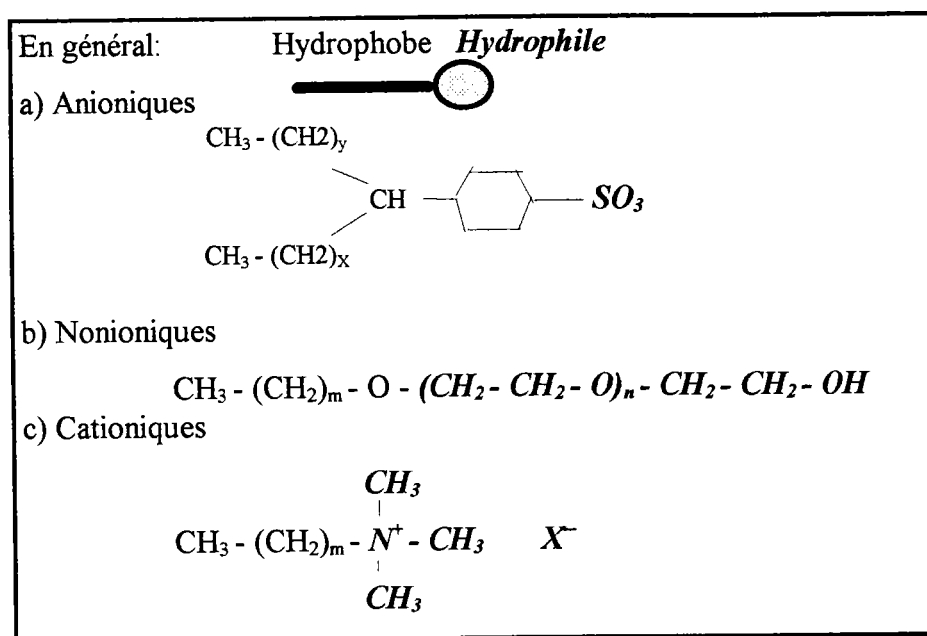


Figure 2. Structures chimiques des surfactants typiques (KLOSTER, 1997)

N.B. la partie hydrophile est en caractère gras italique

Alors que la partie hydrophobe est habituellement une chaîne hydrocarbonée, aromatique ou aliphatique, la partie hydrophile peut porter une charge négative (surfactant anionique), une charge positive (surfactant cationique), à la fois une charge positive et une charge négative (surfactant amphotère ou amphiphile) ou une chaîne polymérique polyoxyéthylène (surfactant non ionique).

Le groupement hydrophobe varie peu d'un surfactant à un autre (Allonier, 1995). En général, il s'agit de longues chaînes hydrocarbonées dont les principaux types sont les chaînes alkyles ramifiée ou linéaire, les alkyl benzènes, les alcools, les alkyles phénols, les

polyoxopropylènes, etc. Les radicaux hydrocarbonés possédant 10 à 20 atomes de carbone sont les plus employés. Commercialement, il existe deux principales sources d'approvisionnement de ces radicaux en quantité suffisante et à prix raisonnable: l'agriculture (huile végétale ou suif animal) et l'industrie pétrolière.

Certains micro-organismes (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Micrococcus*, *Candida*, ...) sont capables de fabriquer des 'biosurfactants' ayant des propriétés parfois différentes de celles des surfactants synthétiques et permettant de nouvelles applications industrielles: plus efficaces et plus spécifiques, ils sont habituellement non toxiques pour l'Homme et biodégradables (Parra *et al.*, 1989).

1.1.3.2. Phénomène de surface et adsorption

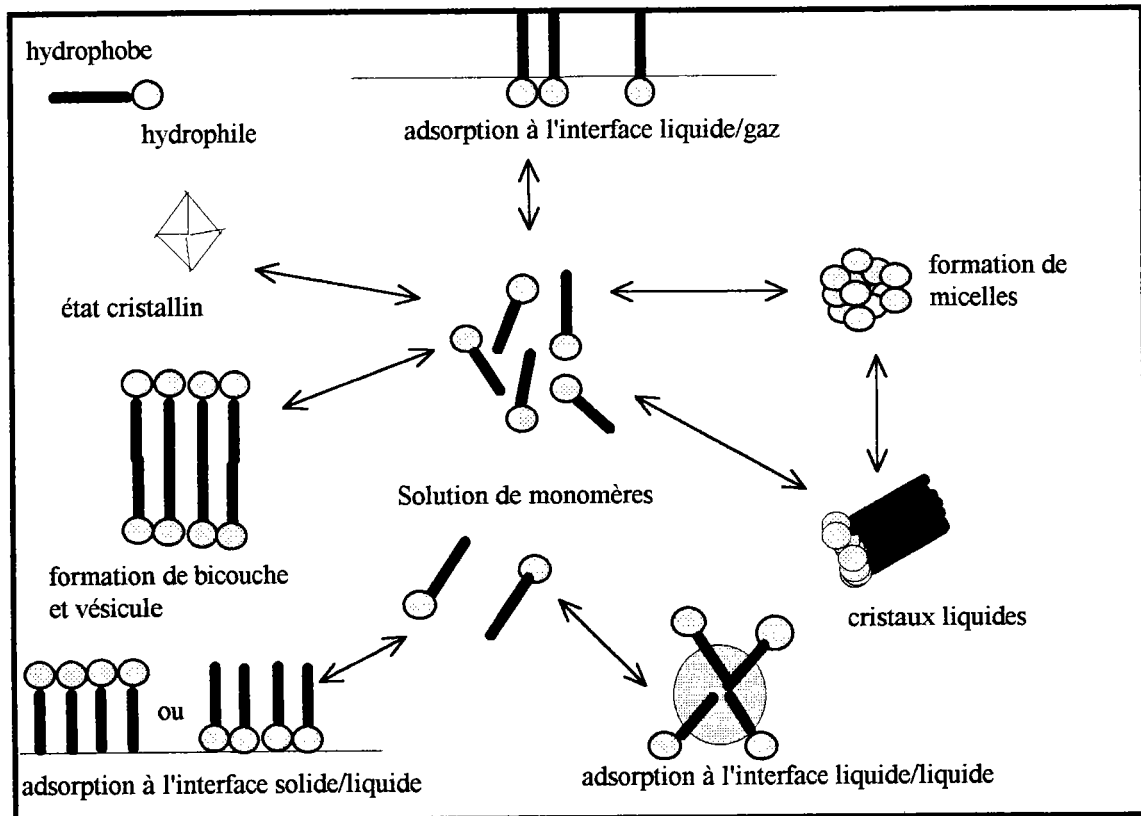
Les tensioactifs ou "agents de surface actifs" ont la propriété de se concentrer à la surface et aux interfaces de solutions aqueuses. Ainsi, à la surface et aux interfaces liquide-solide et liquide-gaz, les molécules tensioactives s'orientent avec leur groupement hydrophile dans l'eau et leur groupement hydrophobe aussi loin que possible dans une direction opposée, mais à une distance qui reste compatible avec les dimensions moléculaires, la géométrie et les forces intermoléculaires s'exerçant sur la molécule (Allonier, 1995). Toutefois, selon Myers, (1997), les interactions des surfactants en solution sont très complexes (Figure 3). Elles dépendent notamment de la structure chimique des surfactants et de facteurs externes comme la température, le pH, la présence de cosolutés, etc. Alors que la plus part des surfactants communs ont une solubilité substantielle dans l'eau, cette caractéristique peut changer significativement avec la longueur de la partie hydrophobe, la nature du groupe de tête (groupe polaire), la charge ionique et d'autres paramètres environnementaux des solutions.

1.1.3.3. Micelles

Selon Abel (1974), outre leur tendance à se concentrer sur les surfaces, la présence de groupements hydrophiles et hydrophobes confère aux surfactants la capacité de réduire la tension superficielle des solutions et de former des micelles quand leur concentration en solution dépasse une certaine concentration critique.

La formation des micelles résulte de l'agrégation d'un grand nombre de molécules tensioactives (Figure 3). La taille et la dispersion des micelles sont sensibles à des facteurs internes (structure hydrophobe, type du groupe de tête, ...) et externes (température, pression, pH, contenu en électrolytes, ...). La concentration micellaire critique est la concentration à

partir de laquelle tout apport en produits se retrouve sous une forme micellaire. Les micelles sont en équilibre avec les monomères et le passage entre les deux états se fait facilement. Dans un surfactant, la longueur de la chaîne d'hydrocarbones est le facteur majeur déterminant la concentration micellaire critique (Myers, 1997).



**Figure 3. 'Spectre' des interactions de surfactants en solution aqueuse
(d'après Myers, 1997)**

1.1.3.4. Quelques applications

Les surfactants se distinguent spécialement par leur capacité de mouillage et leur efficacité comme émulsifiants. Certains surfactants s'adsorbent facilement sur les surfaces. Ces propriétés font que les tensioactifs apparaissent dans des domaines divers comme l'agriculture (De Ruiten *et al.*, 1992; Shilling *et al.*, 1990; Roeyneberg *et al.*, 1992; Grayson *et al.*, 1995), le textile (Martin *et al.*, 1989; Nolte *et al.*, 1995), les détergents (Schwuger, 1997), les agents de corrosion (plus la chaîne hydrocarbonée est longue et plus il y a de l'éthylène oxyde $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$, plus la corrosion est inhibée) (Abdallah, 1994; Claas *et al.*, 1986), cosmétiques (Rieger et Rhein, 1997), etc. Certains surfactants ont des propriétés antimicrobiennes ce qui explique leur

utilisation comme biocides (van Ginkel, 1996).

1.1.3.5. Toxicité, écotoxicité

L'utilisation intensive des surfactants dans de nombreuses applications rend nécessaire la connaissance de leurs propriétés pour mieux évaluer les risques qu'ils font courir pour la santé humaine et l'environnement.

Propriétés biochimiques des surfactants (Sterzel, 1997):

Interactions avec les membranes biologiques: étant donné leur capacité à s'adsorber aux interfaces, les surfactants peuvent réagir avec les membranes biologiques. Cette interaction dépend de la concentration du surfactant. Lorsque celle-ci augmente, les monomères s'adsorbent tout d'abord sur la surface de la membrane, ce qui en modifie la perméabilité aux concentrations faibles et aboutit à une lyse cellulaire aux concentrations élevées. Lorsque la concentration augmente encore, la structure lamellaire de la membrane étant détruite, celle-ci est solubilisée. Les phospholipides sont séparés des protéines qui sont solubilisées de façon significative quand la concentration critique micellaire est dépassée.

Interactions avec les protéines: les interactions avec les protéines sont de nature polaire ou hydrophobe. Elles dépendent notamment de la concentration en surfactants libres, du pH, de la température et de la concentration ionique de la solution. Suivant leur structure chimique variée (anionique, cationique, amphiphile ou non ionique), les surfactants diffèrent dans leur capacité de liaison aux protéines et par conséquent diffèrent dans leur activité biologique.

Interactions avec les enzymes: les surfactants anioniques et cationiques qui sont capables de liaisons massives induisent des changements conformationnels des protéines qui généralement perdent leurs activités biologiques. Dans le cas des enzymes fixées aux membranes, l'inactivation résulte de leur séparation des lipides membranaires ou de la fixation de surfactants sur les sites actifs des enzymes. Les effets de certains surfactants cationiques sur les protéines sont réversibles.

Les surfactants se retrouvent dans les écosystèmes naturels avec des effets détergents ou biocides. Les surfactants peuvent être toxiques vis-à-vis des bactéries, des algues, des daphnies et des poissons à des concentrations inférieures à 1 mg/L (Lewis 1990, Schöberl *et al.*, 1988 in Van Ginkel, 1996). Les algues ne sont sensibles qu'aux surfactants cationiques (Lewis, 1991).

Pour les organismes aquatiques, la toxicité chronique (>48 h pour invertébrés et > 96 h pour poissons) des surfactants anioniques et non ioniques apparaît à des concentrations

supérieures à 0,1 mg/L (Lewis, 1991): par exemple, chez *Daphnia magna*, des effets chroniques de divers non ioniques alkyl ethoxylates apparaissent entre 0,1 à 1,0 mg/L.

Selon Lewis (1991), la gamme (en mg/L) où apparaissent des effets pour les poissons est 0,05 - 28,0 (surfactants anioniques), 0,05 - 50,0 (nonioniques), et 0,05 - 0,46 (cationiques). La gamme (en mg/L) pour les invertébrés est 0,04 - >10,0 (anioniques), < 0,1-20,0 (nonioniques), et 0,009-1,27 (cationiques).

Chez les poissons, des effets sur "l'olfaction", la respiration et la physiologie des branchies sont les effets les plus souvent cités en exposition à des surfactants anioniques (Lewis, 1991): par exemple, des perturbations des mécanismes de contrôle adrénérge et une vasodilatation au niveau des branchies du saumon ont été observées à des concentrations en LAS (Linear Alkylbenzene Sulfonate) égales ou supérieures à 0,6 mg/L (Bolis et Rankin, 1978, 1980 in Lewis, 1991).

La réaction comportementale la plus observée chez les poissons est la réaction d'évasion (Lewis, 1991): par exemple, l'évasion au contact de divers surfactants anioniques a été observée à des concentrations de 0,002 à 0,40 mg/L. Höglund (1976) in (Lewis, 1991) a indiqué que la morue fuit le suif alkyl éthoxylé à la concentration 0,002 mg/L.

D'autres fonctions comme la nage et la nutrition ne sont affectées qu'à des concentrations plus élevées, par exemple entre 0,2 et 5,0 mg/L pour des effets du LAS chez la truite, le poisson rouge, la morue et la carpe (Lewis, 1991). Mais, certains auteurs indiquent que les effets sublétaux sont réversibles (Maciorowski *et al.*, 1977 in Lewis, 1991).

1.1.3.6. Biodégradation

Selon van Ginkel, (1996), les surfactants sont susceptibles d'être biodégradés par des mélanges de micro-organismes. Seuls les alcanes sulphonates, alkyle sulphates et les alkylamines peuvent être complètement minéralisés par un seul micro-organisme. En général, l'attaque s'effectue par une fission centrale des surfactants libérant la chaîne hydrophobe sous forme d'alcools, alcanals ou acides alkanoides; une seconde stratégie des micro-organismes pour métaboliser les chaînes alkyls consiste en une réaction d'oxydation.

Les amines grasses éthoxylées contiennent de 2 à 50 groupes EO ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{O}$) rattachés à l'atome d'azote. Sawyer *et al.* (1956) in (Van Ginkel *et al.*, 1993) ont montré que les amides éthoxylées sont susceptibles d'être oxydées par des bactéries. La biodégradabilité des amines grasses éthoxylées diminue avec l'augmentation du nombre de groupe EO (Schöberl *et al.*, 1988 in (Van Ginkel *et al.*, 1993).

<i>Produit testé</i>	<i>Biodégradation</i>	
	(%) après 28 jours	(%) à la fin du test (jours)
Suif bis (2-hydroxyethyl)amine ^a	60^b	
Suif bis (2-hydroxyethyl) amine	52	64 (42)
Oleylbis (2-hydroxyethyl) amine	63^b	74 (42)
Oleylbis (2-hydroxyethyl) amine	13	54 (126)
Polyoxyethylene (15) amine de suif	42	61 (214)
Polyoxyethylene (15) amine ^a de suif	28	67 (214)
Polyoxyethylene (15) oleyl amine	23	64 (126)

Tableau 6. Tests de biodégradation de diverses amines grasses éthoxylées en bouteille fermée durant 28 jours ou à la fin de tests prolongés (Van Ginkel *et al.*, 1993).

a: chaîne alkyl hydrogénée, b: addition de gel de silice. en gras: facilement biodégradable.

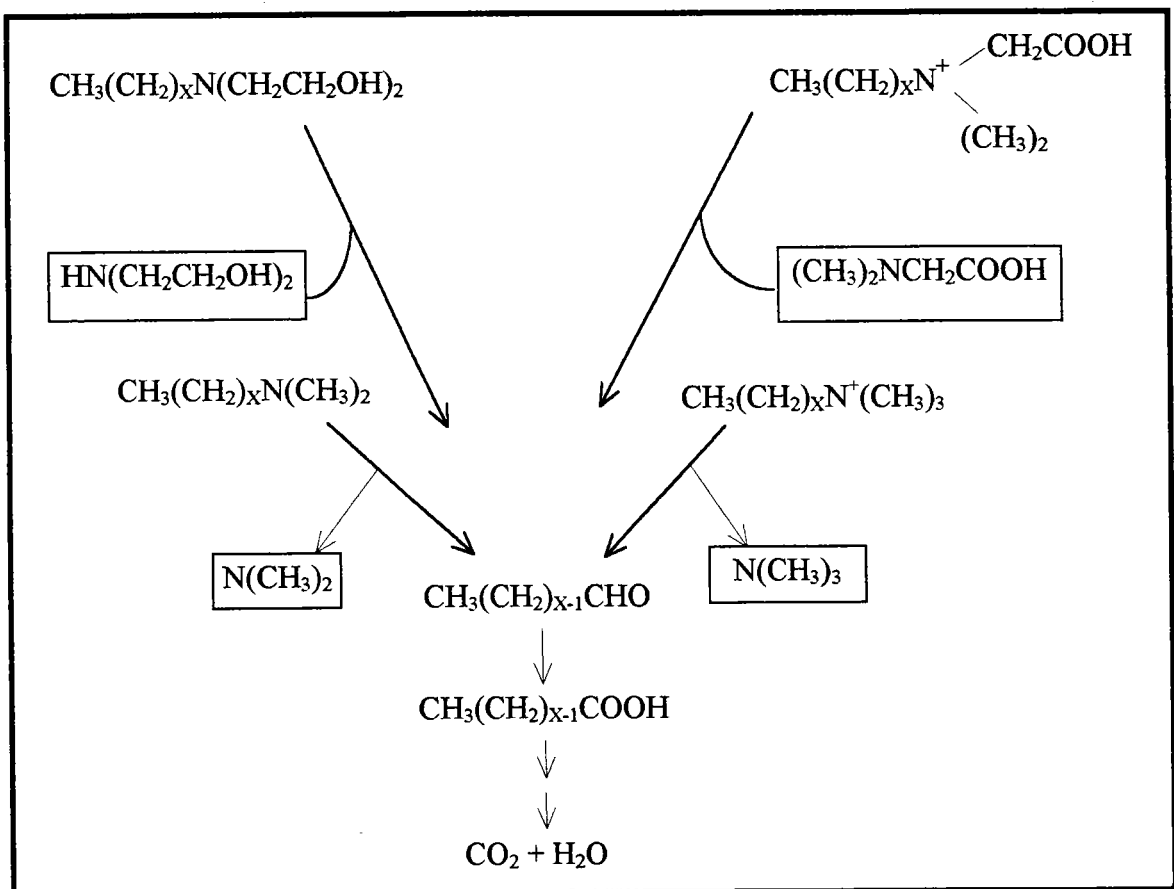


Figure 4. Modalités de dégradation des dérivés d'amines grasses par des souches pures de micro-organismes (d'après van Ginkel, 1996).

N.B. Les cases indiquent les produits qui seront dégradés par d'autres micro-organismes.

La biodégradation via une oxydation initiale rapide de la chaîne alkyle des amines grasses éthoxylées et des amides induit à la fois la perte des propriétés surfactantes de ces composés et génère des composés non toxiques lors du couplage de tests de biodégradabilité avec des tests de croissance chez l'algue verte unicellulaire *Selenastrum capricornutum* et de test de toxicité aiguë chez *Daphnia magna* (Van Ginkel *et al.*, 1993).

En général les micro-organismes dégradent les amines tertiaires en attaquant la liaison C_{alkyl}-N par une déshydrogénation conduisant à la formation de diethanolamine (Figure 4).

1.1.4. Mode d'action du Mexel[®] 432

Le Mexel[®] 432 a des propriétés filmogènes (Van Laer, communication personnelle), propriétés connues pour les amines grasses (Degremont, 1979). En solution aqueuse, le Mexel[®] 432 forme une émulsion dont les micelles sont constituées des composés A et B. Des micelles de B seul peuvent également se trouver dans l'émulsion. Sur les interfaces solide-liquide, seul A se dépose pour former un film bicouche. Des couches supplémentaires, sans doute plus instables, peuvent se déposer sur ce film. Il semble que les micelles soient plus instables que le film déposé sur les parois (Allonier et Khalanski, 1996).

Le protocole d'injection du Mexel[®] 432 doit donc être déterminé de telle sorte qu'il permette la formation du film sur toutes surfaces à protéger. La durée du film, variable selon la qualité de l'eau et sa vitesse, définit d'autres part la fréquence des injections du produit (Allonier *et al.*, en préparation).

1.1.5. Devenir du Mexel[®] 432 en solutions aqueuses

En solution dans l'eau, une baisse immédiate (quelques minutes) de la concentration en Mexel[®] 432 par rapport à la concentration nominale est observée ("demande immédiate") (Allonier *et al.*, en préparation). Elle correspond au dépôt d'un film de Mexel[®] 432 sur les parois et varie de 4 à 16 % pour des concentrations nominales comprises entre 12,5 et 100 mg/L. En eau de rivière, la demande immédiate est fortement augmentée: par exemple, elle peut atteindre 70 % ou plus dans une eau de Seine. Elle augmente avec la quantité de matières en suspension.

La baisse immédiate de la concentration en Mexel[®] 432 est suivie d'une "disparition lente" d'origine physico-chimique ou bactérienne.

Dans des eaux de laboratoire, la vitesse de disparition lente diminue avec l'augmentation de la concentration du produit: par exemple, après 15 jours de conservation, le pourcentage de disparition est de 15 % pour la concentration 10 mg/L et 6 % pour la concentration 100 mg/L. Cette disparition du Mexel[®] 432 est accélérée sous agitation par barreau magnétique et encore plus par bullage d'air comprimé ainsi que par la présence de NaCl jusqu'à la concentration de 30 g/L. En eau de rivière, elle est beaucoup plus rapide qu'en eau déminéralisée en fonction de la quantité de matières en suspension.

Une partie de la disparition lente pourrait être attribuée à une dégradation bactérienne. Au laboratoire, les cultures de bactéries *Pseudomonas aeruginosa* se développent en présence de Mexel[®] 432 à faible concentration (10 mg/L) comme seule source de carbone. Aucun développement bactérien n'est observé en absence du Mexel[®] 432. A forte concentration (1 g/L), le Mexel[®] 432 a une action anti-bactérienne.

<i>Concentration en Mexel[®] 432 (g/L)</i>	<i>Présence de germes (après incubation 24 h)</i>
0	absence de germes
0,01	présence de germes en quantité très importante
0,1	présence de germes
1	absence de germes

Tableau 7. Développement bactérien de *Pseudomonas aeruginosa* dans un milieu contenant le Mexel[®] 432 comme source du carbone (Allonier et Khalanski, 1996)

De même, diverses espèces bactériennes ont été mises en évidence dans des cultures contenant comme seule source de carbone organique le produit A aux concentrations 0,1; 1 et 5 mg/L, le produit B aux concentrations 5, 10 et 20 mg/L et le produit C à 10 mg/L (Allonier et Khalanski, 1996).

Des solutions de 10 mg/L en Mexel[®] 432 dans une eau déminéraliséeensemencées avec des souches bactériennes isolées de l'eau de Seine montrent, après 3 semaines d'incubation, des taux de disparition variables selon les espèces. Par exemple de 40 et 50 % pour les bactéries *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* et d'environ 80 à 98 % pour les bactéries *Pseudomonas putida* et *Stenotrophomonas maltophilia*.

Toutefois chez les témoins, un taux de disparition de 40 % a été observé, peut-être dû à l'adsorption sur les parois des récipients. Ainsi dans le milieu naturel, la disparition du Mexel[®] 432 pourrait être attribuée en premier lieu à une adsorption sur les surfaces puis à une

dégradation bactérienne.

1.1.6. Toxicité du Mexel[®] 432

1.1.6.1. Effets sur les Mammifères

Chez le rat, une exposition au Mexel[®] 432, administré par voie orale, présente une DL₅₀ (15 jours) de 7,8 g/kg pour les mâles et de 6,7 g/kg pour les femelles (Institut Pasteur de Lille, information communiquée par le fabricant).

1.1.6.2. Effets sur les micro-organismes

Le test Microtox, utilisant un réactif bactérien phospholuminescent (*Photobacterium phosphoreum*), a montré que le Mexel[®] 432 et ses constituants ont une action toxique rapide (peu de différences entre les EC₅₀ (5 min et 15 min): EC₅₀ = valeur moyenne de la concentration de Mexel[®] 432 qui inhibe 50 % de la luminescence des bactéries) (Tableau 8, Allonier, 1995). Toutefois, les EC₅₀ sont différentes selon que la mesure est faite instantanément ou après 5 jours de conservation et surtout dans une eau de Seine. Cette différence peut être due à une dégradation du produit qui serait accélérée en eau de rivière.

La valeur moyenne de la concentration de Mexel[®] 432 qui inhibe 50 % de la luminescence des bactéries au bout de 5 et 15 minutes est respectivement 6,4 et 5,7 mg/L (Coulon, 1993).

Solution testée		EC ₅₀ (5 min) (mg/L)		EC ₅₀ (15 min) (mg/L)	
		t = 0	t = 5 jours	t = 0	t = 5 jours
Mexel [®] 432	Eau déminéralisée	6,2 ± 0,8	8,4 ± 0,9	5,2 ± 0,8	7,6 ± 0,7
	Eau de Seine	8,6 ± 0,8	23 ± 2	4,8 ± 0,9	19 ± 3
produit A	Eau déminéralisée	1,9 ± 0,6	3 ± 1	1,7 ± 0,9	4,8 ± 0,5
produit B	Eau déminéralisée	31 ± 5	60 ± 5	16 ± 5	41 ± 5
produit C	Eau déminéralisée	31 ± 4	57 ± 6	26 ± 6	45 ± 9

Tableau 8. Toxicité du Mexel[®] 432 et ses constituants chez la bactérie *Photobacterium phosphoreum* (Test Microtox) (Allonier, 1995)

EC: Concentration efficace réduisant de 50 % la luminescence des bactéries. Ces résultats correspondent à une moyenne sur 3 répétitions.

Dans les eaux naturelles, le test Microtox indique que la toxicité du Mexel[®] 432 dépend de la concentration résiduelle. Par exemple, en eau de Moselle, la CL₅₀ en concentration nominale est 9,94 mg/L avec une concentration résiduelle dans la solution de 5,20 mg/L, alors que dans une eau déminéralisée, elle est de 5,56 mg/L en concentration nominale et résiduelle (Khalanski, 1993).

Comme indiqué plus haut, une concentration de 1 g/L en Mexel[®] 432 exerce une action anti-bactérienne dans des cultures de *Pseudomonas aeruginosa* (Allonier et Khalanski, 1996; Tableau 7).

1.1.6.3. Effets sur les Mollusques

Une des importantes cibles biologiques du Mexel[®] 432 est la moule d'eau douce *Dressena polymorpha* (moule zébrée). Chez cette espèce, un traitement intermittent journalier de 1,5 heures durant 30 jours dans une eau de ville déchlorée à 18°C, provoque 40 à 70 % de mortalité pour des concentrations initiales en Mexel[®] de 2 à 10 mg/L. Durant la même durée, les 100 % de mortalité sont atteints à 6 mg/L, mais avec un traitement de 3 heures par jour (Khalanski, 1994).

En eau de rivière (eau de Moselle), à une température comprise entre 20 et 26°C, les 90 % de mortalité sont atteints avec les traitements suivants: 20 h en continu à 7,3 mg/L, 36 h en continu à 6,1 mg/L, 168 h en continu à 3,9 mg/L, 20 h ou 28 h en traitement séquentiel de 1 heure d'injection et 1 heure d'arrêt (1h/1h) respectivement à 15,3 mg/L et à 10,0 mg/L. En eau froide (10,7 à 15,4°C), des injections séquentielles (1h/1h) pendant 15 jours avec un résiduel d'environ 2,0 mg/L provoquent 60 % de mortalité contre 20 % pour des séquences 1 heure d'injection et 4 heures d'arrêt du traitement.

En eau de Moselle à 20-26°C, une exposition continue de 4 mg/L en Mexel[®] 432 provoque 90 % de mortalité au bout de 7 jours, alors que dans une eau du Rhin à 13 à 15°C, le même résultat est obtenu au bout de 21 jours seulement. La toxicité du Mexel[®] 432 vis-à-vis de la moule zébrée diminuerait avec la température, en raison d'une baisse d'activité des moules (Khalanski, 1994).

L'exposition au Mexel[®] 432 en solution dans une eau de ville déchlorée réduit l'attachement des Dressènes à leur support. Par exemple une concentration de 2 mg/L appliquée 3 heures par jour durant 10 jours induit une réduction de 50 % de la production du byssus, une réduction totale étant atteinte après 3 jours de traitement à 6 et 10 mg/L (Giamberini *et al.*, 1995). Après

24 h d'exposition, la même dose provoque des lésions du tissu branchial (Giambérini *et al.*, 1996).

Le taux de filtration de l'eau et le mouvement valvaire sont réduits de 50 % en 24 h respectivement à partir de 0,5 mg/L et 2 mg/L (Czembor *et al.*, 1997).

Des tests de toxicité aiguë réalisés sur des dressenes d'une taille de 18 à 22 mm, provenant de la rivière Moselle et exposées aux concentrations 2,5, 4, 5, et 7 mg/L ont montré que seule la concentration du produit et non la durée du traitement détermine l'apparition des lésions branchiales, la destruction de la branchie étant rapide (Giambérini *et al.*, 1993).

Sur des cultures de cellules cardiaques de l'huître *Crassostrea gigas*, la concentration réduisant de 50 % l'activité mitochondriale est 12,3 mg/L après 7 jours d'exposition (Coulon, 1993). Au delà de 10 mg/L, le Mexel[®] 432 provoquerait la lyse de l'ensemble de ces cellules en culture.

Sur des cellules branchiales de palourde *Ruditapes decussatus*, la viabilité cellulaire diminue de manière significative à partir de 20 mg/L (Auzoux et Coulon, 1993).

1.1.6.4. Effets sur la Daphnie

Des tests de toxicité aiguë réalisés par l'IRCHA (Villeneuve d'Asques) ont fourni une CL₅₀ (24 h) de 3,1 mg/L en Mexel[®] 432 (communication du fabricant).

Les CE_{50i} ou concentrations efficaces initiales en Mexel[®] 432 qui immobilisent 50 % des daphnies (*Daphnia magna*) pendant 24 et 48 heures sont respectivement 0,64 et 0,55 mg/L (INERIS, 1997).

Dans une eau du Lac Supérieur aux Etats Unis, les CL₅₀ sont respectivement de 26,9; 6,3 et 3,0 mg/L, après 4 jours d'une exposition toxique intermittente de 5, 20 ou 80 minutes chaque jour (Ghillebaert et Brooke, 1997).

Ainsi, en exposition continue, le Mexel[®] 432 est relativement toxique pour les Cladocères et cette toxicité peut varier selon les conditions expérimentales. En exposition discontinue, la CL₅₀ dépend fortement de la durée d'exposition journalière.

1.1.6.5. Effets sur les Poissons

Chez le poisson zèbre (*Brachydanio rerio*), le carrelet (*Pleuronectes platessa*) et le tête de boule (*Pimephales promelas*), les CL₅₀ (24 h) sont respectivement de 1,3; 2,36 et 0,64 mg/L en concentrations nominales (Tableau 9). Les effets du Mexel[®] 432 augmentent avec la durée

d'exposition: par exemple, chez des larves de truite arc-en-ciel, la CL₅₀ (24 h) est 22,6 mg/L contre 7,0 mg/L après 7 jours d'exposition.

Dans les conditions d'utilisation, le Mexel® 432 est injecté dans les circuits hydrauliques en discontinu avec des chocs toxiques de 5 à 80 minutes une à deux fois par jour. Ainsi, l'exposition de larves de tête de boule (*Pimephales promelas*) à des chocs toxiques de 5, 20 et 80 minutes durant 96 heures présente respectivement des CL₅₀ de 13,1; 6,2 et 2,2 mg/L.

<i>Référence</i>	<i>Nom français (stade)</i>	<i>Nom latin</i>	<i>Durée d'exposition</i>	<i>CL₅₀ (mg/L)</i>
Brooke, 1996	Tête de boule (larve)	<i>Pimephales promelas</i>	2 jours	8,34
			4 jours	8,06
			7 jours	7,87
Brooke, 1996	Truite arc en ciel (larve)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	12 h	22,6
			1 jours	12,6
			4 jours	11,3
			7 jours	7,0
Ghillebaert et Brooke, 1997	Tête de boule (larve)	<i>Pimephales promelas</i>	24 h	0,64
			48 h	0,59
			72 h	0,44
			96 h	0,28
IPL, 1990	Poisson zèbre	<i>Brachydanio rerio</i>	24 h	1,3
ICI, 1991	Carrelet (juvénile)	<i>Pleuronectes platessa</i>	24 h	2,36
			48 h	1,15
			72 h	1,00
			96 h	0,83

Tableau 9. Toxicité du Mexel® 432 vis-à-vis de certaines espèces de poissons

Les résultats de référence IPL et ICI ont été fournis par le fabricant.

2^e Partie. Etude expérimentale

1. Introduction

**1.2. L'embryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.)
un modèle expérimental en écotoxicologie**

1.2. L'embryon de carpe: un modèle expérimental en écotoxicologie

1.2.1. Choix des poissons comme modèle en toxicologie

Intérêt du modèle poissons en toxicologie (Powers, 1989; Bailey *et al.*, 1996): les Poissons forment le groupe le plus important et le plus diversifié des Vertébrés. Apparus il y a environ 400 millions d'années, ils comportent aujourd'hui plus d'espèces que le reste des vertébrés réunis. Leur position systématique ni trop proche ni trop éloignée de celle des mammifères et de l'homme, sur lesquels ont été établis les concepts de base et les principales connaissances en toxicologie en font des modèles favorables aux études de toxicologie comparative (Lefebvre, 1990). Leur capacité d'adaptation leur a permis de conquérir la plupart des niches écologiques disponibles, des eaux douces aux eaux salées, des mers polaires aux mers tropicales, de la surface aux grandes profondeurs. Leur importance économique et sociale est considérable pour l'alimentation humaine ou animale ou pour les activités de loisirs comme la pêche. Leurs oeufs sont habituellement de petite taille et à fécondation externe. La transparence des oeufs chez de nombreuses espèces facilite le suivi expérimental du développement embryonnaire.

Les poissons ont servi de modèles expérimentaux pour étudier des effets toxiques variés: notamment sur les fonctions neurobiologiques (Baatrup et Doving, 1990; Moore et Buchanan, 1993, Moore *et al.*, 1993; Gopal et Ram, 1995), endocrinologiques (Mcmaster *et al.*, 1992; Singh et Singh, 1992; Singh, 1992; Hontela, *et al.*, 1993), génétiques (Benton *et al.*, 1994; Fore *et al.*, 1995 a,b), immunologiques (Dunier *et al.*, 1991; Dunier et Siwicki, 1994; Dunier *et al.*, 1994; Wester *et al.*, 1994; Dunier *et al.*, 1995; Jokinen *et al.*, 1995; Lemaire-Gony *et al.*, 1995; Soimasuo *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1996).

1.2.2. Choix des stades embryo-larvaires de poissons en toxicologie

Le choix des stades embryo-larvaires de poissons en toxicologie est justifié par plusieurs arguments: les stades embryo-larvaires constituent une période sensible du cycle de vie des poissons (McKim, 1977; Macek et Sleight, 1977; Kristensen, 1990). L'embryogenèse est une période critique d'expression des perturbations auxquelles les géniteurs ont été soumis (Vladimirov, 1975; Brown *et al.*, 1994; Hermanutz *et al.*, 1992). Les oeufs et les larves possèdent une grande tolérance aux variations des paramètres physico-chimiques du milieu (Naudin, 1996; Ghillebaert, 1996). La taille relativement petite des embryons et larves de poissons rend facile leur utilisation dans les tests toxicologiques (Blaise, 1991). De plus, la

majeure partie des poissons ont un développement libre dans l'environnement, les stades embryon-larvaires sont donc soumis directement aux caractéristiques physico-chimiques du milieu. Les essais étant réalisés du stade cellule unique jusqu'au stade de l'organisme complexe, l'embryogenèse peut être considérée comme un système d'intégration et d'amplification des effets perturbateurs vis-à-vis du développement précoce. Les tests embryon-larvaires peuvent être réalisés sans apport de nourriture, ce qui supprime les risques d'interférences entre les aliments et les toxiques.

1.2.3. Choix du modèle embryon de carpe (*Cyprinus carpio* L.)

Le modèle embryon de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) offre *a priori* de nombreuses facilités expérimentales. La carpe est présente dans les eaux chaudes et tempérées de tous les continents non polaires. La reproduction artificielle est maîtrisée, permettant la réalisation de fécondations *in vitro* presque toute l'année (Horvath, 1978; Roubaud *et al.*, 1987). Le nombre très élevé d'ovocytes produits par femelle (environ 100.000 oeufs par kg de poids vif) permet la réalisation de nombreux tests sur un matériel biologique relativement homogène. Selon Chaillou *et al.*, 1991, les populations d'embryons issues de fécondations simultanées se comportent comme des populations cellulaires naturellement synchronisées et peuvent être utilisées comme modèle en toxicologie cellulaire. Les taux de survie embryonnaire sont souvent élevés: de l'ordre de 80 % à l'éclosion et de 70 % en fin de résorption vitelline. Le développement embryonnaire externe favorise l'étude des interactions entre les toxiques et les paramètres physico-chimiques du milieu. L'embryon de carpe présente un chorion transparent permettant des observations aisées et non destructives. A 24°C, le développement embryon-larvaire, sans apport de nourriture dure une dizaine de jours, les mortalités par inanition en fin de résorption vitelline apparaissant entre le 10^e et le 12^e jour d'incubation.

Néanmoins, le modèle embryon de carpe présente certains désavantages: - la grande taille des géniteurs pose des difficultés pour leur stabulation en laboratoire, - un dimorphisme sexuel qui n'est pas net oblige à augmenter le nombre des géniteurs pour assurer la présence des 2 sexes, - une surmaturation ovocytaire rapide (quelques heures après ovulation) impose des contraintes de temps pour la réalisation de la fécondation (Chaillou *et al.*, 1989).

2^e Partie. Etude expérimentale

2. Toxicité du Mexel[®] 432 dans une eau synthétique

2.1. Effets létaux du Mexel[®] 432, un agent anti-salissures, vis-à-vis du développement embryon-larvaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.).

(Ecotoxicol. Environ. Saf. soumis)

2.1. *Effets létaux du Mexel[®], un agent anti-salissures, vis-à-vis du développement embryoloarvaire de la carpe commune (Cyprinus carpio L.). (Ecotoxicol. Environ. Saf. soumis)*

LETHAL EFFECTS OF MEXEL[®], AN ANTIFOULING AGENT, TOWARDS COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO* L.) EMBRYOLARVAL DEVELOPMENT

Latifa AREHMOUCH, François GHILLEBAERT, Catherine CHAILLOU
and Pierre ROUBAUD

Groupe d'Embryotoxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire, Université Denis Diderot (Paris 7), case 7077, 2 Place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05.

ABSTRACT

Embryolarval lethal effects of Mexel[®], an anti-fouling agent, were tested in the laboratory during continuous exposure, beginning at fertilization, under various experimental conditions on eight different spawns of the common carp (*Cyprinus carpio* L). In synthetic water at 24°C and without larval feeding, low correlation levels were found between the LC₅₀ and the various tested experimental conditions, except Mexel[®] concentration. The mean LC₅₀ were 1.13 ± 0.35 mg/liter after three days of exposure, and 0.88 ± 0.36 mg/liter after seven days. On five spawns, it was 0.69 ± 0.32 mg/liter after nine days. The lowest and highest LC₅₀ were 0.34 and 1.58 mg/liter after seven days of exposure.

The sensitivity to Mexel[®] increased slightly from the egg to the newly hatched larva and the developed larva. No lethality was observed during a period of recuperation after four days of exposure.

The toxicity of Mexel[®] was not strongly reduced after fifteen days of conservation of the solution. Vessel walls pretreated with Mexel[®] showed no toxicity by contact or after eventual desorption. Methodological endpoints such as criteria for spawn quality, experimental conditions for the tests, demonstration of cumulative effects, and toxicometrical importance of the period of mortality by starvation in fish early life toxicity tests, are discussed.

Key words: Anti-fouling, carp, Fish early life, Mexel[®], Toxicity.

INTRODUCTION

The settlement and colonization of hydraulic circuits by fouling organisms cause operation problems and increased maintenance cost and downtime in industrial, agricultural or urban water systems (Cloete *et al.*, 1989; Zvyagintsev, 1989; Afanas'ev *et al.*, 1991). Facing this risk, various preventive or curative methods are used, such as mechanical cleaning, thermal shock or chemical treatment using chlorine, potassium salts (Lu *et al.*, 1986; Khalanski, 1993) and treatments with paints containing heavy metals, notably tributyltin (Ebdon *et al.*, 1988; Karande *et al.*, 1993; Evans *et al.*, 1995).

Mexel[®] is proposed as a complementary method to these processes with the added advantage of corrosion inhibition (Khalanski, 1993; MEXEL company, 59481 Haubourdin, FRANCE).

Mexel[®] is an off-white, thick, viscous, aqueous emulsion of fatty-amines. Its precise chemical composition remains confidential. It contains metal traces, but no aromatic or quaternary ammonium compounds. Mexel[®] was registered by US EPA (Environmental Protection Agency 69100-1, 31/01/96), and its use on an increasing scale in numerous countries makes necessary a thorough knowledge of the consequences of its application within the environment. The presence of fatty-amines in Mexel[®] makes its properties nearer those of surfactants.

Fatty-amine surfactant compounds have proved to be efficient inhibitors for corrosion (Abdallah, 1994). Surfactant are especially noted for their wetting qualities and their effectiveness as emulsifiers. Some of them readily adsorb onto surfaces which leads to surface modification. Thus, surfactants are used as detergents and household cleaners and to a lesser

extent as textile softener, antistatic agents, additives in paints, metal processing, shampoos, cosmetics, and oil drilling operations (van Ginkel, 1996). Due to these uses, most surfactants appear in natural ecosystems either through a discharge of waste water (e.g. detergents) or through direct application (e.g. biocides). Surfactants can be toxic to bacteria, algae, daphnids and fish at concentrations as low as 1 mg/liter.

Due to their ability to adsorb at interfaces, surfactants can interact with biological membranes changing their permeability at low concentrations and leading to cell lysis at higher concentrations (Sterzel, 1997).

With a microtox test on *Photobacterium phosphoreum* in demineralized water (Khalanski, personal communication), the Mexel[®] concentration inhibiting 50 % of bacteria luminescence (IC₅₀ 15 min) was 5.2 mg/liter and was increased to 7.6 mg/liter after five days of aging of the solution. On *Pseudomonas aeruginosa*, a bactericidal effect was observed at high concentrations (1 g/liter), but a bacterial growth was possible with 10 to 100 mg/liter of Mexel[®] as the unique source of organic carbon.

On the mussel *Dreissena (Dreissena polymorpha Pallas)*, one of the major targets for anti-fouling agents in freshwater, lethal effects have been observed within 30 days of daily treatment for 1.5 hour at the nominal concentration of 2 mg/liter (Giamberini *et al.*, 1993). At 2.5 mg/liter, Mexel[®] induced degeneration of the *Dreissena* gill epithelium after a 24-hr exposure and on the gill of the clam (*Ruditapes decussatus*), non-specific tissular effects especially the detachment of cilia and epithelia, and impairment of microvillousities and mitochondria (Khalanski, personal communication).

In the literature, as far as we know, no information is yet available on Mexel[®] toxicity on non-target organisms such as fishes.

In this paper, we study the lethal effects of Mexel[®] on the embryolarval development of the common carp (*Cyprinus carpio L.*). Early life stages (Macek and Sleight, 1977; McKim, 1977), and particularly fertilization, hatching, and transition to exogenic feeding (Van Leeuwen *et al.*, 1985) have been pointed out as the most sensitive phases in the fish life cycle. The common carp is one of the recommended species for standardized tests of toxicity in the early life cycle of freshwater fish (OECD, 1992). It has been chosen for its practical advantages and its environmental representativeness (Lefebvre *et al.*, 1990). Our study is structured as follows:

- 1) We estimate on eight different spawns, the toxicity to Mexel[®] and its variability in synthetic water, during continuous exposure beginning at fertilization.

2) We compare the lethal effects of Mexel[®] on the egg, the newly hatched, and the developed larva with the aim of detecting possible critical sensitive periods and differed effects after the end of the exposure.

3) We test the effects of aged Mexel[®] solution on carp embryolarval sensitivity.

4) Due to its fatty-amine compounds, Mexel[®] can be considered as a film forming product (Degremont. 1979; Van Laer, personal communication). We studied the hypothesis of toxic effects after adsorption on vessel walls and/or short term ulterior desorption.

We discuss methodological endpoints such as criteria for spawn quality, experimental conditions for the tests, demonstration of cumulative effects, and toxicometrical importance of the period of mortality by the starvation of fish in early life toxicity tests.

MATERIALS AND METHODS

Common carp (*Cyprinus carpio* L) breeders came from the fishfarm « Les Alevins de Sologne » (Vignoux sur Barengeon, 18500, FRANCE). Eight biological tests numbered one to eight were performed on eight different spawns.

Production of gametes was carried out according to Jaoul and Roubaud (1982): maintenance of the breeders (males and females) in cold water from autumn to the period of the test, followed by one or two weeks at 20°C under a 13-hr: 11-hr light: dark photoperiod, and by two injections of carp hypophysis extracts 36 and 12-hr before gamete harvesting. In a thermo-controlled room at 24°C, artificial fertilization and incubation were performed according to Ghillebaert *et al.* (1995): about fifty oocytes were dispersed with 10 µl of sperm in 20 ml of the test solution on the bottom of the incubators. About 20 min after fertilization, the exceeding sperm was washed out with the test solution, and the fertilized oocytes, which had stuck to the bottom of the incubators, were covered with the same solution. Incubators were placed on an oscillating table (10 oscillations / min).

In controls, cleavage stages and epiboly occurred during the first day of incubation. At 24°C, hatching occurred in our experimental conditions between the second and the third post-fertilization day. Then, the incubators were rinsed with the test solution to eliminate chorion fragments, dead eggs and larvae.

Counting the age of the animals from fertilization (age 0), we distinguished during the development: the egg (age 0 to day 1-3), the young larvae (age 2-3 days to 4-5 days), the

developed larva (age 4-5 days to 8-9 days), and the starved-weakened larva or starved-dying larva (age 8-9 days and over). Dead embryos and larvae were characterized by yolk coagulation and opaque blank color of the central nervous system (Jaoul and Roubaud, 1982; OECD, 1992). In controls, the survival rates remained stable at least during seven days after hatching.

Exposure

Mexel[®] was provided by the MEXEL company, (59481 Haubourdin, France; batches n° 01/10/92 in tests 1 and 2 and 03/11/95 in tests 3 to 8). It was kept in darkness and at room temperature until use.

The exposure was performed without feeding and, in these conditions, larval lethality due to starvation occurred after the tenth to twelfth day of incubation. The exposure media were renewed daily (except in tests 9 and 10) after control of temperature, pH, and oxygen concentration in each incubator.

The tests were performed in translucent polyethylene 250 ml-capacity vessels with 150 ml of the test solution (Tests 1, 2, 3 and 10) or in crystal polystyrene 120 ml-capacity vessels with 60 ml (Tests 4, 5, 9) or 100 ml (Tests 6, 7, 8).

The survival rates were measured at the end of days one, three, and seven in tests 1 and 2, and every day in the other tests (Tests 3 to 8A).

Tested solutions

Test solutions were prepared from a 100 mg/liter stock Mexel[®] solution in synthetic water (ISO 7346/3, 1984) i.e., for one liter of deionized water (resistivity > 1M Ω): CaCl₂ - 2H₂O: 294.0 mg/liter; MgSO₄ - 7H₂O: 123.3 mg/liter; NaHCO₃: 63.0 mg/liter and KCl: 5.5 mg/liter, pH 7.8.

The tested concentrations were in a geometrical progression of ratio 2. The extreme concentrations were 0.18 - 100 mg/liter in test 1; 0.18 - 6.25 mg/liter in test 2; 0.25 - 4 mg/liter in tests 3 and 5; 0.1 - 3.2 mg/liter in test 4, 0.25 - 2 mg/liter in tests 6 and 8, and 0.125 - 2 in test 7. In test 1, the concentration of 1.04 mg/liter was tested instead of the concentration of 1.56 mg/liter, and in test 8, an additional concentration of 0.75 mg/liter was tested. In test 9, a

10 mg/liter stock solution, aged during 15 days before dilution in synthetic water to the final toxicant concentrations 0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 mg/liter, was compared to the same concentrations of freshly prepared solutions. The concentrations are expressed as nominal concentrations. In each test, three replicates were set per concentration.

Comparative sensitivity of early life stage. Postexposure recuperation.

The compared exposure periods were: from fertilization to the 12th day in continuous exposure (Test 8 A), from fertilization to one day after hatch (newly hatched larva) (Test 8 B), and two successive periods of four days in the larval development before the start of the starvation period (young and developed larva) (Tests 8 C and 8 D). For the first and the second periods (Tests 8 B and 8 C), recuperation incubation in synthetic water was performed from the end of exposure to day 12. Incubation before exposure was performed in synthetic water.

Lethal effects of aged Mexel[®] solutions

Preliminary experiments (unpublished data) have shown that after a 12-hr exposure on newly fertilized eggs and 5-day-old larvae an initial nominal 10 mg/liter Mexel[®] solution induced 100 % mortality, even after respectively four days or seven days aging.

In test 9, the lethal effect of a 10 mg/liter stock solution, kept in a glass bottle for 15 days before dilution in synthetic water to the final nominal Mexel[®] concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10 mg/liter), was compared to the same concentrations of freshly prepared solutions. This test was performed in static condition at $15 \pm 1^\circ\text{C}$. This low incubation temperature was chosen in order to reduce the development rate, allowing longer disposal of a biological stock for experiments. This temperature is compatible with normal carp development (Reznichenko, 1976) and does not change the larval sensitivity to Mexel[®] (unpublished data).

Lethal effects of Mexel[®] by contact with an eventual deposited film on incubator walls or after desorption

In order to test the Mexel[®] toxicity by contact with an eventual deposited film on incubator

walls or after desorption, we conducted test 10 (Fig 1) according to Ghillebaert *et al.* (1996): a 10 mg/liter Mexel[®] solution in synthetic water was kept for 24-hr in an incubator noted "I1". Then, the solution was poured in a new incubator noted "I2", which received a batch of 30 larvae. After being washed three times with 50 ml of synthetic water, the I1 incubator received two different batches of 30 larvae in 100 ml of new synthetic water. The first batch (I1a) was kept away from the « Mexel[®] treated walls » by a 400 µm mesh nylon net cage in a central position. The second batch (I1b) was incubated with contact to the incubator walls. Two days later, the larval survival rates were measured in each of the I1a, I1b, and I2 incubators.

Statistical analysis

The median-lethal-effect-concentrations (LC₅₀) were calculated with the Trimmed Spearman-Kärber Method (U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OHIO 45268). Significant differences in survival rates were calculated with the Tukey multiple comparisons test. Correlation and principal components analysis were performed with STAT-ITCF (1987-1988) and SYSTAT for Windows softwares (1992).

RESULTS

Lethal effects of Mexel[®] in continuous exposure beginning at fertilization

Continuous exposure beginning at fertilization (Tests 1 to 8 A, Table 1, Fig 2) was realized in similar, but not identical experimental conditions (concentration ranges, vessel material, medium volume, Mexel[®] batches). However, low correlation levels were found between the LC₅₀ and these conditions. An important variability of the absolute survival rates was observed before hatching in controls, but these rates appeared relatively stable after hatching (day 3), at least until the 7th day of incubation.

The LC₅₀, when calculable, were found to be in the range of 1.2 to 4.2 mg/liter after one day of exposure during egg cleavage and epiboly, 0.5 to 1.8 mg/liter after three days (newly hatched larva), 0.3 to 1.6 mg/liter after seven days (developed larva), and 0.26 to 1.13 mg/liter after nine or eleven days (weakened or dying starved larva). In test 3, the lowest-

observed-lethal-effect-concentration was reduced by a factor of four during the starvation-death period. In tests 5 (Fig 2) and 8 A, a progressive decrease of LC₅₀ was observed with prolonged exposure. In every test, the LC₅₀ remained stable during a more or less long period of the larval development. For example, in test 7 the LC₅₀ stability period lasted at least from day 5 to day 12 (e.g. LC₅₀ was 0.57 mg/liter at day 5 and 0.55 mg/liter at day 12), while in test 5 it lasted only from day 5 to day 7. During the period of weakening or death by starvation, the LC₅₀ decreased strongly at the end of exposure in tests 3 and 8 A (e.g. in test 8 A, LC₅₀ was 0.78 mg/liter at day 9 and 0.34 mg/liter at day 12).

The lower the concentrations, the more delayed the lethal effects. At high concentrations, mortality occurred very rapidly. For example, in a 6.25 mg/liter solution, we observed 100 % mortality within less than two hours (Tests 1 and 2).

No larval teratogenic effects were observed as a consequence of exposure.

Comparative sensitivity of early life stages; postexposure recuperation (Table 2)

After a 1-day or 2-days exposure, the sensitivity to Mexel[®] increased slightly from the eggs to the newly hatched larvae and then to the developed larvae (Test 8, Table 2). Thus, after 24-hr of exposure, the LC₅₀ was superior to 2 mg/liter for eggs, in the range of 1.32 to 1.40 for young larva, and equal to 1.41 for developed larva (Tests 8 B, C, D).

During recuperation periods after exposure, the LC₅₀ remained stable (Tests 8 B, C). For example, the LC₅₀ was 0.72 mg/liter after 4 days of exposure from fertilization (Test 8 B), and it was still 0.69 mg/liter at day 12, i.e. after 8 days of recuperation. On the contrary, in test 8 A the prolongation of exposure induced an important decrease of LC₅₀: from 0.91 mg/liter at day 4 to 0.34 at day 12.

No larval teratogenic effects were observed during the periods of recuperation as during prolonged exposure.

Lethal effects of aged solutions (Table 3)

The lethal effects of Mexel[®] did not strongly decrease during aging of the solutions. For example (Test 9, Table 3), a 10 mg/liter stock solution of Mexel[®] was aged during 15 days before dilution to the tested concentrations. Compared to freshly prepared solutions, the LC₅₀

24-hr and 72-hr were respectively reduced by 17 % and 44 % (from 2.3 mg/liter to 1.9, and from 1.6 to 0.9).

Lethal effects of Mexel[®] by contact with an eventual deposited film on incubator walls or after desorption (Table 4, Fig. 1)

A 10 mg/liter Mexel[®] solution kills 100 % of the larvae in less than two hours. After 24 hours of aging in a polyethylene incubator (I1) without larvae, and after decanting in a clean new incubator (I2), this solution still had 100 % lethal effect on common carp after less than a 2-hr exposure. In contrast, no lethal effects were observed either when the larvae were prevented from (I1a) or free (I1b) to come to contact the walls of the incubators.

DISCUSSION

Experimental validity of the results. Criteria of spawn quality

In every test, pH, oxygen concentration, and temperature, measured before the daily renewal of the incubation medium, remained compatible with normal embryolarval development (Reznichenko, 1976, Ghillebaert *et al.*, 1995).

In synthetic water at 24°C (Table 1, Fig 2), the evolution of the control survival rates showed the three characteristic toxicometric phases of carp embryolarval development (Ghillebaert *et al.*, 1995): initial phase with important differences of the mortality rates depending on the tests (phase 1: from day 0 to day 3), larval survival stability phase (phase 2: from day 3 to day 10 or day 12), and starvation mortalities phase (phase 3: from day 10 or day 12, depending on the tests).

All tests were performed on spawns of variable survival control rates. However, these rates only showed low correlation with the LC₅₀. Then, it appeared that, at least in the case of Mexel[®], the results of the toxicity tests on spawns of low survival rates might be validated, even though these rates were inferior to the thresholds defined in standard fish early life tests (80 % and 75 % before and after hatching: OECD, 1992). The stability of the survival rates of controls in phase 2 appears to be an indicator of the physiological quality of the larvae. From a statistical point of view, in continuous exposure tests mortalities in controls are negligible,

since toxic effects are only estimated by comparisons to surviving control larvae. Thus, the post-hatching stability of the survival rates could represent a more reliable criterion of the biological and experimental quality of the spawns than absolute survival rates. Moreover, from an ecotoxicological point of view, the results of the tests on low survival rate spawns account for the possibility of the presence of such spawns in natural conditions.

The observed variability between the LC₅₀ (more than a factor of 4) between the various tests, appeared to result from variations in the sensitivity of the spawns or possible unknown parameters rather than variations in the controlled experimental conditions (exposure volume, vessel material, Mexel[®] batch), since low correlations between LC₅₀ and these conditions were observed.

Mexel[®] lethal activity levels

Mexel[®] is likely to be an active toxicant for carp embryolarval development, particularly after long exposures, but without visible teratogenic effects. For example, in one of the 8 tests, an LC₅₀ as low as 0.26 mg/liter was found after nine days of exposure beginning at fertilization (Test 5, Table 1). The mean LC₅₀ (mg/liter) related to the 8 tests was 1.13 ± 0.35 after three days of exposure and 0.88 ± 0.36 after seven days. This toxicity is similar to Mexel[®] toxicity commonly observed with fishes. Thus, in two separate tests on fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae, the LC₅₀ at 96-hr was 0.28 mg/liter in one and the lowest-observed-lethal-effect-concentration was superior to 0.66 mg/liter in the other (L. Brooke and F. Ghillebaert, personal communication). In adult of zebrafish (*Brachydanio rerio* H.B.), the LC₅₀ at 24-hr was 1.3 mg/liter, and in juveniles of plaice (*Pleuronectes platessa* L.), the LC₅₀ at 24 and 96-hr were respectively 2.36 and 0.83 mg/liter (MEXEL company, personal communication). Within the limits of eventual differences in the experimental conditions, these results do not support the reputation of the carp as a highly tolerant species to toxic stress, a reputation probably generated by its great tolerance to anoxia.

The toxicity of Mexel[®] to fish appear compatible with the general toxicity of surfactants. Based on the studies reviewed by Lewis (1991), the range of effect and no effect concentrations of surfactants for fish, was 0.05 - 28.0 mg/liter (anionic surfactants), 0.05 - 50.0 mg/liter (nonionic), and 0.05 - 0.46 mg/liter (cationic). The range for invertebrates was 0.04 - >10.0 mg/liter (anionic), < 0.1 - 20.0 mg/liter (nonionic), and 0.009 - 1.27 mg/liter

(cationic).

Perhaps due to the protection by the chorion, eggs appeared slightly more tolerant than young or developed larvae. For example (Table 2), the LC₅₀ at 48-hr for eggs (Tests 8 A, 8 B) was in the range 1.18 to 1.41 mg/liter and in the range 0.69 to 0.93 mg/liter for larvae (Tests 8 C, D). It is known that, except with particular classes of toxicants such as antimetabolites (Chaillou *et al.*, 1991), fish eggs are a relatively tolerant period in fish early life stages (Van Leeuwen *et al.*, 1985; Kristensen, 1990; Fent et Meier, 1994).

Hypothesis of cumulative effects

In our tests, during continuous exposure beginning at fertilization, the mean measured LC₅₀ decreased by a factor of more than 2 from day 1 to day 3. For example, in the tests where the LC₅₀ were calculable both at days 1 and 3 (Tests 1, 2 and 5), the mean LC₅₀ decreased from 2.47 ± 1.41 mg/liter at day 1 to 1.13 ± 0.57 mg/liter at day 3 (Table 1). Then, except in test 5, the LC₅₀ decrease was strongly slowed down in young and developed larvae. For example, in tests 4 to 8 A, the mean LC₅₀ only decreased from 1.02 ± 0.39 mg/liter at day 3 to 0.68 ± 0.32 mg/liter at day 9.

This observation shows that during continuous exposure from fertilization, the animals which survive at day 4 or 5 are generally tolerant to prolonged exposure, corresponding to an all or nothing individual response to the toxicant. The variability of the individual tolerance could, for example, be related to a variability in the efficiency of a defence system to toxicant penetration such as the production of mucous, as suggested by Khalanski (personal communication). The immediate cause of death from acute detergent poisoning where extensive gill damage (the loss of mucous cells, inflammatory response) occurs is likely to be either asphyxiation or loss of osmotic or ionic stability. Inflammatory stress could explain the avoidance reaction of many fish species to surfactants (Abel, 1974; Lewis, 1991). The toxic effect of Mexel[®] could also result of an increase of the membrane permeability as was observed with surfactants for example on *Carassius auratus* L. (Abel, 1974).

The stability of LC₅₀ after hatching seems to indicate that no short term cumulative effects are to be expected with Mexel[®] on larvae. However, in tests 3 and 8 A, the LC₅₀ strongly decreased after nine days of exposure and in test 5, it decreased almost continually from the first to the 12th day (Tables 1 and 2), suggesting in these tests the existence of cumulative

effects. But, these observations are not by themselves certainly demonstrative of such effects since they could express differed mortalities of a toxic impact at the very beginning of the development. Even if this argument could not concern the test 8 since the absence of differed effects is shown by the stability of LC_{50} during recuperation period, it could eventually concern tests 3 and 5. In tests 3 and 8 A, the decrease of the LC_{50} at the end of the exposure period could also be assigned to a weakening of the larvae by starvation. However, the presence of the toxicant could also increase the speed of yolk resorption, a cumulative effect resulting in an earlier starvation.

From a methodological point of view, this discussion shows the difficulty of drawing conclusions on the presence of cumulative effects in continuous exposure tests on biological material in rapid evolution.

If the occurrence of cumulative effects of Mexel[®] was confirmed on fish early life stages, the repeated spill of Mexel[®] into the environment by a large-scale industrial use could result in high levels of toxicity after continuous long-term exposures, since in laboratory conditions (synthetic water, glass vessel), Mexel[®] solutions did keep a large part of their toxicity during long periods of time (Test 9, Table 3). However, the LC_{50} on egg or larva rapidly decreased during the first two days before stabilizing (Tables 1 and 2). Thus, in short duration treatments, it is likely that the toxicity of Mexel[®] would be strongly reduced.

Mexel[®] toxicity and film formation

Mexel[®] action against fouling is attributed to fatty-amines which rapidly form a film on the treated surfaces (Degremont, 1979, Abdallah, 1994). The existence of this film with Mexel[®] was demonstrated by electrochemical methods (J. Guezennec, personal communication). Thus, the toxic activity of Mexel[®] could *a priori* result from contacts with the treated surfaces or from eventual ulterior desorption in the medium. However, in our test on contact toxicity (Test 10, Table 4, Fig. 1), we did not give any direct evidence of the formation of an adsorbed Mexel[®] film on the polyethylene walls of the incubators. Then, the absence of lethal effects inside the Mexel[®] pretreated incubators (I1a and I1b) could result from the absence of such film. Indeed, contrarily to a similar experiment with deltamethrin, a highly hydrophobic molecule (Ghillebaert *et al.*, 1996), the Mexel[®] filming solution did not loose its toxicity during the treatment of the vessel walls (incubator I2). However, if the existence of the Mexel[®] film

was confirmed, the absence of toxicity by contact would confirm the non-toxicity of surface adsorbed Mexel[®] previously observed in presence of clays (unpublished data). Then, our result could lead to the hypothesis that the toxic activity of Mexel[®] does not result from a film interposition between the biofoulers and the treated surfaces, but principally by direct action of the product in solution, eventually by deposition on the biological surfaces themselves (Giamberini *et al.*, 1993). In this case, Mexel[®] would require, as recommended in its standard utilization procedure, continuous or repeated treatments.

CONCLUSION

In synthetic water, Mexel[®] is a relatively toxic product to carp early life stages, particularly in long-exposure experiments, since it may induce lethal effects in concentrations as low as 0.25 mg/liter. It keeps a large part of its toxicity for a long time after its dissolution in the water. However, standard procedures for Mexel[®] treatments are far from laboratory test conditions. They consist in daily repeated very short exposures (a few minutes to one hour) and one may expect that the toxicity levels are then much lower than in the continuous long term exposures of our experiments. This conclusion is supported by the absence of differed effects of the treatments during recuperation periods. In an other hand, experiments in progress have already demonstrated that the lethality of Mexel[®] on carp early life stages is strongly dependent on the water quality and is significantly lowered in most natural freshwater.

It seems still necessary to define the acceptable discharge limits of Mexel[®] for environmental safety, taking into account the quality of the water and the actual procedures for its anti-corrosion or anti-fouling utilization.

Acknowledgments

This study was supported by grants from EDF (Electricité de France) and MEXEL company (Mr A. Vanlaer). The authors thank Mr Khalanski (EDF) for his contribution to the initiation of this work and teams of the Laboratories of Vegetal Physiology and Comparative Anatomy, which allowed the benefit of their installations. They also thank J. Geraudy, M. Laurin and P. Lai for reviewing the manuscript, and J. Guezennec and L. Brooke for communication of their results.

REFERENCES

- Abdallah, M. (1994). Corrosion kinetics of carbon steel in HCl solutions and the effect of some ethoxylated fatty amines as corrosion inhibitors. *Annali di Chimica*. 84: 529-539.
- Abel, P.D. (1974). Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *J. Fish Biol.* 6, 279-298.
- Afnas'ev, S.A., Romanova, E.G and Slepnev, A.E. (1991). Bacterial fouling of heat exchangers. *Gidrobiol. Zh.* 27 (5), 56-61.
- Chaillou, C., Lefebvre, B., Sjafei, D., et Roubaud, P. (1991). L'embryon de carpe en segmentation: un modèle expérimental pour l'étude toxicologique du cycle cellulaire. *Cybium* 15, 303-314.
- Cloete, T.E., Smith, F. and Steyn, P.L. (1989). The use of planktonic bacterial populations in open and closed recirculating water cooling systems for the evaluation of biocides. *Int. Biodeterior.* 25 (1), 115-122.
- Degremont. (1979). Correction and conditioning of water. In *Water treatment handbook*. 5th ed. (J. Wiley and Sons, Eds.), New York. pp. 396-397.
- Ebdon, L., Evans, K. and Hill, S. (1988). The variation of tributyltin levels with time in selected estuaries prior to the introduction of regulations governing the use of tributyltin-based anti-fouling paints. *Sci. Total Environ.* 68 (0), 207-224.
- Evans, S.M., Leksono, T. and McKinnell, P.D. (1995). Tributyltin pollution: A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* 30 (1), 14-21.
- Fent, K. and Meier, W. (1994). Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 224-231.
- Ghillebaert, F., Chaillou, C., Deschamps, F., and Roubaud, P. (1995). Toxic effects, at three pH levels, of two reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 32, 19-28.
- Ghillebaert, F., Prodorutti, D., Chaillou, C., and Roubaud, P. (1996). Deltamethrin lethal multifactorial activity towards carp larva related to pH, calcium and humic acids concentration. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 35, 24-37.
- Giamberini, L., Guerold, F., Beauvais, M.A., et Pihan, J.C. (1993). Etude histopathologique de la branchie de *Dreissena polymorpha* Pallas exposée à un nouveau mollusquicide organique. *Hydroécol. Appl.* 5 (2), 61-70.

- ISO 7346/3. (1984). Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1e éd. Ref. n°: ISO 7346/3.
- Jaoul, A., et Roubaud, P. (1982). Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**, 3409-3419.
- Karande, A.A., Ganti, S.S. and Udhayakumar, M. (1993). Toxicity of tributyltin to some bivalve species. *Indian J. Mar. Sci.* **22** (2): 153-154.
- Khalanski, M. (1993). Expérimentation de cinq méthodes contre le développement des moules zébrées dans les circuits de centrales thermiques sur la Moselle. Rapport EDF/DER HE-93NV00030. 22 pp.
- Kristensen, P. (1990). Evaluation of the sensitivity of short term fish early life stage tests in relation to other FELS test methods. Water Quality Institute VKI File n° 305019.
- Lefebvre, B., Chaillou, C., Marie, D., Hanafi, C., et Roubaud, P. (1990). Embryotoxicométrie des poissons: problèmes méthodologiques soulevés par l'élaboration d'un test utilisant l'oeuf de carpe. *Ann. A.N.P.P.* **2**, 161-177.
- Lewis, M.A. (1991). Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Wat. Res.* **25** (1), 101-113.
- Lu, R., Liu, Q., Bai, S., Xiao, C., Zhang, Y., Chen, H. and Wang, F. (1986). Efficiency in control of the microbial fouling in desalting water systems by chlorine dioxide in Beijing Heat and Power Station (China). *Acta Microbiol. Sin.* **26** (1), 60-70.
- Macek, K.J. and Sleight, B.H. (1977). Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazards associated with the chronic toxicity of chemicals to fishes. Aquatic toxicology and hazards evaluation. ASTM STP 634. *American Society for testing and materials* (F.L. Mayer and J.L. Hamelink, Eds.), 137-146.
- McKim, J.M. (1977). Evaluation of tests with the early life stages of fish for predicting long term toxicity. *J. Fish. Res. Board. Can.*, **34**, 1148-1154.
- OECD. (1992). Draft OECD guideline for testing of chemicals. «Fish, toxicity test on egg and sac-fry stages.» March 1992, TGP/92.75.
- Reznichenko, P.N. (1976). Ecological and physiological bases of the thermal regimen of carp (*Cyprinus carpio* L.) eggs incubation. Topical Problems. *Trans. Czech. Soviet Ichthyol. Coop.*, **2**, 107-132.

- STAT-ITCF (1987-1988). Version 4. SECI-ITCF Boigneville, 91720 Maise, France.
- Sterzel, W. 1997. Toxicology of surfactants used in cosmetics in *Surfactants in cosmetics*.
Surfactants Science series, vol. 68. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 557-571.
- SYSTAT for Windows. (1992). Version 5.0. Ed. Evanston, IL: Systat, Inc.
- Trimmed Spearman-Kärber (TSK) Program version 1.5. Ecological Monitoring Research
Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory. U. S. Environmental Protection
Agency, Cincinnati, OHIO 45268.
- Van Ginkel, C.G. (1996). Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of
aerobic microorganisms. *Biodegradation*. 7: 151-164.
- Van Leeuwen, C.J., Griffioen, P.S., Vergouw, W.H.A., and Maas-Diepeveen, J.L. (1985).
Differences in susceptibility of early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to
environmental pollutants. *Aquat. Toxicol.* 7, 59-78.
- Zvyagintsev, A.Y. (1989). Fouling and corrosion deterioration of supporting pillars of oil
platforms in the South China Sea. *Biol. Morya (Vladivost.)*. 0 (6), 46-50.

Table 1. Mexel® mortality of freshly prepared solutions in continuous exposure beginning at fertilization.

Test	Toxicity	Age (days)					
		1	3	5	7	9	11 or 12
1	LC ₅₀ (mg/liter)* %Sv (Sd) in controls	3.84≤4.01≤4.19 64 (19)	1.62≤1.69≤1.75 58 (18)		1.53≤1.58≤1.63 55 (17)		
2		2.18≤2.14≤2.21 83 (6)	1.11≤1.14≤1.18 55 (6)		1.05≤1.08≤1.10 50 (7)		
3		>4 ^(a) 98 (1)	1.05≤1.10≤1.15 97 (1)	0.93≤0.98≤1.02 96 (2)	0.88≤0.92≤0.97 94 (2)	0.5≤LC ₅₀ ^(a) ≤1 78 (6)	LC ₅₀ ^(a) <0.25 49 (12)
4		>1.6 ^(a) 99 (2)	1.46≤1.55≤1.65 97 (3)	1.47≤1.56≤1.66 93 (3)	1.13 ^(b) 93 (4)	1.13 ^(b) 90 (3)	1.12 ^(b) 82 (14)
5		1.17≤1.25≤1.35 69 (12)	0.49≤0.55≤0.62 58 (15)	0.33≤0.35≤0.37 57 (13)	0.32≤0.34≤0.36 56 (13)	0.26 ^(b) 54 (11)	LC ₅₀ ^(a) <0.25 49 (10)
6		>2 ^(a) 94 (0.2)	0.92≤0.98≤1.05 89 (3)	0.71 ^(b) 87 (4)	0.67 ^(b) 87 (4)	0.67 ^(b) 87 (4)	
7		>2 ^(a) 93 (6)	0.74≤0.78≤0.83 87 (6)	0.54≤0.57≤0.61 97 (6)	0.53≤0.56≤0.59 87 (6)	0.52≤0.55≤0.58 87 (6)	0.52≤0.55≤0.58 82 (5)
8 A		>2 ^(a) 79 (7)	1.18≤1.22≤1.26 73 (7)	0.83≤0.86≤0.89 72 (7)	0.78≤0.80≤0.81 71 (7)	0.76≤0.78≤0.80 71 (7)	0.34 ^(b) 68 (6)

Note. Eggs and larvae were exposed to various concentrations of Mexel® from fertilization to the end of the 7th, 9th, 11th or 12th day of incubation. Survival rates in controls and exposed batches were measured at the end of referred day of incubation.

Test: reference number of the test. % Sv (Sd): survival percentage (Sv) with standard deviation (Sd) in controls. *: LC₅₀ and associated 95 % confidence limits. ^(a): LC₅₀ are not calculable. ^(b): LC₅₀ 95% confidence limits are not reliable.

Table 2. Comparative sensitivity to Mexel[®] of early life stages.

Test	Toxicity	Age (day)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
8	A	>2 ^(a)	1.22 1.18-1.26	1.22 1.18-1.26	0.91 0.88-0.94	0.86 0.83-0.89	0.85 0.82-0.87	0.80 0.78-0.81	0.78 0.77-0.80	0.78 0.76-0.80	0.61^(b)	0.47 0.45-0.50	0.34^(b)
	B	>2 ^(a)	1.40 1.38-1.41	1.39 1.37-1.40	0.73 0.70-0.75	0.72 0.70-0.74	0.72 0.68-0.72	0.70 0.68-0.73	0.70 0.68-0.72	0.70 0.68-0.72	0.70 0.67-0.72	0.69 0.66-0.71	0.69 0.67-0.71
	C	95 % confidence limits	incubation in synthetic water			1.36 1.32-1.40	0.90 0.86-0.93	0.85 0.81-0.89	0.84 0.80-0.88	0.84 0.80-0.87	0.83 0.80-0.87	0.81 0.79-0.83	0.80 0.78-0.83
	D		incubation in synthetic water							1.41^(b)	0.71 0.69-0.74	0.70 0.67-0.72	0.59 0.57-0.61
% Sv (Sd) in controls		79 (7)	76 (6)	73 (7)	72 (7)	72 (7)	72 (7)	71 (7)	71 (7)	71 (7)	71 (7)	71 (7)	68 (6)

Note. Eggs and larvae were exposed to various concentrations of Mexel[®] in continuous exposure beginning at fertilization (Test 8 A) or during various periods of 4 days (Tests 8 B, C, D) eventually followed by a period of recuperation without Mexel[®] (Tests 8 B, C).

Test: reference number of the test. *: LC₅₀ and associated 95 % confidence limits. ^(a): LC₅₀ are not calculable. ^(b): LC₅₀ 95% confidence limits are not reliable. % Sv (Sd): survival percentage (Sv) with standard deviation (Sd) in controls. **Bold-faced values**: LC₅₀ during the exposure period.

Table 3. Lethal effects of Mexel[®] aged solutions.

Test	Aging	Age (days)	Toxicity	Exposure duration (days)		
				1	2	3
9	< 2 hr	Larvae	LC ₅₀ (mg/liter)*	1.8≤1.9≤2.0	1.0≤1.1≤1.2	0.8≤0.9≤1.0
	15 days	10-13	95 % confidence limits	2.1≤2.3≤2.5	1.5≤1.6≤1.7	1.5≤1.6≤1.7

Note. The lethal effect of a 10 mg/liter stock solution, kept during 15 days before dilution in synthetic water to the final nominal Mexel[®] concentrations (0.625, 1.25, 2.5, 5 and 10 mg/liter), was compared to the same concentrations of freshly prepared solutions.

Test: reference number of the test. **Aging:** duration of solutions aging before exposure. **Age :** age of the larvae during the exposure period. *: LC₅₀ and associated 95 % confidence limits.

Table 4. Lethal effects of Mexel[®] by contact with an eventual deposited film on incubator walls or after desorption

Test	% Sv (Sd) in controls at days (1, 3, 7)	Lifestage dx-dy	Incubator (I1)		Incubator I2
			Solution (I1a)	walls (I1b)	
			% Sv (Sd)*		
10	93 (5), 90 (6), 85 (7)	Larvae	100 (0) ^a	100 (0) ^a	100 (0) ^a
		d5-d7	100 (0) ^a	100 (0) ^a	0 (0) ^b

Note. **I1a**: toxicity by eventual desorption from the walls; **I1b**: toxicity by direct contact with the walls; **I2**: toxicity of a 10 mg/liter nominal concentration solution: the solution has been kept for one day in the first incubator and then poured into a second one.

Test: reference number of the test. **% Sv (Sd)** in controls: survival percentage (Sv) with standard deviation (Sd) after 48 hours of incubation; *: Tukey test multiple comparison index: values in a same column are not different at 5 % risk if their index have at least one common letter.

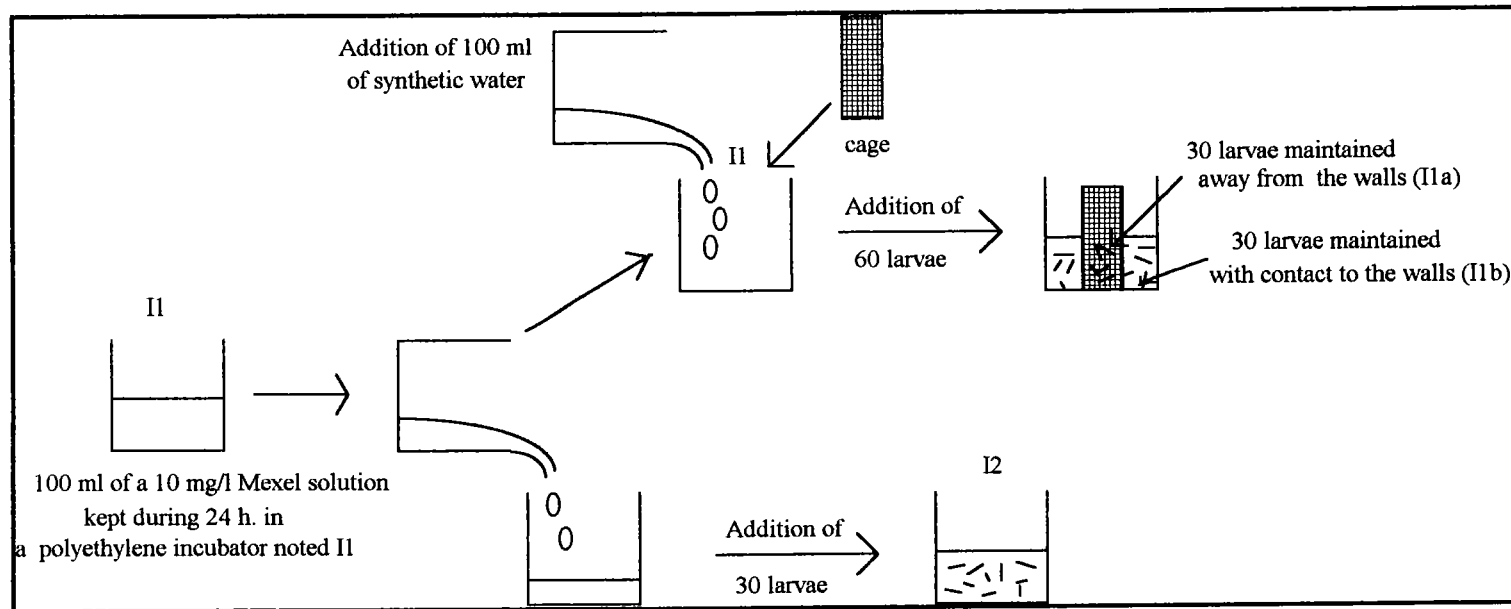
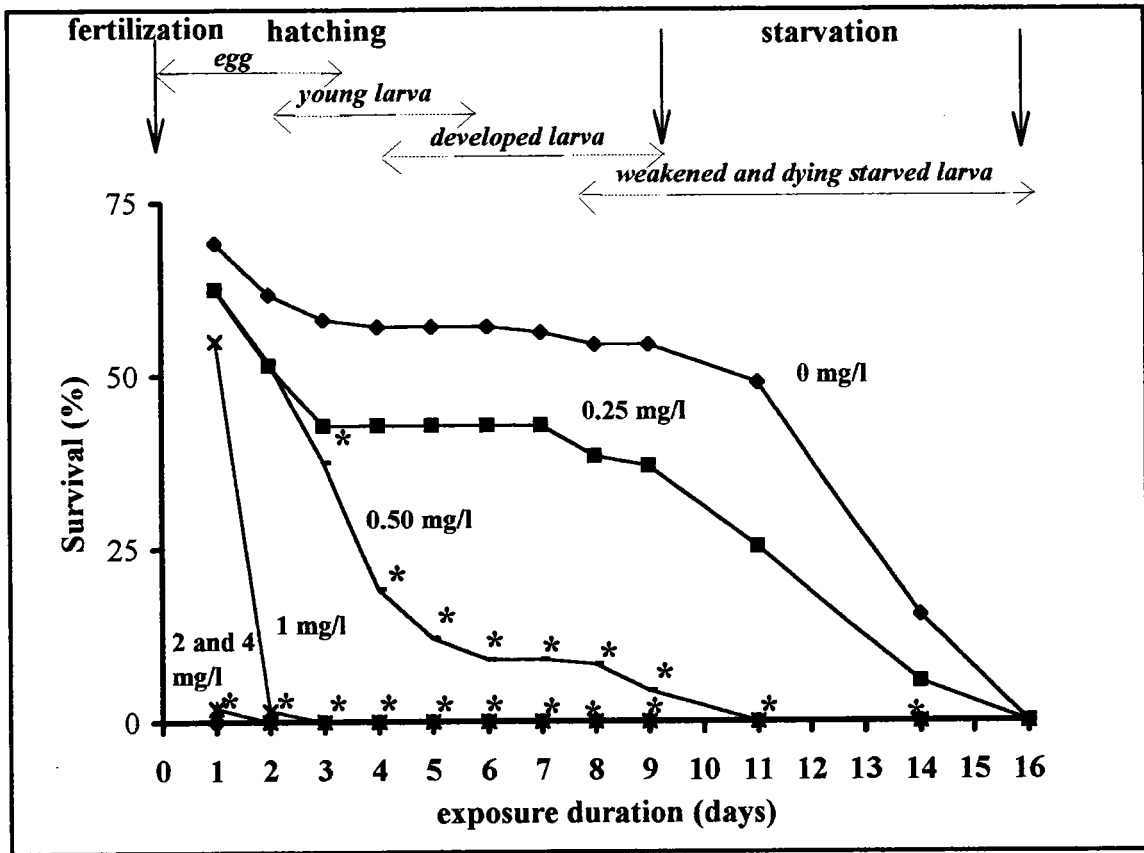


FIG. 1. Lethality of Mexel[®] absorbed to the walls (according to Ghillebaert *et al.*, 1996): A 10 mg/liter Mexel[®] solution in synthetic water was kept for 24-hr in an incubator noted "I1". Then, the solution was poured into a new incubator noted "I2" which received a batch of 30 larvae. After being washed three times with 50 ml synthetic water, the I1 incubator received two different batches of 30 larvae in 100 ml of new synthetic water. The first batch (I1a) was maintained away from the Mexel[®] treated walls by a 400 µm mesh nylon net cage in a central position. The second batch (I1b) was incubated with contact to the incubator wall. Forty-eight hours later, the survival rate of the larvae was measured in each of the I1a, I1b, and I2 incubators.

FIG. 2. Lethal effects of freshly prepared Mexel[®] solutions in synthetic water.



Note. Eggs and larvae were exposed to various concentrations of Mexel[®] from fertilization to the end of the 16th day of incubation (Test 5). Survival rates in controls and exposed batches were measured at the end of every day of incubation.

0, 0.25, 0.5, 1, 2 and 4: nominal concentration of Mexel[®] (mg/liter). *: significant effect ($P \leq 0.05$).

2^e Partie. Etude expérimentale

2. Toxicité du Mexel[®] 432 dans une eau synthétique

2.2. Effets létaux du Mexel[®] 432 vis-à-vis du développement embryon-larvaire de la carpe commune: un essai en condition d'exposition intermittente

2.2. Effets létaux du Mexel[®] 432, un agent anti-salissure, vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe commune: un essai en condition d'exposition intermittente

Par Latifa Arehmouch et Pierre Roubaud

Projet de note brève

Introduction

Dans les conditions d'utilisation industrielle, le Mexel[®] 432 est injecté généralement dans les circuits hydrauliques de façon intermittente, une ou deux fois par jour, à des concentrations de 4 à 10 mg/L, durant 15 à 40 min. Dans les circuits traités et encore plus dans les eaux de rejet, les concentrations du Mexel[®] 432 libre en solution sont *a priori* nettement inférieures à celles injectées, compte tenu du pouvoir filmant du Mexel[®] 432 qui favorise son adsorption sur les particules en suspension dans l'eau et son dépôt sur les surfaces traitées.

Les résultats d'essai réalisés sur plusieurs pontes en exposition continue à partir de la fécondation, montrent en général une chute rapide des CL₅₀ pendant les premiers jours d'exposition suivie par une période de relative stabilité au cours du développement larvaire (Arehmouch *et al.*, soumis). Ainsi, les individus tolérants au début du traitement seraient relativement insensibles à sa prolongation. S'agissant d'un produit ayant des capacités filmogènes, l'hypothèse peut être avancée d'un effet toxique quasi-instantané correspondant au temps de dépôt du film sur les surfaces biologiques. Si l'on suppose en outre que ce film possède une stabilité suffisante sur ces surfaces, les effets d'un traitement de quelques minutes devraient être équivalents à ceux d'un traitement prolongé, la décroissance progressive des taux de survie au cours des premiers jours d'une exposition continue ne s'expliqueraient pas par une accumulation d'effets au cours du temps, mais par une expression plus ou moins tardive en terme de mortalité du choc toxique initial suivant les individus.

Un essai en exposition intermittente de très courte durée journalière a donc été réalisé en choisissant une concentration assez élevée pour provoquer des mortalités rapides en exposition continue. Cette concentration en Mexel[®] 432 peut être représentative de celles rencontrées dans les circuits industriels traités.

Matériel et méthodes

Les gamètes sont obtenus suivant Jaoul and Roubaud (1982): maintien des géniteurs mâles et femelles en eau froide de l'automne jusqu'au moment du test, puis séjour de 2 semaines à 20°C sous une photopériode de 13 heures d'éclairement journalier - injection d'extrait hypophysaire de carpe 36 et 12 heures avant le moment choisi pour la ponte - récolte des gamètes par massage abdominal hors d'eau - insémination artificielle en chambre thermorégulée à 24°C et incubation suivant Ghillebaert *et al.* (1995): environ 50 ovocytes sont dispersés avec 10 µl de sperme dans 20 ml d'eau synthétique (ISO 7346/3, 1984) dans des incubateurs en polystyrène (OSI-Labo) - lavage du sperme en excès au bout de 20 min et incubation à une température moyenne de $24,4 \pm 0,7^\circ\text{C}$ dans 100 ml d'eau synthétique renouvelée tous les jours. Les incubateurs sont mis sur une table oscillante (10 oscillations/min).

Un choc toxique journalier de durée 10 min. est appliqué pendant 12 jours à partir de la fécondation dans une solution fraîchement préparée de Mexel[®] 432 à la concentration 2 mg/L dans une eau synthétique. Au premier jour, le choc toxique est effectué 7 heures après la fécondation. Parallèlement, un essai en exposition continue à partir de la fécondation a été réalisé dans les mêmes conditions.

Les pourcentages de survie sont mesurés chaque jour avant le choc toxique, le critère de discrimination des oeufs morts étant la coagulation du vitellus ou des protéines du système nerveux central.

Les effets létaux sont étudiés à l'aide du logiciel SYSTAT 5.0 (SYSTAT for Windows, 1992) par analyse de variance (McClave *et al.*, 1981) après transformation des pourcentages de survie par la fonction arcsinus. Les concentrations sans effet observé (CSEO) sont calculées au seuil $\alpha = 5\%$ à l'aide du test de comparaison multiple de Tukey.

Résultats

En exposition continue, les concentrations sans effet observé (CSEO) sont 2 mg/L après 1 jour d'exposition, 0,75 après 3 et 5 jours, 0,5 après 9 jours et 0,25 après 12 jours (Arehmouch *et al.*, soumis). En exposition intermittente, la concentration testée 2 mg/L reste sans effet observé jusqu'à la fin du 12^e jour d'exposition (Tableau 1).

[C] (mg/L)	N	% survie $\bar{X}(\sigma)^*$ au jour Jx				
		Exposition continue (jours)				
		J1	J3	J5	J9	J12
0	245	79 (7) ^a	73 (7) ^a	72 (7) ^a	71 (7) ^a	68 (6) ^a
0,25	156	74 (5,5) ^a	71 (3) ^{ab}	71 (3) ^a	70,5 (3) ^a	65 (3) ^a
0,5	190	85 (5) ^a	84 (7) ^a	79 (7) ^a	75 (5) ^a	0 (0) ^b
0,75	172	81 (6) ^a	79 (5) ^a	56 (16) ^a	47 (22) ^b	0 (0) ^b
1	176	79 (15) ^a	54 (10) ^b	9 (16) ^b	0 (0) ^c	0 (0) ^b
2	181	85 (4) ^a	0 (0) ^c	0 (0) ^b	0 (0) ^c	0 (0) ^b
Exposition intermittente (10 min / jour)						
2	140	65 (11) ^a	65 (11) ^a	62 (11) ^a	63 (10) ^a	61 (12) ^a

Tableau 1. Effets létaux du Mexel[®] 432 à 2 mg/L en exposition intermittente de 10 min/jour

[C]: concentration nominale en Mexel[®] 432. N: effectif total testé sur les 3 répliques. \bar{X} : moyenne. σ : écart-type. *: Indice de comparaison multiple du test de Tuckey: deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune. **caractères gras**: effet significatif par rapport aux embryons et larves incubés dans l'eau synthétique.

Discussion

Après 12 jours d'exposition intermittente de 10 min / jour à la concentration de 2 mg/L, les effets du Mexel[®] 432 ne sont pas significativement différents de ceux obtenus en exposition continue avec une concentration 8 fois plus faible soit 0,25 mg/L. L'hypothèse d'une assimilation des effets du Mexel[®] 432 à l'action d'un dépôt quasi-instantané d'un film sur les surfaces biologiques n'est donc pas vérifiée.

La faible toxicité observée en exposition intermittente montre que les risques écologiques liés à l'utilisation du Mexel[®] 432 sont beaucoup moins importants que ne semblent l'indiquer les seuls résultats de tests effectués en exposition continue (Arehmouch *et al.*, soumis).

Après la réalisation de notre essai, les effets du Mexel[®] 432 en exposition intermittente ont été étudiés sur la daphnie (*Daphnia magna*) et le poisson tête de boule (*Pimephales promelas*)

(Ghillebaert et Brooke, 1997). Chez la daphnie, dans une eau du Lac Supérieur aux Etats Unis, les CL₅₀ mesurées après exposition journalière de 5, 20 et 80 min pendant 48 h sont respectivement au moins 135, 43 et 16 fois plus élevées qu'après exposition continue. Chez le poisson tête de boule, pour des durées d'exposition journalières de 5 et 20 min. pendant 4 jours, ces facteurs de multiplication étaient respectivement de 41 et 15.

Ces résultats ne peuvent que limiter les risques susceptibles d'être attribuées au Mexel® 432 au seul vu des essais normalisés effectués en exposition continue.

Etant donné que de nombreuses pollutions notamment celles d'origine humaine, sont provoquées par des relargages discontinus, ces premières observations montrent l'intérêt qui devrait s'attacher à l'élaboration systématique de tests en exposition intermittente pour l'évaluation des risques toxiques dans l'environnement.

Références

- Arehmouch, L., Ghillebaert, F., Chaillou, C. and Roubaud, P. Lethal effects of Mexel®, an antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development. soumis.
- Ghillebaert, F. and Brooke, L. 1997. Mexel® 432 toxicity to cladoceran and *Fathead minnow* during continuous or daily intermittent exposures. MEXEL SA, France. 12 pages.
- Ghillebaert, F., Chaillou, C., Deschamps, F., and Roubaud, P. 1995. Toxic effects, at three pH levels, of two reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**: 19-28.
- ISO 7346/3. 1984. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1^e éd. Ref. n°: ISO 7346/3.
- Jaoul, A., et Roubaud, P. 1982. Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**: 3409-3419.
- McClave, J.T., Sullivan, J.H. and Pearson, J.G. 1981. Statistical analysis of fish chronic toxicity test data (D.R. Branson and K.L. Dickson, Eds.). ASTM STP 737, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*: Fourth Conference: pp. 359-376.
- SYSTAT for Windows. 1992. Version 5.0. Ed. Evanston, IL: Systat, Inc.

2^e Partie. Etude expérimentale

2. Toxicité du Mexel[®] 432 dans une eau synthétique

2.3. Effets du Mexel[®] 432, un agent anti-salissure industriel, vis-à-vis de la croissance embryon-larvaire de la carpe commune

2.3. Effets du Mexel® 432, un agent anti-salissure industriel, vis-à-vis de la croissance embryo-larvaire de la carpe commune

Ghillebaert, F., Arehmouch, L., Chaillou, C. et P. Roubaud

Projet d'une note brève

Introduction

Le Mexel® 432 est un produit de plus en plus utilisé comme agent anti-salissures et anticorrosion dans le traitement des circuits hydrauliques et urbains. En eau pure, au laboratoire, il présente une toxicité élevée vis-à-vis de divers organismes non-cibles (Ghillebaert et Brooke, 1997; INERIS, 1997). Par exemple, pour les embryons et larves de carpe, la CL₅₀ (72 h) est proche de 1 mg/L et peut descendre jusqu'à environ 0,3 mg/L après 7 jours d'exposition (Arehmouch *et al.*, soumis).

Pour l'évaluation des effets toxiques sur le développement embryo-larvaire des poissons, divers critères sublétaux ont été élaborés notamment la mobilité, la croissance et le taux d'éclosion. Parmi ces critères, la croissance est souvent citée pour sa sensibilité élevée (Kristensen, 1990; Ghillebaert, 1996).

Dans ce qui suit, nous étudions les effets du Mexel® 432 sur la croissance embryo-larvaire de la carpe.

Matériel et méthodes

La production des gamètes et la fécondation artificielle sont réalisées suivant Jaoul et Roubaud (1982): maintien des géniteurs mâles et femelles en eau froide de l'automne jusqu'au moment du test, puis séjour de 2 semaines à 20°C sous une photopériode de 13 heures d'éclairage journalier - injection d'extrait hypophysaire de carpe 36 et 12 heures avant le moment choisi pour la ponte - récolte des gamètes par massage abdominal hors d'eau. L'insémination artificielle a lieu en chambre thermorégulée à 24°C: dispersion d'environ 50 ovocytes avec 10 µl de sperme dans 20 ml d'eau synthétique (ISO 7346/3, 1984) dans des incubateurs en polystyrène (OSI-Labo) - lavage du sperme en excès au bout de 20 min. L'incubation est réalisée suivant Ghillebaert *et al.*, (1995) dans 100 ml d'eau synthétique renouvelée tous les jours, sur une table oscillante (10 oscillations / min) à une température

moyenne de $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Les essais sont effectués sur 3 pontes différentes sans apport de nourriture, à raison de 3 répliques par concentration testée.

A la fin de l'exposition, le taux de survie est mesuré dans chaque incubateur: le critère de discrimination des larves mortes est la coagulation du vitellus ou des protéines du système nerveux central. Les larves survivantes sont prélevées et fixées au formol à 10 %, en totalité ou à raison d'un maximum de 30 larves par réplique. Au moment de la mesure, les larves sont déposées sur le fond d'une boîte de Petri et l'eau qui les mouille est éliminée par aspiration à l'aide d'une pipette Pasteur. La longueur de chaque larve est alors mesurée en unité arbitraire à l'aide d'un micromètre oculaire: il s'agit de la distance linéaire entre l'extrémité de la tête et la base de la nageoire caudale. Les larves endommagées dans les manipulations ne sont pas mesurées.

Pour chaque essai, les résultats sont traités par analyse de variance au risque $\alpha = 5\%$. En cas de rejet de l'hypothèse nulle (pas d'effets), les mesures sont étudiées par le test statistique de comparaison des moyennes de Tukey (SYSTAT pour Windows, 1992).

Résultats

Après 7 ou 8 jours d'exposition, les plus faibles concentrations nominales testées ayant un effet léthal observé sont respectivement pour les 3 essais 1; 3,12 et 1,56 mg/L (Tableau 1). A cette concentration létale, la longueur des larves n'a pu être mesurée que dans l'essai 1. Les 100 % de mortalité étant atteints dans les deux autres essais. La croissance est significativement réduite par rapport aux témoins.

Les plus fortes concentrations sans effet léthal observé sont 0,5; 1,04 et 0,78 mg/L. A ces concentrations non létales, une réduction de la croissance est observée dans les essais 1 et 2.

Discussion

La toxicité relativement élevée du Mexel[®] 432 en eau pure vis-à-vis du développement des embryons et larves de carpe est confirmée par la mise en évidence de ses effets sur la croissance: en effet, dans nos essais, ceux-ci peuvent apparaître à des concentrations 2 à 3 fois inférieures au seuil d'apparition des effets létaux.

La notion de sublétalité ne peut être définie de la même façon pour un individu et une population. En effet, des mortalités peuvent se manifester qui n'affectent qu'une partie de la population seulement. Un effet sublétal pour les individus survivants pourra alors être

considéré comme 'paralétal' au niveau de la population, et il ne sera véritablement sublétal à ce niveau que s'il se manifeste à une concentration inférieure ou égale à la plus forte concentration sans effet observé. Comme le montrent les résultats de 2 parmi nos essais, au laboratoire les effets du Mexel® 432 sur la croissance des populations embryon-larvaires de la carpe peuvent être considérés comme véritablement sublétaux.

Cependant, les significations physiologique et écologique d'une diminution de la croissance ne sont pas évidentes. Par exemple, celle-ci pourrait être expliquée par une augmentation de l'activité des embryons dans le milieu d'exposition, alors qu'inversement, une réduction de la mobilité pourrait favoriser la croissance.

Selon des observations préliminaires, le Mexel® 432 a un effet excitateur immédiat sur les larves dès leur mise en contact avec le produit. Cette augmentation de la mobilité pourrait résulter d'un comportement d'évasion ou d'évitement semblable à celui observé chez les poissons vis-à-vis des surfactants (Lewis, 1991), une famille de produits à laquelle le Mexel® 432 peut être rattaché. En l'absence d'apports nutritifs exogènes, ce qui est le cas dans nos essais, les larves consacraient plus d'énergie à la mobilité au dépens de la croissance. Cette hypothèse permettrait d'expliquer aussi la chute des CL₅₀ observée avec le Mexel® 432 en phase d'inanition (phase des mortalités dues à l'épuisement des réserves vitellines), les animaux les plus actifs étant aussi ceux qui meurent le plus vite (Arehmouch *et al.*, soumis).

Toutefois, d'un point de vue écologique, une augmentation de la mobilité, même si elle se traduit par une réduction de la croissance, pourrait être favorable, en permettant par exemple aux larves de mieux fuir les zones polluées ou échapper aux prédateurs. Mais, elle pourrait aussi avoir des effets négatifs, par exemple une augmentation de la pénétration des xénobiotiques. Plus directement, une croissance rapide est généralement considérée comme un facteur de survie dans le milieu (Keast et Eadie, 1985; Pepin, 1993), mais les petites larves pourraient au contraire avoir un avantage sur les grandes vis-à-vis de la prédation (Litvak et Leggett, 1992), d'autant plus qu'un retard de croissance peut être compensé au stade juvénile (Bertram *et al.*, 1993).

La mise en évidence d'effets sublétaux sur la croissance pourrait indiquer que les embryons survivants dans nos essais au moment de la mesure sont en réalité destinés à mourir plus tard (effets prélétaux). Pourtant, d'une part nos résultats expérimentaux ont montré que les effets létaux du Mexel® 432 s'arrêtent quand l'exposition cesse (Arehmouch *et al.*, soumis), et d'autre

part, il est connu que certains effets liés aux surfactants peuvent être réversibles (Maciorowski *et al.*, 1977 in Lewis, 1991). Il est donc possible que le retard de croissance observé puisse être compensé aux stades ultérieurs si l'exposition cesse et si la nourriture est disponible.

Références

- Arehmouch, L., Ghillebaert, F., Chaillou, C. and Roubaud, P. Lethal effects of Mexel®, an antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development. soumis.
- Bertram, D.F., Chambers, R.C. and Leggett, W.C. 1993. Negative correlations between larval and juvenile growth rates in winter flounder: Implications of compensatory growth for variation in size-at-age. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **96**: 209-215.
- Ghillebaert, F. 1996. Le développement précoce des Poissons en écotoxicologie. Exemple: la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): -Importance des facteurs environnementaux et de leurs interactions, - Diversification des critères de toxicité. Thèse de doctorat. Université de Metz, Metz, France. 107 pages.
- Ghillebaert, F. and Brooke, L. 1997. Mexel® 432 toxicity to cladoceran and *Fathead minnow* during continuous or daily intermittent exposures. MEXEL SA, France. 12 pages.
- Ghillebaert, F., Chaillou, C., Deschamps, F., and Roubaud, P. 1995. Toxic effects, at three pH levels, of two reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**: 19-28.
- INERIS (institut national de l'environnement industriel et des risques), 1997. Toxicité aiguë du Mexel 432 vis-à-vis de la daphnie (*Daphnia magna*). 11 pages.
- ISO 7346/3. 1984. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1^e éd. Ref. n°: ISO 7346/3.
- Jaoul, A., et Roubaud, P. 1982. Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**: 3409-3419.
- Keast, A. and Eadie, J.M. 1985. Growth depensation in year-0 largemouth bass (*Micropterus salmoides*): The influence of diet. *Trans. Am. Fish. Soc.* **114**: 204-213.

- Kristensen, P. 1990. Evaluation of the sensitivity of Short Term Fish Early Life Stage Tests in relation to other FELS test methods. Final Report, Commission of the European Communities, Directorate - General Environment, Nuclear Safety and Civil Protection, 44p.
- Lewis, M.A. 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Res.* **25**: 101-113.
- Litvak, M.K. and Leggett, W.C. 1992. Age and size-selective predation on larval fishes: The bigger-is-better hypothesis revisited. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **81**: 13-24.
- Pepin, P. 1993. Effect of temperature and size on development, mortality, and survival rates of the pelagic early life history stages of marine fish. *J. Fish. Aquat. Sci.* **48**: 503-518.
- SYSTAT for Windows. 1992. Version 5.0. Ed. Evanston, IL: Systat, Inc.

N° de l'essai	[C] (mg/L)	N	% survie (σ)*	Longueur (Ua)
1	0	475	92 (3) ^a	7,52 (0,14) ^a
	0,25	213	92 (2) ^a	7,55 (0,18) ^a
	0,5	219	94 (3) ^a	7,42 (0,23)^b
	1	78	29 (5)^b	7,01 (0,19)^c
2	0	743	55 (17) ^a	7,38 (0,46) ^a
	0,18	261	66 (7) ^a	7,48 (0,41) ^a
	0,39	396	48 (38) ^a	7,19 (0,40) ^a
	0,78	292	62 (13) ^a	7,48 (0,41) ^a
	1,04	309	54 (6) ^a	6,24 (1,07)^b
	3,12	307	0 (0)^b	
3	0	463	50 (7) ^a	9,14 (0,34) ^a
	0,19	129	40 (2) ^a	9,05 (0,38) ^a
	0,39	136	40 (9) ^a	8,80 (0,38) ^a
	0,78	134	51 (8) ^a	9,18 (0,43) ^a
	1,56	180	2 (2)^b	

Tableau 1. Effets du Mexel[®] 432 sur la croissance embryo-larvaire de la carpe

[C]: concentration nominale en Mexel[®] 432. N: effectif total testé sur les 3 répliques.
 σ : écart-type. *: Indice de comparaison multiple du test de Tuckey (deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur exposant comporte une lettre commune).
 Ua: unités arbitraires. **caractères gras**: effet significatif par rapport aux larves incubées dans une eau de laboratoire.

2° Partie. Etude expérimentale

2. Toxicité du Mexel® 432 dans une eau synthétique

2.4. Effets létaux des produits constituants du Mexel® 432 vis-à-vis du développement embryon-larvaire de la carpe commune

2.4. Effets létaux des produits constitutants du Mexel[®] 432, vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe commune

Latifa Arehmouch et Pierre Roubaud

Complément au rapport d'exécution du contrat de recherche n°E31/L25-2L6366-AEE1794
(EDF, Dir. des Etudes et Recherches) / (Université Paris 7, Groupe d'Embryotoxicologie
des Poissons : GEP)

Introduction

Le Mexel[®] 432 est un mélange complexe utilisé industriellement à grande échelle comme agent anti-salissures et anticorrosion dans les installations hydrauliques. Sa toxicité potentielle pour l'environnement a été évaluée, notamment par des essais de laboratoire sur des organismes non-cibles comme les poissons et les daphnies (Ghillebaert and Brooke, 1997). En eau pure, sa toxicité vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe s'est révélée importante (Arehmouch *et al.*, soumis).

Selon le fabricant, le Mexel[®] 432 est un mélange contenant 80 % d'eau et 20 % de résidu sec constitué de diamines grasses (produit A, 13,4 % en masse du Mexel[®] 432), d'amines tertiaires (produit B, 3,2 %) et d'un aminoalcool (produit C, 3,4 %).

Dans ce qui suit, nous comparons les effets létaux du Mexel[®] 432 à ceux de ses constituants utilisés séparément vis-à-vis du développement embryo-larvaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.).

Matériel et méthodes

La production des gamètes et la fécondation artificielle sont réalisées suivant Jaoul et Roubaud (1982): maintien des géniteurs mâles et femelles en eau froide de l'automne jusqu'au moment du test, puis séjour de 2 semaines à 20°C sous une photopériode de 13 heures d'éclairage journalier - injection d'extrait hypophysaire de carpe 36 et 12 heures avant le moment choisi pour la ponte - récolte des gamètes par massage abdominal hors d'eau -

insémination artificielle en chambre thermorégulée à 24°C par dispersion d'environ 50 ovocytes avec 10 µl de sperme dans 20 ml de solution testée dans des incubateurs en polystyrène (OSI-Labo) - lavage du sperme en excès au bout de 20 min. L'incubation est réalisée suivant Ghillebaert *et al.*, (1995) dans 60 ml de solution testée renouvelée tous les jours, sur une table oscillante (10 oscillations / min) à une température moyenne de $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Le pH, la concentration en oxygène, la température et le taux de survie sont mesurés dans chaque incubateur avant le renouvellement journalier du milieu. Le critère de discrimination des larves mortes est la coagulation du vitellus ou des protéines du système nerveux central. Les essais sont effectués sur 2 pontes différentes sans apport de nourriture, à raison de 3 répliques par concentration testée.

Dans la première série d'essai, l'exposition débute au moment de la fécondation et se prolonge jusqu'au début des mortalités par épuisement des réserves trophiques vitellines (fin du 11^e jour d'exposition). La deuxième série porte sur des larves âgées de 1 ou 2 jours après éclosion (4 ou 5 jours comptés à partir de la fécondation): un effectif de 30 larves est distribué dans chacun des incubateurs avant l'exposition qui dure 72 h pour le produit A et 24 h pour le produit B.

Les solutions toxiques sont préparées à partir de solutions mères obtenues par dilution ou dispersion de 100 mg du produit à tester dans 1 litre d'eau synthétique (ISO 7346/3. 1984). Pour les produits A et B, cette dispersion est favorisée par dilution préalable des 100 mg de produit dans 0,1 ml d'éthanol. Dans les solutions d'essai, la plus forte concentration en éthanol testée est alors de 32 µl/L, une concentration plus de 70 fois inférieure au seuil de létalité de l'éthanol pour l'embryon de carpe (2,5 ml/L, Lefebvre, 1990).

Les gammes de concentrations (Tableau 1) testées pour chaque produit ont été choisies à partir d'essais préliminaires.

Méthodes statistiques

Les effets létaux sont étudiés à l'aide du logiciel SYSTAT 5.0 (SYSTAT for Windows, 1992) par analyse de variance (McClave, *et al.*, 1981) après transformation des pourcentages de survie par la fonction arcsinus. Les concentrations sans effet observé (CSEO) sont calculées au seuil $\alpha = 5\%$ à l'aide du test de comparaison multiple de Tukey. Les concentrations létales pour 50 % de la population (CL₅₀) sont calculées avec le programme rimmed Spearman-Kärber (TSK) Version 1.5.

Résultats

En exposition continue à partir de la fécondation (Tableau 1), dans le Mexel® 432 comme dans ses constituants A et B séparés, les mortalités significatives n'apparaissent à la plus forte concentration testée qu'à la fin du 3^e jour d'exposition, c'est-à-dire après l'éclosion. Les CL₅₀ décroissent ensuite jusqu'au 5^e jour, puis se stabilisent jusqu'au 11^e jour d'exposition. Lorsque des effets létaux sont observés dans un incubateur, ceux-ci sont concentrés dans le temps. Dans 2 essais, les mortalités ne sont observées que dans une seule des 3 répliques relatives à la même concentration (produit A: 0,04 mg/L et Mexel® 432: 0,5 mg/L).

Le produit A apparaît beaucoup plus toxique que le produit B: par exemple, à la fin du 11^e jour d'exposition, leurs CL₅₀ sont respectivement 50 et 660 µg/L.

Sur des larves âgées de 4 jours, des concentrations supérieures ou égales à 200 µg/L en produit A provoquent 100 % de mortalité en moins de 24 heures, mais la concentration 100 µg/L est sans effet léthal observé après 72 heures.

Sur des larves âgées de 4 ou de 5 jours, une concentration de 2 mg/L en produit B provoque 100 % de mortalité en moins de 12 heures, mais aucun effet léthal n'apparaît à la concentration 1 mg/L.

Avec le produit C, les concentrations de 32 et 100 mg/L sont sans effet léthal.

Discussion

Dans un modèle de toxicité additive, les produits B et C ne représenteraient qu'une part négligeable de la toxicité du Mexel® 432. En effet, non seulement ces produits sont peu toxiques par eux même, mais ils représentent une part très faible (3,2 et 3,4 % respectivement) de la composition du Mexel® 432.

Cependant, au 3^e jour d'exposition, la toxicité du Mexel® 432 ne semble pas seulement due à celle de son composé le plus toxique, le constituant A. En effet, la CL₅₀ (72 h) du Mexel® est de 780 µg/L ce qui correspond à un contenu en produit A d'environ 100 µg/L, soit une concentration nettement inférieure à la CL₅₀ correspondante de ce produit (220 µg/L). Cependant du 7^e au 11^e jour d'exposition, le Mexel® 432 apparaît au contraire légèrement moins toxique que ne l'indiquerait sa teneur en produit A. En effet, cette teneur représente environ 1,5 fois la CL₅₀ du produit A.

Les constituants A et B du Mexel[®] 432 se montrent nettement plus toxiques pour les larves que pour les oeufs. Par exemple, après 24 h d'exposition, les plus fortes concentrations testées (CSEO) sont respectivement 320 et 2000 µg/L pour les oeufs, contre seulement 100 et 1000 µg/L pour des larves exposées directement. Cette différence de tolérance entre les oeufs et les larves a déjà été mise en évidence vis-à-vis du Mexel[®] 432 total (Arehmouch *et al.*, soumis) et pourrait s'expliquer par l'obstacle constitué par le chorion à la pénétration du produit.

Avec les constituants A et B, les CL₅₀ décroissent rapidement après éclosion, mais se stabilisent ensuite jusqu'à la fin de l'exposition: les individus ayant résisté aux premiers jours de l'exposition sont tolérants à sa prolongation. Ce type de réponse en tout ou rien déjà décrit pour l'action du Mexel[®] 432 au stade larvaire pourrait expliquer les écart-types importants mesurés aux concentrations proches du seuil de tolérance pour le produit A et le Mexel[®] 432 (40 et 500 µg/L, Tableau 1), la quasi-totalité des larves étant mortes dans l'une des 3 répliques seulement. Une faible différence de concentration entre les répliques en raison d'une hétérogénéité des solutions testées serait à l'origine de ces mortalités.

La stabilisation des CL₅₀ après le 5^e jour d'exposition ne pouvant pas être attribuée à une augmentation de la tolérance larvaire confirme l'absence d'effets létaux différés du Mexel[®] 432 (Arehmouch *et al.*, soumis) et de ses constituants après exposition et probablement l'absence d'effets cumulatifs.

Pour l'essentiel nos résultats montrent que la toxicité du Mexel[®] 432 vis-à-vis des stades embryo-larvaires de la carpe peut être attribuée à son contenu en amines grasses (produit A). Si ce résultat est vérifié pour d'autres organismes non-cibles et surtout pour les biosalissures qui constituent la cible du Mexel[®] 432, l'utilité de ses autres constituants B et C dans la fonction d'agent anti-salissures pourrait être discutée.

Références

- Arehmouch, L., Ghillebaert, F., Chaillou, C. and Roubaud, P. Lethal effects of Mexel[®], an antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development. soumis.
- Ghillebaert, F. and Brooke, L. 1997. Mexel[®] 432 toxicity to cladoceran and *Fathead minnow* during continuous or daily intermittent exposures. MEXEL SA, France. 12 pages.

- Ghillebaert, F., Chaillou, C., Deschamps, F., and Roubaud, P. 1995. Toxic effects, at three pH levels, of two reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**: 19-28.
- ISO 7346/3. 1984. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1^e éd. Ref. n°: ISO 7346/3.
- Jaoul, A., et Roubaud, P. 1982. Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**: 3409-3419.
- Lefebvre, B. 1990. Bases méthodologiques et conceptuelles de l'embryotoxicologie des poissons. Thèse de doctorat. Université Paris 7, 135 pages.
- McClave, J.T., Sullivan, J.H. and Pearson, J.G. 1981. Statistical analysis of fish chronic toxicity test data (D.R. Branson and K.L. Dickson, Eds.). ASTM STP 737, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*: Fourth Conference: pp. 359-376.
- SYSTAT for Windows. 1992. Version 5.0. Ed. Evanston, IL: Systat, Inc.
- Trimmed Spearman-Kärber (TSK) Program version 1.5. Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory. U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OHIO 45268.

Produit	[C] (µg/L)	N	% survie \bar{X} (σ)* au jour Jx						
			J1	J2	J3	J5	J7	J9	J11
A	0	130	93 (7) ^a	93 (7) ^a	81 (20) ^a	81 (20) ^a	80 (20) ^a	78 (23) ^a	74 (24) ^a
	10	131	95 (4) ^a	95 (4) ^a	86 (7) ^a	85 (6) ^a	85 (6) ^a	84 (4) ^a	84 (4) ^a
	20	139	89 (4) ^a	89 (5) ^a	87 (6) ^a	87 (6) ^a	87 (6) ^a	87 (6) ^a	87 (6) ^a
	40	160	94 (3) ^a	94 (3) ^a	88,5 (1) ^a	64 (44) ^a	61 (44) ^a	61 (44) ^a	56 (40) ^a
	80	144	97 (5) ^a	95 (5) ^a	88 (3) ^a	0 (0)^b			
	160	133	97 (5) ^a	96 (6) ^a	84 (5) ^a	0 (0)^b			
	320	132	93 (9) ^a	93 (9) ^a	0 (0)^b				
	CL₅₀ (Ic) (µg/L)		> 320	> 320	220	50	50	50	50
					220-230	50-50	50-50	50-50	50-50
B	0	157	96 (6) ^a	96 (6) ^a	96 (7) ^a	95 (8) ^a	94 (9) ^a	94 (9) ^a	94 (9) ^a
	62,5	129	100 (0) ^a	97 (4) ^a	96 (5) ^a	96 (5) ^a	96 (5) ^a	96 (5) ^a	96 (5) ^a
	125	128	100 (0) ^a	98 (5) ^a	95 (4) ^a	94 (5) ^a	92 (2) ^a	92 (2) ^a	92 (2) ^a
	250	158	100 (0) ^a	96 (5) ^a	92 (1) ^a	89 (3) ^a	89 (4) ^a	88 (4) ^a	88 (4) ^a
	500	174	100 (0) ^a	100 (0) ^a	95 (4) ^a	95 (4) ^a	95 (4) ^a	93 (1) ^a	93 (1) ^a
	1000	147	96 (6) ^a	95 (5) ^a	80 (16) ^a	0 (0)^b			
	2000	157	97 (5,5) ^a	97 (5,5) ^a	0 (0)^b				
	CL₅₀ (Ic) (µg/L)		> 2000	> 2000	1250	690	680	660	660
				1180-1310	670-700	660-700	640-680	640-680	
Mexel®	0	121	93 (6) ^a	93 (6) ^a	87 (6) ^a	87 (6) ^a	87 (6) ^a	87 (6) ^a	82 (5) ^a
	125	165	89 (7) ^a	89 (7) ^a	88 (6) ^a	84 (3) ^{ab}	83 (3) ^{ab}	82 (2) ^{ab}	77 (6) ^{ab}
	250	177	86 (4) ^a	86 (4) ^a	86 (4) ^a	86 (4) ^a	86 (4) ^a	85 (5) ^{ab}	84 (4) ^a
	500	161	83 (1) ^a	83 (1) ^a	81 (1) ^a	62 (17)^b	60 (21)^b	58 (24)^b	54 (23)^b
	1000	157	89 (12) ^a	89 (13) ^a	21 (12)^b	0 (0)^c			
	2000	185	92 (7) ^a	73 (25) ^a	0 (0)^b				
	CL₅₀ (Ic) (µg/L)		> 2000	> 2000	780	570	560	550	550
				740-830	540-610	530-590	520-580	520-580	

Tableau 1. Effets létaux du Mexel® 432 et de ses principaux constituants (A et B) en solution dans une eau synthétique à partir de la fécondation.

A: diamine grasse primaire et secondaire. **B:** amine tertiaire. N: effectif total sur 3 répliques. $\bar{X}(\sigma)$: pourcentage de survie moyen sur 3 répliques avec écart-type. **CL₅₀ (Ic)**: concentration létale pour 50 % des individus avec intervalle de confiance (Ic). *: indice de comparaison multiple du test de Tukey: pour un même produit donné, deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil 5 % si leur exposant comporte une lettre commune. **Caractère en gras:** effet significatif par rapport aux larves incubées dans l'eau synthétique.

2^e Partie. Etude expérimentale

2. Toxicité du Mexel[®] 432 dans une eau synthétique

2.5. Effets létaux vis-à-vis des larves de la carpe commune de 4 pesticides.

Influence du Mexel[®] 432, un agent anti-salissure industriel

2.5. Effets létaux vis-à-vis des larves de la carpe commune de 4 pesticides. Influence du Mexel® 432, un agent anti-salissure industriel

Latifa Arehmouch, Valérie Tfibel, Catherine Chaillou et Pierre Roubaud

Complément au rapport d'exécution du contrat de recherche n°E31/L25-2L6366-AEE1794 (EDF, Dir. des Etudes et Recherches) / (Université Paris 7, Groupe d'Embryotoxicologie des Poissons : GEP)

Résumé

Les effets létaux de 4 pesticides de degré d'hydrophobie variés (deltaméthrine, captafol, DNOC et amétryne) ont été recherchés chez des larves de carpe, en présence ou en absence d'une concentration sublétale en Mexel® 432, lors d'expositions en conditions statiques.

Les effets létaux de ces produits augmentent avec leur degré d'hydrophobie: à 24°C, sur des larves âgées, la concentration létale pour 50 % des individus après 48 heures d'exposition (CL₅₀, 48 h) est 1,35 µg/L pour la deltaméthrine, 0,17 mg/L pour le captafol, 0,58 mg/L pour le DNOC et supérieure à 16 mg/L pour l'amétryne.

Avec la deltaméthrine, une réduction de la toxicité à basse température est mise en évidence: chez des larves moyennement développées, la CL₅₀ (24 h) est supérieure à 16 µg/L à 14°C contre 5,6 µg/L à 24°C. Chez des larves jeunes à 11°C, la CL₅₀ (96 h) est supérieure à 8 µg/L, contre 0,23 µg/L chez des larves âgées à 24°C.

A 24°C, pour les 4 pesticides étudiés, l'addition de 0,5 mg/L de Mexel® 432 a peu ou pas d'effet sur leur toxicité aiguë. A 11°C avec la deltaméthrine, la CL₅₀ (96 h) est supérieure à 8 µg/L dans l'eau synthétique contre 2,81 µg/L en présence du Mexel® 432.

Ces résultats sont comparés aux données de la littérature sur la toxicité des produits testés vis-à-vis des poissons et discutés notamment quant à leurs implications pour la méthodologie des essais toxicologiques sur le développement précoce des poissons.

Mots clés: toxicité, pesticide, deltaméthrine, captafol, DNOC, amétryne, agent anti-salissures, Mexel® 432, poissons, température.

Introduction

Le développement embryon-larvaire de la carpe commune a été utilisé comme modèle de laboratoire pour l'évaluation prédictive des risques toxicologiques dans le milieu aquatique (Lefebvre, 1990). Plusieurs pesticides, notamment la deltaméthrine, le captafol et le dinitro-ortho-crésol (DNOC) (Lefebvre, 1990; Ghillebaert, 1995 et 1996 a, b) ont été testés sur ce modèle et la carpe a été classée parmi les espèces recommandées pour la réalisation des tests normalisés sur le développement embryon-larvaire des poissons (OCDE, 1997).

Cependant, les études de laboratoire examinant les effets des polluants sont souvent limitées à des tests sur molécules isolées, alors que les expositions dans le milieu aquatique proviennent le plus souvent de mélanges complexes (Schlesinger *et al.*, 1992). Des interactions significatives entre toxiques ne se manifestent pas obligatoirement. Lorsqu'elles existent, elles peuvent relever de la simple addition, de la synergie ou de l'antagonisme (Gupta, 1987; Stacey, 1987; Yang *et al.*, 1992). Leurs effets sur les poissons, comme sur les autres organismes aquatiques peuvent être bénéfiques ou négatifs (Subbiah *et al.*, 1987; Wicklund *et al.*, 1988; Babich *et al.*, 1989; Kershaw *et al.*, 1990; Gallagher and Di-Giulio, 1991).

En raison de leurs propriétés amphiphiles, les surfactants sont susceptibles d'influencer fortement les propriétés toxicocinétiques des xénobiotiques (De-Ruiter *et al.*, 1995; Sterzel, 1997).

Précédemment, nous avons étudié les effets sur le développement embryon-larvaire de la carpe, du Mexel® 432, un agent anti-salissure et anticorrosion utilisé dans les circuits hydrauliques industriels (Arehmouch *et al.*, sous presse et soumis). Le Mexel® 432 est un mélange complexe à base d'amines grasses présentant des propriétés tensioactives.

Dans ce qui suit, nous étudions les effets létaux à court terme chez la larve de carpe commune, de quatre pesticides choisis comme modèles et présentant des degrés d'hydrophobie variés: la deltaméthrine, hautement hydrophobe, le captafol, moyennement hydrophobe, le DNOC, moyennement hydrophile et l'amétryne, fortement hydrophile. L'influence du Mexel® 432 à une concentration sublétale, sur l'activité létale de ces produits est recherchée.

Matériels et méthodes

Matériel biologique

Six essais (Tableaux 2 à 5) ont été réalisés sur des larves de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) issues de 3 pontes différentes et produites au laboratoire par des géniteurs originaires de la pisciculture « Les Alevins de Sologne » (Vignoux sur Barengon, 18500, France). La production des gamètes, la fécondation, l'incubation, la préparation des solutions, l'exposition des larves et la mesure des taux de mortalité ont été réalisées suivant Arehmouch *et al.* sous presse.

Avant exposition, l'incubation des oeufs est effectuée à $24 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 3 jours, c'est-à-dire de la fécondation à la fin de l'éclosion. Les larves sont ensuite transférées à $11 \pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'au début de l'exposition dans les essais 1 et 2 et $14 \pm 1^\circ\text{C}$ pour les autres essais. Ce régime thermique a été choisi de façon à réduire la vitesse de développement pour disposer plus longtemps d'une réserve de larves pour les expériences. Les températures de 11°C et 14°C sont compatibles avec un développement normal des larves de carpe (Reznichenko, 1976) et ne modifient pas leur sensibilité au Mexel[®] 432 (Arehmouch *et al.*, résultats non publiés; Arehmouch *et al.*, sous presse). Elles déterminent des vitesses de développement larvaire respectivement proches du quart ou du tiers de la valeur de cette vitesse à 24°C . Dans nos essais, les âges physiologiques en cours d'exposition rapportés aux âges correspondants à 24°C sont alors approximativement 4-5 jours pour l'essai 1, 5,5-9,5 jours pour l'essai 2; 6-6,3 jours pour l'essai 3 à 14°C et 6-7 jours à 24°C ; 7,3-9,3 jours pour l'essai 4; 6,7-10,7 jours pour l'essai 5 et 6,7-9,7 jours pour l'essai 6.

Exposition. Solutions d'essais

Les effets létaux des 4 pesticides sont mesurés à 24°C en l'absence ou en la présence de $0,5 \text{ mg/L}$ de Mexel[®] 432, une concentration sublétale (Arehmouch *et al.*, soumis). Avec la deltaméthrine, des expositions à 11°C et 14°C sont testées. L'origine et les caractéristiques des pesticides utilisés sont données dans le tableau 1. Le Mexel[®] 432 provient de la société MEXEL (59481 Haubourdin, France; lot 03/11/95).

L'exposition a lieu en condition statique, sans apport de nourriture, dans 100 ml de solution en incubateurs de polyéthylène pour la deltaméthrine et dans 60 ml en incubateurs en polystyrène cristal pour les autres pesticides.

Le milieu de dilution des toxiques est une eau synthétique (ISO 7346/3, 1984) contenant (en mg/L d'une eau déionisée de résistivité $> 1M\Omega$): $CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 294,0; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 123,3; $NaHCO_3$: 63,0 et KCl : 5,5. Le pH est de 7,8.

Les solutions d'essais aux différentes concentrations en pesticides (Tableaux 2 à 5) sont préparées à partir d'une solution mère à 320 mg/L pour la deltaméthrine (solution éthanolique), 20 mg/L pour le captafol (avec prédispersion dans de l'éthanol), 20 mg/L pour l'amétryne et 40 mg/L pour le DNOC. Dans les essais sur la deltaméthrine et le captafol, les solutions sont préparées de manière à contenir 0,1 ml/L d'éthanol, une concentration très largement inférieure au seuil de toxicité de l'éthanol pour la larve de carpe (Lefebvre, 1990). Le Mexel® 432 est introduit à partir d'une solution mère de 100 mg/L d'eau synthétique.

Les concentrations sont exprimées en concentrations nominales. Pour chacune d'entre elles, 3 répliques sont préparées.

Produit	Deltaméthrine	Captafol	DNOC	Amétryne
Nom chimique	(S)-a-cyano-3-phenoxy benzyle-(1R)-cis-3-(2,2-dibromo-vinyl)-2,2-diméthyl cyclopropane carboxylate	cis-N-((1,1,2,2,-Tetrachloroethyl)-thio)4-cyclohexene-1,2,dicarboximide	4,6-Dinitro-o-crésol	N2-ethyl-N4-iso propyl-6-méthyl thio-1,3,5,-triazine -2,4-diamine
N° CAS	52918-63-5	2939-80-2	534-52-1	8073-61-8
Masse moléculaire	505,2	349,1	198,1	227,3
Solubilité dans l'eau (20°C)	environ 2 µg/L	1,4 mg/L	>130 mg/L	185 g/L
Utilisation	insecticide	fongicide	pesticide polyvalent	herbicide
Qualité	99,6% de pureté	technique	technique	99,3 % certifié
Origine	Roussel-Uclaf, France	INRA-CNRA, Versailles, France	Eastman-Kodak	Promochem, lot 31124

Tableau 1. Caractéristiques des pesticides (Roussel Uclaf, 1994; Ghillebaert *et al.*, 1995)

Méthodes statistiques

Les effets létaux des solutions de Mexel[®] 432 sont étudiés à l'aide du logiciel SYSTAT 5.0 (SYSTAT for Windows, 1992) par analyse de variance (McClave *et al.*, 1981) après transformation des pourcentages de survie par la fonction arcsinus. Les concentrations sans effet observé (CSEO) sont calculées au seuil $\alpha = 5\%$ à l'aide du test de comparaison multiple de Tukey. Les concentrations létales pour 50 % de la population (CL₅₀) sont calculées à l'aide du Programme Rimmed Spearman-Kärber (TSK) Version 1.5.

Résultats

Toxicité de la deltaméthrine

Chez des larves âgées de 7 jours de la ponte 1 (essai 1, Tableau 2), les taux de survie à 11°C chez les 3 types de témoins testés se maintiennent proches de 100 % jusqu'à la fin du 4^e jour d'exposition (témoins dans l'eau synthétique avec ou sans 0,1 ml/L d'éthanol et témoins dans la solution à 0,5 mg/L de Mexel[®] 432 plus 0,1 ml/L d'éthanol). Jusqu'à la concentration 8 µg/L, la deltaméthrine est sans effet pendant 4 jours. Cependant, en présence de 0,5 mg/L de Mexel[®] 432, aux concentrations 8 et 4 µg/L de deltaméthrine, la totalité des larves meurent entre la fin du 2^e et la fin du 4^e jour d'exposition.

A 24°C, chez des larves âgées de 13 jours (ponte 1, essai 2), les taux de survie chez les 3 types de témoins commencent à baisser à partir du 3^e jour d'exposition, les écart-types entre répliques étant importants. La toxicité de la deltaméthrine est fortement augmentée par rapport à l'essai 1, aussi bien en la présence qu'en l'absence du Mexel[®] 432: par exemple, après 4 jours d'exposition, les CL₅₀ sont diminuées d'un facteur supérieur à 12. Le Mexel[®] 432 paraît ne pas influencer de manière significative la toxicité de la deltaméthrine.

Sur des larves âgées de 12 jours de la ponte 2 (essai 3, Tableau 3), la toxicité moins élevée de la deltaméthrine à basse température est confirmée: lorsqu'on passe de 14°C à 24°C, la CL₅₀ (24 h) est diminuée d'un facteur supérieur à 2,8. La présence du Mexel[®] 432 reste sans influence dans cet essai.

Toxicité du captafol

Sur des larves âgées de 16 jours de la ponte 3 (essai 4, Tableau 4), un effet léthal du captafol est observé à une concentration aussi faible que 62 µg/L après 2 jours d'exposition dans l'eau

synthétique. Les 100 % de mortalité sont obtenus à la concentration 0,5 mg/L. Le Mexel[®] 432 n'influence pas sensiblement la toxicité du produit.

Toxicité du DNOC

Les pourcentages de survie sur des larves âgées de 14 à 18 jours se maintiennent supérieurs à 90 % dans l'eau synthétique, mais chutent à 61 % dans la solution de Mexel[®] 432 (essai 5, Tableau 5). Les CL₅₀ présentent des valeurs similaires dans l'eau synthétique et en présence du Mexel[®] 432: en 4 jours d'exposition, elles décroissent de 0,68 à 0,21 mg/L dans l'eau synthétique et de 0,61 à 0,22 mg/L en présence du Mexel[®] 432.

Toxicité de l'amétryne

Les taux de survie chez des larves de la ponte 2, âgées de 14 à 17 jours, restent supérieurs à 80 % aussi bien dans l'eau synthétique que dans le Mexel[®] 432 (essai 6, Tableau 5). Jusqu'à la concentration 16 mg/L, aucun effet significatif n'est observé pendant 2 jours d'exposition. A cette concentration, à la fin du 4^e jour, un effet létaux significatif est observé dans la solution de Mexel[®] 432 et à la limite de la significativité dans l'eau synthétique. La solution de Mexel[®] 432 paraît sans influence sur la toxicité du produit.

Discussion

Validité des résultats

Les taux de survie chez les témoins incubés dans l'eau synthétique se sont maintenus supérieurs à 85 % quelque soit le régime thermique appliqué, dans tous les essais à l'exception de l'essai 2. Dans ce dernier essai (Tableau 2), les mortalités en fin d'incubation peuvent être attribuées à l'épuisement des réserves vitellines: l'âge physiologique rapporté à un développement à 24°C est alors 9,5 jours et l'on sait que, sans apport de nourriture, les mortalités par inanition apparaissent généralement chez la carpe entre le 8^e et le 10^e jour d'incubation à cette température (Arehmouch *et al.*, soumis).

La possibilité d'utiliser sans dommage apparent des larves conservées au froid pourrait présenter un intérêt pratique dans la réalisation des tests toxicologiques sur des espèces à développement rapide comme le sont de nombreuses espèces de poissons. Dans cette perspective, des essais systématiques sont entrepris pour mesurer les limites de résistance au froid des embryons et larves de carpe au cours de leur développement.

Dans une solution contenant 0,5 mg/L de Mexel® 432, aucun effet léthal n'est observé, sauf dans l'essai 5 où le pourcentage de survie chute à environ 60 % après 4 jours d'exposition. Dans cet essai, les larves en fin d'exposition ont un âge physiologique avancé (équivalent à environ 11 jours à 24°C) et leur proximité de la phase des mortalités par inanition a pu les fragiliser. Dans un essai précédent (Arehmouch *et al.*, soumis), une CL₅₀ (4 jours) de 0,59 mg/L a été mesurée sur des larves âgées dans des conditions similaires.

Nos résultats (essais 1 et 2, Tableau 2) confirment l'absence d'effets létaux de l'éthanol à la concentration 0,1 ml/L (Lefebvre, 1990).

Effets létaux de la deltaméthrine, du captafol, du DNOC et de l'amétryne dans l'eau synthétique

La deltaméthrine est un produit de toxicité élevée vis-à-vis des larves de poisson, notamment les larves de carpe commune. Par exemple, une concentration de 8 µg/L provoque 100 % de mortalité après 24 h d'exposition (Ghillebaert *et al.*, 1996 b, c). Nous retrouvons ce résultat dans nos essais. Cependant, une réduction importante de la toxicité (CL₅₀ multipliée par un facteur supérieur à 2,8) est mise en évidence à 14°C chez des larves développées (âge équivalent à 24°C: 6-7 jours; essai 3, Tableau 3). Cette influence de la température paraît être confirmée par les résultats des essais 1 et 2 où une multiplication des CL₅₀ (96 h) par un facteur 12 est observée lorsque sont comparés les effets à 11°C sur des larves relativement jeunes à des effets à 24°C sur des larves âgées. Cependant, cette diminution de la toxicité pourrait être, au moins en partie, expliquée par une évolution de la sensibilité des larves en fonction de leur âge: on sait, en effet, que la pénétration de la deltaméthrine est plus importante chez la larve âgée (Lefebvre, 1990). Des essais supplémentaires seront nécessaires pour trancher entre ces interprétations.

La mise en évidence d'un important effet de la température sur la toxicité de la deltaméthrine chez la larve de carpe confirmerait, pour les poissons, les nombreuses observations dans d'autres groupes systématiques montrant une dépendance de l'activité des pyréthrinoïdes vis-à-vis de la température. Cependant, chez les insectes, contrairement à nos observations sur la larve de carpe, la sensibilité au toxique est souvent augmentée aux basses températures (Jagers *et al.*, 1995; Materna *et al.*, 1995; Narahashi *et al.*, 1995; Alzogaray et Zerba, 1996; Pree *et al.*, 1996; Guillen *et al.*, 1997; etc.).

Les effets de la température sur la toxicité des pyréthriinoïdes dépendent des propriétés des canaux à sodium de la membrane (Song et Narahashi, 1996) ou des mécanismes de régulation de la fluidité membranaire (Moya-Quiles *et al.*, 1996). Au cours du développement embryonnaire, la relation de la toxicité des pyréthriinoïdes à la température pourrait varier et constituer dès lors un modèle expérimental pour l'étude du développement précoce des structures et fonctions membranaires chez les poissons.

Avec le captafol, en exposition continue à partir de la fécondation, les concentrations minimales testées ayant un effet observé sont 1 mg/L après 7 jours d'exposition à 24°C, soit 4 jours après éclosion (Ghillebaert *et al.*, 1995) ou 0,5 mg/L après 6 jours à 21°C, soit 2 jours après éclosion (Lefebvre, 1990). Les effets létaux apparaissant surtout après éclosion, la sensibilité de la larve étant plus importante que celle de l'embryon encapsulé. Sur des larves exposées directement après éclosion, cette concentration est de 1 mg/L après 24 h d'exposition (Lefebvre, 1990). Dans nos conditions expérimentales, des effets létaux sont observés sur des larves âgées à des concentrations beaucoup plus faibles: 62 µg/L après 48 h d'exposition, la CL₅₀ étant alors 0,17 mg/L. Cette sensibilité des larves dans notre essai pourrait, sauf erreur expérimentale, s'expliquer éventuellement par les conditions statiques de l'exposition, une sensibilité particulière de la ponte testée, ou un début de fragilisation des larves par épuisement de leurs réserves trophiques, leur âge au moment du test étant équivalent en fin d'exposition à au moins 9 jours à 24°C. Les larves pourraient aussi avoir été fragilisées par les chocs thermiques liés à leur conservation à basse température avant exposition. Des essais supplémentaires seront donc nécessaires pour valider ces interprétations.

Selon Lefebvre (1990), en conditions semi-statiques avec brassage du milieu par bulles d'air à 17 ou 21°C, l'essentiel des effets du DNOC apparaissent avant la fin du 1^{er} jour d'une exposition continue depuis la fécondation. La plus faible concentration ayant un effet observé (CEO) est alors de 1 mg/L. Les animaux survivants à ce moment se montrent alors insensibles à la prolongation de l'exposition pendant au moins 6 jours. Dans des conditions similaires, mais sans brassage par bulles d'air et à 24°C, Ghillebaert *et al.* (1995) observent une stabilité de la CEO après éclosion à la valeur de 1 mg/L pendant 10 jours. Dans nos essais réalisés en conditions statiques à 24°C, les larves exposées directement au DNOC à un âge équivalent à 7-11 jours à 24°C paraissent nettement plus sensibles puisque la CEO, loin d'être stable, décroît de 1 mg/L après 24 h d'exposition jusqu'à 0,25 mg/L après 4 jours. Pour interpréter cette différence, les mêmes hypothèses que celles formulées pour les essais sur le captafol

peuvent être invoquées. D'un point de vue méthodologique, ces interprétations montrent la nécessité, à la fois d'une standardisation poussée des conditions des essais et de leur application sur un nombre suffisant de pontes, si l'on veut comparer et évaluer valablement les toxicités des produits.

A notre connaissance, la toxicité de l'amétryne vis-à-vis des larves de poisson n'a pas été étudiée jusqu'ici. Chez l'adulte de truite arc-en-ciel, une CL_{50} (96 h) de 3,2 mg/L a été citée (Agence de l'Eau Seine-Normandie, 1996). Dans nos essais, chez la larve de carpe âgée, la CL_{50} (72 h) est de l'ordre de 10 mg/L. Ainsi, l'amétryne, comme la plupart des triazines (Agence de l'eau Seine-Normandie, 1996) apparaît comme un produit relativement peu toxique pour les poissons.

Dans nos essais, la toxicité des pesticides diminue suivant l'ordre: deltaméthrine, captafol, DNOC et amétryne, qui correspond à leur classement en fonction de leur degré d'hydrophobie. Ce type de relation apparaît par exemple dans la comparaison des coefficients de partage octanol/eau et des CL_{50} (96 h) chez la truite arc-en-ciel dans la famille des triazines (d'après Agence de l'eau Seine-Normandie, 1996). Cette relation bien connue s'explique notamment par les mécanismes d'interaction des xénobiotiques avec les surfaces biologiques.

Influence du Mexel® 432 sur les effets létaux de la deltaméthrine, du captafol, du DNOC et de l'amétryne dans l'eau synthétique

De part sa composition à base d'amines grasses, le Mexel® 432 présente des propriétés de tensioactif. A ce titre (Sterzel, 1997), il est susceptible d'influencer fortement la physiologie des membranes biologiques et par conséquent la toxicité des xénobiotiques. Des amines grasses éthoxylées comme le surfactant Armoblen ont été utilisées pour augmenter la pénétration d'un herbicide, le glyphosate dans des végétaux (Santier et Chamel, 1992). De nombreuses amines grasses ont été introduites dans les formulations d'herbicides pour réduire leur tension superficielle et améliorer leur pénétration dans les plantes (De-Ruiter *et al.*, 1995). On pourrait donc *a priori* s'attendre à une modification par le Mexel® 432 des propriétés toxiques, en particulier toxicocinétiques des xénobiotiques soit par modification des cibles biologiques notamment membranaires soit par liaison directe avec le xénobiotique lui même. Une autre possibilité d'influence du Mexel® 432 sur la toxicité des xénobiotiques vis-à-vis des larves de poissons tient à son effet excitateur à court terme (observations non publiées). On sait que chez les poissons, la pénétration d'un toxique hydrophobe comme la deltaméthrine dépend de

la mobilité des larves (Ghillebaert *et al.*, 1996 c). Cependant, nos observations qui devront être confirmées, paraissent montrer que chez la larve de carpe à 24°C, le Mexel[®] 432 reste sans influence notable sur la toxicité à court terme de plusieurs produits indépendamment de leur degré relatif d'hydrophobie. A basse température, l'effet observé avec la deltaméthrine après 4 jours d'exposition devra lui aussi être confirmé.

REFERENCES

- Agence de l'Eau Seine-Normandie. 1996. Le point sur les triazines. 92027, Nanterre, France. 74 pages.
- Alzogaray, R.A. and Zerba, E.N. 1996. Comparative toxicity of deltamethrin and cis-permethrin on first instars of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). *J. Med. Entomol.* **33**: 58-62.
- Arehmouch, L., Ghillebaert, F., Chaillou, C. and Roubaud, P. Lethal effects of Mexel[®], an antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development. soumis.
- Arehmouch, L., Tfibel, V., Chaillou, C., Ghillebaert, F. and Roubaud. Lethal effects of Mexel[®], an antifouling agent, on common carp embryolarval stages, in river waters and under various physico-chemical conditions in laboratory water. Sous presse.
- Babich, H., Martin-Alguacil, N. and Borenfreund, E. 1989. Arsenic-selenium interactions determined with cultured fish cells. *Toxicol. Lett. (Amst.)*. **45**: 157-164.
- Chalvet-Monfray, K., Belzunces, L.P., Colin, M.E., Fleche, C. and Sabatier, P. 1996. Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: Modeling approach. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**: 525-534.
- De-Ruiter, H., Straatman, K.R. and Menien, E. 1995. Influence of two fatty amine surfactants on foliar absorption, translocation, and efficacy of 2,4-D triethanolamine salt. *J. Agric. Food Chem.* **43**: 3093-3097.
- Gallagher, E.P. and Di-Giulio, R.T. 1991. Effects of 2,4-D and picloram on biotransformation, peroxisomal and serum enzyme activities in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Toxicol. Lett. (Amst.)*. **57**: 65-72.
- Ghillebaert, F. 1996 a. Le développement précoce des Poissons en écotoxicologie. Exemple: la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): -Importance des facteurs environnementaux et de leurs interactions, - Diversification des critères de toxicité. Thèse de doctorat. Université de

- Metz, Metz, France, 107 pages.
- Ghillebaert, F., Chaillou, C., Deschamps, F., and Roubaud, P. 1995. Toxic effects, at three pH levels, of two reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**: 19-28.
- Ghillebaert, F., Prodorutti, D., Chaillou, C. and Roubaud, P. 1996 b. Deltamethrin lethal multifactorial activity towards carp larva related to pH, calcium, and humic acid concentrations. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **35**: 24-37.
- Ghillebaert, F., Prodorutti, D., Chaillou, C. and Roubaud, P. 1996 c. Deltamethrin multifactorial activity towards carp larva mobility related to calcium, humic acids, and pH. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **35**: 268-276.
- Guillen, G., Diaz, R., Jemio, A., Cassab, J.A., Pinto, C.T. and Schofield, C.J. 1997. Chagas' disease vector control in Tupiza, southern Bolivia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **92**: 1-8.
- Gupta, S. 1987. Physiological stress induced by sublethal concentrations of phenolic compounds in *Notopterus notopterus*: Measurement of hydrolytic enzymes. *Environ. Res.* **42**: 304-311.
- ISO 7346/3. 1984. Qualité de l'eau -Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]-Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1^o éd. Ref. n^o: ISO 7346/3.
- Jagers-Op-Akkerhuis, G.A.J.M., Westerhof, R., Van-Straalen, N.M. and Koeman, J.H. 1995. Water balance, respiration and immobilisation in relation to deltamethrin poisoning and physical conditions in the epigeal spider *Oedothorax apicatus*. *Pesticide Sci.* **44**: 123-130.
- Kershaw, W.C., Iga, T. and Klaassen, C.D. 1990. Ethanol decreases cadmium hepatotoxicity in rats: Possible role of hepatic metallothionein induction. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **106**: 448-455.
- Lefebvre, B. 1990. Bases méthodologiques et conceptuelles de l'embryotoxicologie des poissons. Thèse de doctorat. Université Paris 7, 135 pages.
- Materna, E.J., Rabeni, C.F., La-Point, T.W. 1995. Effects of the synthetic pyrethroid insecticide, esfenvalerate, on larval leopard frogs (*Rana* spp.). *Environ. Toxicol. Chem.* **14**: 613-622.
- McClave, J.T., Sullivan, J.H. and Pearson, J.G. 1981. Statistical analysis of fish chronic toxicity test data (D.R. Branson and K.L. Dickson, Eds.). ASTM STP 737, *Aquat. Toxicol.*

- Hazard Assess.* Fourth Conference: pp. 359-376.
- Moya-Quiles, M.R., Munoz-Delgado, E. and Vidal, C.J. 1996. Effects of the pyrethroid insecticide permethrin on membrane fluidity. *Chem. Phys. Lipids*. **79**: 21-28.
- Narahashi, T., Carter, D.B., Frey, J., Ginsburg, K., Hamilton, B.J., Nagata, K., Roy, M.L., Song, J.H. and Tatebayashi, H. 1995. Sodium channels and GABA-A receptor-channel complex as targets of environmental toxicants. *Toxicol. Lett. (Shannon)*. **82-83**: 239-245.
- OCDE. 1997. Poissons, essais de toxicité à court terme au stade de l'embryon et de l'alevin, ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. **212**. 18 pages.
- Pree, D.J., Stevenson, A.B. and Barszcz, E.S. 1996. Toxicity of pyrethroid insecticides to carrot weevils: Enhancement by synergists and oils. *J. Econom. Entomol.* **89**: 1254-1261.
- Reznicek, P.N. 1976. Ecological and physiological bases of the thermal regimen of carp (*Cyprinus carpio* L.) eggs incubation. Topical Problems. *Trans. Czech. Soviet Ichthyol. Coop.* **2**: 107-132.
- Roussel Uclaf, 1994. Fiche de données de sécurité de la deltaméthrine NN1672/NFI505/B. Roussel Uclaf, Romainville, France. 5 pages.
- Santier, S. and Chamel, A. 1992. Influence of an ethopropoxylated fatty amine on the penetration of glyphosate across isolated tomato fruit cuticles. *Adjuvants Agrichem.*, 101-8. Editor(s): Foy, Chester L. CRC: Boca Raton, Fla. (English).
- Schlesinger, R.B., Zelikoff, J.T., Chen, L.C. and Kinney, P.L. 1992. Assessment of toxicologic interactions resulting from acute inhalation exposure to sulfuric acid and ozone mixtures. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **115**: 183-190.
- Song, J. H. and Narahashi, T. 1996. Modulation of sodium channels of rat cerebellar Purkinje neurons by the pyrethroid tetramethrin. *J. Pharmacol. Experim. Therapeutics*. **277**: 445-453.
- Stacey, N.H. 1987. Assessment of the toxicity of chemical mixtures with isolated rat hepatocytes: Cadmium and chloroform. *Fund. Appl. Toxicol.* **9**: 616-622.
- Sterzel, W. 1997. Toxicology of surfactants used in cosmetics in Surfactants in cosmetics. *Surfactants Sci. Ser.* vol. 68. Marcel Dekker, Inc, New York, pp. 557-571.
- Subbiah, G.N., Buvana, R. and Meenakshi, N. 1987. A study on the treatment of insecticide polluted water. *Proc. Nat. Acad. Sci. India Sec. B (Biol. Sci.)*. **57**: 361-366.
- SYSTAT for Windows. 1992. Version 5.0. Ed. Evanston, IL: Systat, Inc.
- Trimmed Spearman-Kärber (TSK) Program version 1.5. Ecological Monitoring Research

Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory. U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OHIO 45268.

Van Ginkel, C.G., Stroo, C.A. and Kroon, A.G.M. 1993. Biodegradability of ethoxylated fatty amines and amides and the non toxicity of their biodegradation products. *Tenside Surf. Det.* **30**: 213-216.

Wicklund, A., Runn, P. and Norrgren, L. 1988. Cadmium and zinc interactions in fish: Effects of zinc on the uptake, organ distribution, and elimination of cadmium-109 in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**: 345-354.

Yang, K. R., Shim, J. H. and Suh, Y.T. 1992. Comparison of toxicity and detoxifying enzyme activity in carp (*Cyprinus carpio*) treated with some synergistic pesticides. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **35**: 367-374.

Essai 1		% survie $\bar{X}(\sigma)^*$ au jour Jx d'exposition									
[C] ($\mu\text{g/L}$)	N	eau synthétique				Mexel® 432 (0,5 mg/L)					
		J1	J2	J3	J4	N	J1	J2	J3	J4	
<i>Deltaméthrine (ponté 1). 11°C. Age en cours d'exposition: 7-11 jours</i>											
0	79	100 (0) ^a	100 (0) ^a		100 (0) ^a						
0 éth	45	98 (3) ^a	98 (3) ^a		98 (3) ^a	60	100 (0) ^a	99 (3) ^a			99 (3) ^a
0,125	49	100 (0) ^a	100 (0) ^a		85 (25) ^a	78	99 (2) ^a	97 (2) ^a			96 (4) ^a
0,25	65	100 (0) ^a	98 (3) ^a		98 (3) ^a	75	97 (5) ^a	91 (11) ^a			88 (16) ^a
0.5	67	100 (0) ^a	100 (0) ^a		100 (0) ^a	84	100 (0) ^a	100 (0) ^a			100 (0) ^a
1	86	99 (2) ^a	99 (2) ^a		99 (2) ^a	75	99 (2) ^a	99 (2) ^a			99 (2) ^a
2	71	100 (0) ^a	100 (0) ^a		67 (58) ^a	74	100 (0) ^a	99 (2) ^a			99 (2) ^a
4	75	100 (0) ^a	100 (0) ^a		100 (0) ^a	84	100 (0) ^a	100 (0) ^a			0 (0) ^b
8	54	100 (0) ^a	98 (3) ^a		98 (3) ^a	92	100 (0) ^a	100 (0) ^a			0 (0) ^b
CL₅₀ ($\mu\text{g/L}$)		> 8	> 8		> 8		> 8	> 8			2,81**
Essai 2		<i>Deltaméthrine (ponté 1): 24°C. Age en cours d'exposition: 13-17 jours</i>									
0	19	96 (6) ^a	96 (6) ^a	88 (18) ^a	64 (31) ^a						
0 éth	42	98 (4) ^a	89 (6) ^a	71 (18) ^a	60 (19) ^a	29	100 (0) ^a	94 (10) ^a	87 (18) ^a		56 (22) ^a
0,125	39	100 (0) ^a	87 (23) ^a	42 (30) ^{ab}	11 (10) ^b	39	97 (4) ^a	87 (9) ^a	74 (19) ^{ab}		41 (19) ^{ab}
0,25	46	98 (3) ^a	69 (17) ^{ab}	45 (12) ^{ab}	22 (13) ^{ab}	47	98 (3) ^a	82 (12) ^a	70 (17) ^{ab}		21 (2) ^{abc}
0,5	44	100 (0) ^a	81 (4) ^{ab}	40 (30) ^{ab}	13 (16) ^b	35	94 (5) ^a	63 (49) ^{ab}	34 (25) ^b		12 (6) ^{bcde}
1	45	95 (4) ^a	71 (5) ^{ab}	18 (10) ^{bc}	5 (4) ^b	36	87 (15) ^a	67 (9) ^{ab}	48 (13) ^{ab}		29 (21) ^{abcd}
2	36	93 (6) ^a	40 (13) ^b	0 (0) ^c	0 (0) ^b	35	100 (0) ^a	48 (35) ^{abc}	14 (4) ^{bc}		5 (8) ^{cde}
4	36	36 (55) ^{ab}	0 (0) ^c	0 (0) ^c	0 (0) ^b	33	89 (10) ^a	16 (17) ^{bc}	0 (0) ^c		0 (0) ^e
8	35	33 (58) ^{ab}	0 (0) ^c	0 (0) ^c	0 (0) ^b	49	0 (0) ^b	0 (0) ^c	0 (0) ^c		0 (0) ^e
16	25	0 (0) ^b	0 (0) ^c	0 (0) ^c	0 (0) ^b	40	0 (0) ^b	0 (0) ^c	0 (0) ^c		0 (0) ^e
CL₅₀ (Ic)		3,97	1,35	0,64	< 0,64		4,76	1,38	0,59		0,23
($\mu\text{g/L}$)		3,38-4,66	1,14-1,61	0,41-1,00			4,16-5,45	1,05-1,81	0,44-0,80		0,15-0,36

Tableau 2. Influence du Mexel® 432 sur les effets létaux de la deltaméthrine à deux températures \bar{X} : moyenne sur les 3 répliques. σ : écart-type. *: Indice de Tuckey (deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur indice comporte une lettre commune). [C]: concentration en deltaméthrine. N: effectif total sur les 3 répliques. 0 éth: témoins des effets de l'éthanol (0,1 ml/L). caractères gras: effet significatif par rapport aux larves incubées dans l'eau synthétique. CL₅₀ (Ic): concentration létale pour 50 % des individus avec intervalle de confiance (Ic). **: intervalle de confiance non calculable. Age en cours d'exposition: incubation à 24°C pendant 3 jours, puis à 14°C jusqu'au début d'exposition.

Essai 3		% survie $\bar{X}(\sigma)^*$ après 1 jour d'exposition			
		<i>Deltaméthrine (ponte 2). Age en début d'exposition: 12 jours</i>			
[C] ($\mu\text{g/L}$)	N	14°C		24°C	
		Eau synthétique	Mexel [®] (0,5 mg/L)	Eau synthétique	Mexel [®] (0,5 mg/L)
0	90	100 (0) ^a	99 (2) ^a	98 (2) ^a	100 (0) ^a
0,5	90	100 (0) ^a	100 (0) ^a	98 (2) ^a	94 (7) ^a
1	90	100 (2) ^a	99 (2) ^a	99 (2) ^a	99 (2) ^a
2	90	100 (2) ^a	100 (2) ^a	98 (4) ^a	100 (0) ^a
4	90	98 (2) ^a	100 (0) ^a	97 (3) ^a	92 (4) ^a
8	90	80 (12) ^a	70 (15)^b	0 (0)^b	0 (0)^b
16	90	81 (27) ^a	74 (17)^b	0 (0)^b	0 (0)^b
CL₅₀ (Ic) ($\mu\text{g/L}$)		> 16	> 16	5,58 5,47-5,70	5,40 5,17-5,63

Tableau 3. Influence du Mexel[®] 432 sur les effets létaux de la deltaméthrine à deux températures

\bar{X} : moyenne sur les 3 répliques. σ : écart-type. *: Indice de Tuckey (deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur indice comporte une lettre commune). [C]: concentration en deltaméthrine. **caractères gras**: effet significatif par rapport aux larves incubées dans l'eau synthétique. **CL₅₀ (Ic)**: concentration létale pour 50 % des individus avec intervalle de confiance (Ic). **Age en cours d'exposition**: incubation à 24°C pendant 3 jours, puis à 11°C jusqu'au début d'exposition.

Essai 4	% survie $\bar{X}(\sigma)^*$ au jour Jx d'exposition	
	<i>Captafol (ponte P3). Age en cours d'exposition: 16-18 jours</i>	
[C] (mg/L)	Eau synthétique	Mexel® 432 (0,5 mg/L)
	J2	J2
0	99 (2) ^a	94 (10) ^a
0,0625	73 (12) ^b	78 (24) ^{ab}
0,125	76 (12) ^b	69 (8) ^b
0,25	19 (5) ^c	63 (9) ^b
0,5	0 (0) ^d	0 (0) ^c
1	0 (0) ^d	0 (0) ^c
2	0 (0) ^d	0 (0) ^c
CL₅₀ (Ic) (mg/L)	0,17 0,16-0,18	0,25 0,22-0,29

Tableau 4. Influence du Mexel® 432 sur les effets létaux du captafol

\bar{X} : moyenne sur les 3 répliques. σ : écart-type. *: Indice de Tuckey (deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur indice comporte une lettre commune). [C]: concentration en captafol. **caractères gras**: effet significatif par rapport aux larves incubées dans l'eau synthétique. **CL₅₀ (Ic)**: concentration létale pour 50 % des individus avec intervalle de confiance (Ic). **Age en cours d'exposition**: incubation à 24°C pendant 3 jours, puis à 14°C jusqu'au début d'exposition.

Essai 5	% survie $\bar{X}(\sigma)^*$ au jour Jx d'exposition					
	<i>DNOC (ponté P2). Age en cours d'exposition: 14-18 jours</i>					
[C] (mg/L)	Eau synthétique			Mexel® 432 (0,5 mg/L)		
	J1	J2	J4	J1	J2	J4
0	99 (2) ^a	99 (2) ^a	91 (2) ^a	84 (5)^b	83 (3)^b	61 (13)^b
0,0625	100 (0) ^a	100 (0) ^a	92 (2) ^a	99 (2) ^a	94 (4) ^a	63 (15) ^{ab}
0,125	99 (2) ^a	97 (0) ^{ab}	76 (6) ^a	98 (2) ^a	93 (7) ^a	70 (15) ^{ab}
0,25	99 (2) ^a	94 (4) ^{ab}	38 (25)^b	99 (2) ^a	93 (3) ^a	19 (14)^c
0,5	96 (5) ^a	80 (21)^b	0 (0)^c	74 (2)^b	32 (5)^c	0 (0)^d
1	0 (0)^b	0 (0)^c	0 (0)^c	0 (0)^c	0 (0)^d	0 (0)^d
2	0 (0)^b	0 (0)^c	0 (0)^c	0 (0)^c	0 (0)^d	0 (0)^d
CL₅₀ (Ic) (mg/L)	0,68 0,66-0,71	0,58 0,55-0,63	0,21 0,19-0,23	0,61 0,57-0,65	0,45 0,42-0,48	0,22 0,20-0,23
Essai 6	<i>Amétryne (ponté P2). Age en cours d'exposition: 14-17 jours</i>					
	J1	J2	J3	J1	J2	J3
0	93 (9) ^a	93 (9) ^a	87 (12) ^a	90 (3) ^a	89 (4) ^a	81 (5) ^a
1	93 (9) ^a	78 (30) ^a	71 (27) ^a	99 (2) ^a	93 (7) ^a	44 (21) ^a
2	97 (6) ^a	88 (8) ^a	54 (28) ^a	96 (2) ^a	79 (28) ^a	52 (19) ^a
4	98 (4) ^a	81 (27) ^a	59 (21) ^a	98 (2) ^a	97 (3) ^a	61 (7) ^a
8	99 (2) ^a	91 (5) ^a	50 (6) ^a	98 (2) ^a	98 (2) ^a	40 (12) ^a
16	96 (2) ^a	69 (32) ^a	33 (22) ^a	94 (2) ^a	86 (8) ^a	22 (19)^b
CL₅₀ (Ic) (mg/L)	> 16	> 16	10,37 7,05-15,26	> 16	> 16	7,43 5,71-9,66

Tableau 5. Influence du Mexel® 432 sur les effets létaux du DNOC et de l'amétryne

\bar{X} : moyenne sur les 3 répliques. σ : écart-type. *: Indice de Tuckey (deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5% si leur indice comporte une lettre commune). [C]: concentration en DNOC et en amétryne. **caractères gras**: effet significatif par rapport aux larves incubées dans l'eau synthétique. **CL₅₀ (Ic)**: concentration létale pour 50 % des individus avec intervalle de confiance (Ic). **Age en cours d'exposition**: incubation à 24°C pendant 3 jours, puis à 14°C jusqu'au début d'exposition.

2^e Partie. Etude expérimentale

2. Toxicité du Mexel[®] 432 dans une eau synthétique

2.6. Effets létaux du Mexel[®] 432 en présence d'un antigel sur le développement embryo-larvaire de la carpe commune

2.6. Effets létaux du Mexel® 432 en présence d'un antigél sur le développement embryolaire de la carpe commune

Par Latifa Arehmouch et Pierre Roubaud

Rapport confidentiel de l'étude réalisée pour la société MEXEL

Introduction

La commercialisation du Mexel® 432, un nouvel agent anti-salissures industriel, ayant également des propriétés anticorrosion et antitartre, a nécessité de nombreux essais préalables pour vérifier son efficacité et évaluer sa toxicité potentielle dans les zones de rejets.

Selon le fabricant, le Mexel® 432 est un mélange contenant 80 % d'eau et 20 % de résidu sec constitué de diamines grasses, d'amines tertiaires et d'un aminoalcool.

Cependant, l'utilisation du Mexel® 432 à basse température est gênée par sa gélification. Pour y remédier, l'adjonction d'un fluidifiant antigél, l'hexylène-glycol a été mise à l'essai avec succès. Cependant, l'utilisation de ce fluidifiant pourrait modifier la toxicité du Mexel® 432 dans le milieu aquatique.

Le développement embryolaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) constitue un modèle de laboratoire recommandé pour l'évaluation des risques toxicologiques dans l'environnement (Lefebvre, 1990; Ghillebaert, 1996). Dans ce qui suit, nous étudions sur ce modèle les effets létaux du Mexel® 432 en présence de l'antigél.

Matériel et méthodes

Les géniteurs sont des carpes (*Cyprinus carpio* L.) originaires de la pisciculture « Les Alevins de Sologne » (Vignoux sur Barengeon, 18500, France).

La production des gamètes et la fécondation artificielle sont réalisées suivant Jaoul et Roubaud (1982): maintien des géniteurs mâles et femelles en eau froide de l'automne jusqu'au moment du test, puis séjour de 2 semaines à 20°C sous une photopériode de 13 heures d'éclairement journalier - injection d'extrait hypophysaire de carpe 36 et 12 heures avant le moment choisi pour la ponte - récolte des gamètes par massage abdominal hors d'eau.

L'insémination artificielle a lieu en chambre thermorégulée à 24°C: dispersion d'environ 50 ovocytes avec 10 µl de sperme dans 20 ml d'eau synthétique (ISO 7346/3, 1984) dans des incubateurs en polystyrène (OSI-Labo) - lavage du sperme en excès au bout de 20 min. L'incubation est réalisée suivant Ghillebaert *et al.*, (1995) dans 60 ml d'eau synthétique renouvelée tous les jours, sur une table oscillante (10 oscillations / min) à une température moyenne de $24 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$.

Les animaux sont exposés à diverses concentrations en Mexel[®] 432 ou en Mexel[®] fluidifié par 10 % ou 20 % d'antigel (v/v) (notés Mx10 et Mx20) (Tableau 1). Pour chaque produit et chaque concentration, 3 répliques sont préparées (9 répliques pour les témoins).

Méthodes statistiques

Les effets létaux sont étudiés à l'aide du logiciel SYSTAT 5.0 (SYSTAT for Windows, 1992) par analyse de variance (McClave *et al.*, 1981) après transformation des pourcentages de survie par la fonction arcsinus. Les concentrations sans effet observé (CSEO) sont calculées au seuil $\alpha = 5\%$ à l'aide du test de comparaison multiple de Tukey. Les concentrations létales pour 50 % de la population (CL_{50}) sont calculées avec le programme rimmed Spearman-Kärber (TSK) Version 1.5. (U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OHIO 45268).

Résultats

Les taux de survie chez les témoins se maintiennent stables jusqu'au 12^e jour d'incubation (Tableau 1). Dans 3,2 mg/L de Mexel[®] 432, les embryons sont tous morts après 3 jours d'exposition; dans 1,6 mg/L, ils meurent de la fin du 2^e à la fin du 7^e jour. La plus forte concentration sans effet léthal observé est stable à 0,8 mg/L de la fin du 2^e à la fin du 12^e jour d'exposition. Dans la solution Mx20, les CL_{50} décroissent continûment du début à la fin de l'exposition. La présence de l'antigel n'a pas d'effet marqué jusqu'à la fin de l'éclosion (fin du 3^e jour d'incubation). Par contre, chez les larves âgées (du 7^e au 12^e jour d'exposition), les effets létaux augmentent avec la concentration en antigél.

Au moment de la fécondation, contrairement aux oeufs traités par le Mexel[®] 432 pur ou par le Mexel[®] 432 à 10 % d'antigel, les oeufs fécondés dans le Mexel[®] 432 à 20 % d'antigel ne se collent pas tous au fond des incubateurs et ont tendance à s'agglutiner entre eux. Cet effet est d'autant plus visible que la concentration en Mx20 est plus élevée.

Discussion

Les taux de survie sont encore supérieurs à 85 % après 12 jours d'incubation ce qui témoigne de la qualité de la ponte étudiée comme des conditions d'incubation.

Faute de connaissance sur la toxicité propre de l'antigel (hexylène glycol) vis-à-vis des embryons et larves de poissons, il n'est pas possible de dire avec certitude si l'augmentation observée des effets létaux du Mexel[®] 432 en présence de ce produit est due à sa toxicité propre ou à un effet interactif avec le Mexel[®] 432. On sait que l'hexylène glycol est un poison des tubulines (Harris et Clason, 1992; Oka *et al.*, 1991). Il pourrait donc perturber la période de segmentation des oeufs de poissons, particulièrement sensible à ce type de poisons (Chaillou *et al.*, 1991).

Chez la carpe, comme chez les espèces à oeufs collants, l'agglutination des oeufs au moment de la fécondation peut provoquer des mortalités par asphyxie (Billard, 1988). Cet effet pourrait expliquer l'augmentation de toxicité du Mexel[®] 432 en présence de 20 % d'antigel. Cependant, l'agglutination des oeufs ne se produit pas dans les solutions Mx10 à des concentrations en antigel qui pourtant inhibent le collage dans les solutions Mx20: par exemple, cet agglutination est observée aux concentrations 1,6 et 0,8 mg/L de Mx20, alors qu'elle n'apparaît pas aux concentrations doubles de Mx10. Or, avec 10 % d'antigel, la toxicité du Mexel[®] 432 est cependant augmentée. Ces observations indiquent que la toxicité liée à la présence de l'antigel ne résulte probablement pas en totalité de l'inhibition du collage des oeufs.

Dans le Mexel[®] 432 pur, les CL₅₀ et les concentrations sans effet observé restent stables peu après l'éclosion. Au contraire, en présence de 20 % d'antigel, elles continuent à décroître après l'éclosion. Cette observation pourrait indiquer soit que l'antigel associé au Mexel[®] 432 présente une activité toxique initiale dont les effets létaux sont plus ou moins différés dans le temps suivant les individus, soit que l'activité toxique se prolonge au cours de l'exposition. Pour départager ces deux interprétations, des essais établissant la sensibilité particulière de chaque période de développement et la toxicité spécifique de l'antigel seront nécessaires.

Références

Arehmouch, L., Ghillebaert, F., Chaillou, C. and Roubaud, P. Lethal effects of Mexel[®], an antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development. soumis.

- Billard, R. 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. *Mar. behav. Physiol.* **14**: 3-12.
- Chaillou, C., Lefebvre, B., Sjafei, D. et Roubaud, P. 1991. L'embryon de carpe en ségmentation: un modèle expérimental pour l'étude toxicologique du cycle cellulaire. *Cybiurn.* **15**: 303-314.
- Ghillebaert, F. 1996. Le développement précoce des Poissons en écotoxicologie. Exemple: la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): -Importance des facteurs environnementaux et de leurs interactions, - Diversification des critères de toxicité. Thèse de doctorat. Université de Metz, Metz, France. 107 pages.
- Ghillebaert, F., C. Chaillou, F. Deschamps and P. Roubaud. 1995. Toxic effects, at three pH levels, of two reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**:19-28.
- Harris, P.J. and Clason, E.L. 1992. Conditions for assembly of tubulin-based structures in unfertilized sea urchin eggs: Spirals, monasters and cytasters. *J. Cell Sci.* **102**: 557-567.
- ISO 7346/3. 1984. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1^e éd. Ref. n°: ISO 7346/3.
- Jaoul, A. et P. Roubaud. 1982. Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**: 3409-3419.
- Lefebvre, B. 1990. Bases méthodologiques et conceptuelles de l'embryotoxicologie des poissons. Thèse de doctorat. Université Paris 7, 135 pages.
- McClave, J.T., Sullivan, J.H. and Pearson, J.G. 1981. Statistical analysis of fish chronic toxicity test data (D.R. Branson and K.L. Dickson, Eds.). ASTM STP 737, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*: Fourth Conference: pp. 359-376.
- Oka, M.T., Arai, T. and Hamaguchi, Y. 1991. Change in the heterogeneous distribution of tubulin isotypes in mitotic microtubules of the sea urchin egg by treatment with microtubule depolymerizing or stabilizing drugs. *Cell Structure and Function.* **16**: 125-134.
- SYSTAT for Windows. 1992. Version 5.0. Ed. Evanston, IL: Systat, Inc.
- Trimmed Spearman-Kärber (TSK) Program version 1.5. Ecological Monitoring Research Division, Environmental Monitoring Systems Laboratory. U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OHIO 45268.

[C] (mg/L)	N	% survie \bar{X} (σ)* à la fin du jour Jx							
		J1	J2	J3	J5	J7	J9	J11	J12
<i>Témoins dans l'eau synthétique</i>									
0	524	99 (2)	99 (2)	97 (3)	95 (4)	93 (4)	92 (4)	89 (5)	86 (7)
<i>Mexel® 432</i>									
0	200	98 (2) ^a	98 (2) ^a	94 (2) ^a	94 (3) ^a	92 (3) ^a	92 (3) ^a	91 (2) ^a	91 (2) ^a
0,1	126	94 (3) ^a	93 (4) ^a	90 (2) ^a	90 (2) ^a	90 (2) ^a	90 (2) ^a	88 (2) ^a	86 (6) ^a
0,2	109	97 (0) ^a	96 (2) ^a	92 (3) ^a	93 (3) ^a	93 (3) ^a	93 (3) ^a	91 (6) ^a	89 (8) ^a
0,4	134	95 (1) ^a	95 (1) ^a	92 (5) ^a	91 (5) ^a	91 (6) ^a	91 (6) ^a	90 (7) ^a	90 (7) ^a
0,8	140	97 (6) ^a	96 (5) ^a	94 (3) ^a	94 (3) ^a	93 (3) ^a	93 (3) ^a	91 (5) ^a	88 (4) ^a
1,6	128	99 (1) ^a	98 (2) ^a	43 (11)^b	43 (11)^b	0 (0)^b			
3,2	122	79 (6)^b	1 (3)^b	0 (0)^b					
CL₅₀ (Ic) (mg/L)	> 3,2	2,25 2,22-2,28	1,52 1,42-1,62	1,55 1,45-1,65	1,13**	1,13**	1,13**	1,13**	1,13**
<i>Mexel® 432 avec 10 % (v/v) d'antigel</i>									
0	125	99 (2) ^a	99 (2) ^a	97 (1) ^a	96 (2) ^a	93 (6) ^a	90 (6) ^a	75 (15) ^a	69 (18) ^a
0,05	128	99 (2) ^a	99 (2) ^a	99 (2) ^a	95 (6) ^a	95 (6) ^a	93 (4) ^a	88 (5) ^a	87 (5) ^a
0,1	153	99 (1) ^a	99 (1) ^a	96 (4) ^a	95 (5) ^a	95 (5) ^a	95 (5) ^a	79 (26) ^a	74 (27) ^a
0,2	103	99 (2) ^a	99 (2) ^a	98 (3) ^a	97 (5) ^a	96 (8) ^a	95 (7) ^a	91 (10) ^a	88 (11) ^a
0,4	148	97 (1) ^a	97 (1) ^a	98 (2) ^a	93 (4) ^a	91 (3) ^a	90 (4) ^a	81 (3) ^a	70 (9) ^a
0,8	146	98 (1) ^a	98 (1) ^a	98 (0) ^a	36 (32)^b	32 (28)^b	29 (26)^b	11 (18)^b	6 (9)^b
1,6	140	96 (5) ^a	97 (5) ^a	26 (25)^b	0 (0)^b				
3,2	132	88 (11) ^a	9 (9)^b	0 (0)^b					
CL₅₀ (Ic) (mg/L)	> 3,2	2,33 2,27-2,38	1,33 1,27-1,40	0,74 0,70-0,79	0,71 0,67-0,76	0,70 0,66-0,74	0,61 0,58-0,64	0,49 0,53-0,56	
<i>Mexel® 432 avec 20 % (v/v) d'antigel</i>									
0	199	99 (2) ^a	99 (2) ^a	99 (2) ^a	94 (6) ^a	93 (5) ^a	93 (5) ^a	89 (7) ^a	85 (7) ^{ab}
0,05	132	98 (0) ^{ab}	97 (1) ^{ab}	96 (1) ^a	96 (1) ^a	96 (2) ^a	95 (3) ^a	85 (11) ^a	75 (16) ^a
0,1	156	100 (0) ^a	100 (0) ^a	100 (1) ^a	100 (1) ^a	99 (1) ^a	99 (1) ^a	91 (10) ^a	82 (12) ^a
0,2	126	99 (1) ^a	99 (1) ^{ab}	97 (4) ^a	95 (2) ^a	95 (2) ^a	95 (2) ^a	94 (3) ^a	91 (3) ^a
0,4	131	98 (3) ^{ab}	98 (3) ^a	97 (3) ^a	97 (3) ^a	96 (3) ^a	93 (5) ^a	78 (6) ^a	39 (30)^{bc}
0,8	161	96 (2) ^{ab}	96 (2) ^{ab}	97 (1) ^a	49 (38)^b	31 (31)^b	24 (33)^b	11 (18)^b	9 (16)^{cd}
1,6	162	98 (2) ^{ab}	88 (8)^b	51 (27)^b	0 (0)^c				
3,2	159	89 (7)^b	0 (0)^c						
CL₅₀ (Ic) (mg/L)	> 3,2	2,07 2,00-2,15	1,64 1,55-1,74	0,83 0,79-0,88	0,73 0,69-0,77	0,70 0,66-0,73	0,60 0,57-0,63	0,45 0,42-0,49	

Tableau 1. Effets de l'antigel sur la toxicité du Mexel® 432 en solution dans une eau synthétique à partir de la fécondation.

[C]: concentration nominale en produit testé: Mexel® 432, Mexel® 432 à 10 % ou 20 % d'antigel. N: effectif total testé sur les 3 répliques. \bar{X} : moyenne. σ : écart-type arrondi à l'entier voisin. *: indice de comparaison multiple du test de Tuckey: pour chacun des produits testé, deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5 % si leur exposant comporte une lettre commune. LC₅₀ (Ic): concentration létale pour 50 % des individus avec l'intervalle de confiance (Ic). **: l'intervalle de confiance de la LC₅₀ n'est pas calculable. **Caractères gras**: effet significatif par rapport aux embryons et larves incubés dans l'eau synthétique.

2^e Partie. Etude expérimentale

2. Toxicité du Mexel[®] 432 dans une eau synthétique

2.7. L'inhibition du collage des oeufs: un effet toxique chez les poissons. L'exemple d'un lixiviat de cendres de charbon et du Mexel[®] 432 enrichi en antigél.

Principe d'une méthode de quantification

2.7. L'inhibition du collage des oeufs: un effet toxique chez les poissons. L'exemple d'un lixiviat de cendres de charbon et du Mexel® 432 enrichi en antigel. Principe d'une méthode de quantification

Par latifa Arehmouch et Pierre Roubaud

Projet d'une note préliminaire

Introduction

Pour l'évaluation prédictive des risques toxiques dans l'environnement, une panoplie de tests ont été élaborés concernant des espèces et des stades de développement choisis pour représenter la diversité des cibles potentielles des xénobiotiques (OCDE, 1997). Divers critères de toxicité ont été utilisés dont certains peuvent être qualifiés d'universels car ils concernent des propriétés fondamentales de la vie, communes à toutes les espèces et tous les stades de développement: létalité, croissance, respiration, etc. D'autres, au contraire, concernent des effets particuliers attachés à une seule ou à un nombre limité d'espèces. Par exemple, au moment de la fécondation, le collage des oeufs sur des substrats proches de la surface joue un rôle important dans la réussite du développement embryonnaire chez diverses espèces de poissons (Ginsburg, 1968; Loubens, 1989; Robitaille et Vigneault, 1990).

Au laboratoire, lors de la mise en oeuvre de tests toxicologiques sur l'embryon de carpe, l'inhibition du collage empêche l'adhérence des oeufs au fond des incubateurs, ce qui gêne leur lavage au moment du renouvellement des milieux d'essai. En outre, au laboratoire comme pour la mise en oeuvre de la fécondation artificielle en aquaculture (Woynarovich, 1962; Billard, 1988), les oeufs tendent à s'agglutiner les uns aux autres en formant des grumeaux dans lesquels une diffusion réduite de l'oxygène peut entraîner des mortalités par asphyxie. Cette cause de mortalité au laboratoire a pu être invoquée pour interpréter les résultats de tests portant sur divers effluents industriels (Arehmouch *et al.*, 1994, 1995, 1996).

Dans ce qui suit, nous mettons en évidence au laboratoire une inhibition du collage des oeufs de la carpe commune en présence de deux mélanges complexes polluants potentiels du milieu aquatique et nous proposons le principe d'une méthode d'essai pour quantifier cet effet.

Matériels et méthodes

Les effets sur le collage des oeufs de carpe au moment de la fécondation sont étudiés à

24°C dans des solutions de deux mélanges complexes:

- solution d'une formulation de Mexel[®] 432 adaptée à son utilisation aux basses températures par adjonction de 20 % d'antigel (Mexel[®] 432-antigel),
- lixiviat filtré ou non filtré de cendres de charbon lorrain dans une eau de forage prélevée sur site industriel.

Les solutions de Mexel[®] 432-antigel sont préparées à partir d'une solution mère de 100 mg de Mexel[®] 432 à 20 % d'antigel par litre d'eau synthétique (ISO 7346/3. 1984).

Le lixiviat non filtré de cendres de charbon est préparé à partir de 100 g de cendres dans 1 litre d'une eau de forage prélevée sur site industriel (Arehmouch *et al.*, 1995). La suspension est vigoureusement agitée à la main, puis laissée 9 heures à décanter. Le surnageant C est récupéré et sert à préparer les dilutions C/64, C/16 et C/4 dans l'eau de forage.

Le lixiviat filtré de cendres de charbon est préparé suivant la norme AFNOR X31-210/1992: agitation d'une solution de 100 g/L d'eau de forage en bouteille de 2 litres pendant 24 h et filtration du surnageant sous vide sur papier Wattman de diamètre moyen de pores 0,45 µm avant dilution.

Les géniteurs sont des carpes (*Cyprinus carpio* L.) originaires de la pisciculture « Les Alevins de Sologne » (Vignoux sur Barengeon, 18500, France). La production des gamètes est réalisée suivant Jaoul et Roubaud (1982): maintien des géniteurs mâles et femelles en eau froide de l'automne jusqu'au moment du test, puis séjour de 2 semaines à 20°C sous une photopériode de 13 heures d'éclairage journalier - injection d'extrait hypophysaire de carpe 36 et 12 heures avant le moment choisi pour la ponte.

Les ovocytes et le sperme sont récoltés hors d'eau par massage abdominal des géniteurs et conservés à 24°C jusqu'à utilisation. A l'aide d'une spatule sèche, une cinquantaine d'ovocytes sont prélevés et aspergés directement par 20 µl de sperme délivrés à l'aide d'une microseringue à répétition. Le sperme et les ovocytes sont ensuite dispersés au fond des incubateurs dans 20 ml de solution à tester par agitation manuelle, d'abord de la spatule dans la solution puis par un mouvement circulaire horizontal des incubateurs pendant quelques secondes. Les incubateurs sont des pots cylindriques en polystyrène cristal de diamètre 6 cm pour l'essai sur le Mexel[®] 432-antigel ou en polyéthylène de diamètre 7 cm pour l'essai sur les cendres de charbon. Trois répliques sont préparées pour chaque concentration testée.

Après fécondation, les oeufs sont rincés par la solution d'essai en prenant soin de ne pas éliminer les oeufs non collés sur le fond des incubateurs (oeufs libres). Puis, les oeufs sont

incubés dans 60 ml (Mixel[®] 432-antigel) ou 150 ml (lixiviat) de solution d'essai. Après 24 h, le pourcentage des oeufs non collés au fond des incubateurs est déterminé ainsi que le pourcentage des oeufs agglutinés c'est-à-dire formant des agrégats d'au moins 2 oeufs ainsi que le nombre d'oeufs dans chacun de ces agrégats. L'exposition est ensuite prolongée pendant 12 jours pour le Mixel[®] 432-antigel et 7 jours pour le lixiviat de cendres avec renouvellement journalier et mesure des effets létaux (les oeufs morts sont discriminés par l'observation à l'oeil nu de la coagulation du vitellus ou des protéines du système nerveux central).

Une méthode de quantification de l'effet d'inhibition du collage est testée sur des ovocytes de carpe non fécondés (Figure 1). On sait en effet que l'insémination ne modifie pas les processus de l'activation des oeufs de carpe dans l'eau, notamment le collage (Chaillou et Roubaud, non publié).

Les ovocytes sont récoltés 6 après l'heure attendue pour l'ovulation et conservés ensuite pendant 1 heure, à 24°C en récipient ouvert. Ils sont prélevés à l'aide d'une spatule sèche qui est ensuite plongée verticalement dans un incubateur cylindrique en polyéthylène, ayant un diamètre de 7 cm, contenant 20 ml de la solution d'essai.

Au cours de cette opération, l'incubateur est agité par le mouvement d'une table à agitation horizontale (amplitude du mouvement: 0,8 cm, fréquence: 2 cycles par seconde). Les ovocytes entraînés par le mouvement du liquide se décrochent de la spatule. Ceux dont le pouvoir collant est maximum se fixent directement sur le fond de l'incubateur (ovocytes collés), tandis que ceux dont le pouvoir collant est réduit tendent à s'agglutiner les uns aux autres sans adhérer au fond de l'incubateur (ovocytes agglutinés).

L'inhibition du collage est alors évaluée dans l'heure qui suit suivant les critères définis lors des essais précédents.

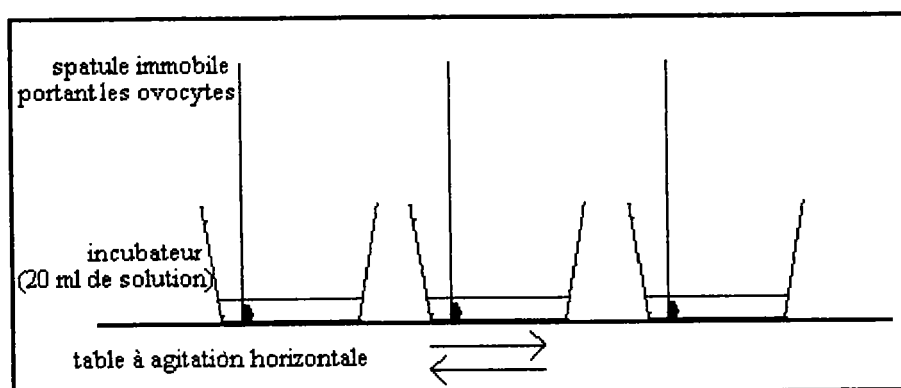


Figure 1. protocole expérimental du test de collage

Résultats

Dans les solutions de Mexel[®] 432-antigel, une partie des oeufs se collent au fond des incubateurs. Les autres restent isolés ou s'agglutinent en groupes plus ou moins nombreux. L'inhibition du collage des oeufs est d'autant plus importante que la concentration en Mexel[®]-antigel est plus élevée. Elle est significative aux concentrations 0,8 et 3,2 mg/L (Tableau 1). Au contraire, la formation d'agrégats, avec une moyenne d'environ 4 oeufs par agrégat, n'apparaît pas avant la concentration 3,2 mg/L, si ce n'est la formation d'un agrégat de 4 oeufs à la concentration 1,6 mg/L.

Aucune inhibition du collage n'est observée dans l'eau synthétique, dans l'eau de forage utilisée pour la préparation des lixiviats des cendres, ni dans les solutions de lixiviation filtrées (Tableau 2). Par contre, dans les solutions de lixiviation non filtrées, le collage des oeufs est significativement inhibé à toutes les dilutions testées. Cet effet augmente, mais de façon non significative, avec la concentration en lixiviat. De la même manière, il y a formation d'agrégats à toutes les dilutions du lixiviat, mais sans différence significative entre elles.

Aussi bien avec le Mexel[®] 432 à 20 % d'antigel qu'avec le lixiviat de cendres, l'agglutination des oeufs ne provoque pas de mortalités significatives au cours du développement embryonnaire.

Lors de l'essai de quantification de l'inhibition du collage (Tableau 3), l'agglutination d'un nombre important d'ovocytes en un seul agrégat est observée dans l'une des répliques correspondant aux témoins dans l'eau synthétique, alors que dans les deux autres répliques, tous les ovocytes sont collés séparément. Dans le lixiviat et ses différentes dilutions, le nombre des ovocytes non collés au fond des incubateurs augmente avec la concentration en lixiviat. Il devient significatif à partir de la dilution 1/4, mais aucune différence significative n'est mise en évidence entre les différentes dilutions. Tous les oeufs non collés sont intégrés à des agrégats dont l'effectif moyen ne varie pas significativement avec la dilution.

Discussion

Les essais effectués sur le Mexel[®] 432-antigel et le lixiviat non filtré de cendres de charbon démontrent l'existence d'un risque d'inhibition du collage des oeufs chez les espèces à oeufs collants comme la carpe. Dans nos conditions expérimentales d'agitation manuelle, avec les deux types de solutions testées, seulement 40 % des oeufs se sont collés au fond des

incubateurs, contre 100 % dans l'eau de laboratoire. Dans l'essai mettant en oeuvre une agitation mécanique reproductible, l'inhibition a porté sur près de 100 % des ovocytes.

Dans les conditions naturelles, le collage des oeufs de carpe permet leur accrochage sur des supports herbus proches de la surface. Une réduction du pouvoir collant des ovocytes pourrait donc avoir des effets importants en favorisant la chute des oeufs sur des fonds peu oxygénés ou d'accès facile aux prédateurs, l'agglutination des oeufs pouvant renforcer encore les risques de mortalité par asphyxie. Cependant, dans nos essais au laboratoire, dans les conditions d'un test toxicologique assurant une oxygénation importante du milieu, l'agglutination n'a pas provoqué d'augmentation significative des taux de mortalité.

Avec les solutions de Mexel[®] 432-antigel, l'inhibition du collage est peut être due à une solubilisation des mucopolysaccharides adhésifs de la coque de l'oeuf par l'hexylène glycol servant d'antigel ou à une précipitation des micelles du Mexel[®] 432 en solution à la surface des oeufs. D'autres essais seront nécessaires pour vérifier ces hypothèses et déterminer si l'inhibition du collage peut être par l'hexylène glycol seul. Divers composés polaires exercent un effet anti-collage notamment des ions métalliques (sels de zinc et mélange zinc-cadmium-cuivre: Brungs, 1969, Eaton, 1973, d'après McKim, 1977) ou des ions phosphate (Ghillebaert, observation non publiée).

Alors que le lixiviat de cendres de charbon est sans effet sur le collage après filtration, il l'inhibe significativement au moins jusqu'à la dilution 1/64 lorsqu'il n'est pas filtré. Cette différence est certainement due à un effet physique, les fines particules de cendres présentes dans le lixiviat non filtré se déposant au fond des incubateurs ou se fixant à la surface des oeufs en supprimant leur adhésivité. Une inhibition analogue sous l'influence d'algues unicellulaires a été invoquée pour expliquer le déclin de l'espèce *Osmerus mordax* dans les eaux du St Laurent au Canada (Robitaille et Vigneault, 1990). Par ailleurs, en aquaculture, le lait est utilisé pour supprimer le collage des oeufs d'espèces comme la carpe (Billard, 1988).

Ainsi, dans l'évaluation des risques toxicologiques des lixiviats sur les oeufs de poissons, les méthodes d'essai comme la norme AFNOR X31-210/1992 qui imposent la filtration préalable des lixiviats paraissent incomplètes.

Plus généralement, la mise au point de méthodes spécifiques pour évaluer l'inhibition du collage des oeufs de poissons est nécessaire. Leur standardisation ne pouvant s'accommoder d'une réalisation manuelle des fécondations, notre essai démontre au moins la possibilité de placer tous les ovocytes dans des conditions de dispersion identiques. Cependant, dans l'une

des 3 répliques relatives à l'eau synthétique dans cet essai, une proportion importante des ovocytes n'a pas adhéré au fond des incubateurs. Ce manque d'adhésivité pourrait traduire un début de surmaturation ovocytaire, les oeufs ayant été traité 7 après l'heure attendue pour l'ovulation. Or, on sait que le vieillissement ovocytaire est rapide chez la carpe (quelques heures) et qu'il mime les processus d'une activation prématurée des oeufs (Chaillou *et al.*, 1989), ceux ci perdant alors rapidement leur aptitude au collage. Une méthode de mesure du collage pourrait donc servir aussi de test de surmaturation ovocytaire.

Parmi les deux processus qui nous ont fourni des critères d'évaluation du degré d'inhibition du collage: fixation au fond des incubateurs et agrégation, aucun n'a permis dans nos essais d'obtenir une réponse significative graduée en fonction de la concentration du toxique. D'autres essais seront donc nécessaires, par exemple pour optimiser l'intensité de l'agitation dans le milieu de fécondation.

Références

- AFNOR (Association française de normalisation). 1992. Essai de lixiviation des résidus solides. Norme X31-210. 13 pages.
- Arehmouch, L., Chaillou, C., Ghillebaert, F. et P. Roubaud. 1995. 1^e Partie. Effets létaux et sublétaux (mobilité, croissance, collage des oeufs), d'un lixiviat de cendres de centrale thermique EDF, sur le développement embryo-larvaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) à partir de la fécondation. 2^e Partie. Principe d'un test de mesure de l'aptitude au collage des ovocytes. Essais de Laboratoire, C.R. de l'essai du 25 janvier 1995, Contrat (EDF, Dir. des Etudes et Recherches, Dept. Env. Aquat. et Atmosph.) / (Ass. pour le Dev. de l'Embryotoxicologie des Poissons : ADEP), 17 pages.
- Arehmouch, L., Chaillou, C., Ghillebaert, F., De mil, R. et P. Roubaud. 1994. Effets létaux et sublétaux (mobilité, croissance) d'un effluent industriel et d'un prélèvement d'eau de Garonne, sur la fécondation et le développement embryo-larvaire de deux pontes de carpe commune (*Cyprinus carpio* L.). Essais de Laboratoire, C.R. de l'essai du 27 Avril 1994, Contrat (EDF, Dir. des Etudes et Recherches, Dept. Env. Aquat. et Atmosph.) / (Ass. pour le Dev. de l'Embryotoxicologie des Poissons : ADEP), 19 pages.
- Arehmouch, L., Ghillebaert, F., Chaillou, C. and Roubaud, P. Lethal effects of Mexel[®], an antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development. soumis.

- Arehmouch, L., Tfibel, V., Ghillebaert, F., Chaillou, C. et Roubaud, P. 1996. Effets létaux et sublétaux (mobilité, croissance) d'un lixiviat de cendres de centrale thermique EDF par une eau de forage, sur le développement embryo-larvaire de la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.) à partir de la fécondation. Essais de Laboratoire, Contrat (EDF, Dir. des Etudes et Recherches, Dept. Env. Aquat. et Atmosph.) / (Ass. pour le Dev. de l'Embryotoxicologie des Poissons : ADEP), 21 pages.
- Billard, R. 1988. Artificial insemination and gamete management in fish. *Mar. behav. Physiol.* **14**: 3-12.
- Chaillou, C., Reinaud, P. Sjafei, D., Lefebvre, B. et Roubaud, P. 1989. Surmaturation ovocytaire et développement embryonnaire de l'oeuf de la carpe commune. International Aquaculture Conference, Bordeaux, France, 2-4 october. *European Aquacult. Soc.* **10**: 61-66.
- Ginsburg, S. 1968. Fertilization in fishes and the problem of polyspermy. *Akad. Nauk. USSR, NOAA and Natl. Sci. Found. Transl.*, Canada, 290 pages.
- ISO 7346/3. 1984. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1^e éd. Ref. n°: ISO 7346/3.
- Jaoul, A. et P. Roubaud. 1982. Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**: 3409-3419.
- Loubens, G. 1989. Observations on the fishes of the Lake Titicaca Bolivian part: IV. *Orestias* spp. *Salmo gairdneri* and management problems. *Rev. Hydrobiol. Trop.* **22**: 157-177.
- McKim, J. M., 1977. Evaluation of Tests with Early Life Stages of Fish for Predicting Long-Term Toxicity. *J. Fish. Res. Board. Can.* **34**: 1148-1154.
- OCDE. 1997. Poissons, essais de toxicité à court terme au stade de l'embryon et de l'alevin, ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. **212**. 18 pages.
- Robitaille, J.A. and Vigneault, Y. 1990. The rainbow smelt (*Osmerus mordax*), an anadromous fish of the St. Lawrence estuary (Canada): synthesis of the knowledge and problems associated with the restoration of its spawning habitats in the Boyer River. *Can. Manuscript Report of Fisheries and Aquatic Sci.* **0(2057)**: I-VI, 1-56.
- Woynarovich, E. 1962. Hatching of carp-eggs in "Zugger" glasses and breeding of carp larvae until an age of 10 days. *Bamidgeh*, **14**: 38-46.

[C] (mg/L)	N	% moyen des oeufs non collés au fond $\bar{X}(\sigma)^*$	% moyen des oeufs agglutinés (groupes de 2 ou plus)	Nombre moyen des oeufs par agrégat
0	199	0 (0) ^a	0 ^a	
0,05	132	0 (0) ^a	0 ^a	
0,1	156	1 (1) ^a	0 ^a	
0,2	126	8 (7) ^{ab}	0 ^a	
0,4	131	3 (2) ^{ab}	0 ^a	
0,8	161	22 (8)^b	0 ^a	
1,6	162	15 (18) ^{ab}	0,01 ^a	4
3,2	176	57 (18)^c	46 (9)^b	3,9 (2,3)

Tableau 1. Effets d'une formulation de Mexel[®] 432 contenant 20 % d'antigel sur le collage des oeufs de carpe

[C]: concentration nominale en Mexel[®] 432 à 20 % d'antigel. N: effectif total testé sur les 3 répliques. \bar{X} : pourcentage moyen des oeufs non collés. σ : écart-type arrondi à l'entier voisin. ^{a, ab, b, c}: indice de comparaison multiple du test de Tuckey: pour chacun des produits testé, deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5 % si leur exposant comporte une lettre commune. **Caractères gras**: effet significatif par rapport aux embryons incubés dans l'eau synthétique.

[C] (mg/L)	N	% moyen des oeufs agglutinés (groupes de 2 ou plus)	Nombre moyen des oeufs par agrégat
ES	310	0 (0) ^a	0 (0) ^a
EL	159	0 (0) ^a	0 (0) ^a
C/64	264	36 (21)^b	9,3 (3,8)^b
C/16	206	47 (36)^b	7,9 (4,8)^b
C/4	284	51 (9)^b	5,8 (0,9)^b
C	290	58 (16)^b	8,1 (1,6)^b

Tableau 2. Effets d'un lixiviat de cendres de centrale thermique EDF à divers degrés de dilution dans une eau de forage prélevée sur site, sur le collage des oeufs de carpe.

[C]: milieu d'essai. N: effectif total. ES: eau synthétique. EL: eau de forage utilisée comme eau de lavage. C, C/4, C/16, C/64: dilutions du lixiviat de cendres dans l'eau de forage. ^{a, b}: indice de comparaison multiple du test de Tuckey: pour chacun des produits testé, deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5 % si leur exposant comporte une lettre commune. **Caractères gras**: effet significatif par rapport aux embryons et larves incubés dans l'eau synthétique.

[C] (mg/L)	N	% moyen des oeufs agglutinés (groupes de 2 ou plus)	Nombre moyen des oeufs par agrégat
ES	106	21 (36) ^a	nd
C/64	179	36 (22) ^{ab}	5,6 (1,9)
C/16	144	50 (38) ^{ab}	7,8 (5,5)
C/4	126	94 (4)^b	24,3 (18,0)
C	136	97 (3)^b	12,1 (0,3)

Tableau 3. Test de mesure des effets d'un lixiviat de cendres sur le collage des ovocytes de carpe

[C]: milieu d'essai. N: effectif total. ES: eau synthétique. nd: non déterminé. C, C/4, C/16, C/64: dilutions du lixiviat de cendres dans l'eau de forage. ^a, ^{ab}, ^b: indice de comparaison multiple du test de Tuckey: pour chacun des produits testé, deux valeurs d'une même colonne ne sont pas différentes au seuil de 5 % si leur exposant comporte une lettre commune. **Caractères gras**: effet significatif par rapport aux embryons et larves incubés dans l'eau synthétique.

2^e Partie. Etude expérimentale

2. Toxicité du Mexel[®] 432 dans une eau synthétique

2.8. Effets histopathologiques du Mexel[®] 432 sur quelques organes sensibles de la larve de carpe (*Cyprinus carpio*, L.)

2.8. Effets histopathologiques du Mexel[®] 432 sur quelques organes sensibles de la larve de carpe (*Cyprinus carpio* L.)

Latifa Arehmouch*, Pierre Roubaud* et Jean Claude Pihan**

Projet d'une note préliminaire

* GEP, Groupe d'Embryotoxicologie des Poissons, Université Denis Diderot (Paris 7), case 7077, 2 Place Jussieu, 75251 Paris Cedex 05. Tel. 01 44 27 82 25. Fax. 01 44 27 56 53.

** CREUM, Centre de Recherches Ecologiques, 1, rue des Récollets. B.P. 4116. 57040, Metz Cedex 01. Tel. 03 87 74 54 39. Fax. 03 87 37 04 61.

Introduction

Les agents anti-salissures sont utilisés dans les circuits hydrauliques industriels pour empêcher le développement excessif de certaines biosalissures, notamment la moule dressène qui génère des pertes économiques importantes (Khalanski, 1993).

Le choix des traitements anti-salissures est fondé sur la combinaison, difficile à réaliser en pratique, des critères d'efficacité, coût et faisabilité à l'échelle industrielle, mais aussi d'innocuité à court et à long terme pour l'écosystème aquatique (Khalanski, 1993).

Chez les poissons, les xénobiotiques peuvent entraîner des perturbations histologiques dans les organes les plus exposés comme les branchies (Abel, 1974; John et Jayabalan, 1993) ou dans ceux qui représentent les principales voies d'élimination comme le foie et les reins (Srebocan *et al.*, 1992). Aussi, en raison de la grande sensibilité de certains organes et de la rapidité des effets, de nombreux auteurs préconisent-ils l'intégration systématique de l'histologie dans la panoplie de méthodes d'essais pour l'évaluation des risques écotoxicologiques (Bruslé, 1990; Fent et Meier, 1994).

Etant donné ses propriétés anti-salissures et anticorrosion, le Mexel[®] 432 peut compléter ou remplacer des produits traditionnellement utilisés dans ces usages comme le chlore ou les dérivés organostaniques (Khalanski, 1993). De part sa composition, ce produit devrait *a priori* posséder les propriétés toxicologiques générales des tensioactifs, notamment réagir avec les membranes biologiques, soit en modifiant leur perméabilité aux concentrations faibles, soit en

provoquant des lyses cellulaires aux concentrations élevées (Sterzel, 1997).

Une étude histopathologique sur la branchie de la moule dressène (*Dressena polymorpha* Pallas), une des cibles biologiques du Mexel® 432 en eau douce, a montré après 24 heures d'exposition à la plus faible concentration testée (2,5 mg/L), une réaction inflammatoire suivie de l'apparition de lésions de l'épithélium branchial (Giamberini *et al.*, 1993).

Chez la palourde (*Ruditapes decussatus*), un traitement pendant 1 heure par 7 mg/L de Mexel® 432 a pour effet de dénuder la plupart des filaments branchiaux. Les filaments exposés à une concentration de 2 à 7 mg/L durant 4 et 6 heures présentent des altérations plus ou moins poussées de leurs parties apicales et basales: décollement des épithéliums, vacuolisation cytoplasmique et diminution du nombre des mitochondries (Auzoux-Bordenave, 1995).

Chez des cultures de cellules de coeur d'huître *Crassostrea gigas*, le Mexel® 432 altère l'activité des déshydrogénases mitochondriales et, au-delà de 10 mg/L, il provoque une lyse cellulaire généralisée (Coulon, 1993).

Le but de ce travail est de rechercher s'il existe des effets histopathologiques du Mexel® 432 en concentrations sublétales sur certains organes particulièrement exposés chez les larves de poissons: la branchie, l'oeil et l'épithélium olfactif.

Matériel et méthodes

Des larves de carpe commune sont exposées à diverses concentrations en Mexel® 432 pendant des temps d'exposition variés puis préparées pour une observation en microscopie optique et électronique.

Matériel biologique

Les larves de carpe sont produites par des géniteurs de la variété miroir provenant de la pisciculture « Les Alevins de Sologne » (Vignoux sur Baregeon, 18500, France). La production des gamètes, la fécondation, l'incubation, la préparation des solutions, l'exposition des embryons et larves et la mesure des taux de mortalité sont réalisées suivant Jaoul et Roubaud (1982). Le Mexel® 432 provient de la société MEXEL (59481 Haubourdin, France; lot 03/11/95). L'incubation avant exposition a lieu dans une eau synthétique (ISO 7346/3, 1984) à une température de $24,4 \pm 0,7^{\circ}\text{C}$.

Exposition

Des larves âgées de 6 jours (âge compté à partir de la fécondation) sont prélevées de

manière aléatoire dans une population stock et exposées à des concentrations en Mexel® 432 de 2,5 ou 3,5 mg/l pendant des durées d'exposition respectives de 2, 4, 6 et 10 heures ou 1, 2, 4 et 6 heures. Pour la microscopie optique comme pour la microscopie électronique, un effectif de 10 larves est prélevé par concentration et par durée d'exposition testées. Au début de l'exposition, le pourcentage de survie chez les témoins est 72 ± 7 .

L'exposition a lieu dans des incubateurs en polystyrène cristal (OSI-Labo) dans 100 ml de solution. A la fin de l'exposition, les larves vivantes sont fixées pour l'observation microscopique. Elles sont vivantes après observation à l'oeil nu, suivant le critère de la non coagulation du vitellus et des protéines du système nerveux central (OCDE, 1997).

Des larves considérées comme vivantes suivant le même critère et provenant d'une population ayant été exposée à la concentration 1 mg/L pendant 6 jours à partir de la fécondation sont choisies de manière aléatoire et fixées comme précédemment.

Microscopie optique

Pour chaque concentration et durée d'exposition, les larves sont fixées au Bouin-Hollande, déshydratées par l'éthanol et incluses classiquement à la paraffine (Gabe, 1968). Les préparations histologiques sont colorées suivant les techniques: hémalum-éosine (coloration topographique générale), trichrome en un temps de Gabe et Martoja, acide périodique-schiff (APS) et combinaison bleu alcian - APS (Gabe, 1968). Les coupes réalisées au microtome sont observées au microscope optique (Leitz DIALUX 20).

Microscopie électronique

Les larves sont fixées au glutaraldéhyde puis à l'osmium, déshydratées par l'éthanol, incluses dans l'épon, coupées à l'ultramicrotome (coupes semi fines) et observées en microscopie électronique à transmission (microscope JEOL CX 100).

Observations microscopiques

Faute de temps, seul un petit nombre de préparations ont été observées et il n'a pas été procédé à une évaluation quantitative des fréquences d'apparitions des figures considérées comme pathologiques.

Résultats

Une coupe parasagittale chez les témoins, montre que les organes (arcs branchiaux, yeux, ...) présentent un aspect normal (Fig. 1).

Après 2 heures d'exposition à la concentration 2,5 mg/L en Mexel® 432, les cellules de l'axe

du filament branchial (Fig. 2), les chondrocytes (Fig. 3) et les cellules à mucus (Fig. 4) ont un aspect normal. Cependant, des espaces sanguins sont dilatés et certaines hématies présentent une importante vacuole au voisinage du noyau (Fig. 5). Après 4 heures d'exposition, les cellules de l'épithélium branchial montrent un début de désorganisation qui conduit à une nécrose généralisée au bout de 10 heures (Fig. 6).

Après 1 heure d'exposition à la concentration 3,5 mg/L, les branchies et les narines ont un aspect normal, mais les yeux présentent un oedème et la cornée est altérée (Fig. 7 et 8). Après 2 à 4 heures d'exposition, les arcs branchiaux sont gonflés et des nécroses apparaissent au niveau des branchies et des narines (Fig. 9, 10, 11 et 12). Après 6 heures, le tissu branchial est complètement désorganisé, certaines cellules épithéliales montrant des protubérances (Fig. 13) et des figures de nécrose avec gonflement de l'espace périnucléaire (Fig. 14). Des corps myéliniques sont observés dans les chondrocytes (Fig. 15).

Après 6 jours d'exposition continue à partir de la fécondation à la concentration 1 mg/L, les larves présentent un aspect normal au microscope optique. Cependant, en microscopie électronique des protubérances de l'épithélium branchial (Fig. 16) sont observés ainsi que des cellules à pseudopodes (Fig. 17) ou des cellules arrondies (Fig. 18).

Discussion

Chez les poissons téléostéens comme la carpe, les branchies sont constituées de 4 paires d'arcs branchiaux portant chacun une série de filaments branchiaux limités par un épithélium simple formé de cellules très aplaties (Fig. 1).

Chez les poissons, les altérations des organes de l'olfaction, de la respiration et de la vision sont les plus souvent étudiées parmi les effets toxiques (souvent réversibles) des tensioactifs en concentrations sublétales (Lewis, 1991; Misra *et al.*, 1985, 1987; Fent et Meier, 1994).

Nos résultats sur les larves de carpe exposées au Mexel® 432 montrent la sensibilité des critères histopathologiques portant sur ces organes. Lors de nos essais, toutes les larves prélevées pour les fixations histo et cytologiques étaient vivantes suivant le critère de la non observation à l'oeil nu des taches blanchâtres liées à la non coagulation du vitellus et des tissus nerveux centraux. Cependant, la validité de ce critère peut être discutée en particulier après des expositions de courtes durées. En effet, chez le tête de boule (*Pimephales promelas*), la CL₅₀ (96 h) en exposition continue est comprise entre 0,28 et 0,36 mg/L, alors que la CL₅₀ (96 h) en exposition journalière de 5 min est de 13 mg/L (données communiqués par la société MEXEL). Chez la carpe, des CL₅₀ (24 h) proches de 1,5 mg/L ont été mesurées et aucun effet

létal différé n'a été observé après la fin des traitements (Cf. 2^e Partie, § 2.1.). Le caractère sublétal des effets histopathologiques observés sur la larve de carpe, devrait être confirmé. Par ailleurs, les animaux prélevés après exposition de 6 jours depuis la fécondation à une concentration en Mexel® 432 de 1 mg/L appartenaient à une population où le taux de survie moyen n'était que 7,5 % et chutait à 0 % après 1 jour supplémentaire d'exposition. Pour la population, les effets observés doivent donc être considérés non comme véritablement sublétaux, mais comme "paralétaux" et probablement "prélétaux". Cependant, les altérations dues au Mexel® 432 sont très limitées et il n'est pas exclu que ces animaux auraient pu survivre une fois replacés en eau pure (effets réversibles).

Par contre, après 6 heures d'exposition à la concentration 3,5 mg/L, la désorganisation complète du tissu branchial témoigne peut être d'une situation prélétales irréversible.

Faute d'une analyse quantitative, les figures histopathologiques observées notamment aux doses faibles ne peuvent être considérées définitivement comme caractéristiques des effets du Mexel® 432.

L'observation histologique et cytologique met en évidence le niveau de sensibilité des branchies, de la narine et de l'oeil des larves de carpe. Une concentration de 2,5 mg/L durant 2 heures provoque des altérations visibles de la branchie comme une dilatation des espaces sanguins et une vacuolisation de certaines hématies. Ceci suggère une perturbation de la fonction respiratoire alors que les cellules de l'axe du filament branchial et les chondrocytes conservent un aspect normal (Fig. 5, 2 et 3). Au niveau des filaments branchiaux, des cellules à mucus ont un aspect normal (Fig. 4). Leur présence intacte pourrait expliquer l'absence d'altérations du tissu branchial et des chondrocytes, le mucus ayant pu protéger la branchie contre l'action du Mexel® 432. Un rôle protecteur de la couche de mucus a été invoqué pour expliquer l'existence d'effets en tout ou rien lors d'exposition au Mexel® 432 (Cf. 2^e Partie, § 2.1.). Chez les poissons, l'exposition à différents xénobiotiques détergents ou métaux lourds montre une augmentation de l'activité ou du nombre des cellules à mucus (Abel, 1974; Kozaric *et al.*, 1992; Stouthart *et al.*, 1995). Ces observations pourraient conduire à une réponse adaptative ou à un rôle protecteur par les couches de mucus.

Après traitement au Mexel® 432, la présence dans l'épithélium branchial de cellules arrondies ou à pseudopodes pourrait être due aux propriétés tensioactives de ce produit. Dans l'oeuf de carpe en segmentation, le Mexel® 432 provoque une augmentation apparente de la vitesse de clivage pouvant être attribuée à un artefact d'observation, le Mexel® 432 modifiant la

forme des cellules et permettant ainsi une observation plus précoce des sillons de segmentation (Ghillebaert, 1996). D'autres xénobiotiques provoquent également des réactions inflammatoires notamment des dilatations des espaces intercellulaires branchiaux (Giamberini *et al.*, 1993).

Dans les conditions d'utilisation, l'évaluation de la toxicité potentielle du Mexel® 432 pour l'environnement doit tenir compte du caractère discontinu du traitement, en effet ce produit est appliqué en traitements journaliers durant 15 à 40 minutes. L'observation d'effets histo et cytopathologiques après un seul traitement de 2 heures à la concentration 2,5 mg/L devrait être confirmé pour l'évaluation des effets écotoxicologiques du Mexel® 432.

Références

- Abel, P.D. 1974. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *J. Fish Biol.* 6: 279-298.
- Arehmouch, L., Ghillebaert, F., Chaillou, C. and Roubaud, P. Lethal effects of Mexel®, an antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development. Soumis.
- Auzoux-Bordenave, S. 1995. La branchie de palourde *Ruditapes decussatus* (mollusque, bivalve): un modèle expérimental en pathologie et en écotoxicologie marine. Thèse de doctorat, Muséum d'Histoire Naturelle, Paris. 200 pages.
- Bruslé, J. 1990. Intérêt des critères anatomo-histo-cyto et physio-pathologiques pour la compréhension des effets des produits phytosanitaires sur la reproduction des Vertébrés. *Ann. A.N.P.P.* 2: 137-152.
- Coulon, I. 1993. Mise au point d'un système contrôlé de culture de cellules de coeur d'huître *Crassostrea gigas*. Application au test de la toxicité des produits chimiques en milieu aquatique. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris Grignon. 249 pages.
- Fent, K. and Meier, W. 1994. Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: 224-231.
- Gabe, M. 1968. Techniques histologiques. Masson Ed. 1113 pages
- Ghillebaert, F. 1996. Le développement précoce des Poissons en écotoxicologie. Exemple: la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): -Importance des facteurs environnementaux et de leurs interactions, - Diversification des critères de toxicité. Thèse de doctorat. Université de Metz, Metz, France. 107 pages.

- Giamberini, L., Guerold, F., Beauvais, M.A., et Pihan, J.C. 1993. Etude histopathologique de la branchie de *Dreissena polymorpha* Pallas exposée à un nouveau mollusquicide organique. *Hydroécol. Appl.* **5**: 61-70.
- ISO 7346/3. 1984. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1e éd. Ref. n°: ISO 7346/3.
- Jaoul, A. et P. Roubaud. 1982. Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**: 3409-3419.
- John, K.R. and Jayabalan, N. 1993. Sublethal effects of endosulfan on the histology and protein pattern of *Cyprinus carpio* gill. *J. Appl. Ichthyol.* **9**: 49-56.
- Khalanski, M. 1993. Expérimentation de cinq méthodes contre le développement des moules zébrées dans les circuits de centrales thermiques sur la Moselle. Rapport EDF/DER, 93NV00030, 22 pages.
- Kozaric, Z., Novak, R. and Srebocan, E. 1992. Effect of cadmium on histological and histochemical characteristics of skin in the carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinarski Arhiv.* **62**: 179-186.
- Lewis, M.A. 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Wat. Res.* **25**: 101-113.
- OCDE. 1997. Poissons, essais de toxicité à court terme au stade de l'embryon et de l'alevin, ligne directrice de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. **212**. 18 pages.
- Soivio, A.; Nikunen, E. and Tuurala, H. 1988. Acute response to sodium hypochlorite in rainbow trout acclimatized to pulp and paper mill effluents. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*. **13**: 77-88.
- Srebocan, E., Kozaric, Z., Pompe-Gotal, J., Kezic, N. and Novak, R. 1992. Cadmium distribution and its influence on the histological and histochemical characteristics of the carp liver and kidney. *Veterinarski Arhiv.* **62**: 99-109.
- Sterzel, W. 1997. Toxicology of surfactants used in cosmetics in Surfactants in cosmetics. *Surf. Sci. ser.* Marcel Dekker, Inc, New York. **68**: 557-571.
- Stouthart, A.J.H.X.; Spanings, F.A.T.; Lock, R.A.C. and Wendelaar-Bonga, S.E. 1995. Effects of water pH on chromium toxicity to early life stages of the common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol. (Amst.)*. **32**: 31-42.

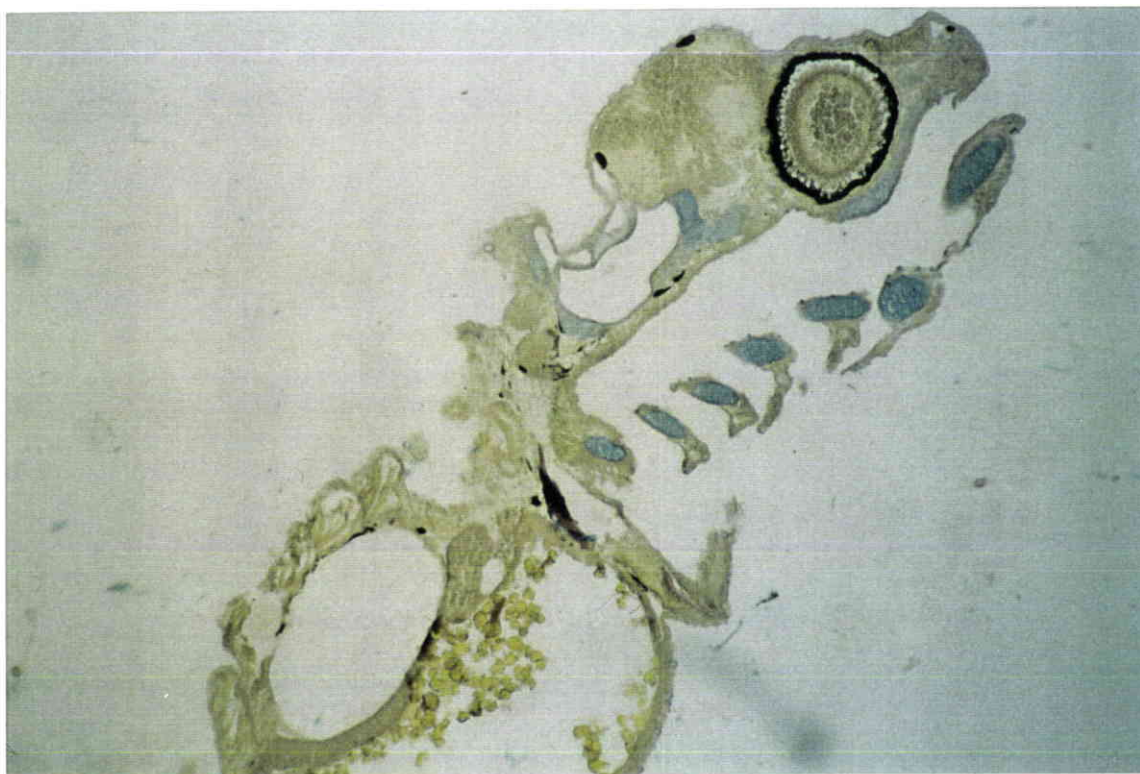


Figure 1. Coupe parasagittale d'une larve de carpe témoin montrant le cerveau, l'oeil, les branchies avec le mucus et le vitellus; microscopie optique x 160.

Planche 1. Ultrastructure de la branchie de la larve de carpe exposée au Mexel® 432

(Figures 2 à 6)

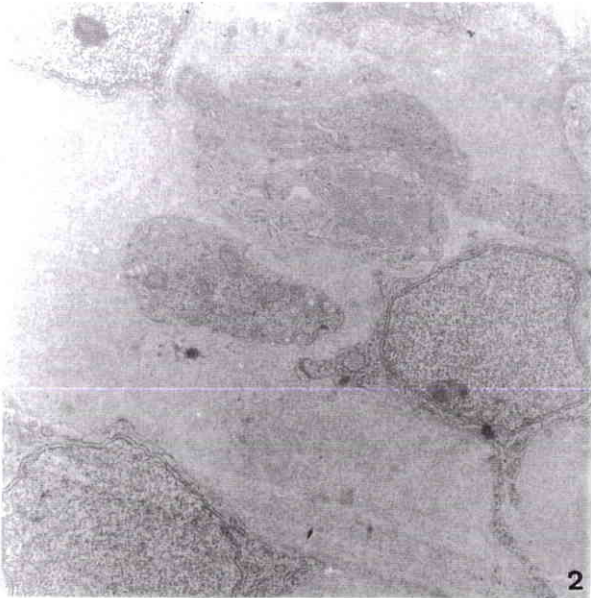
Figure 2. Aspect normal des cellules de l'axe du filament branchial chez des larves exposées à 2,5 mg/L durant 2 heures; microscopie électronique x 5000.

Figure 3. Chondrocytes présentant un aspect normal chez des larves exposées à 2,5 mg/L durant 2 heures; microscopie électronique x 4000.

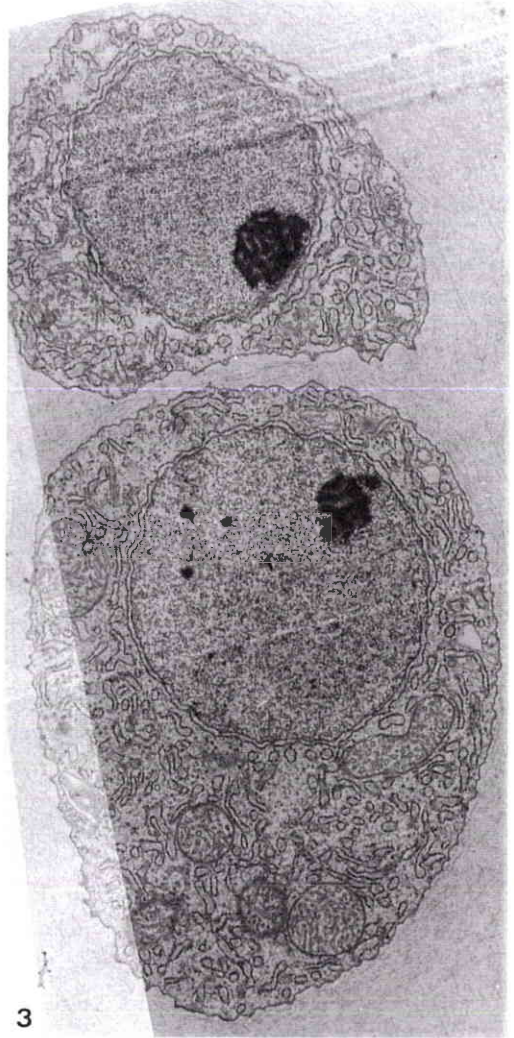
Figure 4. Aspect normal des cellules à mucus sur un filament branchial chez des larves exposées à 2,5 mg/L durant 2 heures; microscopie électronique x 7500.

Figure 5. Filament branchial présentant des hématies vacuolisées chez des larves exposées à 2,5 mg/L durant 2 heures; microscopie électronique x 4000.

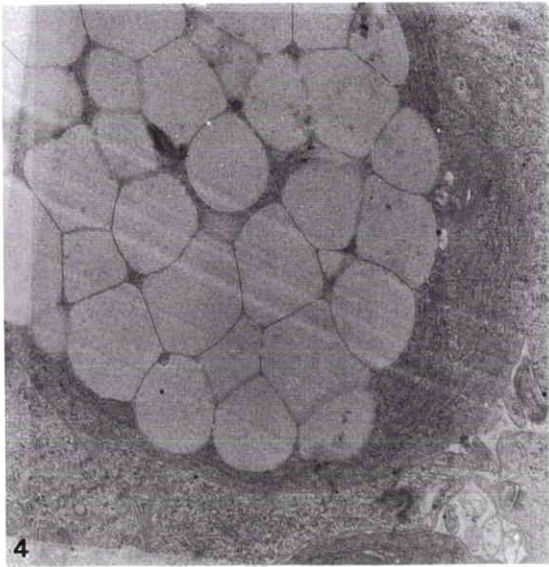
Figure 6. Cellules de l'épithélium branchial nécrosées chez des larves exposées à 2,5 mg/L durant 10 heures; microscopie électronique x 5000.



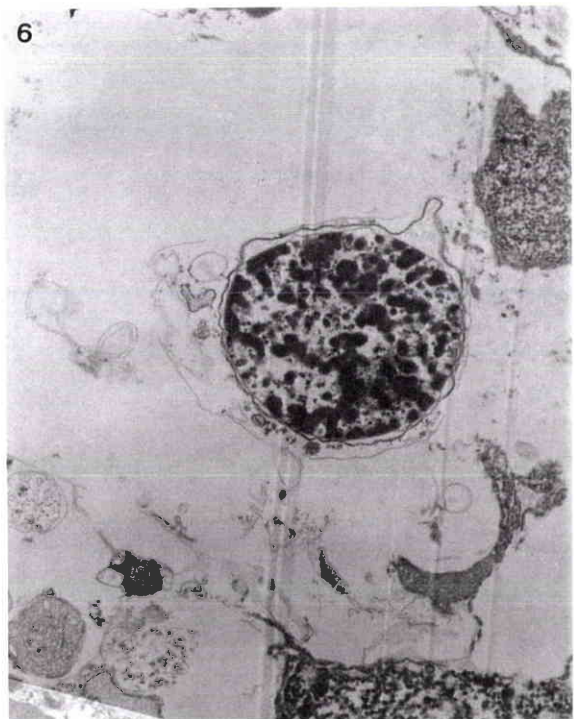
2



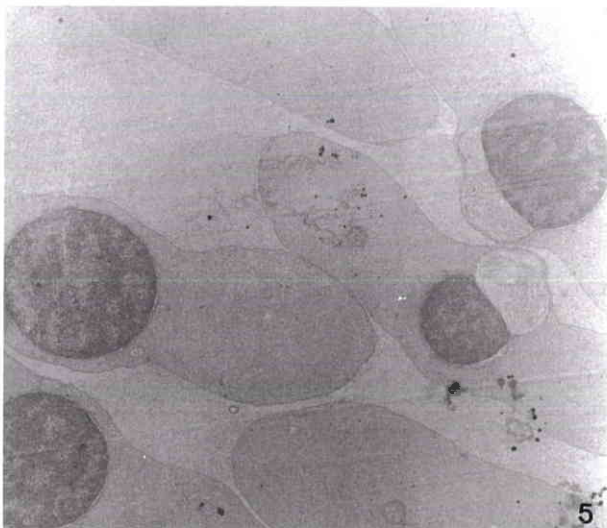
3



4



6



5

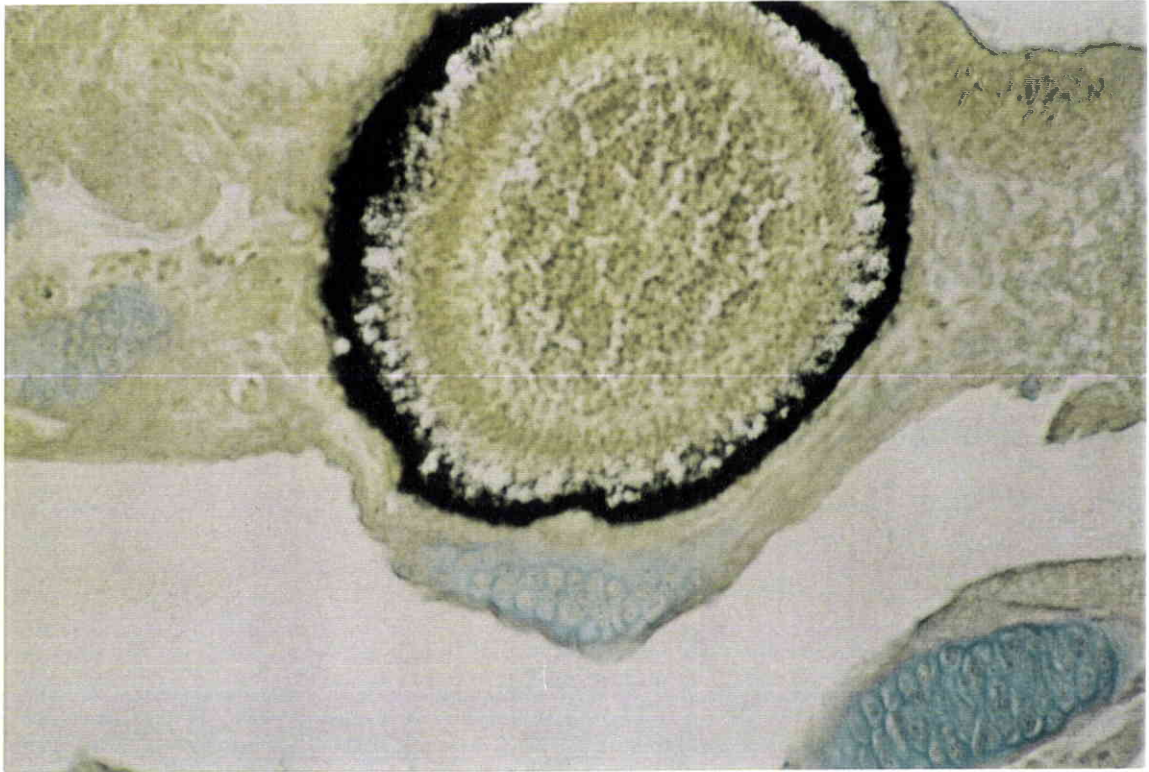


Figure 7. Aspect normal de l'oeil de la larve de carpe non exposée au Mexel® 432; microscopie optique x 250.

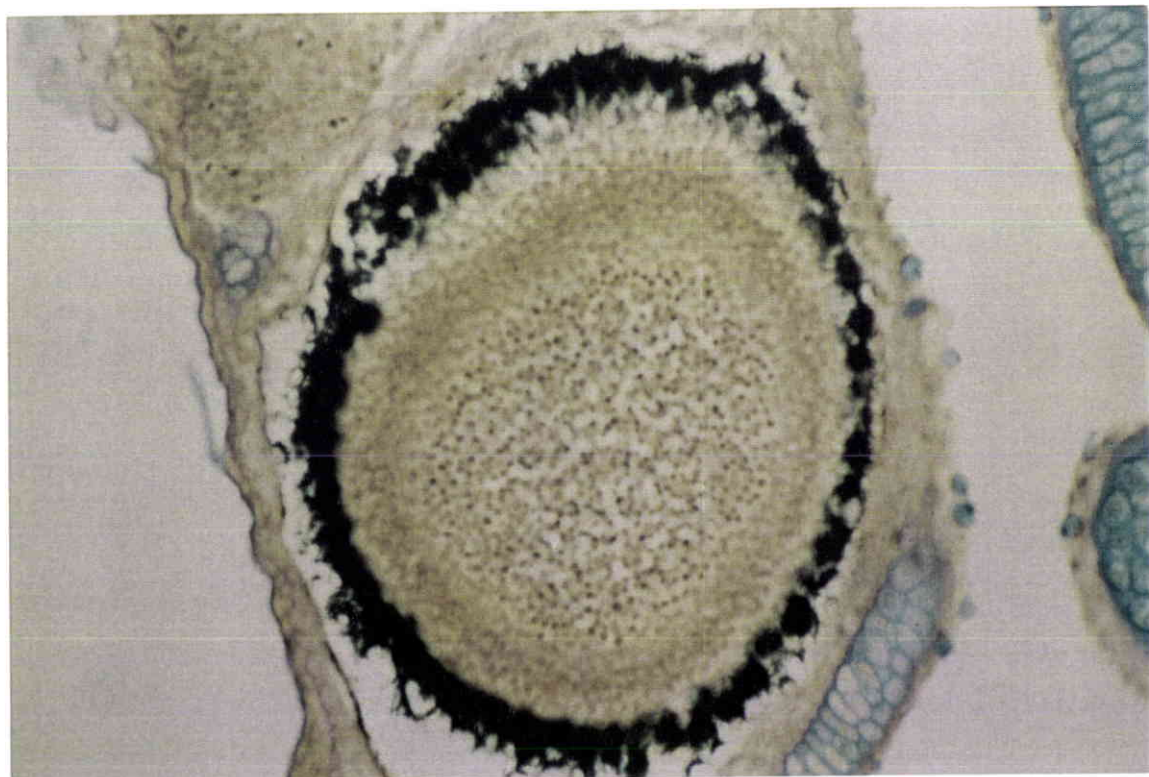


Figure 8. Oedème oculaire et cornée altérée chez des larves carpe exposées à 3,5 mg/L en Mexel® 432 durant 1 heure; microscopie optique x 250.

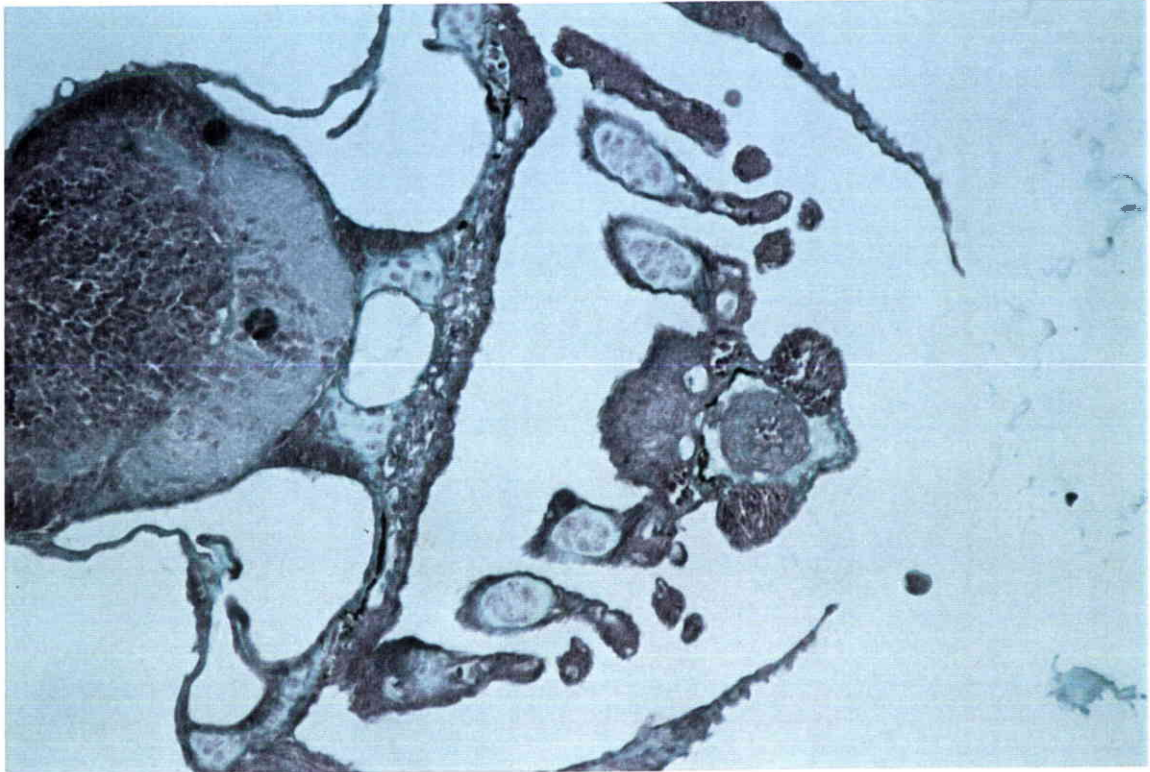


Figure 9. Aspect normal de la branchie de la larve de carpe non exposée au Mexel[®] 432; microscopie optique x 160.

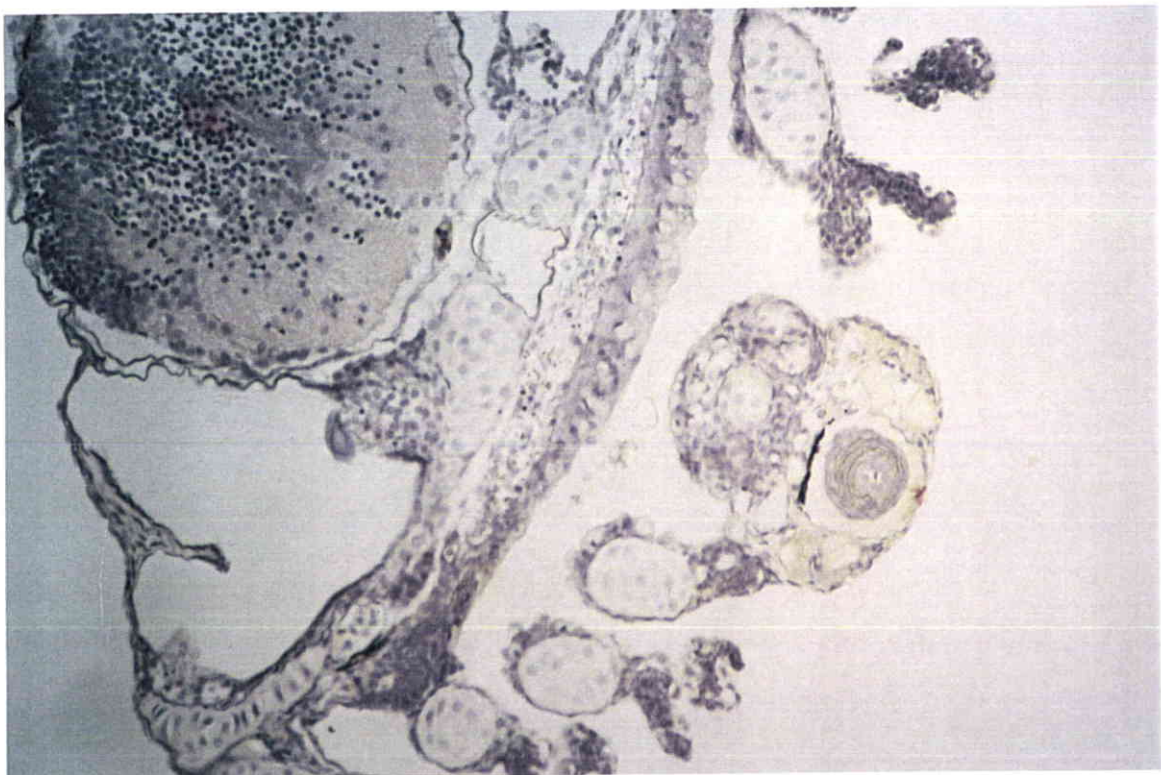


Figure 10. Arcs branchiaux gonflés chez des larves carpe exposées à 3,5 mg/L en Mexel[®] 432 durant 2 heures; microscopie optique x 160.

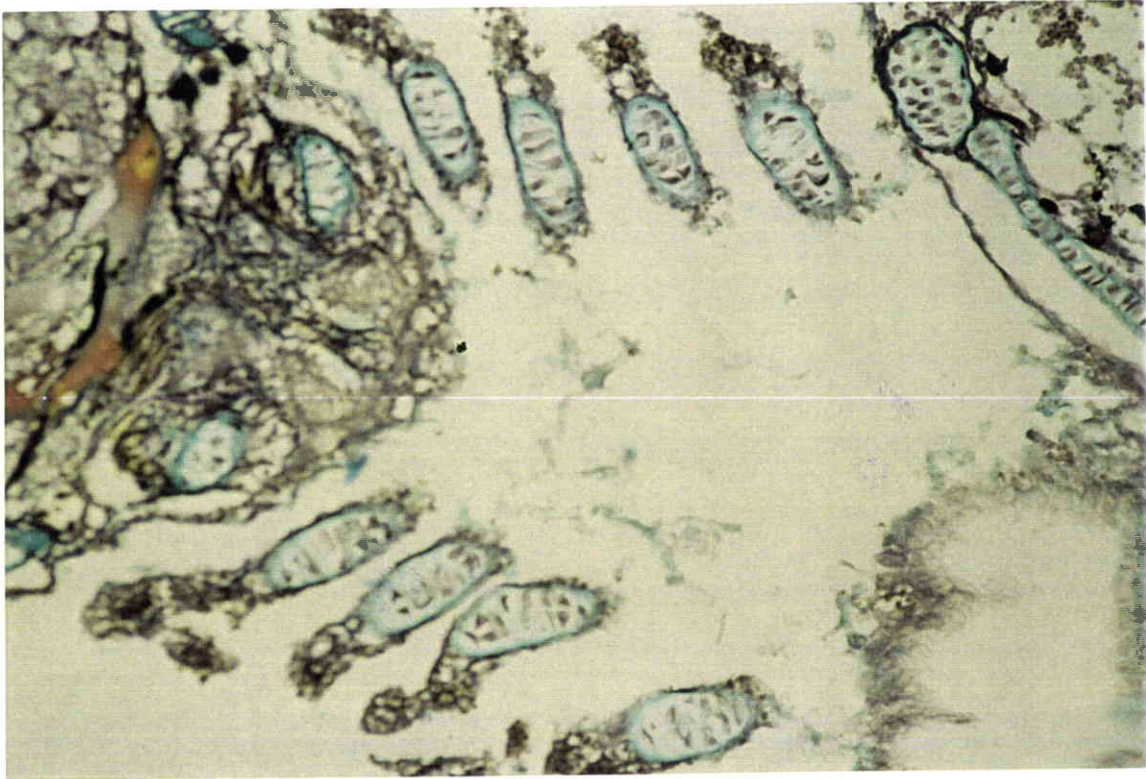


Figure 11. Branchies nécrosées chez des larves de carpe exposées à 3,5 mg/L en Mexel[®] 432 durant 4 heures; microscopie optique x 160.

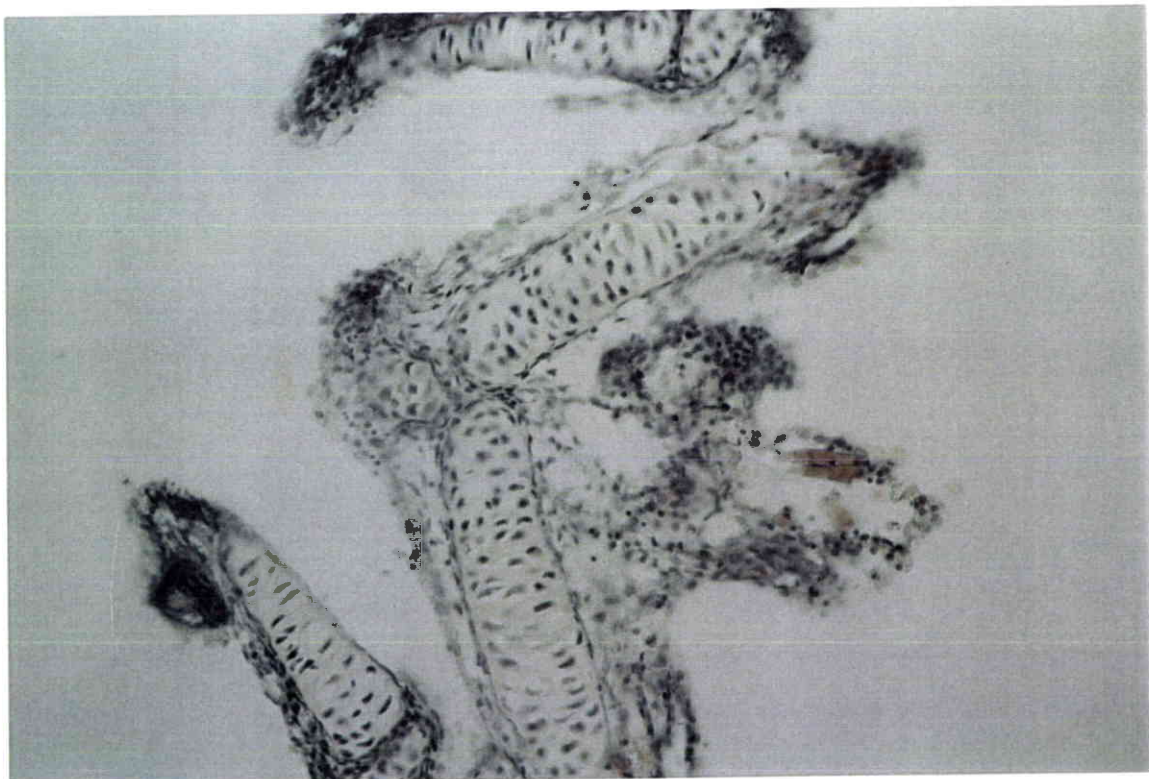


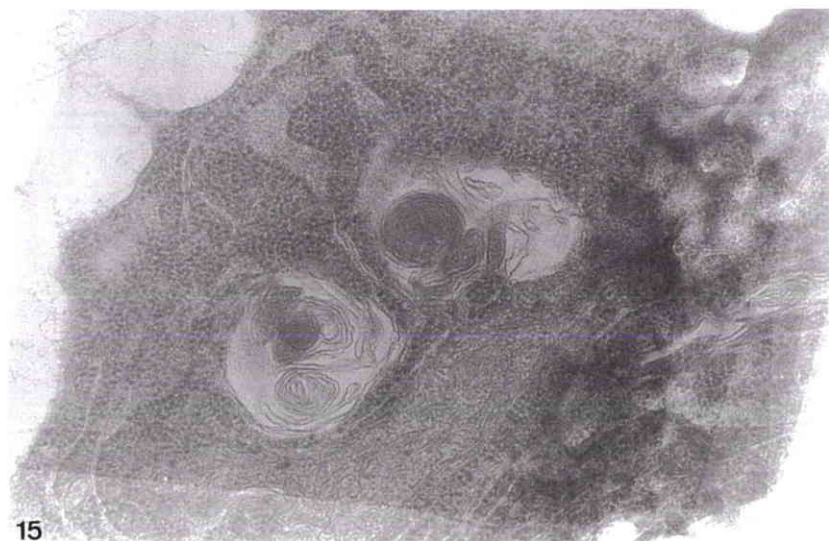
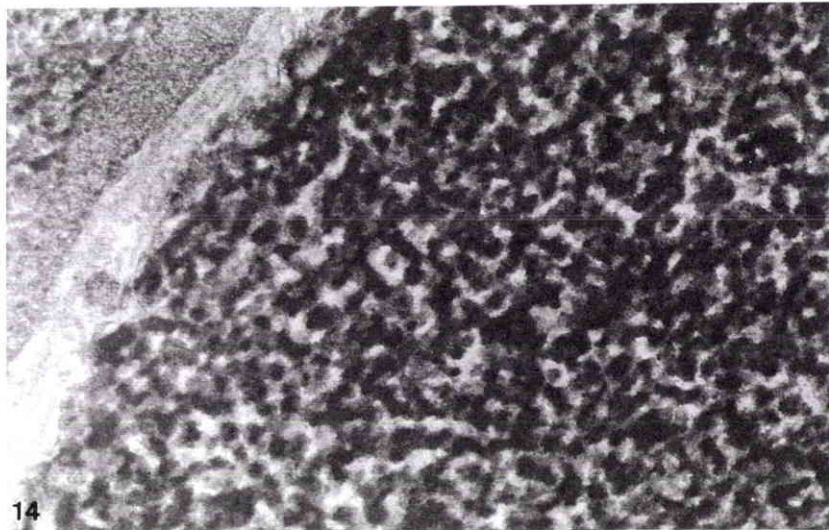
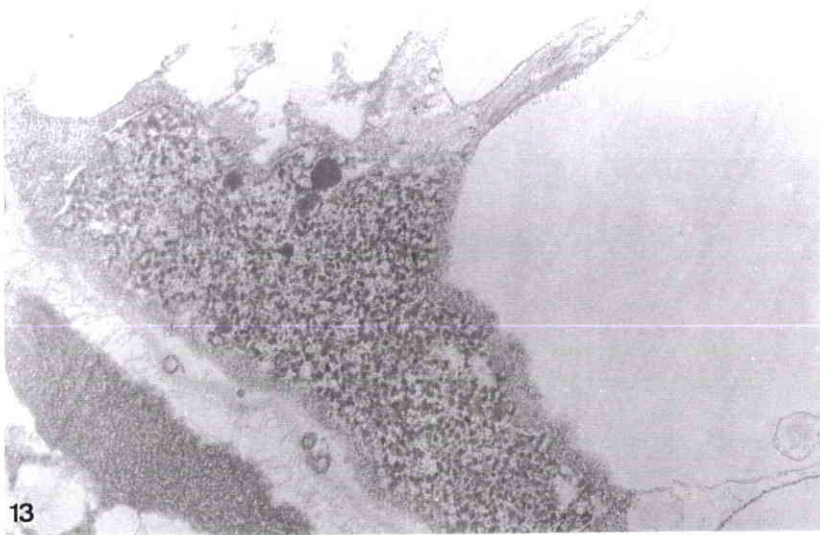
Figure 12. Narine nécrosée chez des larves carpe exposées à 3,5 mg/L en Mexel[®] 432 durant 4 heures; microscopie optique x 160.

**Planche 2. Ultrastructure de la branchie de la larve de carpe exposée au Mexel® 432
(Figures 13, 14 et 15)**

Figure 13. Cellules épithéliales branchiales présentant des protubérances chez des larves exposées à 3,5 mg/L durant 6 heures; microscopie électronique x 10000.

Figure 14. Cellules épithéliales branchiales présentant un gonflement de l'espace périnucléaire chez des larves exposées à 3,5 mg/L durant 6 heures; microscopie électronique x 20000.

Figure 15. Chondrocytes présentant des corps myéliniques chez des larves exposées à 3,5 mg/L durant 6 heures; microscopie électronique x 20000.

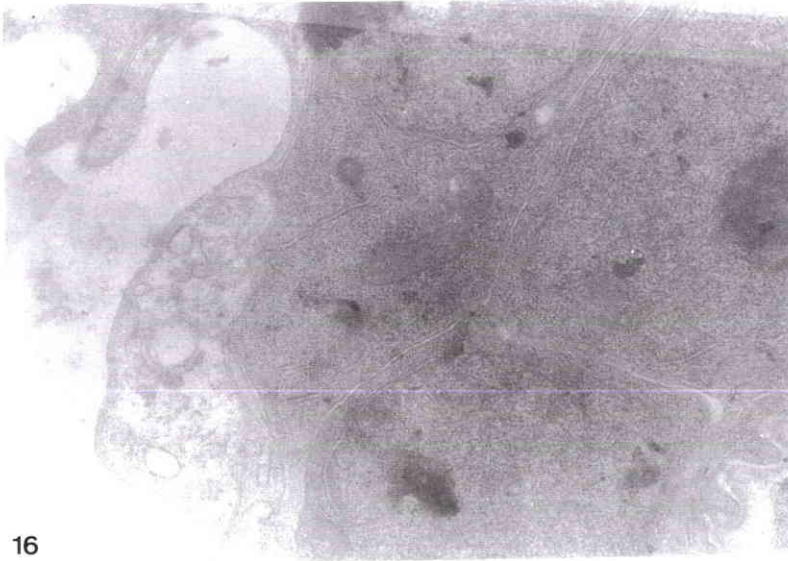


**Planche 3. Ultrastructure de la branchie de la larve de carpe exposée au Mexel[®] 432
(Figures 16, 17 et 18)**

Figure 16. Cellules épithéliales branchiales présentant des protubérances chez des larves exposées à 1 mg/L durant 6 jours; microscopie électronique x 10000.

Figure 17. Cellules épithéliales branchiales présentant des pseudopodes chez des larves exposées à 1 mg/L durant 6 jours; microscopie électronique x 7500.

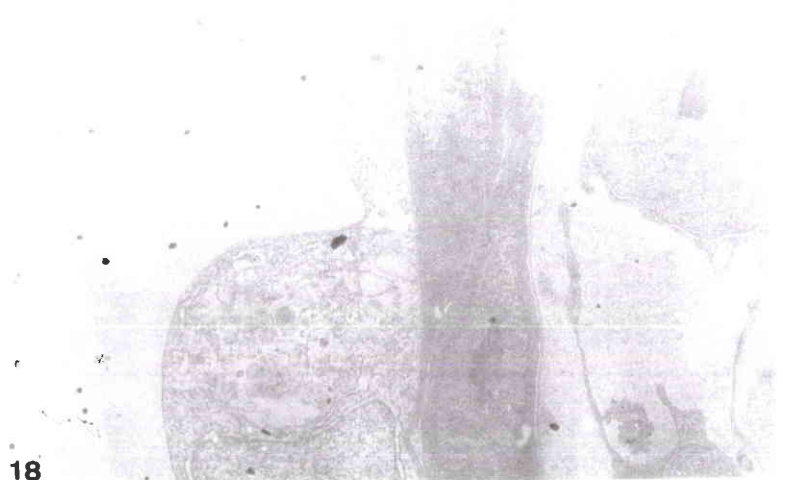
Figure 18. Epithélium branchial présentant des cellules arrondies chez des larves exposées à 1 mg/L durant 6 jours; microscopie électronique x 5000.



16



17



18

2^e Partie. Etude expérimentale

Effets létaux du Mexel[®] 432 dans des eaux naturelles

Toxicité du Mexel[®] 432 dans des eaux de rivière et dans des conditions physico-chimiques variées en eau synthétique (*Environ. Toxicol. Chem.* sous presse)

3^e Partie. Toxicité du Mexel[®] dans des eaux de rivière et dans des conditions physico-chimiques variées en eau synthétique (*Environ. Toxicol. Chem.* sous presse)

Running head: **Lethal effects of Mexel[®] on common carp embryos and larvae**

Name: **Latifa AREHMOUCH**

Address: Groupe d'Embryotoxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire; Université Denis Diderot (Paris 7); case 7077; 2, Place Jussieu; 75251 Paris Cedex 05.

Total number of words in text: 4737

Total number of words in references: 1054

Total number of words in tables: 266

Total number of words in figures: 139

Lethal effects of Mexel[®], an antifouling agent, on common carp embryolarval stages, in river waters and under various physico-chemical conditions in laboratory water

Latifa AREHMOUCH, Valérie TFIBEL, Catherine CHAILLOU

François GHILLEBAERT and Pierre ROUBAUD

Groupe d'Embryotoxicologie des Poissons du Laboratoire de Cytophysiologie et Toxicologie Cellulaire, Université Denis Diderot (Paris 7); case 7077; 2, Place Jussieu; 75251 Paris Cedex 05.

ABSTRACT

Lethal effects of Mexel[®], an antifouling agent for industrial water, were tested in the laboratory on common carp embryolarval stages in waters from the Moselle and Seine rivers.

Diluting Mexel[®] in river water resulted in the disappearance of its lethal effects within a few days. In freshly prepared 10 mg/L solutions, 100 % mortality were attained after a few hours in laboratory water, compared to 96 hours in Seine river water. No lethal effect was observed after exposure during seven days in a freshly prepared 50 mg/L solution in Moselle river water or in a two-day-old 10 mg/L solution in Seine river water.

Mexel[®] toxicity inhibition by river waters was not due to calcium concentration, temperature or pH, since these factors had negligible influence on Mexel[®] lethality in laboratory water in the respective ranges of 0.8 to 800 mg/L, 15 to 24°C and 6.9 to 9.0. Aldrich humic acids immediately suppressed Mexel[®] lethality with an apparent ratio of 1-2 mg of Mexel[®] per mg of Aldrich humic acids. Clays and Aldrich humic acids immediately reduced Mexel[®] concentration in semiquantitative dosage after complexation by methyl-orange in an acidic medium and extraction in dichloroethane.

Key words: antifouling, embryolarval toxicity test, fish, Mexel[®], humic acids.

INTRODUCTION

Various types of fouling agents have been quantitatively and qualitatively listed: systematic groups (algae, annelids, bacteria, bryozoans, mollusks, ...), communities structures, attachment and reproductive processes, intra and interspecific interactions, etc. Various sites were inspected: cooling circuit of power stations [1, 2], oil platforms [3], harbors or estuarine areas [4, 5], ships [6], oyster culture installations where fouling induces significant mortalities [7], etc.

The settlement, distribution, and succession of fouling communities are influenced by various physico-chemical parameters, including temperature, salinity, turbulence, light, ambient nutrient levels and resultant predator characteristics, nature of substratum [8-12], etc.

In consequence, control of biofouling requires the definition of methods adapted to the diversity of the environmental situations where the fouling is likely to be found. Besides mechanical cleaning, the principal methods to control fouling are chemical treatments, typically by chlorine or tin and copper compounds. These treatments have the disadvantage of disturbing or impairing the normal development of non-target organisms [13, 14].

Recently, Mexel[®] has been developed and increasingly commercialized as an alternative or complementary antifouling agent. It is based on fatty-amines, but its exact chemical composition is not published. Fatty-amines have been used in a large variety of applications, including film-forming corrosion inhibitors [15], antirust and antimicrobial additives in water treatment [16], or pesticide adjuvants [17]. Particular fatty-amines have been directly tested against nematodes or trematodes [18]. In mammalian cells, xenobiotic or endogenous aliphatic amines may degrade into toxic metabolites [19]. Degradation in water may be complete in the presence of composite bacterial communities, but incomplete degradation may result in the formation of toxic products [20].

Some data on Mexel[®] toxicity on the major macrofouler in freshwaters i.e., the mussel *Dreissena polymorpha* Pallas are available in literature [21, 22]. However, no information is available on the toxic effects of Mexel[®] on non-target organisms like fish. The common carp is one of the species recommended for early life standardized toxicity tests in freshwater fish [23]. It has been chosen for its practical advantages and its environmental representativeness [24].

In previous work (unpublished data), we showed that the toxicity of the Mexel[®] solutions on embryolarval development of common carp is significant in laboratory freshwater, particularly after prolonged continuous exposure. For example, after exposure during 11 days beginning at fertilization, the no-observed-effect-concentration (NOEC_{11days}), was less than 0.25 mg/L.

In this study, we tested in the laboratory the lethal effects of the Mexel[®] on common carp eggs and larvae. Seven biological tests were executed during two years, using six different spawns.

1) In the first tests, compared to laboratory water, we studied the lethal effects of the Mexel[®] in river water.

2) In order to interpret the results of these tests, we observed :

- the influence of calcium concentration, temperature, pH, and Aldrich humic acids on the Mexel[®] toxicity in laboratory water.

- the effects of clays and Aldrich humic acids on Mexel[®] solutions.

MATERIALS AND METHODS

Biological reagent

Common carp (*Cyprinus carpio* L) breeders were obtained from the fish farm « Les Alevins de Sologne » (Vignoux sur Barengeon, 18500 FRANCE).

Production of gametes by thermal and hormonal treatment of the parents (males and females) was carried out according to Jaoul and Roubaud [25] : maintenance of the breeders in cold water (less than 10°C) from autumn to the period of the test, followed by one or two weeks at 20°C with two injections of carp hypophysis extracts under a 13 hr light / 11 hr dark photoperiod.

Artificial fertilization and incubation were performed according to Ghillebaert et al. [26]: approximately 50 oocytes were dispersed with 10 µl of sperm in 20 ml of the test solution on the bottom of the incubator. About 20 min after fertilization, the excess sperm was washed out with the test solution, and the fertilized oocytes which had stuck to the bottom of the incubators were covered with the same solution. Incubators were placed on an oscillating table (10 oscillations / min). After hatching, the incubators were rinsed with the test solution to

eliminate chorion fragments and dead eggs and larvae. The larval incubation was performed without feeding.

In controls, at 24°C in our experimental conditions, egg cleavage and epiboly occurred during the first day of incubation and hatching occurred during the third day. The larval survival rates remained stable at least during seven days. At 15°C, hatching occurred after eleven days and the physiological development rate was approximately reduced by a factor of three (unpublished data).

Mexel® solutions (Tables 1, 2 and 4)

Mexel® was provided by the MEXEL company, (59481 Haubourdin, France; batches n° 01/10/92 in test 2 and 03/11/95 in the other biological tests and the dosages). It was kept in darkness and in room temperature until use. The dilution waters were river waters and standard or modified ISO waters [27]. The calcium concentration in the laboratory ISO water was 80 mg/L. The test solutions were renewed daily after measurement of the temperature, pH and oxygen concentration in each incubator.

Conditions of the tests in river waters (Tables 1 and 2, Fig. 1)

Seine and Moselle river waters were sampled into 20 liter polyethylene cans, just upstream of the electric power stations of EDF (électricité de France), in Cattenom (57570, France) and Nogent (10400, France) respectively. Water was carried to the laboratory and was kept in darkness at 15°C during eight days before the beginning of the tests.

In the test 1, two liters of a 10 mg/L nominal concentration Mexel® solution in the Seine river water were prepared in advance successively each day so as to insure aging durations of one hour and one, two and four days at the moment of use i.e., the daily renewal of the exposure media. Controls in a Seine river water and laboratory water were also prepared.

In the test 2 A, solutions of various Mexel® initial concentrations in a Moselle river water were aged during eight days before starting of the experiment, i. e. they continued to age until the end of the test. In the test 2 B, a 10 mg/L Mexel® stock solution in laboratory water was aged eight to fifteen days and was diluted to 1 mg/L in Moselle river water at the time of use, i.e., just before the daily renewal of the solutions.

In the test 2 C, the Mexel concentrations were in a geometric progression ratio of 1/2.

Conditions of the tests in laboratory ISO water (Tables 1 and 3 to 5)

Calcium concentrations in standard or modified ISO waters (tests 3 and 4) were realized with $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (Prolabo).

In the test 4, solutions buffered at pH 6.9, 7.8 and 9.0 were prepared by adding 10 mM of a pH buffer (SIGMA), respectively MOPSO (3-[N-morpholino]-2-hydroxy-propanesulfonic acid), POPSO (piperazine- $\text{N}_2\text{N}'$ -bis-[2-hydroxy-propanesulfonic acid]) and AMPSO (3-[(1,1-dimethyl-2-hydroxymethyl)amino]-2-hydroxy-propane-sulfonic acid). The pH levels of the dilution solutions were adjusted by NaOH.

In the tests 5 A and 5 B, the physiological ages of the larvae at the beginning of exposure were almost identical. In the test 5 A, the incubators containing the larvae were transferred eight hours before exposure to a thermo-controlled room at 15°C.

In the test 6, the physiological age of the larvae at the beginning of exposure was approximately the age of 5-day-old larvae incubated at 24°C.

In the test 7, the Aldrich humic acids were technical Aldrich humic acids, batch n° 0201816. In the test 7A, the Aldrich humic acids were introduced at the concentration 50 mg/L just before exposure into a 10 mg/L Mexel[®] solution which was previously aged during one hour or one, three, five or seven days. In the test 7 B, the same concentration of Aldrich humic acids was introduced before exposure into freshly prepared solutions of Mexel[®]. The physiological age of the larvae at the beginning of exposure was approximately the age of six or seven-day-old larvae incubated at 24°C.

In the tests 7 (B, C, D), incubation before exposure was performed at $24.4^\circ\text{C} \pm 1.4$ from fertilization to hatching and then $15^\circ\text{C} \pm 1$ until exposure.

Except in the tests 7 A and 7 C, the Mexel concentrations were in a geometric progression ratio of 1/2.

Lethal effects measurements

The toxicity of the Mexel[®] was measured by its lethal effects. Dead embryos and larvae were characterized by yolk coagulation and an opaque blank color of the central nervous

system [23, 25]. In the tests 1 to 4, the total number of eggs (N) was determined in each incubator at the end of the first day of incubation. In the tests 5, 6 and 7, a known number of larvae (N) was introduced into each incubator one or two hours before the beginning of the experiment (N=45 in tests 5 and 6; N=60 in test 7). The number (L) of the surviving embryos and larvae was counted before the daily renewal of the test solutions. The survival rates were then calculated by the ratio $(L / N) \times 100$. Every test was realized in triplicate.

Semiquantitative estimation of Mexel[®] concentration

The method for Mexel[®] semiquantitative estimation was adapted from Wang and Langley [28] and Allonier (personal communication): in an acidic medium, the basic fatty-amines of the Mexel[®] are ionized and form with the acidic dye methyl-orange, hydrophobic colored complexes which are extracted by dichloroethane and quantified by colorimetry (Fig. 2 and 3).

Forty milliliters of the test solution were taken into a polypropylene graduated syringe (Polylabo) with successively:

- 4 ml of pH 3.75 acetic acid - acetate buffer, in presence of a high concentration of KCl to enhance hydrophilicity (acetic acid: 300 ml, sodium acetate: 70 g, KCl: 125 g, brought to 1 liter with deionized water),
- 4 ml of a 0.4 g/L methyl-orange commercial aqueous solution (Prolabo),
- 8 ml of dichloro 1, 2 -ethane (99 % H.P.), noted DCE (Prolabo),
- 4 ml of air, which favors mixing by 1 minute vigorous manual shaking.

After decantation in the syringe, the organic phase was transferred to a 25 ml volumetric flask, avoiding transfer of the interface zone between aqueous medium and DCE. These operations of extraction were repeated three times with 8 ml of DCE, each time in the same syringe containing the aqueous medium. The extracted volume, collected in the volumetric flask, was adjusted to 25 ml with DCE. The solution volume necessary for spectrophotometric measurement (1 cm optic travel-spectrophotometer Shimadzu UV240) was then centrifuged for five minutes at 12,000 g (EPENDORF Centrifuge 5414). In the absence of a calibration curve, this method was only used as a semiquantitative method.

Effects of Aldrich humic acids or various clays on Mexel[®] solutions in laboratory water

The tests were realized with Aldrich humic acids, kaolinite (Prolabo, reference 24926, 1995), green clay (ARGILETZ S.A., 77290 Mitry Mory, France) and bentonite (Prolabo, reference 21794, 1995).

Tested solutions contained 50 mg/L of Mexel[®] and 35 g/L of KCl in deionized water, either alone (Mx50), or in the presence of various concentrations of Aldrich humic acids (HA) (Fig. 2 and 3), or 50 mg/L of kaolinite (K), bentonite (B), green clay (Gc) (Fig. 3). The solutions were noted Mx-HA (50-3.12), ..., Mx-HA (50-50), Mx-K (50-50), Mx-B (50-50) and Mx-Gc (50-50). The first value in brackets refers to the concentration of Mexel[®] (mg/L) and the second value refers to the concentration of Aldrich humic acids or suspended mineral matter. For example, Mx-HA (50-6.25) refers to a test solution containing 50 mg/L of Mexel[®] and 6.25 mg/L of Aldrich humic acids. The tests with mineral matters in suspension were performed without replicate and those with Aldrich humic acids in triplicate.

Statistical analysis

Biological data were treated at 5 % risk by analysis of variance [29] after transformation of the survival rates by the arcsinus function. Then, NOECs were calculated with the TUKEY multiple comparisons test. Statistical analysis were performed with SYSTAT 5.0 software [30]. Median lethal concentration (LC₅₀) were calculated with the Trimmed Spearman-Kärber (TSK) Program Version 1.5. (U. S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OHIO 45268).

RESULTS

Survival rates in controls

During continuous exposure experiments from fertilization (Table 3), the survival rates in controls remained greater than or equal to 85 % after seven days, except in test 2 (Table 2 C) where they fell to 55 % after hatching (third day). However, even in this test, they remained relatively stable from hatching to the end of the test (seventh day). In every experiment on

larvae (Tables 4 and 5), the control mortality rates during the tests were less than 5 %.

Control survival rates in Seine river water (95 %, 94 % and 89 % respectively at day 1, day 3 and day 7) were not significantly different from rates in laboratory water (Fig. 1). However, the Moselle river water appeared toxic to common carp early life stages (Table 2). The survival rates in Moselle river water sample after one, three and seven days of exposure were respectively 90, 52 and 36 %, with a variability between replicates and a significant difference compared to laboratory water at day 7.

Lethal effects of Mexel® in river water. Effect of solution aging

Test in Seine river water (test 1, Fig. 1)

During an exposure to a one-hour or a one-day-old 10 mg/L Mexel® solution, no lethal effect was observed until hatching (day 3), and 100 % mortality was reached at the end of the fourth day of exposure. On the contrary, no lethal effect was observed during a seven day exposure to a two-day-old or a four-day-old solution.

Tests in Moselle river water (test 2, Table 2)

The lethal effects of Mexel® in solutions aged eight to fifteen days in Moselle river water sample was low (test 2 A): the LC₅₀ was 67.8 mg/L after seven days of exposure. In the eight to fifteen days aged 10 mg/L solution in ISO water which was diluted to 1 mg/L in a Moselle river water at the time of use (test 2 B), significant mortalities were observed after exposure during seven days.

Lethal effects of freshly prepared solutions of Mexel® in laboratory ISO water

In continuous exposure beginning at fertilization (Tables 2 C and 3), the LC₅₀ was superior to 2 mg/L after one day of exposure and decreased to 1.1 or 0.6 mg/L after three or five days of exposure. Then it remained stable for at least four days.

This stability of the LC₅₀ was also observed at a similar level (0.6 or 0.7 mg/L) during direct

exposure of developed larvae independently of the preexposure or exposure temperatures (tests 5 A, B and 6, Table 4: calcium concentration 80 mg/L).

Influence of calcium and temperature on Mexel[®] lethal effects in laboratory water

In continuous exposure from fertilization (test 3, Table 3), no significant effect of a low calcium concentration (20 mg/L) was observed in laboratory ISO water, but the LC₅₀ of Mexel[®] was slightly increased (0.8 vs. 0.6 mg/L).

During direct exposure of larvae (tests 5 and 6, Table 4), independently of the preexposure or exposure temperature, little or no variations of the lethal effects of Mexel[®] were observed in the ranges of nominal calcium concentrations 0 to 800 mg/L and temperatures of 15 to 24°C.

Influence of pH on Mexel[®] lethal effects in laboratory ISO water

In continuous exposure beginning at fertilization, control survival rates in ISO water without buffers were 97 %, 96 %, 94 % and 77 % after respectively one, three, seven and ten days of incubation. Compared to these controls, no lethal effect was observed in the buffered waters at pH 6.9, 7.8 and 9.0 (test 4, Table 3). Mexel[®] appeared slightly more toxic with increasing pH: for example, the LC₅₀ (10 days) were 0.6, 0.5 and 0.4 mg/L respectively at pH 6.9, 7.8 and 9.0.

Influence of Aldrich humic acids on Mexel[®] lethal effects in laboratory ISO water

During direct exposure of larvae, Aldrich humic acids had no proper lethal effect up to the concentration 64 mg/L. In their presence, the toxicity of Mexel[®] was drastically reduced (test 7, Table 5): 50 mg/L were enough to suppress the lethal effects of a 10 mg/L solution of Mexel[®] regardless of the age of the solution (test 7 A, Tables 1 and 5), and in freshly prepared solutions, the LC₅₀ (2 days) of the Mexel[®] was 113 mg/L (test 7 B). Similarly, in the presence of 2 mg/L of Aldrich humic acids, the toxicity of 1 mg/L of Mexel[®] was suppressed (test 7 C) and the LC₅₀ (3 days) was 2.8 mg/L while 100 % mortality was observed with 1 mg/L of Mexel[®] in pure ISO water (test 7 D).

Influence of suspended matters and Aldrich humic acids on Mexel® solutions

After dichloroethane extraction in acidic medium (Fig. 2 and 3), the absorbency spectrum of Mexel® fatty-amines - methyl-orange complexes in the organic phase showed two peaks (at wavelengths $\lambda = 354$ and 414 nm).

With the deionized water (control solutions), a very weak coloration of the dichloroethane extract was observed. In the presence of Aldrich humic acids, this coloration was not changed. Without Mexel®, during dichloroethane extraction, the Aldrich humic acids were concentrated on droplet surfaces at the interface between the aqueous solution and dichloroethane. In presence of Mexel®, the color intensity of Aldrich humic acids at this interface was increased, the droplets diameter being strongly reduced as well as the aqueous supernatant coloration. Symmetrically, the dichloroethane phase coloration was reduced with increasing Aldrich humic acids concentration mixed to Mexel®. The absorbencies attributed to the Mexel® solutions decreased sharply with increasing concentrations of humic acids, especially at 354 nm (Fig. 2).

Suspended mineral matters reduced the quantity of extractable Mexel® fatty-amines-methyl-orange complexes (Fig. 3). The least important effect was observed with kaolinite and the most important with bentonite. The absorbency reduction was more important at 354 nm than at 414 nm.

DISCUSSION

Biological tests validity

In every biological test, pH, oxygen concentration and temperature, measured before the daily renewal of the incubation medium, remained compatible with a normal embryolarval development [26, 31].

Except in test 2, the control survival rates were better than required in standardized carp early life toxicity tests: 80 % at hatching and 75 % before yolk resorption [23].

In the test 2 C (Table 2), control survival rates in laboratory water declined before hatching but later remained relatively stable, which represents a reliable criterion of the quality of the spawns and incubation conditions [26]. Simultaneous tests on reference molecules (unpublished data) have confirmed the quality of the spawn tested in this test.

Previous experiments (unpublished data) have shown that in our experimental conditions, the incubator type (polyethylene or polystyrene) and volume medium (150, 100 or 60 ml) had no significant influence on Mexel[®] lethality on common carp early life stages.

Mexel[®] toxicity in natural waters, influence of solution aging

In laboratory ISO water, Mexel[®] is a relatively toxic product for carp early life stages, particularly in subchronic tests: the NOEC (11 days) may fall under 0.25 mg/L (unpublished data). In these conditions, the toxicity remained almost unchanged during at least two weeks of conservation of the tested solutions.

In river waters such as Seine or Moselle river water, Mexel[®] toxicity was considerably lower, particularly after solution aging (Fig. 1, Table 2).

In the tested Seine river water (test 1), the reduction of toxicity was first due to a rapid or immediate inhibition, since in a 10 mg/L solution, the lethal effect appeared after three days exposure compared to only few hours in laboratory water (unpublished data). Further aging was then likely to suppress completely the lethal activity of Mexel[®] in solution within two days. A similar reduction of the Mexel[®] solution activity in time occurred in the tested Moselle river water, since after eight to fifteen days of aging of the solution, the LC₅₀ (7 days) was as high as 67.8 mg/L. However, no important immediate inhibition was then observed, since in the test 2 B and C, the lethal activity of freshly prepared 1 mg/L solutions was not very different in the ISO water (Table 2 C) or in a 90 % - 10 % Moselle river water - laboratory ISO water v/v (Table 2 B). Other experiments will be necessary to verify if this difference between Seine and Moselle river waters in the time required to suppress Mexel toxicity could be explained by differences in their suspended or dissolved organic contents.

Our observations are consistent with the data (Allonier and Khalanski, unpublished data) which distinguished, after microtox tests, a variable « immediate demand » followed by a progressive inhibition which was considered as resulting, at least for a part, from bacterial degradation. In parallel, for a given nominal Mexel[®] concentration, the disappearing percentage of Mexel[®] in solution in the Seine river water was strongly dependent of the season of water sampling (A.S. Allonier, personal communication).

Mexel[®] toxicity in laboratory waters, influence of physico-chemical parameters

Our tests confirm the wide survival tolerance domain of carp embryo and larva to variations of calcium concentration, temperature, pH and Aldrich humic acids concentration [31, 32]. Indeed, no survival rate difference was observed on larvae during two or three days in the ranges of 0 to 800 mg/L for calcium concentration, 15 to 24°C for temperature, 6.9 to 9.0 for pH and 0 to 64 mg/L for Aldrich humic acids. Related to this wide tolerance domain, most fish embryos and larvae encounter and tolerate a great diversity of environmental situations in natural waters. For this reason, multifactorial evaluation of the toxic risk linked to a xenobiotic could *a priori* appear as indispensable [33]. Moreover, fouling is likely to develop in a wide diversity of environmental situations (Cf. Introduction), consequently inducing the use of antifouling agents in the same situations. However, within the limits of our tests, none of the calcium, temperature and pH physico-chemical parameters exerted an important influence on Mexel[®] toxicity on carp early life stages (Tables 3 to 5). The only observed effect was a slight increase of the toxicity at basic pH which could be due to an ionization rate change of its fatty-amines content. On the contrary, Mexel[®] toxicity was strongly inhibited by Aldrich humic acids (Table 5) at an apparent ratio 1-2 mg of Mexel[®] per mg of humic acids, at concentrations of humic acids widely observed in natural water [34]. For example, in Moselle river water, the suspended matters content varied between 10 to 80 mg/L during the spring and summer 1992 [8]. The existence of an immediate demand of Mexel[®] in natural waters was in agreement with the immediate detoxicant effect observed with Aldrich humic acids. Among fishes, a similar protective effect of humic acids was observed on carp larva [33] and, with other toxicants, on diverse development stages of different fish species [35, 36, 37]. However, Aldrich humic acids are not representative of most of the humic acids present in an aquatic medium since their binding affinities and capacities are quite different from those in many natural waters [38].

Mexel[®] solution analysis

Mexel[®] solution analysis in the presence of Aldrich humic acids and suspended matters (Fig. 2 and 3) showed that these materials are likely to link strongly enough with the Mexel[®] fatty-amines in acidic medium to render non-extractable their complexes with methyl-orange in dichloroethane. Thus, the inhibitory effect of Aldrich humic acids could be attributed to a

reduction of its bioavailability by complexation. The absorbency peaks in the visible spectrum of these complexes suggests that among Mexel[®] components, the complex related to the toxicity absorbs light at 354 nm. The confirmation of this hypothesis could lead to the definition of a more specific dosage method of the toxic fraction in the Mexel[®] complex mixture than the present method.

In colorimetric analysis conditions, the adsorption of Mexel[®] fatty-amines by Aldrich humic acids was associated with a concentration of the complexes Aldrich humic acids - Mexel[®] fatty-amines - methyl-orange at the interface between the aqueous medium and dichloroethane. However, the physico-chemical conditions for this observation or for the dosages (acidic medium, presence of KCl and methyl-orange) were very far from the conditions of an eventual complexation of Mexel[®] in natural waters.

In pure deionized water (at neutral or weakly basic pH and without the presence of methyl-orange or KCl), humic acids also form complexes with Mexel[®]. This is shown by the preliminary observation that the absorbency of centrifuged Aldrich humic acids solutions directly measured in water was progressively reduced by addition of increasing concentrations of Mexel[®]. Measurement of Mexel[®] n-octanol / river waters partition coefficients (K_{ow}) and eventual concentration at the water surface could provide better data about the relations between suspended or dissolved organic matters and the true immediate bioavailability of Mexel[®] in the medium. The existence of an apparent ratio of complexation (1 mg of Aldrich humic acids per 1 or 2 mg of Mexel[®]) will have to be confirmed especially in the case of low Mexel[®] concentrations with various types of humic acids, which are generally weak adsorbants compared to Aldrich humic acids [38]. In each case, it would also be necessary to verify whether the humic acids - Mexel[®] complexes are likely to dissociate, as observed with hexachlorobiphenyl [39], which could make the toxicant bioavailable again. The humic acids could also protect the toxicant against bacterial degradation, which would enhance its persistence and accumulation in the environment.

CONCLUSION

From a methodological point of view, the demonstration of an inhibitory power of suspended mineral waters or organic matters on Mexel[®] toxicity points out one of the major limitations of laboratory aquatic toxicity tests when they are performed in semi-static exposure

condition or with exogenous feeding. This limitation is especially obvious in the case of hydrophobic and amphiphilic molecules which are likely to adsorb strongly on a wide diversity of substratums. For example, in semi-static tests, the presence of carp larvae strongly increased the percentage of disappearance of the insecticide deltamethrin, a very hydrophobic molecule, in the medium [33]. Therefore, laboratory flow-through tests or rapid renewal semi-static tests will be therefore necessary to confirm the actual level of Mexel[®] toxicity in pure waters.

The complexation of Mexel[®] with suspended mineral or dissolved organic matters could offer an explanation for the observed variations in the time of its toxic effect and the rapidity of its disappearance in river waters at different periods of the year. Indeed, suspended or dissolved matter concentrations are widely changing parameters, especially in the rivers where the problem of biofouling proliferation exists. In practice, Mexel[®] utilization could find a limitation in the case of highly charged waters. A precise adjustment of Mexel[®] treatments to the water quality and to the treated hydraulic circuit characteristics will be necessary to optimize the anticorrosion and antifouling treatments themselves and to simultaneously minimize the toxicity of Mexel[®] on non-target organisms in the environment. For this purpose, a method for rapid field determination of the immediate demand is under study.

Acknowledgments

This study was supported by grants from EDF (Electricité de France) and MEXEL company. The authors thank Dr. M. Khalanski for his contribution to the initiation and progress of this work, and the teams of the Laboratories of Vegetal Physiology (University Paris 6) and Comparative Anatomy (University Paris 7) which contributed the benefit of their competencies and installations. They also thank R. Kreuzer, M. Laurin and P. Lai for reviewing the manuscript.

REFERENCES

1. **Sasikumar, N., V.K. Nair and J. Azarih.** 1990. Colonization of marine foulants at a power plant site. *Proc. Indian Acad. Sci. Anim. Sci.* **99** (6): 525-532.
2. **Afanas'ev, S.A., A.V. Siderskii and A.V. Shatokhina.** 1990. The problem of the biological fouling of nuclear power station headraces. *Gidrobiol. Zh.* **26** (2): 25-29.
3. **Zvyagintsev, A.YU.** 1989. Fouling and corrosion deterioration of supporting pillars of oil platforms in the South China Sea. *Biol. morya (Vladivost.)*. **0** (6): 46-50.
4. **Maruthamuthu, S., M. Eashwar, S.T. Manickam, S. Ambalavanan, G. Venkatachari and K. Balakrishnan.** 1990. Marine fouling on test panels and in-service structural steel in Tuticorin harbour (India). *Indian J. Mar. Sci.* **19** (1): 68-70.
5. **Santhakumari, V. and N.B. Nair.** 1984. Vertical distribution of marine wood boring and fouling organisms from the estuarine areas of the southwest coast of India. *Fish. Technol.* **21** (2): 118-125.
6. **Cheng, I.J. and T.Z. Chen.** 1994. Preliminary study of the macrofouling invertebrate community on a wooden fishing vessel. *J. Fish. Soc. Taiwan.* **20** (3): 269-271.
7. **Je, J.G., J.S. Hong and S.K. Yi.** 1988. A study on the fouling organisms in the pearl oyster culture grounds on the southern coast of Korea (South Korea). *Ocean Res. (Seoul)*. **10** (1): 85-106.
8. **Moreteau, J.C. et M. Khalanski.** 1994. Fixation et croissance de *D. polymorpha* dans les circuits d'eau brute de la centrale nucléaire de Cattenom. Rapport EDF/DER HE-31/94/012, Chatou, France.
9. **Swami, B.S. and A.A. Karande.** 1988. Recruitment and growth of biofouling invertebrates during monsoon in Bombay waters, west coast of India. *Indian J. Mar. Sci.* **17** (2): 143-149.
10. **Hurlbut, C.J.** 1993. The adaptive value of larval behavior of a colonial ascidian. *Mar. Biol. (Berl.)*. **115** (2): 253-262.
11. **Wood, R.** 1993. Nutrients, Predation and the History of Reef-Building. *Palaios*. **8** (6): 526-543.
12. **Anderson, M.J. and A.J. Underwood.** 1994. Effects of substratum on the recruitment and development of an intertidal estuarine fouling assemblage. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **184** (2): 217-236.

13. **Dempsey, C.H.** 1986. The exposure of herring (*Clupea harengus*) postlarvae to chlorine in coastal power stations. *Mar. Environ. Res.* **20** (4): 279-290.
14. **Stewart, C. and J.A.J. Thompson.** 1994. Extensive butyltin contamination in southwestern coastal british columbia, Canada. *Mar. Pollut. Bull.* **28** (10): 601-606.
15. **Degremont.** 1979. Water treatment handbook. 5th ed. John Wiley and Sons, New York.
16. **Watanabe, S., H. Kawahara and T. Kuramochi.** 1991. Adducts of cyclic acid anhydrides and fatty amines as anti-rust additives in water - based cuttings fluids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **68** (2): 92-4.
17. **De-Ruiter, H., K.R. Straatman and E. Menien.** 1995. Influence of two fatty amine surfactants on foliar absorption, translocation, and efficacy of 2,4-D triethanolamine salt. *J. Agric. Food Chem.* **43** (12): 3093-3097.
18. **Foster, J.M., I. Marshall and J.A. Svoboda, M.J. Thompson and H.H. Rees.** 1996. Effect of insect-growth-disrupting amines and amides on *Schistosoma mansoni* in vitro. *J. Parasitol.* **82** (2): 340-343.
19. **Lyles, G.A.** 1996. Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: Biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28** (3): 259-274.
20. **Van-Ginkel, C.G.** 1996. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. *Biodegradation.* **7** (2): 151-164.
21. **Giamberini, L., Guerold, F., Beauvais, M.A., et Pihan, J.C.** 1993. Etude histopathologique de la branchie de *Dreissena polymorpha* Pallas exposée à un nouveau molluscicide organique. *Hydroécol. Appl.* **5** (2), 61-70.
22. **Khalanski, M.** 1993. Expérimentation de cinq méthodes contre le développement des moules zébrées dans les circuits de centrales thermiques sur la Moselle. Rapport EDF/DER HE-93NV00030. 22 pp.
23. **OECD.** 1992. Draft OECD guideline for testing of chemicals. «Fish, toxicity test on egg and sac-fry stages.» March 1992, TGP/92.75.
24. **Lefebvre, B., Chaillou, C., Marie, D., Hanafi, C., et Roubaud, P.** 1990. Embryotoxicométrie des poissons: problèmes méthodologiques soulevés par l'élaboration d'un test utilisant l'oeuf de carpe. *Ann. A.N.P.P.* **2**, 161-177.
25. **Jaoul, A. et P. Roubaud.** 1982. Résistance de l'oeuf de carpe commune (*Cyprinus carpio* L. *Cyprinidae*) à des chocs thermiques chauds ou froids. *Can. J. Zool.* **60**: 3409-3419.

26. **Ghillebaert, F., C. Chaillou, F. Deschamps and P. Roubaud.** 1995. Toxic effects, at three pH levels, of two reference molecules on common carp embryo. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**:19-28.
27. **ISO 7346/3.** 1984. Qualité de l'eau -Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)]-Partie 3, Méthode avec renouvellement continu. International Organisation for Standardization, 1e éd. Ref. n°: ISO 7346/3.
28. **Wang, L.K. and D.F. Langley.** 1977. Identification and determination of ionic surface active agents. *Arch. Environ. Contam. Toxic.* **5**: 447-456.
29. **McClave, J.T., J.H. Sullivan and J.G. Pearson.** 1981. Statistical analysis of fish chronic toxicity test data (D.R. Branson and K.L. Dickson, Eds.). ASTM STP 737, Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: Fourth Conference: pp. 359-376.
30. **SYSTAT for Windows.** 1992. Version 5.0. Ed. Evanston, IL: Systat, Inc.
31. **Kaur, k. and H.S. Toor.** 1980. Role of abiotic factors in the embryonic development of Scale Carp. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad. B* **46** (1): 136-148.
32. **Ghillebaert, F.** 1996. Le développement précoce des Poissons en écotoxicologie. Exemple: la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): -Importance des facteurs environnementaux et de leurs interactions, - Diversification des critères de toxicité. Ph.D, thesis. University of Metz, Metz, France.
33. **Ghillebaert, F., D. Prodorutti, C. Chaillou and P. Roubaud.** Deltamethrin lethal multifactorial activity towards carp larva related to pH, calcium and humic acids concentration. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* (in press.).
34. **Wetzel, R.G.** 1983. Limnology. Second ed. Saunders college Publishing. Philadelphia, USA.
35. **Gundersen, D.T., S. Bustaman, W.K. Seim and L.R. Curtis.** 1994. PH, hardness, and humic acid influence aluminum toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in weakly alkaline waters. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **51** (6):1345-1355.
36. **Rodgers, D.W.** 1994. Reduction in the toxicity of boiler blowdown effluent by addition of calcium or humic acid. *Chem. Speciation Bioavailability.* **6** (1):23-26.
37. **Fent, K. and P.W. Looser.** 1995. Bioaccumulation and bioavailability of tributyltin chloride: Influence of pH and humic acids. *Water Res.* **29** (7):1631-1637.

38. **Chioux, C.T., D.E. Kile, T.I. Brinton, R.L. Malcolm and J.A. Leenheer.** 1987. A comparison of water solubility enhancements of organic solutes by aquatic humic materials and commercial humic acids. *J. Environ. Qual.*, **16**: 69-72.
39. **Lores, E.M., J.M. Patrick and J.K. Summers.** 1993. Humic acid effects on uptake of hexachlorobiphenyl by sheepshead minnows in static sediment/water systems. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**: 541-550.

Table 1. Experimental conditions of the tests.

Test, Spawn: references of the test and spawn. **dx-dy:** exposure period from the end of day x to the end of day y (age 0 = fertilization). **PE, PS:** polyethylene, polystyrene incubator. **Incubation temp. (°C):** incubation temperature before exposure. **1**:** a 10 mg/L solution of Mexel® in ISO water aged 8 to 15 days was diluted to the concentration 1 mg/L by Moselle river water at the time of use (daily renewal of the solutions). **0.18*-6.25, 0.25*-2, etc.:** Mexel® concentrations are in a geometric progression ratio of 1/2 in the range 0.18 - 6.25 mg/L, 0.25-2 mg/L, etc.

Table 2. Toxicity of Mexel® in Moselle river water. Effect of solution aging.

90/10:** see 1** (Table 1). **ISO:** standard laboratory water. **(Sd)^{a, b}:** standard deviation with statistical index according to Tukey multiple comparisons test ($\alpha=0.05$). When referred to at least one identical superscript letter, daily values do not significantly differ. **LC₅₀:** median lethal concentration. **Bold-faced values:** no-observed-effect-concentrations (NOECs). **Italic LC₅₀:** 95 % confidence limits are not reliable. **nd:** not determined. For other legends, see Table 1.

Table 3. Influence of calcium and pH on Mexel® embryolarval lethal effects in ISO water.

%Sv_d^{Sd}: survival percentage with standard deviation (Sd) at day (d). For other legends, see Tables 1 and 2.

Table 4. Effect of calcium and temperature on Mexel® larval lethal effects in ISO water.

For legends, see Tables 1 and 2.

Table 5. Effect of Aldrich humic acids Mexel® embryolarval lethal effects in ISO water.

NOEC: no-observed-effect-concentration. **LOC₁₀₀:** 100 % lethal-observed-concentration. For other legends, see Tables 1 and 2.

Figure 1. Lethal effects of Mexel[®] in a Seine river water. Effect of solution aging.

Sw: a sample of Seine river water. ISO: laboratory water. 1h, 1d, 2d, 4d: 10 mg/L solutions of Mexel[®] in a Seine river water were prepared in advance successively each day so as to insure aging durations of 1 hour or 1, 2 and 4 days at the moment of use (daily renewal of the exposure medium).

Figure 2. Mexel[®] semiquantitative estimation in presence of clays and Aldrich humic acids: absorbance spectra.

Solutions containing 50 mg/L of Mexel[®] in deionized water (Mx 50) in the presence of 50 mg/L of kaolinite (Mx-K) or green clay (Mx-Gc) or bentonite (Mx-B) or Aldrich humic acids (Mx-HA).

Figure 3. Mexel[®] semiquantitative estimation in presence of humic acids: absorbance spectra.

Mx-HA: concentration (mg/L) of Mexel[®] and humic acids.

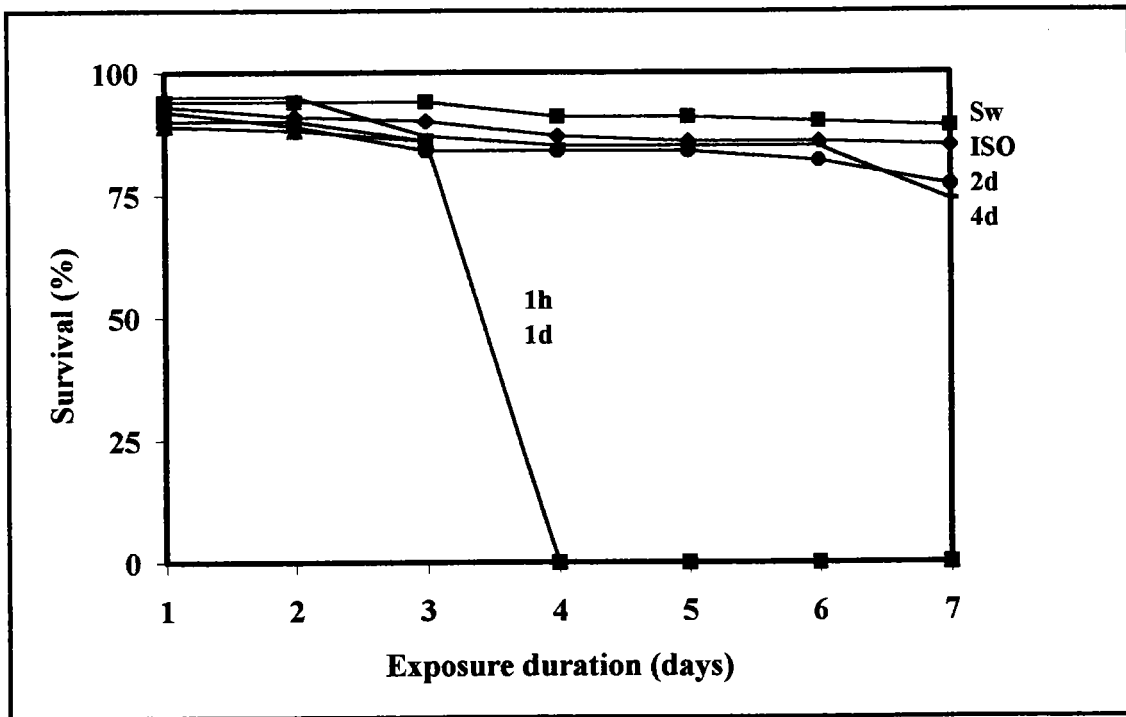
Test <i>Spawn</i>		lifestage (dx-dy)	vessel type volume (ml)	incubation temp. (°C)	exposure temp. (°C)	solution aging	[Mixel] (mg/L)
1 <i>Sp₁</i>		from fertilization d0-d7	PE-100		24.4 ± 0.3	1h, 1, 2, 4d	10
2 <i>Sp₂</i>	A	from fertilization d0-d7	PE-150		22.8 ± 1	8-15d	0, 1, 10, 50, 100
	B					< 2h	1**
	C					< 2h	0.18-*-6.25
3 <i>Sp₃</i>		from fertilization d0-d9	PS-60		24 ± 1	< 2h	0.25-*-2
4 <i>Sp₄</i>		from fertilization d0-d10	PS-60		24 ± 1	< 2h	0.05-*-1.6
5 <i>Sp₅</i>	A	larvae	PS-60	24 ± 1	15 ± 1	< 2h	0.25-*-2
	B	d7-d9			24 ± 1		
6 <i>Sp₆</i>		larvae d14-d17	PS-60	15 ± 1	15 ± 1	< 2h	0.25-*-1
7 <i>Sp₄</i>	A	larvae d7-d9	PE-100	24.4±1.4	24 ± 1	1h, 1,3,7d	10
	B	larvae	PS-60	24.4±1.4	24 ± 1	< 2h	10-*-320
	C	d12-d14		prehatching			1
	D	larvae d14-d17		15±1 after hatching			1-*-8

Test	Dilution	[Mexel] water	[Mexel] (mg/l)	Toxicity	Exposure duration (days)		
					1	3	7
2	A	Moselle river water	0	Survival % (Sd) ^{a,b}	90 (5) ^a	52 (16) ^a	36 (9) ^a
			1		86 (1) ^a	54 (4) ^a	29 (4) ^a
			10		89 (3) ^a	48 (1) ^a	34 (4) ^a
			50		90 (4)^a	54 (8)^a	37 (4)^a
			100		54 (17) ^b	10 (7) ^b	0 (0) ^b
			LC ₅₀ (mg/L)		nd	nd	67.8
	B	90/10**	1**	Survival % (Sd) ^{a,b}	81 (11)^a	44 (10)^a	20 (6) ^b
	C	ISO	0	Survival % (Sd) ^{a,b}	83 (6) ^a	55 (6) ^a	50 (7) ^a
			0.2		82 (10) ^a	49 (3) ^a	40 (2) ^a
			0.4		86 (8) ^a	53 (14) ^a	40 (9) ^a
			0.8		82 (7) ^a	59 (5)^a	51 (8)^a
			1.0		82 (4)^a	4 (3) ^b	2 (2) ^b
			3.1		0 (0) ^b		
6.2			0 (0) ^b				
LC ₅₀ (mg/L)			2.1≤2.1≤2.2		1.1≤1.1≤1.2	1.0≤1.0≤1.1	

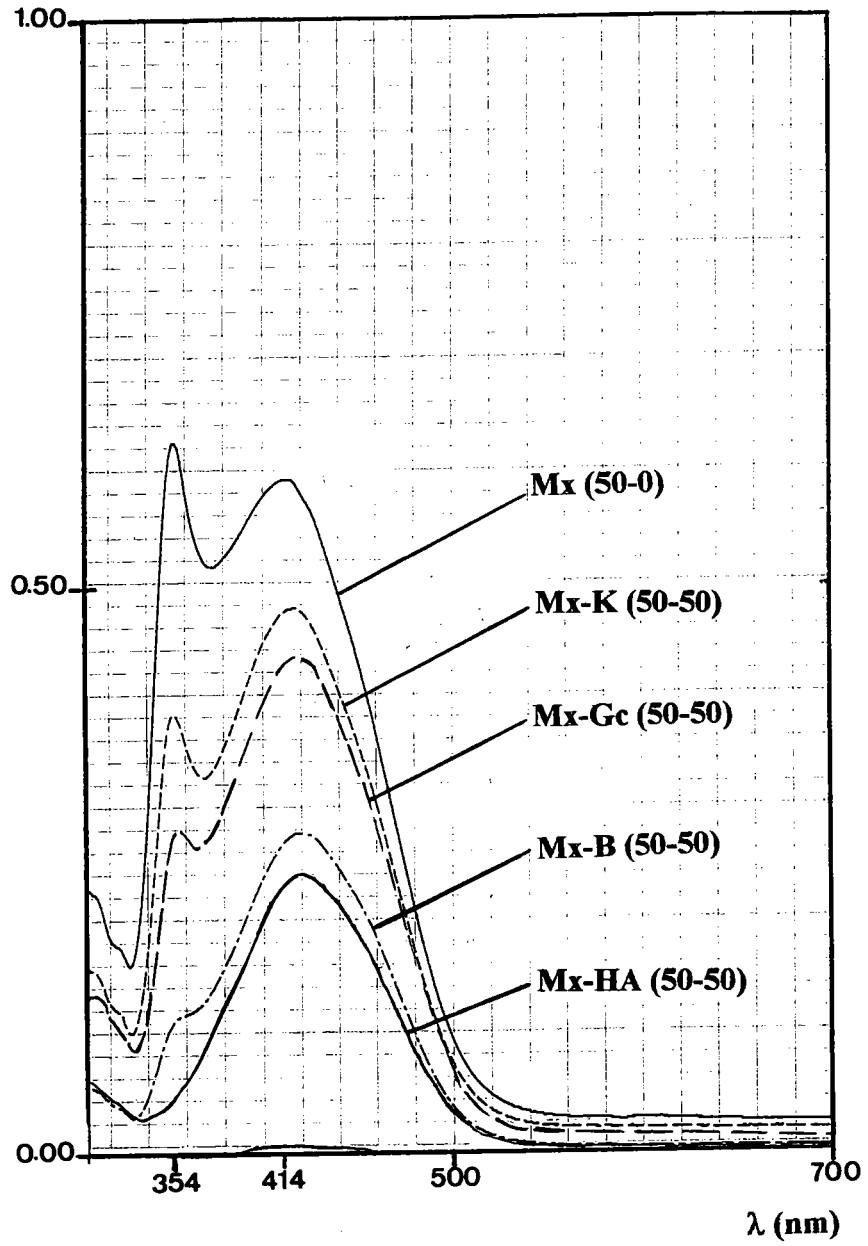
Test	Dilution water		Controls %Sv _d ^{Sd}	Toxicity (mg/L)	Exposure duration (days)					
					1	3	5	7	9	10
3	Calcium	20	98 ₁ ² , 93 ₃ ⁷ , 88 ₇ ⁹ , 66 ₉ ³²	LC ₅₀	> 2	1.0 ≤ 1.1 ≤ 1.2	0.7 ≤ 0.8 ≤ 0.9	0.7 ≤ 0.8 ≤ 0.9	0.7 ≤ 0.8 ≤ 0.9	
	(mg/L)	80 (ISO)	94 ₁ ⁰² , 89 ₃ ³ , 87 ₇ ⁴ , 87 ₉ ⁴		> 2	0.9 ≤ 0.9 ≤ 1.0	0.6	0.6	0.6	
4	pH	6.9	98 ₁ ³ , 94 ₃ ³ , 93 ₇ ¹ , 91 ₁₀ ¹	LC ₅₀	> 1.6	> 1.6	0.7 ≤ 0.7 ≤ 0.8	0.6 ≤ 0.7 ≤ 0.7		0.6 ≤ 0.6 ≤ 0.7
		7.8	98 ₁ ⁴ , 96 ₃ ⁴ , 88 ₇ ¹⁵ , 87 ₁₀ ¹⁴		> 1.6	0.9 ≤ 1.0 ≤ 1.0	0.5 ≤ 0.5 ≤ 0.6	0.5		0.5 ≤ 0.5 ≤ 0.6
		9.0	99 ₁ ¹ , 99 ₃ ¹ , 99 ₇ ¹ , 97 ₁₀ ³		> 1.6	0.9 ≤ 1 ≤ 1.0	0.5 ≤ 0.5 ≤ 0.6	0.5 ≤ 0.5 ≤ 0.6		0.3 ≤ 0.4 ≤ 0.4

Test	Incubation temp. (°C)	Exposure temp. (°C)	calcium (mg/L)	Controls %Sv _d ^{Sd}	Toxicity (mg/L)	Exposure duration (days)			
						1	2	3	
5	A	24 ± 1	15 ± 1	0.8	100 ₂ ⁰	LC ₅₀	0.7	0.5 ≤ 0.5 ≤ 0.6	
				80 (ISO)	98 ₂ ⁰		0.6 ≤ 0.7 ≤ 0.7	0.5 ≤ 0.6 ≤ 0.6	
				800	96 ₂ ⁸		0.7	0.6 ≤ 0.7 ≤ 0.7	
	B	24 ± 1	24 ± 1	0.8	100 ₂ ⁰	LC ₅₀	0.7	0.6 ≤ 0.7 ≤ 0.7	
				80 (ISO)	96 ₂ ⁸		0.6 ≤ 0.7 ≤ 0.7	0.7	
				800	96 ₂ ⁸		0.7	0.6 ≤ 0.7 ≤ 0.7	
6	15 ± 1	15 ± 1	0	100 ₃ ⁰	LC ₅₀	0.7	0.6 ≤ 0.6 ≤ 0.7	0.6 ≤ 0.6 ≤ 0.7	
			8	100 ₃ ⁰		0.7	0.6 ≤ 0.6 ≤ 0.7	0.6 ≤ 0.6 ≤ 0.7	
			80 (ISO)	100 ₃ ⁰		0.7	0.7	0.7	
			800	100 ₃ ⁰		0.7	0.5 ≤ 0.6 ≤ 0.6	0.5 ≤ 0.5 ≤ 0.6	

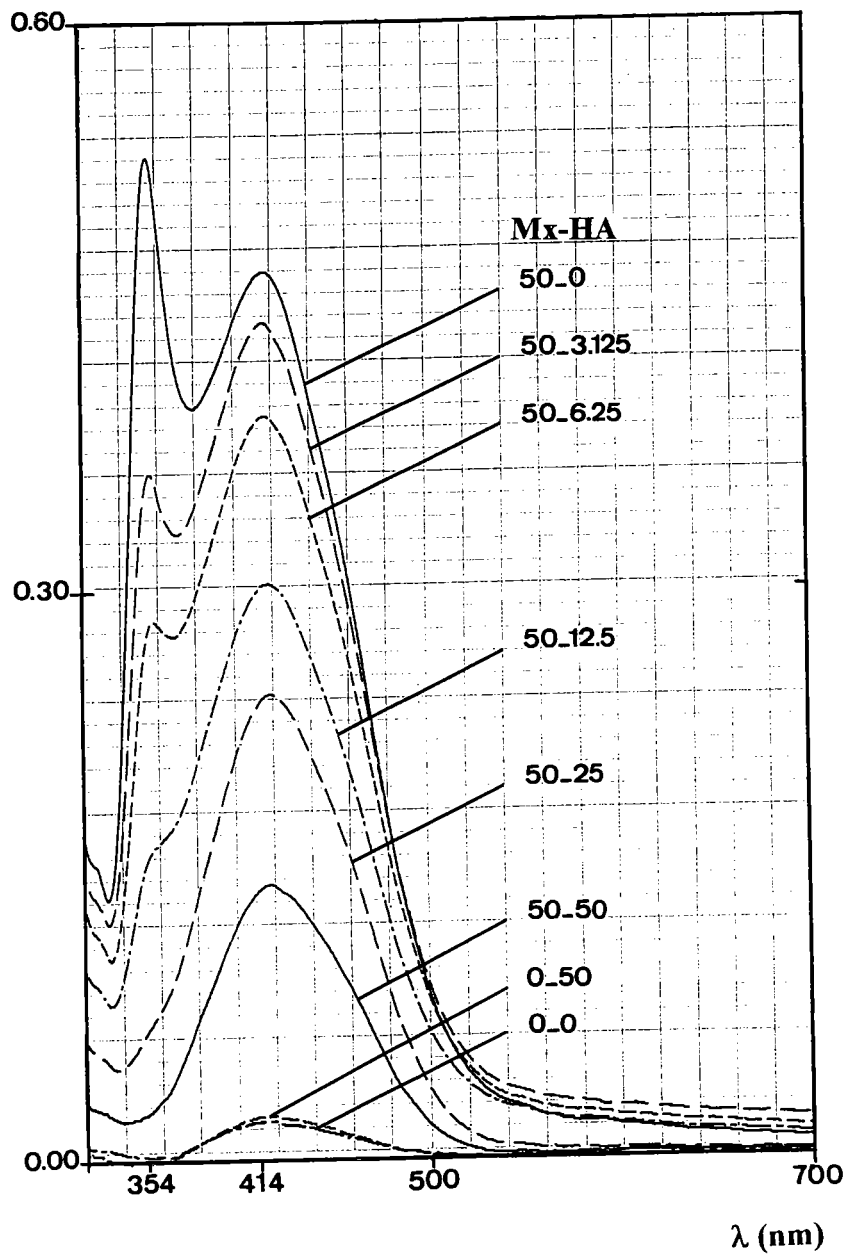
Test	Controls	[HA]	Toxicity	Exposure duration (day)			
				1	2	3	
7 <i>Sp.</i>	A	100 ₂ ⁰	50	NOEC	10	10	
	B	100 ₂ ⁰	50	LC ₅₀	113	113	
	C	100 ₂ ⁰	2-64	NOEC	1	1	
	D	98 ₃ ³	0	LOC ₁₀₀	1	1	1
			2	LC ₅₀	2.8	2.8	2.8



Absorbance



Absorbance



2^e Partie. Etude expérimentale

Dosage du Mexel[®] 432: seuils de détection et de mesure aux basses concentrations

4^e Partie. Dosage du Mexel[®] 432, un agent anti-salissures et anticorrosion industrielles: seuils de détection et de mesure aux basses concentrations

L. Arehmouch, F. Ghillebaert et P. Roubaud

Complément au rapport d'exécution du contrat de recherche n°E31/L25-2L6366-AEE1794 (EDF, Dir. des Etudes et Recherches) / (Université Paris 7, Groupe d'Embryotoxicologie des Poissons : GEP)

Introduction

Le Mexel[®] 432 est un mélange complexe commercialisé à une échelle grandissante pour lutter contre les salissures biologiques et la corrosion dans les circuits hydrauliques industriels. Il est composé de 3 molécules ou familles de molécules: des amines grasses primaires et secondaires (composé A), des amines grasses tertiaires (composé B) et un aminoalcool (composé C). Son utilisation implique des rejets contrôlés dans l'environnement à des concentrations non dangereuses pour les organismes aquatiques. Cependant sa toxicité élevée est attestée par des essais de laboratoire réalisés en eau pure sur diverses espèces aquatiques: micro-organismes (Allonier et Khalanski, 1996), juvéniles ou stades embryo-larvaires de poissons (Brooke, 1996; Ghillebaert et Brooke, 1997; Arehmouch *et al.*, soumis et sous presse), microcrustacés (INERIS, 1997; Ghillebaert et Brooke, 1997), mollusques (Coulon, 1993; Giamberini *et al.*, 1993, 1995, 1996; Khalanski, 1994): les concentrations létales pour 50 % des individus traités sont comprises entre quelques centaines de µg et quelques mg/L pour des durées d'exposition continues de 1 à 12 jours.

Il est donc nécessaire de disposer de méthodes analytiques sensibles pour déterminer les quantités de Mexel[®] 432 éventuellement rejetées dans l'environnement à des concentrations toxiques.

A cette fin, une première méthode de dosage a été développée par EDF (méthode EDF: Allonier, 1995) à partir de la méthode de Wang et Langley (1977) définie pour les amines grasses. La méthode EDF est caractérisée par des seuils de détection et de mesure respectivement égaux à 1,36 et 2,73 mg/L après établissement d'une droite d'étalonnage entre

les concentrations nominales 1,46 et 43,8 mg/L. De tels seuils sont à l'évidence trop élevés pour déterminer des risques toxiques environnementaux liés aux rejets du Mexel[®] 432.

Dans ce qui suit, nous montrons que, sans modifier le protocole standard de la méthode EDF, l'établissement d'une droite d'étalonnage dans une gamme de concentrations plus faibles permet d'obtenir au laboratoire des seuils de détection et de mesure eux-mêmes considérablement diminués.

Matériels et méthodes

Principe (Méthode de dosage colorimétrique à l'orange de méthyle)

La méthode EDF tire partie de deux caractéristiques fondamentales des amines grasses: de par leur fonction grasse, c'est-à-dire la présence de radicaux hydrophobes, elles sont susceptibles d'être extraites de leur solutions aqueuses par des solvants organiques. De part leurs fonctions amines, elles peuvent se lier à des colorants anioniques en particulier en milieu acide. Elles forment alors des complexes dont le degré d'hydrophobie est élevé en raison de la neutralisation des groupements amines polaires.

Le dosage consiste donc en une ionisation des amines en milieu acide suivi de leur neutralisation par un colorant anionique et d'une extraction des complexes amines grasses-colorant par un solvant organique.

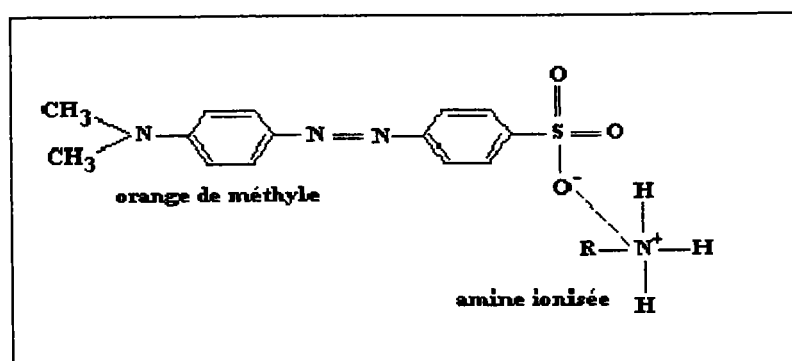


Figure 1. Complexation d'une amine grasse par l'orange de méthyle

La concentration en Mexel[®] 432 est alors évaluée au spectrophotomètre par mesure de l'absorption à la longueur d'onde 414 nm qui correspond à l'un des pics d'absorption de ces complexes. Selon Wang et Langley, ce principe est valable pour les amines grasses dont les radicaux comportent au moins 6 atomes de carbone; en effet, ces amines doivent présenter une

partie hydrophobe assez importante pour que leurs complexes avec le colorant puissent être extraits dans la phase organique. Ainsi les composés A et B du Mexel[®] 432 sont pris en compte ensemble lors du dosage, alors que l'amino-alcool n'est pas dosé.

Protocole expérimental

La méthode de dosage élaborée par EDF (Allonier, 1995) est adaptée pour des concentrations comprises entre 0,1 et 12,8 mg/L rangées suivant une progression géométrique de raison 2. Au lieu de réaliser une pesée séparée pour chaque concentration de la gamme d'étalonnage, une solution mère est préparée puis diluée pour obtenir les différentes concentrations. Une nouvelle pesée est cependant réalisée pour chaque répétition de la gamme d'étalonnage.

<i>Matériel utilisé</i>	<i>Produits utilisés</i>
balance METLER AE 420	dichloro -1, 2 éthane (Prolabo)
flacons en verre de 125 ml, à fermeture hermétique	orange de méthyle à 0,04 % (Prolabo)
pipettes à 2 traits de 10 ml	acide nitrique 10 %*
pipettes automatiques de 1,25 et 2 ml	acétone*
ampoules à décanter de 250 ml	le Mexel [®] 432 utilisé est le lot n° 95/11/03
agitateur magnétique	
spectrophotomètre type PERKIN ELMER LAMBDA 5UV	

*: L'acide nitrique à 10 % et l'acétone sont utilisés pour nettoyer la verrerie.

Tableau 1. Liste des matériels et produits utilisés lors de l'établissement de la droite d'étalonnage du Mexel[®] 432

Solution tampon acide (pH= 3,75)

- 125 g de KCl,
- 70 g de CH₃COONa,
- 300 ml d'acide acétique glacial,
- Eau déminéralisée pour 1 litre.

La forte concentration en KCl renforce les interactions hydrophobes et facilite donc l'extraction des complexes amines grasses - colorant par le dichloroéthane.

Préparation de l'échantillon et dosage

Les solutions de Mexel[®] 432 sont préparées en distribuant les volumes nécessaires d'une solution mère de concentration 100 mg/L à l'aide d'une micropipette à répétition. Le Mexel[®] 432 est pesé sur une feuille d'aluminium. La feuille portant le produit est introduite dans une fiole jaugée en verre contenant 1 litre d'eau déminéralisée. Le produit est alors dissous par agitation manuelle.

Des volumes de 50 µl, 0,1 ml, 0,2 ml, 0,4 ml, 0,8 ml, 1,6 ml, 3,2 ml et 6,4 ml de solution mère sont introduits dans une fiole de 50 ml pour obtenir les concentrations nominales 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 3,2; 6,4 et 12,8 mg/L.

Dans un flacon en verre de 125 ml à col rodé, muni d'un barreau aimanté, 50 ml de la solution à doser et 2 ml de tampon acide sont alors introduits avec 1,25 ml d'orange de méthyle et 10 ml de dichloroéthane. La préparation est agitée pendant 7 minutes à l'aide d'un barreau magnétique tournant à 700 tours/minute. Après décantation pendant quelques secondes, la phase organique est recueillie dans la cuve du spectrophotomètre. Des essais préliminaires ont montré l'existence de 2 pics d'absorption à 354 et 414 nm dans cet extrait et l'existence d'une turbidité résiduelle marquée par une absorption variable à 750 nm. L'absorbance de la phase organique est donc mesurée, après 10 minutes de stabilisation, à 354, 414, et 750 nm par rapport à l'acétone. Huit essais sont effectués à partir de 8 solutions mères différentes (répétitions), chaque solution mère servant à préparer une gamme complète de concentrations. Une seule mesure spectrophotométrique est effectuée par concentration et répétition. La concentration en Mexel[®] 432 est rapportée à la différence des absorbances à 354 ou 414 et 750 nm.

La pente de la droite d'étalonnage est déterminée par régression linéaire de type: $C = aA_{\lambda} + b$, où C est la concentration en Mexel[®] 432 (mg/L) et A_{λ} la différence des absorbances aux longueurs d'onde λ et 750 nm. Les calculs sont effectués à l'aide du logiciel Excell 5/1994.

Résultats

Pour la longueur d'onde 414 nm (Tableaux 2, 3, 6 et 7, Figures 2, 3), le seuil de la régression linéaire est inférieur à 0,005. L'équation de la droite de régression est alors:

$$C = (7,21 \pm 0,09) A_{414} - (0,003 \pm 0,06),$$

ce qui correspondrait pour des cuves de 2 cm de trajet optique à la droite:

$$C = (18,02 \pm 0,22) A_{414} - (0,007 \pm 0,15).$$

Les seuils de détection S_{d414} et de mesure S_{m414} , calculés suivant (Allonier, 1995), sont alors respectivement:

$$S_{d414} = 0,29 \text{ mg/L, et } S_{m414} = 0,58 \text{ mg/L}$$

C (mg/L)	A ₄₁₄ (nm)								Moy (1-8)	s (1-8)
	1	2	3	4	5	6	7	8		
0	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,1	0,030	-0,007	0,013	0,018	0,019	0,007	0,006	0,003	0,011	0,011
0,2	0,021	-0,012	0,049	0,026	0,037	-0,002	0,009	0,048	0,022	0,023
0,4	0,017	0,008	0,040	0,023	0,047	0,065	0,055	0,049	0,038	0,020
0,8	0,086	0,059	0,128	0,051	0,093	0,070	0,132	0,142	0,095	0,035
1,6	0,210	0,280	0,208	0,189	0,225	0,202	0,231	0,273	0,227	0,033
3,2	0,613	0,501	0,395	0,415	0,420	0,437	0,602	0,550	0,492	0,088
6,4	0,790	0,882	0,996	0,871	0,991	0,945	0,829	1,105	0,926	0,103
12,8	1,722	1,672	1,796	1,711	1,698	1,836	1,705	1,709	1,731	0,055

Tableau 2. Mesures relatives au pic d'absorption de longueur d'onde 414 nm pour chaque concentration des 8 répétitions de la gamme d'étalonnage.

C: concentration en Mexel[®] 432. A₄₁₄: différences des absorbances mesurées à 414 et 750 nm. Moy: moyennes sur les 8 répétitions. s: écart-type.

1: $C = (7,34 \pm 0,34) A_{414} - (0,01 \pm 0,22)$
2: $C = (7,42 \pm 0,23) A_{414} + (0,04 \pm 0,15)$
3: $C = (6,99 \pm 0,17) A_{414} + (0,01 \pm 0,12)$
4: $C = (7,37 \pm 0,09) A_{414} + (0,12 \pm 0,06)$
5: $C = (7,30 \pm 0,21) A_{414} - (0,03 \pm 0,14)$
6: $C = (6,86 \pm 0,08) A_{414} + (0,11 \pm 0,06)$
7: $C = (7,43 \pm 0,29) A_{414} - (0,11 \pm 0,20)$
8: $C = (7,06 \pm 0,36) A_{414} - (0,21 \pm 0,26)$

Tableau 3. Equations des droites d'étalonnage des 8 répétitions relatives au pic d'absorption de longueur d'onde 414 nm (cuves spectrophotométriques de trajet optique 5 cm).

C: concentration en Mexel[®] 432. A₄₁₄: différences des absorbances mesurées à 414 et 750 nm.

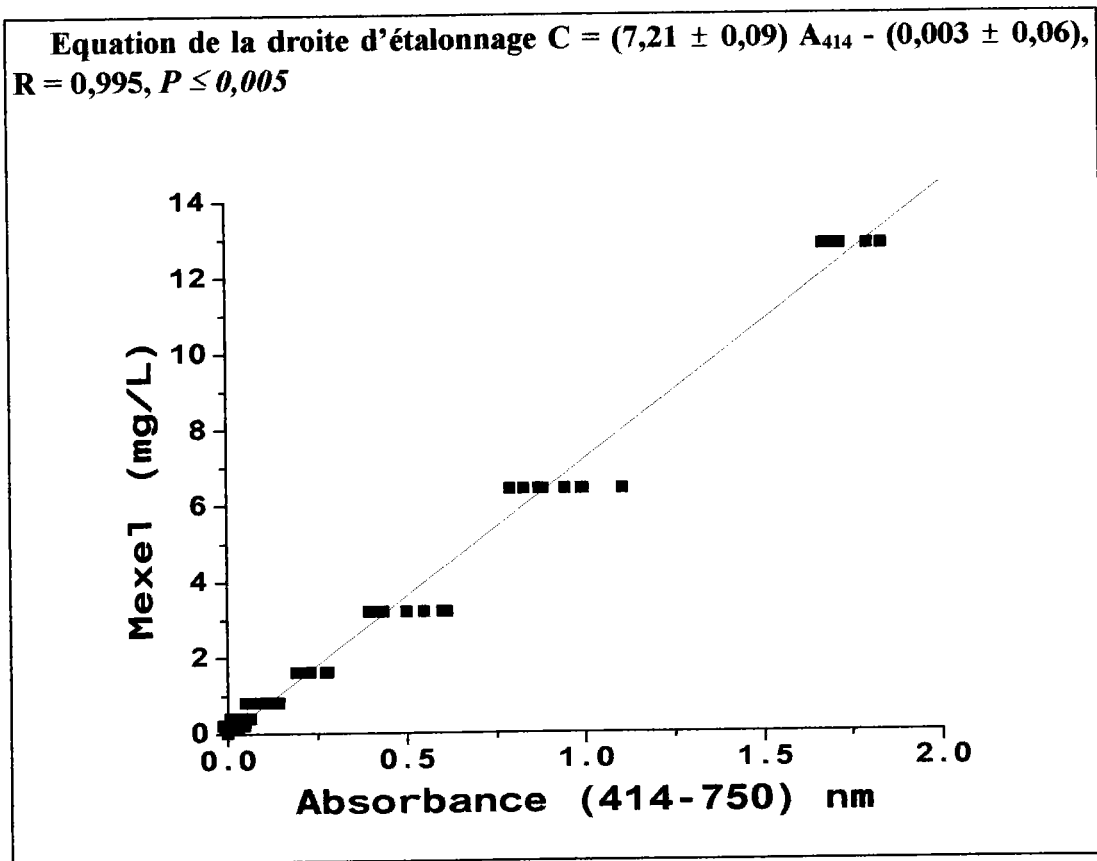


Figure 2. Droite d'étalonnage relative au pic d'absorption de longueur d'onde 414 nm sur les 8 répétitions.

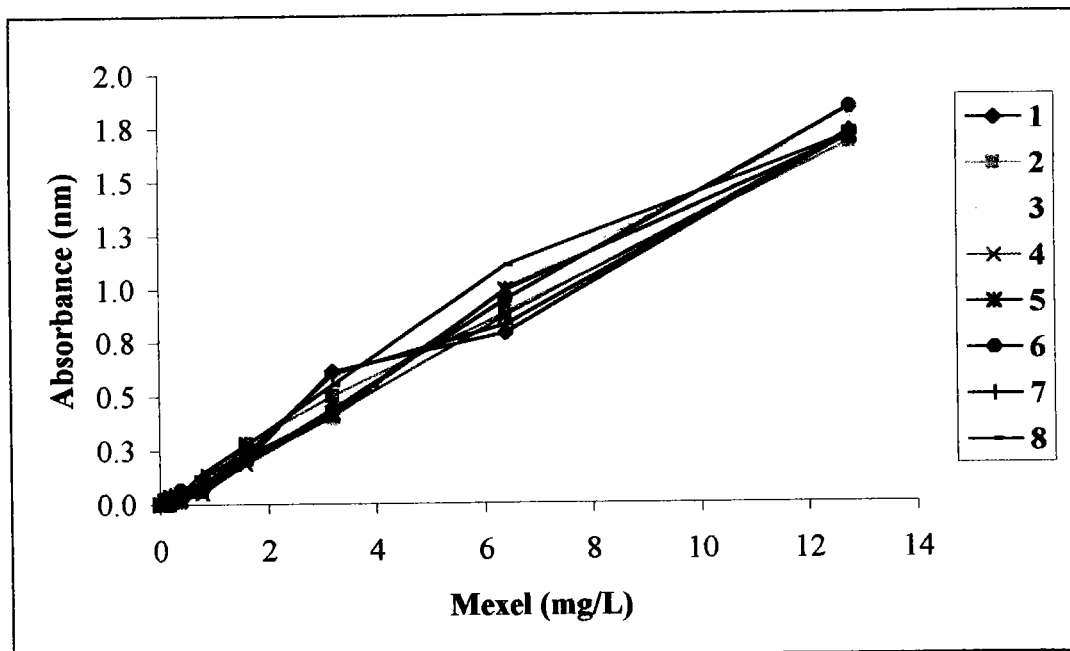


Figure 3. Courbes d'étalonnage des 8 répétitions relatives au pic d'absorption de longueur d'onde 414 nm.

A 354 nm (Tableaux 4, 6 et 7, Figure 4), le seuil de significativité de la droite de régression linéaire est inférieur à 0,005. L'équation de la droite de régression est alors:

$$C = (5,63 \pm 0,13) A_{354} + (0,62 \pm 0,10)$$

Les seuils de détection S_{d354} et de mesure S_{m354} , calculés suivant (Allonier, 1995), sont alors respectivement:

$$S_{d354} = 0,25 \text{ mg/L et } S_{m354} = 0,49 \text{ mg/L}$$

Cependant, aux concentrations les plus faibles (0 - 1,6 mg/L), la pente de la courbe d'étalonnage est largement supérieure à celle calculée sur l'ensemble de la gamme des concentrations testées (0 - 12,8 mg/L): 10,16 contre 5,63.

C (mg/L)	A ₃₅₄ (nm)								Moy	s
	1	2	3	4	5	6	7	8		
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,1	0,020	-0,010	0,013	-0,005	0,016	0,005	-0,010	0,005	0,004	0,012
0,2	-0,007	-0,053	0,042	0,003	0,040	0,005	0,002	-0,003	0,004	0,030
0,4	-0,013	-0,031	0,036	-0,028	0,031	0,050	0,028	0,026	0,012	0,031
0,8	0,056	-0,024	0,077	-0,012	0,019	0,017	0,025	0,056	0,027	0,035
1,6	0,039	0,086	0,048	0,010	0,010	0,049	0,025	0,073	0,043	0,028
3,2	0,459	0,386	0,215	0,306	0,270	0,387	0,436	0,236	0,337	0,093
6,4	1,031	1,008	0,874	1,151	0,808	0,890	0,811	0,786	0,920	0,130
12,8	2,409	1,825	2,561	2,347	1,899	2,414	2,032	1,997	2,186	0,278

Tableau 4. Mesures relatives au pic d'absorption de longueur d'onde 354 nm pour chaque concentration des 8 répétitions de la gamme d'étalonnage.

C: concentration en Mexel® 432. A₃₅₄: différences des absorbances mesurées à 354 et 750 nm. Moy: moyennes sur les 8 répétitions. s: écart-type.

Discussion et conclusion

Lors d'essais antérieurs réalisés avec des cuves spectrophotométriques de 2 cm de trajet optique (Allonier, 1995) à la longueur d'onde 414 nm, la droite d'étalonnage était établie à partir d'une gamme de concentration de valeurs extrêmes 1,46 - 43,8 mg/L. La pente de la droite d'étalonnage était alors $18,28 \pm 1$ et les seuils de détection et de mesure calculés suivant (Allonier, 1995) étaient respectivement 1,35 et 2,73 mg/L.

La réalisation d'essais en cuves de 5 cm dans la gamme de concentration 0,1 - 12,8 mg/L à

la longueur d'onde de 414 nm, a permis de retrouver une droite d'étalonnage ayant une pente comparable, une fois rapportée à des cuves de même trajet optique (2 cm): $18,02 \pm 0,22$. Cependant, les seuils de détection et de mesure presque 5 fois plus faibles.

A 354 nm, la variation importante de la pente de la courbe d'étalonnage lorsque la concentration augmente montre que les mesures effectuées à cette longueur d'onde ne peuvent fournir une méthode de dosage fiable sur l'ensemble de la gamme d'étalonnage, et que les processus chimiques qui la sous-tendent diffèrent de ceux impliqués dans les mesures à 414 nm.

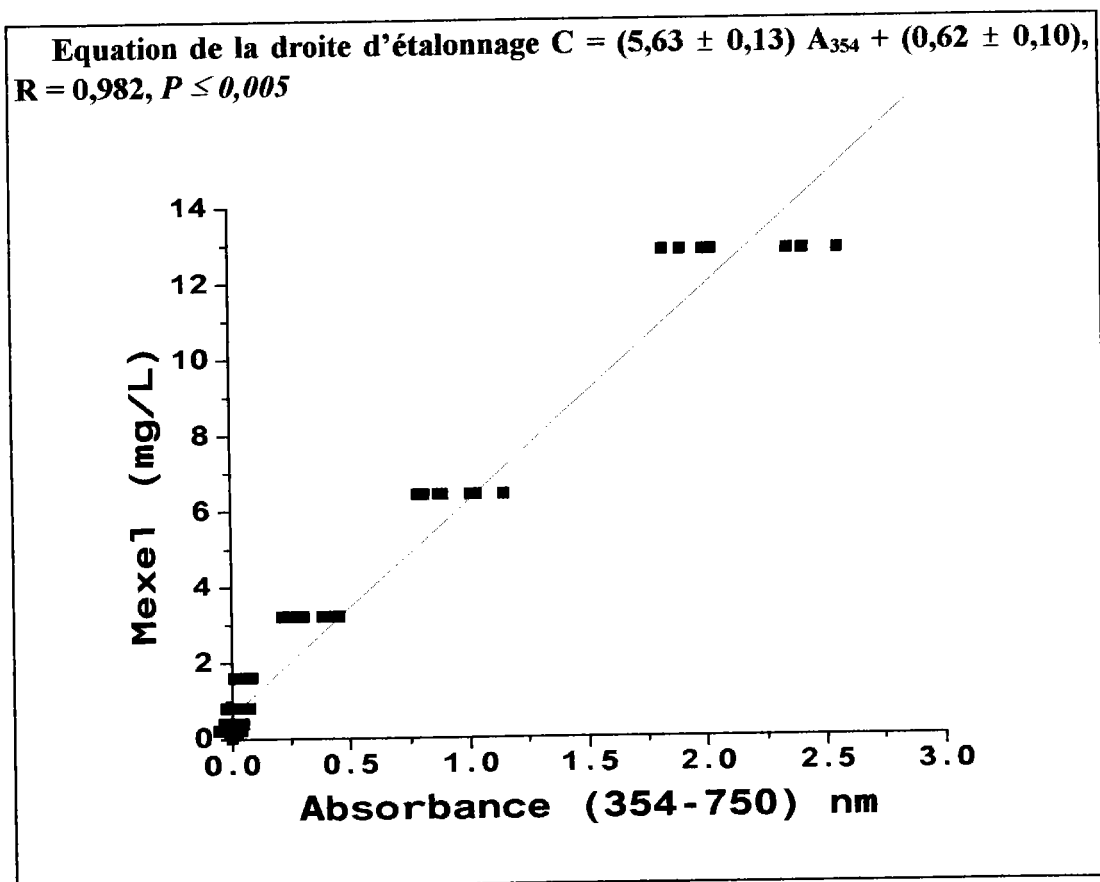


Figure 4. Droite d'étalonnage relative au pic d'absorption de longueur d'onde 354 nm sur les 8 répétitions.

D'autres méthodes de calcul des seuils de détection et de mesure pourraient être appliquées (INERIS, communication personnelle): par exemple, ils pourraient être calculés en tenant compte seulement des variations de l'absorbance mesurée à la concentration 0 (absence du Mexel[®] 432) suivant les relations:

$$S_{d\lambda} = a (3 s_{c0}) + b \text{ et } S_{m\lambda} = a (10 s_{c0}) + b$$

où a et b sont les coefficients de la droite d'étalonnage et s_{c0} l'écart type de l'absorbance

mesurée à la concentration 0 (Tableau 5), ce qui revient à calculer les concentrations qui correspondent à des absorbances respectivement égales à 3 fois et 10 fois l'écart-type relatif à la concentration 0, soit pour $\lambda = 414$, $s_{C_0} = 0,02$:

$$S_{d414} = 0,43 \text{ mg/L et } S_{m414} = 1,44 \text{ mg/L.}$$

C ₀	Répétitions								Moy	s
	1	2	3	4	5	6	7	8		
414 nm	0,141	0,159	0,140	0,145	0,129	0,092	0,139	0,125	0,103	0,020
354 nm	0,116	0,140	0,092	0,122	0,084	0,081	0,100	0,089	0,134	0,020

Tableau 5. Valeurs des absorbances mesurées, sur les 8 répétitions aux longueurs d'onde 414 et 354 nm, en absence du Mexel[®] 432.

Les seuils déterminés par les diverses méthodes de calcul restent relativement élevés s'ils sont comparés aux niveaux de toxicité mesurés sur diverses espèces aquatiques. Par exemple, après 11 jours d'exposition, les plus fortes concentrations sans effet léthal observé pour les stades embryon-larvaires de la carpe peuvent être inférieures à 0,25 mg/L (Arehmouch *et al.*, soumis), et après 48 h, les concentrations létales pour 50 % des individus traités chez la daphnie sont d'environ 0,50 mg/L (Ghillebaert et Brooke, 1997). Cependant, dans les conditions recommandées par le fabricant, le Mexel[®] 432 est utilisé en traitements séquentiels de quelques minutes à quelques heures par jour et les seuils de toxicité observés dépassent alors les seuils de détection et de mesure observés dans nos essais (Cf. 2.2.; 2^e Partie, § 1.1.6.).

Une augmentation de la sensibilité et de la fiabilité de la mesure devra être recherchée, si nécessaire, par exemple en augmentant le rapport volumique entre l'échantillon testé et le dichloroéthane ou en concentrant la solution de complexe Mexel[®] 432 - orange de méthyle dans le dichloroéthane par évaporation.

D'autres méthodes de dosage du Mexel[®] 432 en solution aqueuse sont recherchées actuellement pour déterminer la "demande immédiate" en Mexel[®] 432 dans les eaux naturelles.

Références

- Allonier, A.S. 1995. Etude analytique et écotoxicologique d'un produit filmogène. DEA/Institut national agronomique Paris-Grignon. 27 pages.
- Allonier, A.S. et Khalanski, M. 1996. Biodégradation du Mexel 432 par des bactéries de la Seine. Rapport EDF-DER/INA Paris-Grignon. HE-31/96-020. 17 pages.

- Arehmouch, L., F. Ghillebaert, C. Chaillou and P. Roubaud. Toxicity of Mexel®, a surface antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development in synthetic waters. Soumis.
- Arehmouch, L., Tfibel, V., Chaillou, C., Ghillebaert, F. and Roubaud. Lethal effects of Mexel®, an antifouling agent, on common carp embryolarval stages, in river waters and under various physico-chemical conditions in laboratory water. Sous presse.
- Brooke, L. 1996. Mexel 432 toxicity testing at Lake Superior Research Institute. Lake Superior Research Institute, university of Wisconsin-Superior / RTK Technologies, Inc Baton Rouge, LA. 18 pp.
- Coulon, I. 1993. Mise au point d'un système contrôlé de culture de cellules de coeur d'huître *Crassostrea gigas*. Application au test de la toxicité des produits chimiques en milieu aquatique. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris Grignon. 249 pages.
- Ghillebaert, F. and Brooke, L. 1997. Mexel® 432 toxicity to cladoceran and *Fathead minnow* during continuous or daily intermittent exposures. MEXEL SA, France. 12 pages.
- Giamberini, L., Czembor, N. and Pihan, J.C. 1995. Inhibitory effects of organic molluscicide on byssal thread development in zebra mussels. *J. Invert. Pathol.* **66**: 205-206.
- Giamberini, L., Guerold, F., Beauvais, M.A., et Pihan, J.C. 1993. Etude histopathologique de la branchie de *Dreissena polymorpha* Pallas exposée à un nouveau mollusquicide organique. *Hydroécol. Appl.* **5**: 61-70.
- Giamberini, L., Guerold, F., Beauvais, M.N. and Pihan, J.C. 1996. Histological effects of an organic molluscicide on the gills of the zebra mussel: ultrastructural study. *Toxicol. Environ. Chem.* **57**: 27-35.
- INERIS (institut national de l'environnement industriel et des risques), 1997. Toxicité aiguë du Mexel 432 vis à vis de la daphnie (*Daphnia magna*). 11 pages.
- Khalanski, M. 1994. Etudes expérimentales sur l'élimination de la moule zébrée par un produit anti-corrosion: le Mexel 432. Rapport EDF/DER, HE-31/94/011.
- Wang, L.K. and D.F. Langley. 1977. Identification and determination of ionic surface active agents. *Arch. Environ. Contam. Toxic.* **5**: 447-456.

Répétition	C (mg/L)	λ (nm)					
		354	414	700	750	900	414-750
1	0	0,269	0,294	0,166	0,153	0,178	0,141
	0,1	0,394	0,429	0,275	0,258	0,262	0,171
	0,2	0,230	0,283	0,134	0,121	0,144	0,162
	0,4	0,696	0,751	0,610	0,593	0,566	0,158
	0,8	1,044	1,099	0,899	0,872	0,815	0,227
	1,6	0,404	0,600	0,266	0,249	0,251	0,351
	3,2	1,979	2,158	1,442	1,404	1,321	0,754
	6,4	1,237	1,021	0,102	0,090	0,121	0,931
	12,8	2,598	1,936	0,090	0,073	0,091	1,863
2	0	0,343	0,362	0,213	0,203	0,213	0,159
	0,1	0,340	0,362	0,222	0,210	0,214	0,152
	0,2	0,098	0,158	0,014	0,011	0,041	0,147
	0,4	0,531	0,589	0,432	0,422	0,399	0,167
	0,8	0,889	0,991	0,785	0,773	0,724	0,218
	1,6	0,694	0,907	0,490	0,468	0,446	0,439
	3,2	0,664	0,798	0,151	0,138	0,144	0,660
	6,4	1,251	1,144	0,113	0,103	0,111	1,041
	12,8	2,718	2,584	0,781	0,753	0,687	1,831
3	0	0,211	0,259	0,125	0,119	0,130	0,140
	0,1	0,152	0,200	0,052	0,047	0,068	0,153
	0,2	0,341	0,396	0,217	0,207	0,210	0,189
	0,4	0,306	0,358	0,187	0,178	0,181	0,180
	0,8	0,371	0,470	0,217	0,202	0,203	0,268
	1,6	0,176	0,384	0,040	0,036	0,065	0,348
	3,2	0,355	0,583	0,052	0,048	0,077	0,535
	6,4	1,114	1,284	0,154	0,148	0,153	1,136
	12,8	2,837	2,120	0,198	0,184	0,178	1,936
4	0	0,171	0,194	0,056	0,049	0,070	0,145
	0,1	0,178	0,224	0,066	0,061	0,089	0,163
	0,2	0,155	0,201	0,080	0,030	0,090	0,171
	0,4	0,127	0,201	0,037	0,033	0,060	0,168
	0,8	0,148	0,234	0,042	0,038	0,067	0,196
	1,6	0,173	0,375	0,043	0,041	0,072	0,334
	3,2	0,494	0,626	0,072	0,066	0,092	0,560
	6,4	1,296	1,039	0,024	0,023	0,061	1,016
	12,8	2,525	1,912	0,061	0,056	0,083	1,856

Tableau 6. Valeurs brutes des absorbances aux longueurs d'onde 354, 414, 700, 750 et 900 nm (répétitions 1, 2, 3, 4).

C: concentration en Mexel® 432. λ : longueur d'onde de mesure.

Répétition	C (mg/L)	λ (nm)					
		354	414	700	750	900	414-750
5	0	0,115	0,160	0,033	0,031	0,065	0,129
	0,1	0,134	0,182	0,036	0,034	0,064	0,148
	0,2	0,241	0,283	0,126	0,117	0,132	0,166
	0,4	0,223	0,284	0,113	0,108	0,125	0,176
	0,8	0,826	0,945	0,735	0,723	0,689	0,222
	1,6	0,126	0,386	0,034	0,032	0,067	0,354
	3,2	0,459	0,654	0,111	0,105	0,133	0,549
	6,4	1,531	1,759	0,658	0,639	0,593	1,120
	12,8	2,806	2,650	0,843	0,823	0,780	1,827
6	0	0,182	0,193	0,112	0,101	0,128	0,092
	0,1	0,137	0,150	0,061	0,051	0,087	0,099
	0,2	0,091	0,095	0,017	0,005	0,028	0,090
	0,4	0,267	0,293	0,153	0,136	0,156	0,157
	0,8	0,308	0,372	0,225	0,210	0,223	0,162
	1,6	0,247	0,411	0,132	0,117	0,138	0,294
	3,2	0,468	0,529	0,008	0,000	0,039	0,529
	6,4	1,185	1,251	0,234	0,214	0,226	1,037
	12,8	2,587	2,020	0,110	0,092	0,109	1,928
7	0	0,269	0,308	0,177	0,169	0,175	0,139
	0,1	0,373	0,428	0,291	0,283	0,277	0,145
	0,2	0,161	0,207	0,067	0,059	0,079	0,148
	0,4	0,198	0,264	0,078	0,070	0,089	0,194
	0,8	0,703	0,849	0,593	0,578	0,539	0,271
	1,6	0,230	0,475	0,110	0,105	0,113	0,370
	3,2	0,672	0,877	0,149	0,136	0,135	0,741
	6,4	1,011	1,068	0,109	0,100	0,122	0,968
	12,8	2,305	2,017	0,187	0,173	0,171	1,844
8	0	0,540	0,576	0,465	0,451	0,432	0,125
	0,1	0,243	0,277	0,156	0,149	0,162	0,128
	0,2	0,125	0,212	0,045	0,039	0,060	0,173
	0,4	0,860	0,919	0,766	0,745	0,690	0,174
	0,8	0,410	0,532	0,282	0,265	0,258	0,267
	1,6	0,620	0,856	0,480	0,458	0,413	0,398
	3,2	1,783	2,133	1,481	1,458	1,371	0,675
	6,4	1,278	1,633	0,425	0,403	0,363	1,230
	12,8	2,303	2,051	0,230	0,217	0,217	1,834

Tableau 7. Valeurs brutes des absorbances aux longueurs d'onde 354, 414, 700, 750 et 900 nm (répétitions 5, 6, 7, 8).

C: concentration en Mexel[®] 432. λ : longueur d'onde de mesure.

3^e Partie. Discussion et conclusion

- 1. L'embryon de carpe comme modèle en toxicologie**
- 2. Principales informations concernant le Mexel[®] 432 apportées par l'utilisation du modèle embryon de carpe**

Discussion et conclusion

1. L'embryon de carpe comme modèle en toxicologie

La protection de l'environnement exige des contrôles *a priori* et *a posteriori* des effets toxicologiques des produits chimiques et matériaux divers utilisés par l'homme. Cependant, la réalisation d'essais de laboratoire ou d'études sur le terrain représente un coût économique et une contrainte de temps importants et l'augmentation des exigences normatives pourrait se retourner contre l'innovation. C'est pourquoi il est nécessaire de développer des méthodes d'étude et des modèles toxicologiques expérimentaux capables d'apporter un maximum d'informations au moindre coût. A ce titre, l'embryon de poisson, et notamment celui de la carpe commune, présente de nombreux avantages (Cf. 2^e Partie, § 1.2.).

Une recherche bibliographique informatisée portant sur les études toxicologiques relatives aux stades précoces du développement des poissons à partir des mots clés "*fish* and (early life stage* or egg* or larva*) and toxic**" dans la base de données Biological Abstract durant la période 1990-1997, a permis de répertorier 377 références portant sur 95 espèces différentes. Les espèces d'eau douce prédominent, notamment la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) (environ 12 % des études), le tête de boule (*Pimephales promelas*) (environ 9 %), la carpe commune (environ 6 %), le poisson zèbre (*Brachydanio rerio*) ou le medaka (*Oryzias latipes*) (environ 4 % chacun) et le crapet arlequin (*Lepomis macrochirus*) (environ 2,5 %). Les poissons euryhalins comme les saumons représentent ensemble environ 12 % des citations. Les poissons de mer les plus cités sont la lamproie marine (*Petromyzon marinus*) (environ 2,5 %), les diverses soles (*Pleuronectes sp.*) (ensemble environ 2,5 %), le hareng (*Clupea harengus*) et le topsmelt (*Atherinops affinis*) (environ 2 % chacun).

Une recherche bibliographique portant sur la totalité des stades de développement des poissons (mots clés "*fish* and toxic**") a permis de recenser plus de 8000 références, dont 350 concernent la carpe (ensemble des espèces) et 60 sur la carpe commune. Dans cet ensemble, les stades embryo-larvaires ne représentent que 4,7 % du total. Chez la carpe commune 6 % des études concernent les stades embryo-larvaires. Ainsi, bien que les stades précoces du développement aient été considérés comme des stades de sensibilité critique dans le cycle de vie des poissons (Cf. 2^e Partie 1.2.; McKim, 1977; OCDE, 1997), leur prise en compte dans les études toxicologiques est restée limitée.

Cette faible quantité d'études sur les stades précoces de développement chez les poissons

reflète l'usage limité dans les réglementations liées à l'usage des produits chimiques. En effet, contrairement aux essais sur juvéniles ou adultes, les tests embryo-larvaires sur poisson ne sont exigés que pour des substances commercialisées en quantité très importante.

Par ailleurs, les difficultés de mise en oeuvre des tests embryo-larvaires au laboratoire ont peut-être aussi joué un rôle dans cette sous-estimation. Par exemple, la mise en oeuvre de nos essais a confirmé l'importance des contraintes expérimentales associées au modèle embryon de carpe, notamment pour la stabulation des géniteurs au laboratoire ou le transport des gamètes, l'induction de ponte et la réalisation rapide des fécondations en raison de la vitesse de surmaturation ovocytaire.

Cependant, la grande prolificité des carpes permet d'envisager la réalisation d'un grand nombre d'essais avec une seule ponte. Ces essais peuvent être simultanés, mais la possibilité de ralentir le développement par le froid pourrait permettre aussi d'utiliser les produits d'une seule ponte pour effectuer des essais successifs (Cf. 2^e Partie, § 2.1.) sur des larves ayant des âges physiologiques équivalents: par exemple, on pourrait, sur une seule et même ponte, établir une CL_{50} (48 h):

- dans un premier essai sur des animaux incubés à 24°C depuis la fécondation pendant 4 jours,
- dans un deuxième essai sur des larves incubées à 15°C depuis la fécondation pendant 12 jours.

Dans nos essais, des larves ont été exposées à divers pesticides après séjour préalable à 24°C jusqu'à l'éclosion, puis à 11°C ou 14°C jusqu'au début de l'exposition, elle même réalisée à 24°C. Ainsi, les animaux ont été soumis à deux chocs thermiques importants et, même si aucun effet toxique visible n'a été observé chez les témoins, les activités toxiques de 3 pesticides (deltaméthrine, captafol et DNOC) mesurées dans ces conditions ont été particulièrement élevées (Cf. 2^e Partie, § 2.5.). Cependant, dans ces essais, d'autres facteurs que le régime thermique auraient pu expliquer la forte activité observée: âge élevé des larves au moment de l'exposition, sensibilité particulière de la ponte utilisée pour les tests, recours à des conditions statiques d'exposition. *Par conséquent, la possibilité expérimentale de conserver les larves de carpe à basse température comme matériel biologique de réserve pour des essais successifs ne pourra être validée qu'avec la démonstration d'une indépendance toxicologique réelle de ces larves vis-à-vis du régime thermique d'incubation (température de base et variations de température).*

La mise en évidence d'une diminution importante de la toxicité de la deltaméthrine aux basses températures (Cf. 2^e Partie, § 2.5. Tableau 3) confirme *la nécessité des études multifactorielles pour l'évaluation des risques toxicologiques environnementaux*. Le modèle embryon de carpe apparaît comme particulièrement favorable à ce type d'études. Par exemple, il tolère, sans effets létaux, des températures constantes d'incubation comprises entre 12 et 28°C (Reznichenko, 1976) et selon nos essais (résultats non publiés) des températures jusqu'à 10°C après éclosion.

La sensibilité embryo-larvaire de la carpe commune au Mexel[®] 432 est comparable à celle établie sans apport de nourriture pour des larves de diverses espèces de poissons (Cf. 2^e Partie, § 1.1.6.5. Tableau 9: essais sur tête de boule, poisson zèbre et carrelet). Cette observation rejoint celle de Lefebvre (1990) à propos de la toxicité de 9 pesticides. *La réputation de la carpe quant à sa tolérance toxicologique élevée mériterait donc d'être mise à l'épreuve par des expériences spécifiques. En même temps, des études systématiques réalisées dans des conditions expérimentales comparables devraient vérifier la thèse suivant laquelle les stades embryo-larvaires représentent une période de sensibilité critique dans le cycle de vie des poissons.*

Dans nos essais réalisés à partir de la fécondation, les taux de survie sur témoins ont varié dans de larges proportions (Cf. 2^e Partie, § 2.1. Tableau: 1), certains d'entre eux étant largement inférieurs aux taux exigés dans les tests normalisés (OCDE, 1997). En outre, quelque soit leurs valeurs initiales, ces taux de survie sont restés stables après éclosion jusqu'à l'apparition des mortalités par inanition. Cependant, les seuils de sensibilité mesurés en présence du Mexel[®] 432 n'ont montré aucune relation nette avec ces taux, une observation qui rejoint celles effectuées avec d'autres produits (Lefebvre, 1990; Ghillebaert, 1996). Nos essais sur le Mexel[®] 432 confirment donc après Ghillebaert (1996), que l'observation de la stabilité des taux de survie larvaire chez les témoins pourrait compléter ou remplacer les valeurs absolues de ces taux comme critère de qualité des pontes.

L'étude de la toxicité du Mexel[®] 432 en présence d'un antigel ou de suspensions de cendres industrielles (Cf. 2^e Partie, § 2.6.), a confirmé l'existence d'un effet toxicologique spécifique des espèces de poissons à oeufs collants: l'inhibition du collage. Cet effet, notamment sous l'influence de particules en suspension comme des cendres ou des argiles, pourrait avoir des implications biogéographiques chez de nombreuses espèces de poissons. Chez la carpe, le collage des oeufs résulte de la libération de mucopolysaccharides au moment de la mise à l'eau

des ovocytes. Il est donc possible de le déclencher à volonté dans des solutions d'essai. Le modèle de l'embryon de carpe est donc un modèle favorable pour la quantification de cet effet toxique. L'élaboration d'un système d'agitation des ovocytes au moment de l'activation a permis de mettre en évidence un seuil d'activité anti-collage, mais sans établir jusqu'ici de relation dose-effet. *D'autres essais seront donc nécessaires pour élaborer une méthode standardisée de quantification de ce phénomène.*

2. Principales informations concernant le Mexel[®] 432 apportées par l'utilisation du modèle embryon de carpe

Comme notre étude bibliographique introductive l'a montré, le développement des bioalissures en milieu aquatique peut causer une gêne importante pour de nombreuses activités humaines industrielles. Les agents anti-salissures élaborés pour y faire face doivent s'adapter à la grande diversité des situations techniques rencontrées, des espèces et de leurs effets, de leur mode de recrutement et de dispersion, de leurs sensibilités variées aux facteurs environnementaux, etc. (Cf. 1^e Partie). Mais leur efficacité dans le contrôle des bioalissures ne peut pas suffire à leur choix car ils doivent aussi être utilisables avec un minimum de risques pour les espèces non-cibles dans les zones traitées en même temps qu'un minimum d'effets secondaires néfastes dans les zones de traitement.

Le développement du Mexel[®] 432 présente à la fois l'avantage d'une efficacité avérée contre de nombreuses salissures et d'une protection contre la corrosion. L'enjeu des études réalisées sur plusieurs espèces notamment non-cibles est donc important pour l'évaluation prédictive des risques, en comparant les sensibilités des différentes espèces. De même, la multiplicité des essais sur plusieurs espèces pourrait renseigner sur les modalités d'action du produit.

2.1. Toxicité du Mexel[®] 432 dans une eau synthétique

En eau pure, en exposition continue prolongée à partir de la fécondation, le Mexel[®] 432 est apparu comme un produit de forte toxicité vis à vis de l'embryon de carpe. Par exemple, une CL₅₀ égale à 0,34 mg/L a été mesurée après 7 jours d'exposition sur une ponte particulièrement sensible. Mais une variabilité importante des sensibilités suivant les essais a été observée, la CL₅₀ (7 jours) la plus élevée dans nos essais étant 1,58 mg/L (Cf. 2^e Partie, § 2.1., Tableau 1). La toxicité du Mexel[®] 432 est encore renforcée par l'observation d'effets sur la croissance en concentrations sublétales (Cf. 2^e Partie, § 2.3.). Cependant, l'évaluation des risques liés à

l'emploi du Mexel[®] 432 doivent tenir compte des conditions de son utilisation: en particulier, le caractère intermittent des traitements par ce produit fait disparaître les effets toxiques à des concentrations pourtant hautement toxiques en exposition continue. *Cet exemple montre la nécessité d'élaborer des tests spécifiques pour l'évaluation des risques toxiques associés à des expositions intermittentes.*

Comme cela a été observé avec d'autres toxiques et d'autres espèces de poissons, l'embryon de carpe apparaît plus tolérant que la larve (Cf. 2^e Partie, § 2.1. Tableau 2) peut être en raison d'un rôle protecteur du chorion (Van Leeuwen *et al.*, 1985; Kristensen, 1990; Fent et Meir, 1994; Lefebvre, 1990). *L'utilisation des techniques d'élimination du chorion et d'incubation des embryons déchorionnés (Yamaha et al., 1986) pourrait permettre de vérifier cette hypothèse.*

Dans la plupart de nos essais (Cf. 2^e Partie, § 2.1. Tableau 1, 2.4. Tableau 1), la prolongation de l'exposition au Mexel[®] 432 après éclosion jusqu'à la phase d'inanition ne provoque pas d'importantes mortalités. Les animaux ayant supporté les premiers jours d'exposition tolèrent sa prolongation. Le Mexel[®] 432 ne semble donc pas avoir en général d'effets cumulatifs. Ce résultat est soutenu par l'absence d'effets différés après la fin d'une exposition (Cf. 2^e Partie, § 2.1. Tableau 2). La réponse larvaire en tout ou rien devant l'action du Mexel[®] 432 pourrait être due à un effet protecteur des mucus épithéliaux notamment au niveau des branchies. *Une étude des effets du Mexel[®] 432 sur les couches de mucus pourrait vérifier cette hypothèse.*

Cependant, après une exposition prolongée jusqu'à la phase d'inanition, la sensibilité au Mexel[®] 432 paraît augmentée, ce qui pourrait manifester aussi bien un épuisement accéléré des réserves trophiques vitellines et/ou une sensibilité spécifique des larves affaiblies par l'inanition. La première hypothèse est cohérente avec l'observation d'une diminution de la croissance (Cf. 2^e Partie, § 2.3.) et d'une augmentation de la mobilité larvaire en présence du Mexel[®] 432 (résultats non publiés). *Une étude spécifique de la sensibilité propre de la phase d'inanition serait nécessaire pour vérifier ces interprétations.*

Les solutions de Mexel[®] 432 conservées en eau synthétique gardent leur toxicité pendant plusieurs jours, et le Mexel[®] 432 éventuellement déposé sur les parois des incubateurs ou les surfaces présentes dans le milieu (matières organiques et en suspension) n'exerce pas d'effet létal sur les larves: Ainsi, la toxicité du Mexel[®] 432 ne paraît pas résulter d'un effet des surfaces traitées. Par contre, le Mexel[®] 432 pourrait très bien agir en filmant en permanence les surfaces

biologiques (chorion, branchies, peau). Cependant, l'étude histopathologique de la branchie (Cf. 2^e Partie, § 2.8.) semble montrer des effets sur les hématies et les vaisseaux sanguins après des traitements qui laissent apparemment intacts les épithéliums et notamment leurs cellules muqueuses. *Il serait donc nécessaire de rechercher des méthodes permettant de visualiser la présence d'un éventuel film de Mexel[®] 432 sur les surfaces biologiques.*

Dans nos conditions expérimentales, les effets létaux du Mexel[®] 432 sont légèrement plus importants à pH 9 qu'à pH 6,9 (Cf. 3^e Partie, Tableau 3). Cette influence du pH pourrait être attribuée à une augmentation de la forme non ionique des amines conduisant à une affinité plus grande pour les membranes biologiques par interaction hydrophobe. *La mise en évidence des pK d'ionisation du Mexel[®] 432 permettrait de tester cette interprétation.*

Contrairement à ce qui pourrait être attendu d'un produit détergent et donc susceptible de se lier aux membranes biologiques, ni la température (entre 14 et 24°C), ni la concentration en calcium (entre 0 et 800 mg/L), ni leurs interactions n'ont d'effet significatif sur l'activité létale du Mexel[®] 432. *La connaissance des caractéristiques du Mexel[®] 432 comme tensioactif en particulier la température et concentration micellaires critiques pourrait éventuellement servir à interpréter cette relative indépendance.*

La toxicité du Mexel[®] 432 paraît due pour l'essentiel à son contenu en diamines grasses (produit A). Sa fonction antisalissure est donc probablement déterminée par ce seul produit. *La nécessité dans cette fonction de la présence des autres composants (amines tertiaires et amino-alcool) devrait donc être testée.*

De part ses propriétés tensioactives cationiques, le Mexel[®] 432 devrait *a priori* pouvoir se lier aux molécules hydrophobes comme aux molécules hydrophiles anioniques. On pourrait donc s'attendre à ce qu'il exerce une influence sur la toxicité des xénobiotiques hydrophobes et anioniques. Dans nos conditions expérimentales (Cf. 2^e Partie, § 2.5.), cette hypothèse n'est cependant pas vérifiée dans le cas de 4 pesticides choisis pour leur degré d'hydrophobie varié ou leur caractère anionique.

2.2. Toxicité du Mexel[®] 432 dans des eaux de rivière

En eau pure, une solution concentrée en Mexel[®] 432 (10 mg/L) provoque 100 % de mortalité en quelques heures (Cf. 3^e Partie). La même solution, mais préparée avec une eau de Seine et conservée pendant une heure, ne provoque des mortalités qu'après 3 jours d'exposition (Cf. 3^e Partie, Figure 1). L'eau de Seine a donc un effet inhibiteur immédiat sur le Mexel[®] 432.

Conservée pendant 2 jours, cette solution est sans effet létal jusqu'au 7^e jour d'exposition. L'inhibition immédiate (moins d'une heure) est donc suivie par une inhibition lente (quelques jours). Ces résultats confirment les observations de Allonier *et al.*, (1995 et en préparation) qui distinguent par des dosages colorimétrique en milieu acide et des tests microtox une "*demande immédiate*" en Mexel[®] 432 et une "*disparition lente*" d'origine physico-chimique ou bactérienne (Cf. 2^e Partie, § 1.1.5.). En eau de Seine, la demande immédiate peut atteindre plus de 70 % et augmente avec la quantité de matières en suspension (MES).

Les acides humiques provoquent en moins d'une heure une importante réduction de la toxicité du Mexel[®] 432 vis-à-vis de l'embryon de carpe (Cf. 3^e Partie, Tableau 5). Cet effet peut s'expliquer par une "*demande immédiate*" en Mexel[®] 432 en relation avec ses propriétés tensioactives, par complexation avec les acides humiques. Des dosages du Mexel[®] 432 en milieu acide en présence d'orange de méthyle, montrent en effet, comme dans l'eau de Seine, que la quantité de Mexel[®] 432 libre diminue fortement en présence d'acides humiques ou d'argiles en suspension (Cf. 3^e Partie, Figures 2 et 3). De même, des complexes acides humiques-Mixel[®] 432 se concentrent à l'interface entre l'eau et un solvant organique (dichloroéthane à pH acide ou n-octanol à pH neutre), ce qui a pour effet, en présence d'orange de méthyle, de réduire à la fois la concentration en acides humiques dans l'eau et la concentration en complexe Mixel[®]-orange de méthyle dans le solvant organique. *Le Mexel[®] 432 comme certaines amines grasses pourrait donc être utilisé pour éclaircir les eaux chargées en matières organiques. En même temps, la concentration et la toxicité des solutions de Mexel[®] 432 au voisinage des interfaces eau-air devraient être prises en considération.*

Cependant la démonstration rigoureuse du rôle des acides humiques ou des argiles dans la demande immédiate en Mexel[®] 432 supposerait de doser le produit libre en solution aux pH des eaux traitées et en l'absence de l'orange de méthyle. Des essais préliminaires (non publiés) ont effectivement montré que, dans ces conditions, le spectre d'absorption des acides humiques est modifié en présence du Mexel[®] 432 ainsi que la quantité de Mexel[®] 432 extractible par le n-octanol, un solvant organique dont le degré d'hydrophobie est comparable à celui des membranes biologiques.

L'adsorption du Mexel[®] 432 sur les matières en suspension explique sans doute la faible toxicité mesurée dans les essais réalisés sur des larves exposées en présence de nourriture (Cf. 1^e Partie, § 1.1.6.5., Tableau 9) et la non-toxicité à court terme du Mexel[®] 432 ajouté à des effluents de papeterie ou de laiterie (résultats non publiés).

La diminution du Mexel[®] 432 biodisponible dans le milieu en présence de matières organiques dissoutes ou de matières en suspension exigerait donc le recours à des doses plus élevées que dans des eaux peu chargées pour la lutte contre les biosalissures. Dans ces conditions, la quantité de Mexel[®] 432 libre biodisponible dans les eaux de rejet ne sera que peu ou pas diminuée par la demande immédiate, tandis que celle présente sous forme adsorbée pourra augmenter. L'évaluation des risques écotoxicologiques liés au Mexel[®] 432 dans les eaux naturelles bénéficie des connaissances sur le devenir des amines grasses dans le milieu aquatique (Allonier *et al.*, en préparation; Van Ginkel, 1993 et 1996).

2.3. Dosage du Mexel[®] 432

Etant donné que la toxicité du Mexel[®] 432 peut se manifester pour des concentrations de quelques centaines de µg/L, des méthodes de dosage compatibles avec ces niveaux de toxicité devraient être élaborées. Nos essais suivant la technique standardisée par EDF (Allonier, 1995: dosage colorimétrique à l'orange de méthyle en milieu acide), ont permis d'atteindre en eau de laboratoire des seuils de détection et de mesure de 0,29 et 0,58 mg/L (Cf. 4^e Partie). *Il sera donc nécessaire de perfectionner la technique de dosage:*

- *pour atteindre des seuils de détection et de mesure inférieurs à 100 µg/L,*
- *pour adapter la technique de dosage à la présence des impuretés contenues dans les eaux naturelles,*
- *pour mesurer la quantité de Mexel[®] 432 réellement biodisponible,*
- *pour mesurer la quantité de Mexel[®] 432 adsorbé ou lié et visualiser les films de Mexel[®] déposés sur les surfaces solides.*

Ces perfectionnements devront permettre à la fois d'optimiser les doses utilisées en fonction de la demande immédiate des eaux traitées et de contrôler les concentrations dans les eaux de rejets.

Conclusion générale et perspectives

Aux vues de ces résultats, il apparaît nécessaire de développer des essais sur le développement embryon-larvaire de la carpe commune, en vue d'une normalisation. En effet, et malgré certains inconvénients de ce modèle, il a néanmoins permis d'évaluer les niveaux de toxicité de nombreux produits déjà existants sur le marché notamment la deltaméthrine, le captafol, le DNOC, des effluents industriels, ... (Lefebvre, 1990; Ghillebaert, 1996; Cf. 2^e Partie, § 2.7.), ou en cours d'évaluation pour la mise sur le marché des produits anti-salissures et anticorrosion comme le Mexel[®] 432. Il a également contribué à prévoir, en partie, le devenir de ce produit dans le milieu aquatique (complexation ou liaison avec les matières organiques ou en suspension).

De nombreux efforts doivent être entrepris pour améliorer la faisabilité des essais sur embryons et larves de carpe, notamment, en utilisant un système de flux continu pour se dispenser de la préparation journalière des solutions d'essai et surtout pour maintenir des concentrations constantes en produits testés.

Un allègement des essais pourrait être obtenu, notamment par l'utilisation de techniques comme l'analyse d'images, ce qui assurerait un comptage rapide et facile des oeufs.

La stabulation des géniteurs et la ponte peuvent être réalisées chez un pisciculteur ce qui pourrait alléger la quantité de travail durant la réalisation des essais.

Enfin, la conservation des gamètes ou des larves pourrait être un moyen pratique pour disposer d'un matériel biologique disponible, notre effort de ralentir le développement embryon-larvaire par le froid nécessite d'être poursuivi.

Dans nos essais, comme dans de nombreuses études, le critère de toxicité retenu a été la létalité, mais l'embryon de carpe offre la possibilité d'utiliser d'autres critères (Ghillebaert, 1996). L'optimisation de l'utilisation du modèle embryon de carpe devrait s'accompagner par l'augmentation des critères de toxicité pour une bonne évaluation de la toxicité des xénobiotiques.

Le Mexel[®] 432 fait partie des produits généralement actifs à court terme, les mortalités dépendent essentiellement des concentrations utilisées. Toutefois, et contrairement aux expositions continues, les niveaux de toxicité baissent fortement lors d'expositions intermittentes (Cf. 2^e Partie, § 2.2.).

Parfois on observe une augmentation de la sensibilité en prolongeant l'exposition sans toutefois affirmer l'existence d'effets cumulatifs ou d'effets différés. Les altérations sont d'autant plus importantes que les concentrations sont proches des doses létales et au moins chez l'embryon et la larve de carpe, les effets létaux cessent quand l'exposition s'arrête (Cf. 2^e Partie, § 2.1.).

La grande rapidité d'action du Mexel[®] 432 et le caractère non spécifique des lésions qui touchent tous les tissus en contact avec l'eau, sont des éléments compatibles avec une atteinte des structures membranaires entrant en contact avec le produit (Khalanski, 1994; Cf. 2^e Partie, § 2.8.).

La détermination des conditions d'acceptabilité environnementale de l'utilisation du Mexel[®] 432 bénéficie des connaissances accumulées sur divers organismes non-cibles et sur d'autres critères de toxicité autres que les effets létaux.

Bibliographie

Bibliographie

- ABDALLAH, M. 1994. Corrosion kinetics of carbon steel in Hcl solutions and the effect of some ethoxylated fatty amines as corrosion inhibitors. *Annali di Chimica*. **84**: 529-539.
- ABEL, P.D. 1974. Toxicity of synthetic detergents to fish and aquatic invertebrates. *J. Fish Biol.* **6**: 279-298.
- AFANASEV, S.A., ROMANOVA, E.G and SLEPNEV, A.E. 1991. Bacterial fouling of heat exchangers. *Gidrobiol. Zh.* **27**: 56-61.
- ALLONIER, A.S. 1995. Etude analytique et écotoxicologique d'un produit filmogène. DEA / Institut national agronomique Paris-Grignon. 27 pages.
- ALLONIER, A.S. et KHALANSKI, M. 1996. Biodégradation du Mexel 432 par des bactéries de la Seine. Rapport EDF-DER/INA Paris-Grignon. HE-31/96-020. 17 pages.
- ALLONIER, A.S., ANGELY, C., BOUTEAU, B., GOLASZEWSKI, G. et KHALANSKI, M. Dosage et comportement d'un produit anti-salissure en eau de rivière. Rapport EDF/DER en cours de rédaction.
- AMBLER, R.P and CANETE, J.I. 1991. Settlement and recruitment of *Pyura chilensis* Molina, 1782 (Urochordata: Ascidiacea) on artificial plates suspended in La Herradura Bay, Coquimbo, Chile. *Rev. Biol. Mar.* **26**: 403-413.
- ANDERSON, M.J. and UNDERWOOD, A.J. 1994. Effects of substratum on the recruitment and development of an intertidal estuarine fouling assemblage. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **184**: 217-236.
- ANIL, A.C. and WAGH, A.B. 1988. Accumulation of copper and zinc by *Balanus amphitrite* in a tropical estuary. *Mar. Pollut. Bull.* **19**: 177-180.
- ANIL, A.C., CHIBA, K., OKAMOTO, K. and KUROKURA, H. 1995. Influence of temperature and salinity on larval development of *Balanus amphitrite*: Implications in fouling ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **118**: 159-166.
- ANTSULEVICH, A.E. and CHIVILEV, S.M. 1992. Current state of benthic fauna in Luga Bay of the Gulf of Finland. *Vestn. S. T-Peterb. G. Univ. Ser. 3 Biol.* **0(3)**: 3-7.
- AREHMOUCH, L, GHILLEBAERT, F., CHAILLOU, C. and ROUBAUD, P. Toxicity of Mexel[®], a surface antifouling agent, towards common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryolarval development in synthetic waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* Soumis.
- AREHMOUCH, L., TFIBEL, V., CHAILLOU, C., GHILLEBAERT, F., and ROUBAUD, P. Lethal effects of Mexel[®], an antifouling agent, on common carp embryolarval stages, in river waters and under various physico-chemical conditions in laboratory water. *Environ. Toxicol.Chem.* Sous presse.
- ARIAS, E., SOUSA, J.M, MORALES, E, VIVES, F. and SUAUI, P. 1986. Biological "fouling" in the harbor of Villanueva Y Geltru (Eastern Spain): Trials in prevention with antifouling paints. *Inf. Tec. Inst. Invest. Pesq.* **0(134)**: 3-24.
- AUZOUX, S. et COULON, I. 1993. Etude du processus d'action toxique d'un produit antsalissures sur la palourde *Ruditapes Decussatus* (Mollusque bivalve). Rapport final d'étude entrant dans le contrat cadre entre EDF et BERTIN. 37 pages.
- BAATRUP, E. and DOVING, K.B. 1990. Histochemical demonstration of mercury in the olfactory system of salmon (*Salmo salar* L.) following treatments with dietary methylmercuric chloride and dissolved mercuric chloride. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **20**: 277-289.
- BAGAVEEVA, E.V. 1986. Biogeographical and biotopic study of fouling polychaetes of the northwestern Sea of Japan. *Biol. morya (Vladivost.)*. **0(1)**: 9-15.

- BAGAVEEVA, E.V. 1988. Polychaetes in the fouling of coastal ships in the north-western Sea of Japan. *Biol. morya (Vladivost.)* **0(3)**: 22-26.
- BAILEY, G.S., WILLIAMS, D.E. and HENDRICKS, J.D. 1996. Fish models for environmental carcinogenesis: The rainbow trout. *Environ. Health Perspect.* **104**: 5-21.
- BAUMANN, S.B. 1991. The vibrating probe as a sensitive toxicological assay for the effects of tributyltin on ionic currents in *Acetabularia mediterranea*. *Toxicol. In Vitro*. **5**: 103-108.
- BECKER, K. 1993. Attachment strength and colonization patterns of two macrofouling species on substrata with different surface tension (in situ studies). *Mar. Biol. (Berl.)*. **117**: 301-309.
- BELANGER, S.E., CHERRY, D.S., FARRIS, J.L., SAPPINGTON, K.G. and CAIRNS, J.JR. 1991. Sensitivity of the Asiatic clam to various biocidal control agents. *Am. Water Works Assoc. J.* **83**: 79-87.
- BENITEZ, J.C., GIUDICE, C.A. and RASCIO, V.J.D. 1985. Bioactivity of antifouling paints based on organotin toxicants. *J. Chem. Technol. Biotechnol. A Chem. Technol.* **37**: 387-394.
- BENTON, M.J., DIAMOND, S.A. and GUTTMAN, S.I. 1994. A genetic and morphometric comparison of *Helisoma trivolvis* and *Gambusia holbrooki* from clean and contaminated habitats. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **29**: 20-37.
- BERG, C.J.JR., BUTMAN, B., EARLY, J.A. and TURNER, R.D. 1987. Seasonal recruitment of marine invertebrates to hard substrates on Georges Bank and the Eastern Continental shelf of the USA. *Nautilus*. **101**: 19-24.
- BHAT, K.L. and WAGH, A.B. 1992. Biochemical composition of zooplankton of Bombay High (oil platform) area in the Arabian Sea. *Indian J. Mar. Sci.* **21**: 220-223.
- BLAISE, C., 1991. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility, and prospects. *Environ. Toxicol. Water Qual.* **6**: 145-155.
- BOBZIN, S.C. and FAULKNER, D.J. 1992. Chemistry and chemical ecology of the Bahamian sponge *Aplysilla glacialis*. *J. Chem. Ecol.* **18**: 309-332
- BRAIKO, V.D. and DOBROTINA, G.A. 1988. Ecology and metabolism of *Obelia loveni* hydroids in fouling cenoses. *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.* **0(6)**: 824-832.
- BRAIKO, V.D., BOBKOVA, A.N. and DOBROTINA, G.A. 1988. Metabolites of *Botryllus* and their functional role in the community. *Izv. Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.* **0(1)**: 29-35.
- BROOKE, L. 1996. Mexel 432 toxicity testing at Lake Superior Research Institute. Lake Superior Research Institute, university of Wisconsin-Superior / RTK Technologies, Inc Baton Rouge, LA. 18 pp.
- BROS, W.E., 1987. Effects of removing or adding structure (barnacle shells) on recruitment to a fouling community in Tampa Bay, Florida (USA). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **105**: 275-296.
- BROWN, L.N., ROBINSON, M.G. and HALL, B.D. 1988. Mechanisms for copper tolerance in *Amphora coffeaeformis*: Internal and external binding. *Mar. Biol. (Berl.)*. **97**: 581-586.
- BROWN, V., SHURBEN, D., MILLER, W. and CRANE, M. 1994. Cadmium toxicity to rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* Walbaum and brown trout *Salmo trutta* L. over extended exposure periods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **29**: 38-46.
- BRYKOV, V.A, CHERNYAEV, M.ZH. and BLINOV, S.V. 1986. The blue mussel in the fouling of anchor chains in Vostok Bay in the Sea of Japan. *Biol. Morya (Vladivost.)*. **0(4)**: 29-35.
- BUSSCHER, H.J, VAN-DER-KUIJL-BOOIJ, M. and VAND-DER-MEI, H.C. 1996. Biosurfactants from thermophilic dairy streptococci and their potential role in the fouling control of heat exchanger plates. *J. Ind. Microbiol.* **16**: 15-21.

- CANETE, J.I. and AMBLER, R.P. 1990. Growth and age determination in the spirorbid polychaete *Romanchella pustulata* Knights-Jones, 1978. *Rev. Biol. Mar.* **25**: 147-164.
- CARLTON, J.T. 1992. Introduced marine and estuarine mollusks of North America: An end-of-the-20th-century perspective. *J. Shellfish Res.* **11**: 489-505.
- CHAILLOU, C., LEFEBVRE, B., SJAFEL, D. et ROUBAUD, P. 1991. L'embryon de carpe en segmentation: un modèle expérimental pour l'étude toxicologique du cycle cellulaire. *Cybium*. **15**: 303-314.
- CHAILLOU, C., REINAUD, P., SJAFEL, D., LEFEBVRE, B. et ROUBAUD, P. 1989. Surmaturation ovocytaire et développement embryonnaire de l'oeuf de la carpe commune. In *Aquaculture Europe 89, European Aquacult. Soc. Special Pub.*, **10**: 61-62.
- CHEN, C.P., TSAI, W.S., LIU, C.Y. and LEE, Q.S. 1990. Recruitment and induction of settlement of planktonic juveniles of the oyster flatworm, *Stylochus orientalis* Bock (Platyhelminthes, Polycladida). *Bull. Inst. Zool. Acad. Sin. (Taipei)*. **29**: 57-64.
- CHENG, I.J. and CHEN, T.Z. 1994. Preliminary study of the macrofouling invertebrate community on a wooden fishing vessel. *J. Fish. Soc. Taiwan*. **20**: 269-271.
- CHEUNG, S.G. 1991. Energetics of transplanted populations of the green-lipped mussel *Perna viridis* (Linnaeus) (Bivalvia: Mytilacea) in Hong Kong: I. Growth, condition and reproduction. *Asian Mar. Biol.* **8**: 117-131.
- CHIEN, Y.H. and CHOU, Y.H. 1989. The effects of residual chlorine, temperatures and salinities on the mortality of larval milkfish *Chanos chanos*. *J. Fish. Soc. Taiwan*. **16**: 271-280.
- CHIMENZ, C., FRESI, E. and BRUNETTI, R. 1985. Study of benthic populations of the hard substrate of the Port of Ischia (Italy): *Ascidia*. *Cah. Biol. Mar.* **26**: 15-33.
- CLAAS, K.E., HOHAUS, E. and MONIEN, H. 1986. Liquid column-chromatographic separation and determination of long-chain primary n-alkylamines (n-C₁₀H₂₁NH₂ to n-C₂₂H₄₅NH₂) after their fluorescence derivatization with salicylaldehyde diphenylboron chelate. *Fresenius Z Anal. Chem.* **325**: 15-19.
- CLEARY, J.J. and STEBBING, A.R.D. 1985. Organotin and total tin in coastal waters of southwest England (UK). *Mar. Pollut. Bull.* **16**: 350-355.
- CLOETE, T.E., SMITH, F. and STEYN, P.L. 1989. The use of planktonic bacterial populations in open and closed recirculating water cooling systems for the evaluation of biocides. *Int. Biodeterior.* **25**: 115-122.
- COOPER, E.L., ARIZZA, V., CAMMARATA, M., PELLERITO, L. and PARRINELLO, N. 1995. Tributyltin affects phagocytic activity of *Ciona intestinalis* hemocytes. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* **112**: 285-289.
- COULON, I. 1993. Mise au point d'un système contrôlé de culture de cellules de coeur d'huître *Crassostrea gigas*. Application au test de la toxicité des produits chimiques en milieu aquatique. Thèse de doctorat. Institut National Agronomique Paris Grignon. 249 pages.
- CZEMBORD, N., GIAMBERINI, L. and PIHAN, J.C. Effects of Mexel 432 on pumping and valve activities of zebra mussel: used of a new experimental evaluation system. Rapport en préparation. 13 pages.
- DANIEL, G.F., CHAMBERLAIN, A.H.L. and JONES, E.B.G. 1987. Cytochemical and electron microscopical observations on the adhesive materials of marine fouling diatoms. *Br. Phycol. J.* **22**: 101-118.
- DAVENPORT, J., OXFORD, P. and AWOBAMISE, A. 1986. A study of the effectiveness of antifouling electrodes in the marine environment. *Water Res.* **20**: 703-708.

- DAVIES, I.M. and PAUL, J.D. 1986. Accumulation of copper and nickel from anti-fouling compounds during cultivation of scallops (*Pecten maximus*) and Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*. **55**: 93-102.
- DAVIS, A.R. 1991. Alkaloids and ascidian chemical defense: Evidence for the ecological role of natural products from *Eudistoma olivaceum*. *Mar. Biol. (Berl.)*. **111**: 375-380.
- DE RUITER, H., MEINEN, E. and VERBEEK, M.A.M. 1992. Influence of the type and concentration of surfactant on glyphosate absorption; relevance of drop spreading and drying time. *Adjuvants Agrichem.* 109-16.
- DEALTERIS, J.T., BULLOCK, R.C. and ROMNEY, W.L. 1988. Alternative treatments to prevent the biodeterioration of offshore wood lobster traps by the wood-boring bivalve, *Xylophaga atlantica*. *J. Shellfish Res.* **7**: 445-452.
- DE-FRANCA, F.P. and LUTTERBACH, M.T.S. 1996. Variation in sessile microflora during biofilm formation on AISI-304 stainless steel coupons. *J. Ind. Microbiol.* **17**: 6-10.
- DEGREMONT. 1979. Correction and conditioning of water. In *Water treatment handbook*. 5th ed. (J. Wiley and Sons, Eds.), New York. pp. 396-397.
- DEMPSEY, C.H. 1986. The exposure of herring (*Clupea harengus*) postlarvae to chlorine in coastal power stations. *Mar. Environ. Res.* **20**: 279-290.
- DEVI, P. 1995. Abundance of bacterial and diatom fouling on various surfaces. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad. Part B Biol. Sci.* **61**: 231-239.
- DE-WOLF, W., SEINEN, W. and HERMENS, J.L.M. 1993. N-acetyltransferase activity in rainbow trout liver and in vitro biotransformation of chlorinated anilines and benzenes in fish. *Xenobiotica*. **23**: 1045-1056.
- DILLON, P.S., MAKI, J.S. and MITCHELL, R. 1989. Adhesion of Enteromorpha swarmers to microbial films. *Microb. Ecol.* **17**: 39-48.
- DOHERTY, F.G., FARRIS, J.L., CHERRY, D.S. and CAIRNS, J.JR. 1986. Control of the freshwater fouling bivalve *Corbicula fluminea* by halogenation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **15**: 535-542.
- DOROUDI, M.S. 1996. Infestation of pearl oysters by boring and fouling organisms in the northern Persian Gulf. *Indian J. Mar. Sci.* **25**: 168-169.
- DUBOST, N., MASSON, G. and MORETEAU, J.C. 1996. Temperate freshwater fouling on floating net cages: Method of evaluation, model and composition. *Aquaculture*. **143**: 303-318.
- DUNIER, M. and SIWICKI, A.K. 1994. Effects of Lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity: I. Effect of Lindane on antibody-secreting cells (ASC) measured by ELISPOT assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **27**: 1-6.
- DUNIER, M., SIWICKI, A.K. and DEMAEL, A. 1991. Effects of organophosphorus insecticides: Effects of trichlorfon and dichlorvos on the immune response of carp (*Cyprinus carpio*): III. In vitro effects on lymphocyte proliferation and phagocytosis and in vivo effects on humoral response. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **22**: 79-87.
- DUNIER, M., SIWICKI, A.K., SCHOLTENS, J., DAL-MOLIN, S., VERGNET, C. and STUDNICKA, M. 1994. Effects of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **27**: 324-334.
- DUNIER, M., VERGNET, C., SIWICKI, A.K. and VERLHAC, V. 1995. Effect of lindane exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity: IV. Prevention of nonspecific and specific immunosuppression by dietary vitamin C (ascorbate-2-polyphosphate). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **30**: 259-268.
- EBDON, L., EVANS, K. and HILL, S. 1988. The variation of tributyltin levels with time in selected estuaries prior to the

- introduction of regulations governing the use of tributyltin-based anti-fouling paints. *Sci. Total Environ.* **68**: 207-224.
- EDF. 1996. Eau et environnement. Guide pratique à l'usage des exploitants des centrales thermiques classiques et nucléaires. 143 pages.
- ELLIS, D.V. and PATTISINA, L.A. 1990. Widespread neogastropod imposex: A biological indicator of global TBT contamination?. *Mar. Pollut. Bull.* **21**: 248-253.
- ELLISON, A.M. and FARNSWORTH, E.J. 1990. The ecology of Belizean mangrove-root fouling communities: I. Epibenthic fauna are barriers to isopod attack of red mangrove roots. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **142**: 91-104.
- ENRIGHT, C., KRAILO, D., STAPLES, L., SMITH, M., VAUGHAN, C., WARD, D., GAUL, P. and BORGESE, E. 1984. Biological control of fouling algae in oyster aquaculture. *J. Shellfish Res.* **3**: 41-44.
- EVANS, S.M., DAWSON, M., DAY, J., FRID, C.L.J., GILL, M.E., PATTISINA, L.A. and PORTER, J. 1995. Domestic Waste and TBT Pollution in Coastal Areas of Ambon Island (Eastern Indonesia). *Mar. Pollut. Bull.* **30**: 109-115.
- EVANS, S.M., HUTTON, A., KENDALL, M.A. and SAMOSIR, A.M. 1991. Recovery in populations of dog whelks *Nucella lapillus* (L.) suffering from imposex. *Mar. Pollut. Bull.* **22**: 331-333.
- EVANS, S.M., LEKSONO, T. and MCKINNELL, P.D. 1995. Tributyltin pollution: A diminishing problem following legislation limiting the use of TBT-based anti-fouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* **30**: 14-21.
- FENT, K. and MEIER, W. 1994. Effects of triphenyltin on fish early life stages. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27**: 224-231.
- FISHER, S.W., STROMBERG, P., BRUNER, K.A. and BOULET, L.D. 1991. Molluscicidal activity of potassium to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*: Toxicity and mode of action. *Aquat. Toxicol. (Amst.)* **20**: 219-234.
- FORE, S.A., GUTTMAN, S.I., BAILER, A.J., ALTFATER, D.J. and COUNTS, B.V. Exploratory analysis of population genetic assessment as a water quality indicator: II. *Campostoma anomalum*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **30**: 36-46.
- FORE, S.A., GUTTMAN, S.I., BAILER, A.J., ALTFATER, D.J. and COUNTS, B.V. 1995. Exploratory analysis of population genetic assessment as a water quality indicator: I. *Pimephales notatus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **30**: 24-35.
- FRANZ, D.R. 1989. Population density and demography of a fouling community amphipod. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **125**: 117-136.
- FRANZ, D.R. and MOHAMED, Y. 1989. Short-distance dispersal in a fouling community amphipod crustacean, *Jassa marmorata* Holmes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **133**: 1-14.
- FRONTIER, S. et VIALE, D. 1990. La biomasse. Structure, Fonctionnement et Evolution des Ecosystèmes. pp. 177-189.
- GERHART, D.J. 1986. Prostaglandin A-2 in the Caribbean gorgonian *Plexaura homomalla*: Evidence against allelopathic and antifouling roles. *Biochem. Syst. Ecol.* **14**: 417-422.
- GHILLEBAERT, F. 1996. Le développement précoce des Poissons en écotoxicologie. Exemple: la carpe commune (*Cyprinus carpio* L.): - Importance des facteurs environnementaux et de leurs interactions, - Diversification des critères de toxicité. Thèse de doctorat. Université de Metz, France. 107 pages.
- GHILLEBAERT, F. and BROOKE, L. 1997. Mexel[®] 432 toxicity to cladoceran and Fathead minnow during continuous or daily intermittent exposures. MEXEL SA, France. 12 pages.
- GIAMBERINI, L., CZEMBOR, N. and PIHAN, J.C. 1995. Inhibitory effects of an organic molluscicide on byssal thread

- development in zebra mussels. *J. Invert. Pathol.* **66**: 205-206.
- GIAMBERINI, L., GUEROLD, F., BEAUVAIS, M.A., et PIHAN, J.C. 1993. Etude histopathologique de la branchie de *Dreissena polymorpha* Pallas exposée à un nouveau molluscicide organique. *Hydroécol. Appl.* **5**: 61-70.
- GIAMBERINI, L., GUEROLD, F., BEAUVAIS, M.N. and PIHAN, J.C. 1996. Histological effects of an organic molluscicide on the gills of the zebra mussel: ultrastructural study. *Toxicol. Environ. Chem.* **57**: 27-35.
- GOPAL, K. and RAM, M. 1995. Alteration in the neurotransmitter levels in the brain of the freshwater snakehead fish (*Channa punctatus*) exposed to carbofuran. *Ecotoxicology* **4**: 1-4.
- GOTO, R., KADO, R., MURAMOTO, K. and KAMIYA, H. 1993. Furospogolide, an antifouling substance from the marine sponge *Phyllospongia papyracea* against the barnacle *Balanus amphitrite*. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **59**: 1953.
- GRASSE, P.P. 1961. Zoologie. I. Invertébrés. Embranchement des Mollusques. Précis de Sciences Biologiques publiés sous la direction du Pr P.P. Grassé. Masson et C^{ie} Editeurs. pp: 416-418.
- GRAYSON, B. TERENCE, B., SARAH, L., WALTER, B. and WALTER, D. (Shell Research Limited, Sittingbourne Research Center, Sittingbourne, Kent, ME9 8AG, UK), 1995. Reinvestigating adjuvants for the wild oat herbicide, flamprop-M-isopropyl. I: glasshouse trials. *Pestic. Sci.* **43**: 147-55.
- GREENLAND, D.C., NEWTON, S.H. and FAUCETTE, R.F.JR. 1988. Effects of cage encrustation by the bryozoan *Plumatella casmiana* on production of channel catfish. *Progr. Fish-Cult.* **50**: 42-45.
- HAAG, W.R., BERG, D.J., GARTON, D.W. and FARRIS, J.L. 1993. Reduced survival and fitness in native Bivalves in response to fouling by the introduced zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in western Lake Erie. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**: 13-19.
- HACHE, A. 1966. La corrosion des métaux. Série "Que sais-je", n° 843. 2^e édition, Presses Universitaires de France. 127 pages.
- HARMS, J. 1990. Marine plastic litter as an artificial hard bottom fouling ground. *Helgo. Meeresunters.* **44**: 503-506.
- HELLSTEN, M.E., KLINGBERG, A.W. and GUNVOR KARISSE, B.T. 1989. Liquid detergents from cationic, anionic and nonionic surfactants. Adsorption, detergency and antistatic properties. *J.A.O.C.S.* **66**: 1381-1385.
- HERMANUTZ, R.O., ALLEN, K.N., ROUSH, T.H. and HEDTKE, S.F. 1992. Effects of elevated selenium concentrations on bluegills (*Lepomis macrochirus*) in outdoor experimental streams. *Environ. Toxicol. Chem.* **11**: 217-224.
- HOLMES, P.E. 1986. Bacterial enhancement of vinyl fouling by algae. *App. Environ. Microbiol.* **52**: 1391-1393.
- HONTELA, A., RASMUSSEN, J.B. and CHEVALIER, G. 1993. Endocrine responses as indicators of sublethal toxic stress in fish from polluted environments. *Water Pollut. Res. J. Can.* **28**: 767-780.
- HORVATH, L., 1978. Relation between ovulation and water temperature by farmed cyprinids. *Aquacultura Hungarica. (Svarvas).* **1**: 58-65.
- HURLBUT, C.J. 1993. The adaptive value of larval behavior of a colonial ascidian. *Mar. Biol. (Berl.).* **115**: 253-262.
- IGIC, L. 1984. Biotic action in fouling communities on edible shellfish, oysters (*Ostrea edulis*) and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) in the northern Adriatic. *Acta Adriat.* **25**: 11-28.
- IGIC, L. 1992. Fouling as indicators of municipal pollution in the area of Rovinj (Northeastern Adriatic). *Boll. Mus. Civ. Stor. Nat. Venezia.* **43**: 157-178.
- INERIS (institut national de l'environnement industriel et des risques), 1997. Toxicité

- aiguë du Mexel 432 vis à vis de la daphnie (*Daphnia magna*). 11 pages.
- JAYATILAKE, G.S. and BAKER-B-J. 1996. Comparison of terpenoid cytotoxin concentration in laboratory-maintained versus wild-collected *Spongia* sp. *J. Nat. Toxins*. **5**: 287-293.
- JE, J.G., HONG, J.S. and YI, S.K. 1988. A study on the fouling organisms in the pearl oyster culture grounds on the southern coast of Korea (South Korea). *Ocean Res. (Seoul)*. **10**: 85-106.
- JOHNSON, L.E. 1992. Potential and peril of field experimentation: The use of copper to manipulate molluscan herbivores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **160**: 251-262.
- JOKINEN, E.I., AALTONEN, T.M. and VALTONEN, E.T. 1995. Subchronic effects of pulp and paper mill effluents on the immunoglobulin synthesis of roach, *Rutilus rutilus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**: 219-225.
- JUNQUEIRA, A.D.O.R., SILVA, S.H.G.D. and SILVA, M.J.M. 1989. Evaluation of the infestation and diversity of Teredinidae (Mollusca-Bivalvia) along the coast of Rio de Janeiro State, Brazil. *Memo. Inst. Oswaldo Cruz Rio de Janeiro*. **84**: 275-280.
- KARANDE, A.A., GANTI, S.S. and UDHAYAKUMAR, M. 1993. Toxicity of tributyltin to some bivalve species. *Indian J. Mar. Sci.* **22**: 153-154.
- KARAS, P. 1992. Zooplankton entrainment at Swedish nuclear power plants. *Mar. Pollut. Bull.* **24**: 27-32.
- KASHIN, S.M. and KUZNETSOVA, I.A. 1985. Mechanisms and dynamics of the *Balanus* settlement on different substrates. *Okeanologiya*. **25**: 846-850.
- KAWAMURA, T., NIMURA, Y. and HIRANO, R. 1988. Effects of bacterial films on diatom attachment in the initial phase of marine fouling. *J. Oceanogr. Soc. Japan*. **44**: 1-16.
- KETELAARS, H.A.M. and WAGENVOORT, A.J. 1995. Control of *Dreissena* biofouling by the water storage corporation Brabantse Biesbosch. *Aqua (Oxford)*. **44**: 97-101.
- KHALANSKI, M. 1993. Expérimentation de cinq méthodes contre le développement des moules zébrées dans les circuits de centrales thermiques sur la Moselle. Rapport EDF/DER, 93NV00030, 22 pages.
- KHALANSKI, M. 1993. Expérimentation de cinq méthodes contre le développement de moules zébrées dans les circuits de centrales thermiques sur la Moselle. Rapport EDF/DER, 94NV00021, 22 pages.
- KHALANSKI, M. 1994. Etudes expérimentales sur l'élimination de la moule zébrée par un produit anti-corrosion: le Mexel 432. Rapport EDF/DER, HE-31/94/011.
- KHALANSKI, M. 1996. Ecotoxicological Aspects of River Water Treatment With an Organic Anti-fouling Product. In Sixth International Zebra Mussel and Other Aquatic Nuisance Species Conference; Michigan Sea Grant College Program. p.129.
- KHALANSKI, M. et LUTZ, P., 1987. La chloration de l'eau de réfrigération. *Rev. Gén. Nucl.* **1** (Janvier-Février): 52-58.
- KHANDEPARKER, D.C., ANIL, A.C. and VENKAT, K. 1995. Larvae of fouling organisms and macrofouling at New Mangalore Port, west coast of India. *Indian J. Mar. Sci.* **24**: 37-40.
- KLOSTER, G. 1997. Analytical methods for surfactants and complexing agents at concentrations relevant to environmental occurrence, in *Getergents in the environment. Surfactants Sci. Ser.* Edited by Milan Johann Schwuger. **65**: 66-68.
- KONIG, G.M., COLL, J.C., BOWDEN, B.F., GULBIS, J.M., MACKAY, M.F., LA-BARRE, S.C. and LAURENT, D. 1989. The structure determination of a xenicane diterpene from *Xenia garciae*. *J. Nat. Prod. (lloydia)*. **52**: 294-299.
- KORYAKOVA, M.D. and ZORINA, L.G. 1989. Effect of the chemical nature of a substrate on the mineral composition

- nature of the mussel *Mytilus trossulus* from the fouling community. *Biol. Morya (Vladivost.)*. **0(6)**: 41-45.
- KRISTENSEN, P. 1990. Evaluation of the sensitivity of short term fish early life stage tests in relation to other FELS test methods. Water Quality Institute VKI File n° 305019. Final Report, Commission of the European Communities, Directorate - General Environment, Nuclear Safety and Civil Protection, 44 p.
- KRIVENKO, M.S. 1984. Changes in the biomass and species composition of fouling organisms in the lake, Ozero Biserovo, (Russian SFSR, USSR). *Biol. Nauki (Mosc.)*. **0**: 69-74.
- LAKE, N.C.H., JONES, M.B. and PAUL, J.D. 1987. Crab predation on scallop (*Pecten maximus*) and its implication for scallop cultivation. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom*. **67**: 55-64.
- LATYPOV, YU.YA. 1991. Pioneer settlements of reef-building corals on piles of oil platforms in the South China Sea. *Biol. Morya (Vladivost.)*. **0(3)**: 93-99.
- LEFEBVRE, B. 1990. Bases méthodologiques et conceptuelles de l'embryotoxicologie des Poissons. Thèse de doctorat. Université Paris VII, Paris, France. 135 pages.
- LEMAIRE-GONY, S., LEMAIER, P. and PULSFORD, A.L. 1995. Effects of cadmium and benzo(a)pyrene on the immune system, gill ATPase and EROD activity of european sea bass *Dicentrarchus labrax*. *Aquat. Toxicol. (Amst.)*. **31**: 297-313.
- LENIHAN, H.S., OLIVER, J.S. and STEPHENSON, M.A. 1990. Changes in hard bottom communities related to boat mooring and tributyltin in San Diego Bay (California, USA): A natural experiment. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **60**: 147-160.
- LEWBEL, G.S., HOWARD, R.L. and GALLAWAY, B.J. 1987. Zonation of dominant fouling organisms on northern Gulf of Mexico petroleum platforms. *Mar. Environ. Res.* **21**: 199-224.
- LEWIS, M.A. 1991. Chronic and sublethal toxicities of surfactants to aquatic animals: a review and risk assessment. *Water Res.* **25**: 101-113.
- LITTLEWOOD, D.T.J. and MARSBE, L.A. 1990. Predation on cultivated oysters, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding), by the polyclad turbellarian flatworm, *Stylochus frontalis* Verrill. *Aquaculture*. **88**: 145-150.
- LODEIROS, C.J.M. and HIMMELMAN, J.H. 1996. Influence of fouling on the growth and survival of the tropical scallop, *Euvola (Pecten) ziczac* (L. 1758) in suspended culture. *Aquaculture Res.* **27**: 749-756.
- LU, R., LIU, Q., BAI, S., XIAO, C., ZHANG, Y., CHEN, H. and WANG, F. 1986. Efficiency in control of the microbial fouling in desalting water systems by chlorine dioxide in Beijing Heat and Power Station (China). *Acta Microbiol. Sin.* **26**: 60-70.
- LUDYANSKII, M.L. and SOLONIN, V.N. 1986. Effect of copper compounds on biological overgrowing. *Gidrobiol. Zh.* **22**: 35-40.
- MACEK, K.J. and SLEIGHT, B.H. 1977. Utility of toxicity tests with embryos and fry of fish in evaluating hazards associated with the chronic toxicity of chemicals to fishes. Aquatic toxicology and hazards evaluation. ASTM STP 634. *American Society for testing and materials* (F.L. Mayer and J.L. Hamelink, Eds.), 137-146.
- MACISAAC, H.J. 1996. Potential abiotic and biotic impacts of zebra mussels on the inland waters of North America. *American Zoologist*. **36**: 287-299.
- MALZ, F. 1997. Loading surface waters with surfactants in Detergents in the environment. *Surfactants Sci. Ser.* Marcel Dekker, New York. **65**: 3-37.
- MARUTHAMUTHU, S., EASHWAR, M., MANICKAM, S.T., AMBALAVANAN, S., VENKATACHARI, G. and BALAKRISHNAN, K. 1990. Marine fouling on test panels and in-service

- structural steel in Tuticorin harbour (India). *Indian J. Mar. Sci.* **19**: 68-70.
- MA-SHI-DE, LI-YAN-TO, HUANG-XIUMING, ZHANG-GUO-AN, CHANGWEI and WU-PEI-HUI. 1995. Corrosion and adherence at sea oil-platform. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **13**: 253-257.
- MCKAY, G., BLAIR, H.S. and GRANT, S. 1987. Desorption of copper from a copper-chitosan complex. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **40**: 63-74.
- MCKIM, J.M. 1977. Evaluation of tests with early life stages of fish for predicting long term toxicity. *J. Fish. Res. Board Can.* **34**: 1148-1158.
- MCMASTER, M.E., PORTT, C.B., MUNKITTRICK, K.R. and DIXON, D.G. 1992. Milt characteristics, reproductive performance, and larval survival and development of white sucker exposed to bleached kraft mill effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **23**: 103-117.
- MEENAKUMARI, B and NAIR, N.B. 1994. Settlement and community interrelations of fouling organisms in cochin harbour, India. *Fish. Technol.* **31**: 12-17.
- MEENAKUMARI, B, GUPTA, R. and NAIR, N.B. 1993. Occurrence of fungi in the primary film on glass slides submerged in Cochin backwaters. *Fish. Technol.* **30**: 109-111.
- MESSIHA, N.N. and IKLADIOUS, N.E. 1986. Antifouling performance of some new organotin polymers in the Mediterranean and Red Sea. *J. Controlled Release.* **3**: 235-242.
- MILLS, E.L., LEACH, J.H., CARLTON, J.T. and SECOR, C.L. 1993. Exotic species in the Great Lakes: A history of biotic crises and anthropogenic introductions. *J. G. Lakes Res.* **19**: 1-54.
- MOORE, L.E. and BUCHANAN, J.T. 1993. The effects of neurotransmitters on the integrative properties of spinal neurons in the lamprey. *J. Exp. Biol.* **175**: 89-114.
- MOORE, L.E., HILL, R.H. and GRILLNER, S. 1993. Voltage-clamp frequency domain analysis of NMDA-activated neurons. *J. Exp. Biol.* **175**: 59-87.
- MORALES-ALAMO, R. and MANN, R. 1990. Recruitment and growth of oysters on shell planted at four monthly intervals in the lower Potomac River, Maryland. *J. Shellfish Res.* **9**: 165-172.
- MORAN, P.J. 1991. The effects of dredging on the larval settlement and community development of fouling organisms in Port Kembla Harbour, Australia. *Water Res.* **25**: 1151-1156.
- MORAN, P.J. and GRANT, T.R. 1989. The effects of industrial pollution on the development and succession of marine fouling communities: I. Analysis of species richness and frequency data. *Mar. Ecol.* **10**: 231-246.
- MORAN, P.J. and GRANT, T.R. 1989. The effects of industrial pollution on the development and succession of marine fouling communities: II. Multivariate analysis of succession. *Mar. Ecol.* **10**: 247-262.
- MORAN, P.J. and GRANT, T.R. 1991. Transference of marine fouling communities between polluted and unpolluted sites: Impact on structure. *Environ. Pollut.* **72**: 89-102.
- MORAN, P.J. and GRANT, T.R. 1993. Larval settlement of marine fouling organisms in polluted water from Port Kembla Harbour, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* **26**: 512-514.
- MORETEAU, J.C. et KHALANSKI, M. 1994. Fixation et croissance de *Dresseina polymorpha* dans les circuits d'eau brute de la centrale nucléaire de Cattenom. Collection des notes internes de la direction des études et recherches, Biologie, Sciences de la terre et protection de l'environnement. 29 pages.
- MYERS, D. 1997. Physical properties of surfactants used in cosmetics. in *Surfactants in cosmetics. Surfactants Sci. Ser.* Marcel Dekker, New York. **68**: 29-31.
- NAGATOMO, K., MATSUSHITA, H., INUI, E. and MIYOSHI, Y. 1993.

- Studies on marine fouling of the bottom plates and propeller surface: I. A case on investigation of attached marine organisms and a measure for prevention of marine fouling. *J. Shimonoseki Univ. Fish.* **41**: 167-178.
- NAIR, K.V., MURUGAN, P. and ESWARAN, M.S. 1988. Macrofoulants in Kalpakkam coastal waters, east coast of India. *Indian J. Mar. Sci.* **17**: 341-343.
- NAIR, N.B., DHARMARAJ, K., AZIS, P.K.A., ARUNACHALAM, M. and KUMAR, K.K. 1984. Ecology of biofouling on *Crassostrea madrasensis* (Mollusca: Bivalvia) in a tropical backwater. *Proc. Indian Acad. Sci. Anim. Sci.* **93**: 419-430.
- NANDAKUMAR, K., TANAKA, M. and KIKUCHI, T. 1993. Interspecific competition among fouling organisms in Tomioka Bay, Japan. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **94**: 43-50.
- NASSER, J.C. and VASQUEZ, E. 1989 (1990). Abundance, composition and succession of periphyton on artificial substrates (nets) in a blackwater reservoir (Macagua), Caroni River, Venezuela. *Mem. soc. cienc. nat. la salle.* **49-50**: 55-70.
- NAUDIN, S. 1996. 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. Thèse de doctorat. Université de Metz, Metz, France. 197 pages.
- NEAL, A.L. and YULE, A.B. 1994. The interaction between *Elminius modestus* Darwin cyprids and biofilms of *Deleya marina* NCMB1877. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **176**: 127-139.
- NEWMAN, L.J., CANNON, L.R.G. and GOVAN, H. 1993. *Stylochus matatasi*, new species (Platyhelminthes, Polycladida): Pest of cultured giant clams and pearl oysters from Solomon Islands. *Hydrobiologia.* **257**: 185-189.
- NODA, T., MORITA, S., YAMANO, T., SHIMIZU, M., NAKAMURA, T., SAITOH, M. and YAMADA, A. 1991. Teratogenicity study of tri-n-butyltin acetate in rats by oral administration. *Toxicol. Lett. (Amst.)* **55**: 109-116.
- NOLTE, HEIKE, KRAEMER, CLAUDIA, WOLF, KLAUS. 1995. (Deutsches Wollforschungsinstitut, TH Aachen e. V., Germany). DWI Rep., 114 (Aachener Textiltagung, 1994), 463-79.
- ORLOV, D.V., MARFENIN, N.N. and RAIKIN, A.I. 1994. The settlement of planulae of the White Sea hydroids *Gonothyrea loveni* (Allman) and *Laomedea flexuosa* (Hincks) on the slim bacterial film from the surface of intertidal algae. *Vestnik Moskovskogo Universiteta Seriya XVI Biologiya.* **0(3)**: 47-51.
- OSHURKOV, V.V. 1986. The development and structure of some fouling communities in Avacha Bay (Russian SFSR, USSR). *Biol. morya (Vladivost.)* **0(5)**: 20-27.
- OVSYANNIKOVA, I.I. 1989. Distribution of barnacles on the shell of the Japanese scallop in suspension culture. *Biol. morya (Vladivost.)* **0(4)**: 71-76.
- PADILLA, D.K., ADOLPH, S.C., COTTINGHAM, K.L. and SCHNEIDER, D.W. 1996. Predicting the consequences of dreissenid mussels on a pelagic food web. *Ecol. Model.* **85**: 129-144.
- PARRA, J.L., GUINEA, J., MANRESA, M.A., ROBERT, M., MERCADE, M.E., COMELLES, F. and BOSCH, M.P. 1989. Chemical characterization and physicochemical behavior of biosurfactants. *J.A.O.C.S.* **66**: 141-145.
- PAUL, J.D. and DAVIES, I.M. 1986. Effects of copper-based and tin-based anti-fouling compounds on the growth of scallops (*Pecten maximus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture.* **54**: 191-204.
- PERERA, M., BALLESTEROS, M. and TURON, X. 1990. Study of epibiotic organisms in a marine bivalve culture in

- the Ebro delta (Spain). *Cah. Biol. Mar.* **31**: 385-400.
- PETERSON, S.M., BATLEY, G.E. and SCAMMELL, M.S. 1993. Tetracycline in antifouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* **26**: 96-100.
- PFISTER, G., EL-NAGGAR, E. and BAHADIR, M. 1994. Evaluation of controlled release molluscicide formulations with improved environment acceptance. *Chemosphere.* **28**: 305-312.
- PILLAI, A.G.G. and RAVINDRAN, K. 1992. Influence of environmental variables on corrosion of carbon steel. *Fish. Technol.* **29**: 1-4.
- POWERS, D.A. Fish as model systems. *Science.* **246**: 352-358.
- RADHAKRISHNAN, R., KASIM, H.M. and NATARAJAN, R. 1987. Studies on wood boring sphaeromids in vellar estuary in south east coast of India. *Trop. Ecology.* **28**: 49-56.
- RAILKIN, A.I., PAVLENKO, G.V. and SKUGAROVA, M.G. 1993. Suppression of the adhesion of bacterial pioneers of biofouling in the White Sea. *Mikrobiologiya.* **62**: 951-962.
- RAJAGOPAL, S., NAIR, K.V.K. and AZARIAH, A. 1995. Response of brown mussel, *Perna indica*, to elevated temperatures in relation to power plant biofouling control. *J. Therm. Biol.* **20**: 461-467.
- RAMSAY, G.G., TACKETT, J.H. and MORRIS, D.W. 1988. Effect of low-level continuous chlorination on *Corbicula fluminea*. *Environ. Toxicol. Chem.* **7**: 855-856.
- RAO, K.S. and BALAJI, M. 1990. Accumulation of copper by *Mytilopsis sallei* (Recluz) an important fouling bivalve at Visakhapatnam harbour. *Indian J. comp. anim. physiol.* **8**: 1-3.
- RAO-K, S. and BALAJI, M. 1991. Effect of copper on oxygen consumption on the marine fouling dreissenid bivalve, *Mytilopsis sallei* (Recluz). *Indian J. comp. anim. physiol.* **9**: 19-22.
- READ, G.B. and GORDON, D.P. 1991. Adventive occurrence of the fouling serpulid *Ficopomatus enigmaticus* (Polychaeta) in New Zealand. *New Zealand J. Mar. freshwater res.* **25**: 269-274.
- REZNICENKO, P.N. 1976. Ecological and physiological bases of the thermal regimen of carp (*Cyprinus carpio* L.) eggs incubation. Topical Problems. *Trans. Czech. Soviet Ichthyol. Coop.* **2**: 107-132.
- RICE, C.D., KERGOSIEN, D.H. and ADAMS, S.M. 1996. Innate immune function as a bioindicator of pollution stress in fish. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **33**: 186-192.
- RIEGER, M.M. and RHEIN, L.D. 1997. Surfactants in cosmetics. Second edition. Marcel Dekker, New York. **68**: 619 pages.
- ROCHA, R.M.D. 1991. Replacement of the compound ascidian species in a southeastern Brazilian fouling community. *Bol. Inst. Oceanogr.* **39**: 141-153.
- ROEYNEBERG, T., BALKE, N.E. and LUND-HOEIE, K. 1992. Effects of adjuvants and temperature on glyphosate absorption by cultured cells of velvetleaf (*Abutilon theophrasti* Medic.). *Weed Res.* **32**: 419-28.
- ROUBAUD, P., CHAILLOU, C., LEFEBVRE, B. et MARIE, D. 1987. Résultats et perspectives de l'embryotoxicologie des poissons. *Ann. A.N.P.P.* **1**: 123-136.
- RUENESS, J. 1989. *Sargassum muticum* and other introduced Japanese macroalgae: Biological pollution of European coasts. *Mar. Pollut. Bull.* **20**: 173-176.
- RYCHKOVA, M.A. 1986. Fouling algae in Lake Ilmen (Russian SFSR, USSR). *Gidrobiol. Zh.* **22**: 24-26.
- RZEPECKI, L.M. and WAITE, J.H. 1995. Wrestling the muscle from mussel beards: Research and applications. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **4**: 313-322.
- SAAVEDRA-ALVAREZ, M.M. and ELLIS, D.V. 1990. Widespread

- neogastropod imposex in the Northeast Pacific: Implications for TBT contamination surveys. *Mar. Pollut. Bull.* **21**: 244-247.
- SACCHI, C.F. 1985. Investigations into comparative ecology of the intertidal prosobranch gastropods *Littorina obtusata* and *Littorina mariae* from the Ria de Arosa (northwest Spain): II. Fouling animals on the shells of living mollusks. *Att. Soc. Ital. Sci. Nat. Mus. Civ. Stor. Nat. Milano.* **126**: 213-236.
- SAKAGUCHI, I. 1986 a. Effect of exposure to air on marine mussels. *DENRYOKU CHUO KENKYUSHO HOKOKU.* **0(485015)**: 1-16.
- SAKAGUCHI, I. 1986 b. The ecology and attachment mechanism of marine mussel. *DENRYOKU CHUO KENKYUSHO HOKOKU.* **0(485024)**: 1-17.
- SAKAGUCHI, I. and SHINSHIMA, K. 1992. Control of mussel fouling with hot air treatment: A preliminary study for practical application. *DENRYOKU CHUO KENKYUSHO HOKOKU.* **0(U92024)**: I-III, 1-20.
- SAKAGUCHI, I., SHINSHIMA, K., KAWARATANI, K. and SUGAI, O. 1989. Control of microbiofouling using bacteriophage: 2. Detection of phages and fundamental study of their lytic effect on fouling bacteria. *DENRYOKU CHUO KENKYUSHO HOKOKU.* **0(U89030)**: 1-32.
- SAKAGUCHI, I., SHINSHIMA, K., KAWARATANI, K. and SUGAI, O. 1989. Control of mussel fouling with hot air injection and solid body abrasion. *DENRYOKU CHUO KENKYUSHO HOKOKU.* **0(U89031)**: 1-51.
- SANTHAKUMARAN, L.N. 1984. Vertical distribution of fouling and woodboring organisms in Trondheimsfjorden (Western Norway). *Gunneria.* **0(47)**: 1-30.
- SANTHAKUMARAN, L.N. and SNELL, J.A. 1984. Studies on the marine fouling and wood-boring organisms of the Trondheimsfjord (Western Norway). *Gunneria.* **0(48)**: 1-36.
- SANTHAKUMARI, V. and NAIR, N.B. 1984. Vertical distribution of marine wood boring and fouling organisms from the estuarine areas of the southwest coast of India. *Fish. Technol.* **21**: 118-125.
- SASAKI, Y.F., SAKAGUCHI, M., YAMADA, H., MIYAHARA, T. and KOZUKA, H. 1994. Antagonizing effect of triphenyltin chloride on cytosine-1-beta-D-arabinofuranoside potentiation of chromosome aberrations induced by mitomycin C. *Mutat. Res.* **323**: 99-104.
- SASAKI, Y.F., YAMADA, H., SUGIYAMA, C. and KINAE, N. 1993. Increasing effect of tri-n-butyltins and triphenyltins on the frequency of chemically induced chromosome aberrations in cultured Chinese hamster cells. *Mutat. Res.* **300**: 5-14.
- SASIKUMAR, N., NAIR, K.V.K. and AZARIAH, J. 1990. Colonization of marine foulants at a power plant site. *Proc. indian acad. sci. anim. sci.* **99**: 525-532.
- SASIKUMAR, N., RAJAGOPAL, S. and NAIR, K.V.K. 1989. Seasonal and vertical distribution of macrofoulants in Kalpakkam coastal waters (India). *Indian J. Mar. Sci.* **18**: 270-275.
- SAWANT, S.S., SONAK, S. and GARG, A. 1995. Growth inhibition of fouling bacteria and diatoms by extract of terrestrial plant, *Derris scandens* (Dicotyledonae: Leguminosae). *Indian J. Mar. Sci.* **24**: 229-230.
- SCHAWAIGER, J., FENT, K., STECHER, H., FERLING, H. and NEGELE, R.D. 1996. Effects of sublethal concentrations of triphenyltinacetate on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **30**: 327-334.
- SCHLOESSER, D.W., NALEPA, T.F. and MACKIE, G.L. 1996. Zebra mussel infestation of unionid bivalves (Unionidae) in North America. *American Zoologist.* **36**: 300-310.
- SCHMITT, T.M., HAY, M.E. and LINDQUIST, N. 1995. Constraints on chemically mediated coevolution: Multiple

- functions for seaweed secondary metabolites. *Ecology (Washington D C)*. **76**: 107-123.
- SCHWUGER, M.J. 1997. Detergents in the environment. *Surfactants Sci. Ser.* **65**. Marcel Dekker, Inc, New York, 317 pages.
- SEARS, M.A., GERHART, D.J. and RITTSCHOF, D. 1990. Antifouling agents from marine sponge *Lissodendoryx isodictyalis* Carter. *J. Chem. Ecol.* **16**: 791-800.
- SELIN, N.I. 1991. The role of molluscs in the formation of fouling community on supports of oil platforms in the South China Sea. *Biol. morya (Vladivost.)*. **0(4)**: 90-94.
- SHAPIRO, A.Z. and BOBKOVA, A.N. 1986. The effect of antifouling paint poisons on the carbohydrate metabolism enzymes of some fouling organisms. *Gidrobiol. Zh.* **22**: 79-82.
- SHILLING, D.G., HALLER, W.T., WILLARD, T.R. and MOSSLER, M.A. 1990. Influence of surfactants and additives on phytotoxicity of glyphosate to torpedograss. *J. Aquat. Plant Manage.* **28**: 23-27.
- SHIM, J.H. and JURNG, M.S. 1987. Development and succession of marine fouling organisms on artificial substrata. *J. Oceanol. Soc. Korea.* **22**: 257-270.
- SHORT, J.W. and THROWER, F.P. 1987. Toxicity of tri-n-butyltin to chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, adapted to seawater. *Aquaculture.* **61**: 193-200.
- SHOUKR, F.A., MONA, M.H. and EL-SHEIKH, H. 1991. Identification of marine fouling Crustacea in the Suez Canal, with a note on distribution and migration. *Pak. J. Zool.* **23**: 79-84.
- SINGH, H.R. and SASEKUMAR, A. 1996. Wooden panel deterioration by tropical marine wood borers. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* **42**: 755-769.
- SINGH, P.B. 1992. Impact of malathion and gamma-BHC on lipid metabolism in the freshwater female catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **23**: 22-32.
- SINGH, P.B. and SINGH, T.P. 1992. Modulatory actions of ovine luteinizing hormone-releasing hormone and Mystus gonadotropin on gamma-BHC-induced Changes in lipid levels in the freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **24**: 192-202.
- SMITH, C.M. and HACKNEY, C.T. 1989. The effects of hydrocarbons on the setting of the American oyster, *Crassostrea virginica*, in intertidal habitats in southeastern North Carolina (USA). *Estuaries.* **12**: 42-48.
- SOIMASUO, R., AALTONEN, T., NIKINMAA, M., PELLINEN, J., RISTOLA, T. and OIKARI, A. 1995. Physiological toxicity of low-chlorine bleached pulp and paper mill effluent on whitefish (*Coregonus lavaretus* L. s.l.): A laboratory exposure simulating lake pollution. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **31**: 228-237.
- SRINIVAS, D., SAWANT, S.S. and WAGH, A.B. 1992. Biofoulers on aluminium and stainless steel panels at Vijaydurg harbour, central west coast of India. *Indian J. Mar. Sci.* **21**: 143-145.
- STEPHENSON, M.D. and LEONARD, G.H. 1994. Evidence for the decline of silver and lead and the increase of copper from 1977 to 1990 in the coastal marine waters of California. *Mar. Pollu. Bull.* **28**: 148-153.
- STERZEL, W. 1997. Toxicology of surfactants used in cosmetics in Surfactants in cosmetics. *Surf. Sci. Ser.* Marcel Dekker, Inc, New York. **68**: 557-571.
- STRITTMATTER, R.J., YANG, B. and JOHNSON, D.A. 1993. A comprehensive investigation on the application of ozone in cooling water systems: Correlation of bench-top, pilot scale and field application data. *Ozonz Sci. & Eng.* **15**: 47-80.
- SWAMI, B.S. and KARANDE, A.A. 1988. Recruitment and growth of biofouling invertebrates during monsoon in Bombay

- waters, west coast of India. *Indian J. Mar. Sci.* **17**: 143-149.
- SZEWCZYK, U., HOLMSTOM, C., WRANGSTADH, M., SAMUELSSON, M.O., MAKI, J.S. and KJELLEBERG, S. 1991. Relevance of the exopolysaccharide of marine *Pseudomonas* sp. strain S9 for the attachment of *Ciona intestinalis* larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **75**: 259-265.
- TAN, T.K., TOH, A. 1989. The fungal problem in buildings in the humid tropics. *Intern. Biodeterioration.* **25**: 27-38.
- THOMPSON, J.E. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*: 1. Biological evidence. *Mar. Biol. (Berl.)*. **88**: 23-26.
- THOMPSON, T.E. 1988. Acidic allomones in marine organisms. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* **68**: 499-518.
- THORP, C.H., PYNE, S. and WEST, S.A. 1987. *Hydroides ezoensis*, new record Okuda, a fouling serpulid new to British (UK) coastal waters. *J. Nat. Hist.* **21**: 863-878.
- TURON, X. and PERERA, M. 1988. The ascidians of the Ebro delta (Spain): Faunistic and quantitative aspects. *Publ. dep. zool. (Barc.)*. **14**: 81-90.
- TURSI, A., MATARRESE, A., SCALERALIACI, L., MONTANARO, C. and CECERE, E. 1984. Seasonal factors in mussel facies settlement on annual fouling panels. *Oebalia*. **10**: 69-84.
- UDHAYAKUMAR, M. and KARANDE, A.A. 1996. Field notes on a fouling serpulid *Hydroides elegans* Haswell (Polychaeta: Serpulidae) present in confined waters of Bombay. *Indian J. Mar. Sci.* **25**: 133-136.
- URIZ, M.J., MARTIN, D., TURON, X., BALLESTEROS, E., HUGHES, R. and ACEBAL, C. 1991. An approach to the ecological significance of chemically mediated bioactivity in Mediterranean benthic communities. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **70**: 175-188.
- VAN GINKEL, C.G. 1996. Complete degradation of xenobiotic surfactants by consortia of aerobic microorganisms. *Biodegradation.* **7**: 151-164.
- VAN GINKEL, C.G., STROO, C.A. and KROON, A.G.M. 1993. Biodegradability of ethoxylated fatty amines and amides and the non toxicity of their biodegradation products. *Tenside Surf. Det.* **30**: 213-216.
- VENUGOPALAN, V.P. and WAGH, A.B. 1987. *Cilicsea latreillei* new record Leach: A little known fouling sphaeromatid from Bombay High, Arabian Sea. *Biol. Oceanogr.* **5**: 133-136.
- VENUGOPALAN, V.P. and WAGH, A.B. 1990. Biofouling of an offshore oil platform: Faunal composition and biomass. *Indian J. Mar. Sci.* **19**: 53-56.
- Vladimirov, V.J. 1975. Critical periods in the development of fishes. *J. Ichtyol.* **19**: 851-863.
- VOROB'eva, M.YU. 1991. Microphytic fouling of man-made substrates from a mussel farm in the Chupa Bay of the White Sea (USSR). *Vestn. Leningr. Univ. Biol.* **0(2)**: 38-43.
- VRISER, B. 1986. Bio-fouling on limestone experimental plates, protected from the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Piran Bay, Gulf of Trieste, northern Adriatic). *Biol. Vestn.* **34**: 101-114.
- WALKER, R.P., THOMPSON, J.E. and FAULKNER, D.J. 1985. Exudation of biologically-active metabolites in the sponge *Aplysina fistularis*: 2. Chemical evidence. *Mar. Biol. (Berl.)*. **88**: 27-32.
- WALLS, J.T., RITZ, D.A. and BLACKMAN, A.J. 1993. Fouling, surface bacteria and antibacterial agents of four bryozoan species found in Tasmania, Australia. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **169**: 1-13.
- WANG, J. and HUANG, Z. 1993 (1994). Fouling polychaetes of Hong Kong and adjacent waters. *Asian Mar. Biol.* **10**: 1-12.
- WANTKE, F., GOETZ, M. and JARISCH, R. 1993. Histamine-free diet: Treatment of choice for histamine-induced food intolerance and supporting treatment for

- chronical headaches. *Clin. Exp. Allergy*. **23**: 982-985.
- WESTER, P.W., VETHAAK, A.D. and VAN-MUISWINKEL, W.B. 1994. Fish as biomarkers in immunotoxicology. *Toxicology*. **86**: 213-232.
- WHITEHOUSE, J. W., KHALANSKI, M., SAROGLIA, M.G. and JENNER, H.A., 1985. The control of biofouling in marine and estuarine power stations: A collaborative research working group report for use by station designers and station managers. Rapport CEGM/EDF/ENEL/KEMA. 48 pages.
- WILDISH, D.J., WILSON, A.J., YOUNGLAI, W., DECOSTE, A.M., AIKEN, D.E. and MARTIN, J.D. 1988. Biological and economic feasibility of four grow-out methods for the culture of giant scallops in the Bay of Fundy (Canada). *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* **0(1658)**: I-III, 1-21.
- WILLEMSSEN, P.R. 1995. The screening of sponge extracts for antifouling activity using a bioassay with laboratory-reared cyprid larvae of the Barnacle *Balanus amphitrite*. *Int. Biodeterio. & Biodegrad.* **34**: 361-373.
- WOLFAARDT, G.M. and CLOETE, T.E. 1992. The effect of some environmental parameters on surface colonization by microorganisms. *Water Res.* **26**: 527-537.
- WOOD, R. 1993. Nutrients, Predation and the History of Reef-Building. *Palaios*. **8**: 526-543.
- WRIGHT, D.A. and ZAMUDA, C.D. 1991. Copper contamination in the Patuxent River, Maryland (USA). *Hydrobiologia*. **215**: 31-42.
- WRIGHT, M., BAKUS, G.J., ORTIZ, A., ORMSBY, B. and BARNES, D.M. 1991. Computer image processing and automatic counting and measuring of fouling organisms. *Comput. Biol. Med.* **21**: 173-180.
- YAMAHA, E., USUI, K., ONOZATO, H. and HAMADA, K. 1986. A method for dechoriation in goldfish *Carassius auratus*. *Bull. Japanese Soc. Scient. Fish.* **52**: 1929-1934.
- YUNHER, V.P. 1985. Oedogonium algae in Lake Belye (Ukrainian Polesye, USSR). *Ukr. Botanich. Zh.* **42**: 38-44.
- YUNHER, V.P. 1986. Oedogoniales in water bodies of the Ukrainian Polesye (USSR). *Ukr. Botanich. Zh.* **43**: 9-12.
- ZAITSEV, YU.P., BOROB'EVA, L.V. and ALEKSANDROV, B.G. 1988. The northern source for replenishing the Black Sea fauna. *Dok. Akad. Nauk Ukr. SSR Ser. B Geol. Khim. Biol. Nauki.* **0(11)**: 63-65.
- ZAJAC, R.N., WHITLATCH, R.B. and OSMAN, R.W. 1989. Effects of interspecific density and food supply on survivorship and growth of newly settled benthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **56**: 127-132.
- ZEVINA, G.B. 1988. Underwater scraping of ship fouling in tropical waters. *Biol. morya (Vladivost.)*. **0(1)**: 45-51.
- ZOLOTAREV, V. 1996. The Black Sea ecosystem changes related to the introduction of new mollusc species. *Mar. Ecol.* **17**: 227-236.
- ZULLO, V.A. 1992. *Balanus trigonus* Darwin (Cirripedia, Balaninae) in the Atlantic basin: An introduced species? *Bull. Mar. Sci.* **50**: 66-74.
- ZVYAGINTSEV, A.YU. 1984. Successions of fouling communities accumulating on ships during one voyage across Peter the Great Bay (the Sea of Japan). *Biol. morya (Vladivost.)*. **0(3)**: 22-29.
- ZVYAGINTSEV, A.YU. 1989. Fouling and corrosion deterioration of supporting pillars of oil platforms in the South China Sea. *Biol. morya (Vladivost.)*. **0(6)**: 46-50.
- ZVYAGINTSEV, A.YU. 1991. Seasonal changes in the epifauna on the valve of the oyster *Crassostrea gigas* in Amur Bay of the Sea of Japan. *Biol. morya (Vladivost.)*. **0(2)**: 71-76.