



20496



Agence de l'eau
Rhin-Meuse

U.F.R. Sciences et Techniques Biologiques
Ecole Doctorale Biologie et Santé de Nancy
Laboratoire de Biologie Appliquée / Aquarium du Musée de Zoologie

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement
le 1^{er} février 1996

pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY 1
Spécialité : Biologie des organismes

par

Marielle THOMAS

**BIODETECTION EN TEMPS REEL
CONTRIBUTION A LA REALISATION D'UN NOUVEAU SYSTEME DE
DETECTION BIOLOGIQUE PRECOCE DE LA POLLUTION DES EAUX DE
SURFACE, FONDE SUR L'EXPLOITATION DES DECHARGES
AUTOSTIMULATRICES D'UN POISSON ELECTRIQUE TROPICAL :
APTERONOTUS ALBIFRONS (Apteronotidae-Gymnotiformes)**

MEMBRES DU JURY

Rapporteurs : Mr J.C. BLOCK (Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1)
Mr C. GRAFF (Maître de Conférences, Université de Grenoble)
Melle P. VASSEUR (Professeur, Université de Metz)

Examineurs : Mr B. KRAFFT (Professeur, Université Henri Poincaré, Nancy 1)
Mr D. TERVER (Maître de Conférences, Université Henri Poincaré, Nancy 1)

T A B L E D E S M A T I E R E S]

AVANT-PROPOS ..	11
INTRODUCTION ..	12

C H A P I T R E 1

ETUDE CRITIQUE DES SYSTEMES DE DETECTION BIOLOGIQUE PRECOCE DES POLLUTIONS DES EAUX DE SURFACE

1.1. Historique et définition..	20
1.2. Applications - Sites d'utilisation.....	21
1.3. Caractéristiques des biodétecteurs.....	23
1.4. Choix des réactifs biologiques.....	23
1.5. Présentation des biodétecteurs selon la nature du réactif biologique.....	26
1.5.1. Les poissons	26
1.5.1.1. Critère de létalité	26
1.5.1.2. Critère comportemental	26
1.5.1.2.1. Réactions de fuite - Préférence / Evitement	26
1.5.1.2.2. Comportement locomoteur	27
1.5.1.2.3. Rhéotaxie	29
1.5.1.3. Critère physiologique.....	30
1.5.1.4. Critère électrique	31
1.5.2. Les mollusques bivalves	32
1.5.3. Les microcrustacés et les larves d'insectes	33
1.6. Présentation des biocapteurs selon le principe développé	35
1.6.1. Bioluminescence.....	35
1.6.2. Activité photosynthétique	37
1.6.3. Activité dénitrifiante	38

1.6.4. Activités respiratoire38
1.6.5. Autres biocapteurs39
1.7. Analyse des données40
1.8. Performances des systèmes biologiques d'alerte précoce	41
1.9. Analyse critique des biodétecteurs..	43
1.10. Conclusion et problématique47

C H A P I T R E 2

M A T É R I E L S E T M É T H O D E S

D E S C R I P T I O N G É N É R A L E D U B I O D É T E C T E U R D É V E L O P P É D A N S C E T T E É T U D E

2.1. Introduction	50
2.2. Matériel biologique	50
2.2.1. Systématique...	50
2.2.2. Répartition biogéographique	51
2.2.3. Description morpho-anatomique - Biologie	52
2.2.4. Système électro-sensorimoteur	53
2.2.4.1. Introduction	53
2.2.4.2. Electrogenèse	55
2.2.4.3. Electroréception	57
2.2.4.4. Caractéristiques de la décharge électrique de l'aptéronote	58
2.3. Matériel expérimental : le système thermo-hydraulique	61
2.4. Méthodes de recueil et de traitement de l'information bioélectrique	64
2.4.1. Montages électroniques	64
2.4.2. Procédé et exploitation informatique	66

C H A P I T R E 3

ETUDE DE L'INFLUENCE DE PARAMETRES PHYSICO-CHIMIQUES SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE D'APTERONOTUS ALBIFRONS

3.1. Introduction	69
3.2. Matériel et méthodes	71
3.2.1. Matériel biologique	71
3.2.2. Protocole expérimental	72
3.2.2.1. La température	72
3.2.2.2. Le pH	73
3.2.2.3. La conductivité	73
3.2.2.4. L'oxygène dissous	74
3.2.3. Analyse statistique	74
3.3. Résultats	76
3.3.1. Influence de la température sur les caractéristiques bioélectriques	76
3.3.1.1. Fréquence de décharge	76
3.3.1.2. Forme du signal	79
3.3.2. Influence du pH sur les caractéristiques bioélectriques	80
3.3.2.1. Fréquence de décharge	80
3.3.2.2. Forme du signal	84
3.3.3. Influence de la conductivité sur les caractéristiques bioélectriques	86
3.3.3.1. Fréquence de décharge	86
3.3.3.2. Forme du signal	87
3.3.4. Influence de la concentration en oxygène dissous sur les caractéristiques bioélectriques	88
3.3.4.1. Fréquence de décharge	88
3.3.4.2. Forme du signal	89
3.4. Discussion	90
3.4.1. La température	90
3.4.2. Le pH	93

3.4.3. La conductivité	95
3.4.4. La concentration en oxygène dissous..	97
3.5. Conclusion	98

C H A P I T R E 4

ETUDE DE L'INFLUENCE DE SUBSTANCES TOXIQUES SUR L'ACTIVITE ELECTRIQUE D'APTERONOTUS ALBIFRONS

4.1. Introduction.....	100
4.2. Matériel et méthodes.....	100
4.2.1. Matériel biologique.....	100
4.2.2. Les substances toxiques testées.....	101
4.2.2.1. Le cyanure	103
4.2.2.2. Le phénol..	104
4.2.2.3. L'atrazine	104
4.2.2.4. Le trichloroéthylène	105
4.2.2.5. Le chrome hexavalent	105
4.2.2.6. Le gazole..	105
4.2.3. L'unité expérimentale	106
4.2.4. L'eau de dilution	106
4.2.5. La procédure des essais toxicologiques	107
4.2.6. L'exploitation mathématique des résultats	109
4.2.6.1. Echantillonnage des données	109
4.2.6.1.1. Fréquence des EOD.....	109
4.2.6.1.2. Forme des EOD	110
4.2.6.2. Lissage de la courbe.....	110
4.2.6.3. Calcul des pentes..	110
4.2.6.4. Définition des limites supérieures et inférieures	111
4.2.6.4.1. Fréquence des EOD	111
4.2.6.4.2. Forme des EOD	111
4.2.6.5. Attribution d'un rang, d'une déviation et d'un degré	111
4.2.6.6. Critères d'alarme	113
4.2.7. Organigramme récapitulatif du protocole expérimental	115

4.3. Résultats..	116
4.3.1. Performances de détection du cyanure de potassium	116
4.3.1.1. Evaluation selon le critère d'alarme 1..	116
4.3.1.1.1. Fréquence des EOD	116
4.3.1.1.2. Forme des EOD	119
4.3.1.2. Evaluation selon le critère d'alarme 2..	124
4.3.2. Performances de détection du phénol	125
4.3.2.1. Evaluation selon le critère d'alarme 1.	126
4.3.2.1.1. Fréquence des EOD	126
4.3.2.1.2. Forme des EOD..	130
4.3.2.2. Evaluation selon le critère d'alarme 2..	133
4.3.3. Performances de détection de l' atrazine	135
4.3.3.1. Evaluation selon le critère d'alarme 1..	135
4.3.3.1.1. Fréquence des EOD	135
4.3.3.1.2. Forme des EOD..	140
4.3.3.2. Evaluation selon le critère d'alarme 2	141
4.3.4. Performances de détection du trichloroéthylène..	144
4.3.4.1. Evaluation selon le critère d'alarme 1..	144
4.3.4.1.1. Fréquence des EOD	144
4.3.4.1.2. Forme des EOD..	147
4.3.4.2. Evaluation selon le critère d'alarme 2	150
4.3.4.3. Influence d'intoxications successives au trichloroéthylène sur les performances de détection des aptéronotes	151
4.3.4.3.1. Fréquence des EOD..	151
4.3.4.3.2. Forme des EOD	153
4.3.5. -Performances de détection du chrome hexavalent	154
4.3.5.1. Evaluation selon le critère d'alarme 1..	154
4.3.5.1.1. Fréquence des EOD	154
4.3.5.1.2. Forme des EOD	158
4.3.5.2. Evaluation selon le critère d'alarme 2	160
4.3.6. Performances de détection du gazole	161
4.3.6.1. Evaluation selon le critère d'alarme 1.....	162
4.3.6.1.1. Fréquence des EOD	162
4.3.6.1.2. Forme des EOD	166
4.3.6.2. Evaluation selon le critère d'alarme 2..	174
4.3.7. Les fausses alarmes.. * <	175
4.4. Discussion	178
4.4.1. Sensibilité et rapidité des réponses	178
4.4.1.1. Le cyanure de potassium	179
4.4.1.2. Le phénol..	183
4.4.1.3. L'atrazine	186
4.4.1.4. Le trichloroéthylène	189

4.4.1.5. Le chrome hexavalent 191
4.4.1.6. Le gazole.. 194
4.4.2. Fiabilité et crédibilité de l'information collectée 199
4.4.3. Variabilité intraspécifique	,204
4.4.4. Mécanismes toxicologiques	,207
4.5. Conclusion 212
CONCLUSION GENERALE - PERSPECTIVES	214
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	221
PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	240

Nous présentons dans cette étude un nouveau système de détection biologique de pollutions accidentelles des eaux de surface, fondé sur une exploitation en temps réel de signaux électriques engendrés par des poissons tropicaux.

Cette recherche s'inscrit dans le cadre d'une convention **CIFRE** signée entre le Centre International de l'eau de Nancy (**Nan.c.i.e.**) et le Laboratoire de Biologie Appliquée (**L.B.A.**) de l'Université Henri Poincaré (Nancy I). Ce travail a bénéficié par ailleurs d'une aide financière de la part du District de l'**Agglomération** Nancéienne, de l'Agence de l'**Eau** Rhin-Meuse et du Ministère de l'**Enseignement** Supérieur et de la Recherche.

A l'origine, une première étude¹, dont l'objectif était de définir la sensibilité de truites arc-en-ciel aux hydrocarbures, avait été entreprise au Laboratoire de Biologie Appliquée, au cours des mois de juillet à septembre 1991. Ce travail, réalisé sur la commande du District de l'**Agglomération** de Nancy et la Société Nancéienne des Eaux, devait évaluer les potentialités de détection d'une pollution des eaux de surface par des hydrocarbures, avec le système de biodétection utilisé au niveau de la station d'alerte de **Messein**. Le principe de ce biodétecteur est fondé sur la capacité de nage à contre-courant de truitelles, réponse comportementale **normalement** perturbée lors de l'arrivée d'une vague de pollution. Les conclusions de l'étude montrèrent très clairement qu'en cas de pollution de la Moselle par du gazole, l'aptitude des truites à donner l'alerte était quasiment nulle. Ce travail augurait mal alors de la crédibilité d'un tel système envers d'autres types de polluants. Nous attirions l'attention dans cette étude sur le fait que les truites bénéficiaient d'une réputation d'espèce sensible, en oubliant que si ce poisson n'est pas présent dans des eaux de mauvaise qualité, cette absence ne constitue pas une réponse à court terme à une éventuelle pollution, mais correspond davantage à un processus à moyen voire long terme. Ce problème de sensibilité est d'autant plus aigu que nous avons recours à des poissons provenant d'élevages intensifs, qui favorisent très probablement l'obtention de souches plus résistantes aux conditions du milieu environnant. Aussi est-ce l'ensemble de ces considérations qui a conduit le Laboratoire de Biologie Appliquée à proposer un nouvel axe de recherche, avec le recours à une nouvelle espèce dans le domaine de la toxicologie : *Apteronotus albifrons*, poisson tropical électrogène, pour la détection de pollution des eaux de surface. C'est le sujet de notre travail, que nous présentons maintenant.

¹: Thomas M. (1991). Examen préliminaire traitant de la sensibilité de truites arc-en-ciel aux hydrocarbures. Application à la détection d'une pollution accidentelle dans les stations de pompage des eaux de surface destinées à la consommation. 43 pages.

L'eau est la substance minérale la plus répandue à la surface du globe et la plus essentielle à la vie. Son volume est estimé à 1 370 millions de km^3 . Non seulement elle constitue le principal composant du protoplasme cellulaire, mais elle représente les deux tiers du poids de l'homme et jusqu'aux neuf dixièmes du volume des végétaux. Aussi ce constituant majeur est-il surtout **synonyme de vie biologique**.

La simplicité de sa formule chimique, H_2O , contraste avec la **pluralité de ses fonctions** au sein de notre société. L'ensemble des usages domestiques, industriels et agricoles auquel l'eau répond, révèle en effet jusqu'à quel point l'eau peut se définir comme le vecteur privilégié de la vie et de l'activité humaine. Elle est un élément social, elle peut être un instrument politique. De tous les usages de l'eau, la **distribution de l'eau potable** est celui qui mobilise certainement le plus d'attention. Les besoins en eau de l'humanité augmentent avec le niveau de développement économique du pays. Aussi leurs disparités sont-elles significatives : la consommation en eau, tous usages confondus, varie de 100 m^3 par an et par habitant pour les pays en voie de développement à 1 500 m^3 pour les pays les plus industrialisés.

La considération de ces données, aussi bien d'un point de vue biologique et écologique, que social ou économique, nous permet de juger de **l'importance des démarches qui visent à la protection et à la surveillance des écosystèmes aquatiques en général**. En effet, les ressources en eau sont, corollaire obligé, sujettes à des risques croissants de pollution. Dans ce contexte, soulignons que la qualité de **l'eau** est une notion subjective, qui se réfère à un objectif d'utilisation ou de préservation du milieu. L'Organisation Mondiale de la Santé (O.M.S.) a fourni en 1961 la définition suivante de la pollution des eaux douces :

*“Un cours d'eau est considéré comme étant pollué lorsque la composition ou l'état des eaux sont directement ou indirectement **modifiés** du fait de l'activité de **l'homme** dans une mesure telle que celles-ci se prêtent moins facilement à toutes les utilisations auxquelles elles pourraient servir à leur état naturel ou à certaines d'entre elles. ”*

Cette définition est une perception environnementaliste du problème de la qualité de l'eau ; elle inclut les modifications des propriétés physiques et chimiques aussi bien que biologiques de cette ressource.

L'eau en général et plus encore celle destinée à la consommation humaine doit **satisfaire** à des **exigences de qualité** toujours plus strictes. Si les traitements appliqués sont aujourd'hui relativement bien **maîtrisés**, leurs performances sont assujetties en partie à la qualité des eaux brutes. Malheureusement, celle-ci est très variable, ce qui complique nécessairement la gestion

des installations de production d'eau potable. De plus, la vulnérabilité des ressources s'accroît avec l'augmentation de l'activité humaine. On recense généralement 3 sources essentielles de pollution des eaux potables : les industries en amont des stations de traitement, les transports à proximité des voies d'eau et le sabotage. Les dégradations de la qualité des eaux brutes peuvent avoir diverses conséquences : un arrêt momentané de la production, voire même de la distribution d'eau potable, la production d'une eau de mauvaise qualité ou encore une augmentation du coût de production de cette eau. Cette situation appelle en conséquence une **surveillance étroite de la qualité de l'eau**. À terme, cela doit exiger une évaluation des risques potentiels de pollution, une détection en temps réel des variations de la qualité des eaux et une protection des unités de traitement. Longtemps, cette surveillance s'est concrétisée par une **approche exclusivement physico-chimique**. Un échantillonnage périodique de l'eau, son transfert au laboratoire puis une analyse chimique permettent alors la collecte d'informations nécessaires quant à une définition de la qualité du milieu. Ceci est réalisé au moyen de méthodes ionométrique, potentiométrique, **ampérométrique**, spectrophotométrique, chromatographique, etc... Ce mode de surveillance révèle les résultats des tests à un instant **différé** par rapport au moment du prélèvement. Aussi la principale critique que nous pouvons formuler touchant cette approche est qu'elle ne permet pas toujours une intervention *in situ* pertinente, compte tenu des délais parfois nécessaires au recueil de l'information.

Face à cette limite essentielle, les stations de surveillance se sont progressivement équipées de **capteurs**, qui permettent un suivi continu ciblé sur un facteur donné. Elles contrôlent des paramètres classiques tels que température, pH, turbidité, **oxygène** dissous, conductivité, carbone organique total, ammoniacale, nitrite, nitrate, . . . Certains capteurs, plus récents, permettent de détecter la présence de polluants potentiels, comme par exemple les hydrocarbures, les métaux (plomb, cadmium, cuivre, zinc, nickel, chrome). Notons cependant qu'un enregistrement continu est irréalisable pour beaucoup de substances xénobiotiques. Parfois même l'analyse est impossible. Selon **Botterweg et al. (1989)**, nous pouvons détecter de façon routinière 150 à 200 substances, ce qui est évidemment peu en considération du nombre de composés chimiques existant lequel, qui plus est, croît d'année en année. Par ailleurs, outre l'impossibilité technique d'une analyse complète de l'ensemble des paramètres physiques et chimiques, se posent des problèmes de coût et de maintenance de tels procédés de contrôle. On ne peut raisonnablement pas envisager de développer un **capteur** pour chaque substance potentielle dans l'écosystème aquatique.

Aussi le problème de la surveillance de la qualité des eaux s'avère-t-il complexe ; il l'est d'autant plus que les méthodes chimiques présentent des limites d'utilisation du fait même de leur principe de fonctionnement. Certaines questions en effet surgissent, comme par exemple de savoir comment détecter et doser une substance en cas de dégradation partielle ou

d'absorption sur un substrat ? Ou bien encore, comment appréhender les effets cumulatifs, synergiques, . de différentes substances réagissant entre elles ? Comment aborder le problème des micropolluants, substances qui interviennent à des doses infimes dans la pollution des eaux et qui sont très difficiles à mettre en évidence par les procédés d'analyses habituelles ? *etc...*

Aussi le caractère spécifique du suivi physico-chimique ne permet-il qu'une extrapolation limitée, alors qu'une méthodologie plus globale serait souhaitable. L'interaction de substances, le nombre croissant de toxiques, la présence de composés au-dessous des seuils de détection des analyses chimiques, . autant d'arguments qui appellent la notion d'intégration de l'ensemble des effets des paramètres physiques et chimiques. C'est la raison pour laquelle apparaît aujourd'hui incontournable de coupler les données physiques et chimiques à des **informations biologiques** (Caims et Gruber, 1979 ; Gruber *et al.*, 1980 ; Morgan *et al.*, 1981). Ces dernières sont essentielles et il existe dans ce domaine plusieurs types d'investigations, ayant des objectifs propres à chacune, qui sont précisément :

1. UNE EVALUATION : C'est l'analyse des **communautés** naturellement présentes au sein d'un écosystème. Elle permet une évaluation des conditions de ce milieu. Patrick (1949) est le pionnier de ce concept qui vise à la détermination du degré de pollution à partir d'**indices biologiques**. Ceux-ci peuvent être fondés sur une seule catégorie d'organismes, les macro-invertébrés généralement, récoltés directement sur le terrain, témoins de l'état fonctionnel et de la qualité de l'écosystème aquatique. Notons que la présence d'une espèce nous informe que certaines conditions minimales sont rencontrées, alors que la signification de l'absence d'une espèce est considérablement plus difficile à déterminer (Caims, 1974) : cette **espèce** est absente soit parce que les conditions environnementales sont impropres, soit parce qu'elle n'a pas été introduite dans ce milieu où elle pourrait vivre si on l'y plaçait. De même, la structure du peuplement, exprimée notamment par la richesse spécifique (nombre d'espèces) et les abondances-dominantes des taxons, révèle l'état d'équilibre et de complexité de la communauté. Cependant avant de pouvoir conclure à l'existence d'une perturbation, il est nécessaire de connaître l'état "normal" de cet équilibre. En somme, nous pouvons distinguer différentes approches : la première concerne les méthodes basées sur les **saprobies**, qui s'appuient sur la notion d'espèces indicatrices telles que les macro-invertébrés, les protozoaires et les diatomées (Sladeczek, 1969). La deuxième approche est l'étude des **indices biotiques**, qui tiennent compte à la fois des notions de groupes indicateurs et de richesse en taxons (Vemeaux et Tufféry, 1967). A titre d'exemple, il existe une norme expérimentale pour la détermination de l'indice biologique global généralisé (norme AFNOR T 90-350, 1992). Enfin, des indices plus fonctionnels, basés sur des paramètres synthétiques de structure de peuplement, **comme la diversité taxinomique** (Caims et Dickson, 1971) peuvent être évalués.

2. UNE PREDICTION : Ce sont les *tests de toxicité*. Il s'agit essentiellement d'une approche de Moratoire mais ces tests sont aussi parfois réalisés *in situ*. Ils permettent de détecter la présence d'éléments toxiques par l'étude de la mort, de modifications **métaboliques** ou comportementales d'un "matériel" biologique et donc d'en mesurer les risques, Ceci passe par la mise en place de **tests de toxicité soit aiguë, soit chronique**. Dans ce contexte, une petite précision s'impose quant à la définition des toxicités aiguë et chronique ; la première détermine des effets d'une ou plusieurs substances sur des organismes après un court temps d'exposition, **inférieur** à 4 jours selon Parrish (1985). En contrepartie, une toxicité chronique se développe après une exposition à long terme. Cependant, ces définitions, vraies au sens général, sont par trop imprécises pour être satisfaisantes. En effet, il est fondamental d'intégrer la notion de durée de vie des organismes pour approcher avec justesse un tel problème. Ainsi une durée d'exposition de 4 ou 5 jours à un toxique est considérée comme un test de toxicité aiguë pour les poissons, mais peut déjà provoquer des effets chroniques sur des micro-organismes dont le cycle de vie est plus court. Aussi actuellement **observons-nous**, aussi bien pour des raisons pratiques qu'économiques, le développement d'essais chroniques rapides, notamment pour l'évaluation de la toxicité des **effluents** (Garric *et al.*, 1992). L'évaluation de la toxicité aiguë est exprimée par des résultats de nature statistique, généralement. Elle correspond à la mesure d'une concentration qui entraîne l'effet recherché sur 50 % des individus (ou dans 50 % des répétitions) en un temps limité (6, 24, 48 ou 96 heures, ...). La concentration s'appelle suivant les cas : concentration inhibitrice (CI 50), concentration efficace (CE 50), concentration létale (CL 50). Ces résultats peuvent également être exprimés par l'évaluation de la plus petite concentration qui entraîne un effet significatif sur les organismes (il s'agit de la LOEC, *i.e.* "Lowest Observed Effect Concentration" ou MTC, *i.e.* "Minimal Threshold Concentration") et également par la concentration maximale n'entraînant aucun effet significatif (on parle alors de la NOEC, *i.e.* "No Observed Effect Concentration"). Parmi les différents tests de toxicité aiguë, nous pouvons citer les essais préconisés par l'Association Française de Normalisation (AFNOR). Il s'agit des déterminations de la concentration d'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Strauss, crustacé, Cladocère (norme AFNOR T 90-301, 1983), de la luminescence de *Photobacterium phosphoreum*, bactérie marine (norme AFNOR T 90-320, 1991) ou encore de la croissance de *Scenedesmus subspicatus*, algue verte (norme AFNOR T 90-304, 1980). Cela peut être aussi la détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis du poisson zèbre, *Brachydanio rerio* (norme AFNOR T 90-303, 1978). En ce qui concerne la toxicité chronique, nous pouvons déterminer la concentration maximale d'une substance acceptée par l'organisme pendant une période relativement longue (c'est la MATC, *i.e.* "Maximum Acceptable Toxicant Concentration", moyenne géométrique de la NOEC et de la LOEC). D'une façon générale, les tests de toxicité permettent d'étudier les modes d'action toxiques.

3. UNE DETERMINATION : Cela concerne les *tests de bioaccumulation et de biomagnification* qui étudient plusieurs phénomènes biologiques. Dans ce domaine d'étude, nous évaluons généralement la **bioconcentration**, processus par lequel une substance chimique pénètre dans l'organisme, *via* les branchies ou les tissus épithéliaux, et s'y accumule. Les tests de bioconcentration concernent principalement les substances chimiques hydrophobes, qui tendent à s'accumuler dans les tissus gras. Nous déterminons alors le facteur de bioconcentration, rapport entre la concentration moyenne d'une substance accumulée dans les tissus et la concentration moyenne de cette même substance dans le milieu ambiant de l'organisme. Ainsi l'objectif des études de **bioaccumulation** concerne précisément l'évaluation de tels processus de bioconcentration ainsi que des investigations sur l'accumulation de substances chimiques par l'intermédiaire des aliments consommés. D'un autre côté, les tests de **biomagnification** regroupent l'ensemble des processus qui se développent durant les phénomènes de bioconcentration et de bioaccumulation. Il s'agit là d'une approche globale par laquelle nous observons une augmentation de la concentration des substances dans les tissus de l'organisme le long de la chaîne trophique.
4. UNE RECONNAISSANCE : C'est *l'utilisation d'indicateurs biologiques* qui permet d'enregistrer d'éventuelles contaminations du milieu environnemental, avec intégration du facteur temps, par l'étude qualitative et quantitative de substances étrangères (des métaux traces le plus souvent) qui se concentrent dans les tissus des organismes sentinelles. On utilise généralement des espèces sédentaires (bryophytes, moules, ...). Il doit exister pour ce type d'étude une **corrélation** simple entre la concentration de substances étrangères dans l'organisme et les concentrations de ces mêmes substances dans l'eau. Il est également nécessaire de s'assurer que les conditions environnementales du site étudié **n'entraînent** pas une absorption **atypique** de substances dans l'organisme. Globalement, le recours à des **indicateurs biologiques** doit permettre d'identifier des zones de pollution, de surveiller les rejets industriels, de s'assurer de l'efficacité de mesures de restauration du milieu dégradé, . . .
5. UNE SURVEILLANCE : Cela intéresse *les systèmes d'alerte biologique précoce - ou biodétecteurs* - qui sont principalement caractérisés par leur capacité de fournir une information rapide sur la toxicité éventuelle d'effluents et de faciliter la détection de décharges accidentelles de substances étrangères dans le milieu. Cela concerne généralement l'étude des effets sublétaux. Ces derniers peuvent être d'ordre biochimique, physiologique, comportemental, histologique, . . . Les activités liées à ce type d'investigation sont la surveillance des effluents industriels et des eaux brutes destinées à la production d'eau potable. Ce dernier point caractérise l'objet de la présente étude, dont l'ambition est la mise au point d'un nouveau **système de détection biologique précoce** de pollutions des eaux de surface.

S'intéresser un tant soit peu aux systèmes de détection biologique précoce, c'est prendre très vite conscience de la multiplicité des procédés, multiplicité qui s'exprime aussi bien du point de vue des organismes utilisés que de celui des principes développés. Aussi la première question qui se pose est-elle la suivante : pourquoi recourir à une nouvelle approche compte tenu de l'arsenal de systèmes déjà existants ? Répondre à cette question sera un des objectifs du premier chapitre. Celui-ci s'articulera globalement autour de deux axes. Le premier concernera une étude descriptive des principes et des limites des divers systèmes de biodétection. Le second axe sera une discussion plus générale sur le concept de tels systèmes et sur les informations qu'ils nous apportent par rapport à ce qu'on en attend. Ce premier chapitre est une partie introductive pour réaliser un **état de l'art de ce domaine de recherche** et identifier **les limites actuelles des biodétecteurs**, ce qui caractérisera à terme, la véritable problématique de notre étude.

Nous entrerons dans le vif du sujet, lors du deuxième chapitre. Celui-ci sera consacré à la **présentation du biodétecteur**, objet de notre recherche, fondé sur la caractérisation automatique et en temps réel des signaux électriques engendrés par un poisson tropical. Ce chapitre "matériel et méthodes" sera abordé sous différents **angles**, biologique, hydraulique, informatique, électronique et mathématique.

L'un des problèmes majeurs rencontrés avec les biodétecteurs est celui des interférences de facteurs physico-chimiques sur les réponses biologiques enregistrées. Aussi allons-nous étudier dans un troisième chapitre **l'influence dz certains paramètres physiques et chimiques sur le signal électrique du poisson**.

Compte tenu de ce que l'espèce ichthyaire retenue dans notre étude n'a jamais été sollicitée dans ce domaine, nous dresserons dans un quatrième chapitre, le **profil de sensibilité toxicologique** du poisson vis-à-vis de **6** polluants de différentes natures et représentatifs des risques majeurs de pollutions accidentelles encourus par la Moselle.

Enfin nous conclurons ce travail, sans oublier une **présentation des perspectives futures** et notamment des améliorations nécessaires à réaliser pour un développement approprié du système, en regard des conditions réelles d'utilisation.

Au début de ce travail, nous nous étions fixés comme objectifs :

- de réaliser un BILAN DES CONNAISSANCES ACTUELLES dans le domaine des biodétecteurs et des biocapteurs et d'identifier les limites des systèmes existants,
- de CONCEVOIR UN NOUVEAU PROCEDE DE DETECTION BIOLOGIQUE PRECOCE des pollutions des eaux de surface, au moyen des émissions électriques engendrées directement par des poissons,
- D'EVALUER L'INFLUENCE DE FACTEURS PHYSICO-CHIMIQUES SUR LES REPONSES BIOELECTRIQUES exploitées,
- de DEFINIR UN PROFIL DE SENSIBILITE TOXICOLOGIQUE de l'espèce ichtyaire vis-à-vis de substances polluantes de différentes natures.

La première partie de cette étude nous a permis :

- de montrer la **multiplicité des systèmes de détection biologique précoce**, dont la diversité s'exprime aussi bien du point de vue de l'espèce utilisée que du principe développé,
- de définir clairement ce **qu'on est en droit d'attendre de tels systèmes**,
- de recenser les différents **facteurs biotiques et abiotiques** qui influencent les performances des biodétecteurs et des biocapteurs,
- d'insister **sur l'importance du facteur temps** dans la définition de la sensibilité des réponses,
- de reconsidérer très précisément le problème des fausses alarmes, de façon à distinguer deux notions généralement confondues que sont la **fiabilité** et la **crédibilité** des systèmes de biodétection.

En **réaffirmant** tout l'intérêt que présente l'exploitation de réponses biologiques pour une détection des changements de la qualité des milieux aquatiques, nous avons conclu que de toutes les approches, celle qui consistait à exploiter les signaux électriques engendrés par *Gnathonempetersi* était une des plus intéressantes. Notre avis favorable est **essentiellement** motivé par la constatation qu'on y utilise un réactif biologique directement assimilable à un générateur électrique. A l'encontre des promesses d'un tel procédé, nous identifions cependant plusieurs inconvénients majeurs, les principaux étant de natures électrique (signaux' de type pulsatoire irrégulier) et biologique (espèce grégaire).

Sur la base de cette critique, nous avons élaboré un nouveau concept de détection biologique. Sa description fait l'objet de la deuxième partie de ce travail. Elle s'articule autour de plusieurs thèmes :

- le premier consiste en une **présentation détaillée d'*Apteronotus albifrons***, organisme choisi dans notre étude comme réactif biologique. Une présentation taxinomique, biogéographique, morpho-anatomique et biologique de cette espèce est proposée. Suivent alors des considérations plus générales sur les phénomènes d'électrogenèse et d'électroréception chez les poissons dits faiblement électriques, et finalement une **définition précise des caractéristiques électriques d'*Apteronotus albifrons***. Cette présentation attire particulièrement l'attention sur un point fondamental qui est **l'extrême régularité de l'activité électrique naturelle de ce poisson**.
- le deuxième thème consiste en une **présentation des systèmes thermique et hydraulique** développés dans cette étude. L'ensemble des choix indispensables à la conception de tels systèmes trouve aussi sa justification, dans le respect de **considérations biologiques, déontologiques et techniques**. En particulier, nous nous sommes imposé au cours de ce développement, la conception d'un biodétecteur qui devra être facilement transférable à une unité de terrain et donc opérationnel dans des conditions évidemment plus drastiques *in situ* qu'en laboratoire.
- Enfin le troisième thème intéresse **le mode de recueil, de traitement et d'analyse** des informations électriques fournies par les poissons. La principale originalité de cette étude est qu'elle porte non seulement sur la **fréquence** de décharge, mais aussi sur la **forme** du signal ondulatoire et sur la vitesse de leurs variations temporelles.

Parce qu'il est essentiel de connaître la sensibilité du réactif biologique aux changements environnementaux, la troisième partie de ce travail s'est proposée de définir l'influence de quatre paramètres physico-chimiques sur l'activité électrique d'*A. albifrons*.

- Le premier concerne la température. Nous montrons l'existence d'une **relation parfaitement linéaire entre la fréquence de décharge et la température de l'eau** (dans une gamme de 22 à 32°C). Nous calculons une variation de 45 à 64 Hz / °C selon les individus et un **Q10 égal à 1,6**. Un **phénomène d'hystérésis** est également signalé au niveau de la fonction qui lie la fréquence et la température de l'eau.

- Le deuxième paramètre étudié est le pH. Nos expériences prouvent **que des conditions acides (jusqu'à 3,6) se répercutent sur la fréquence de décharge des aptéronotes par une diminution**, en moyenne de 8,5 Hz / unité pH. Au contraire, **des conditions alcalines (jusqu'à 10,6) conduisent à une élévation de la fréquence**, en moyenne de 6,1 Hz / unité pH.
- La **conductivité électrique de l'eau**, dans une gamme de 54 à 484 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, **n'exerce une influence que sur l'amplitude du signal**. Celle-ci diminue avec l'augmentation de la charge ionique de l'eau.
- Enfin le dernier paramètre étudié est la concentration en oxygène dissous. Dans le cas le plus général, nous montrons **qu'un appauvrissement progressif de l'eau en oxygène conduit à une baisse de la fréquence de décharge** chez les aptéronotes.

Dans tous les cas, aucune relation de cause à effet n'est montrée entre l'un ou l'autre des paramètres physico-chimiques et la forme du signal d'*A. albifrons*. Nos résultats démontrent clairement **la nécessité d'une maîtrise parfaite de la température de l'eau**, de façon à **s'affranchir** totalement de l'influence de ce facteur sur la fréquence de décharge des aptéronotes. D'autre part, nous nous sommes intéressés au fait que des modifications de pH ou d'oxygène dissous dans les eaux de surface pouvaient être non seulement le résultat d'une évolution naturelle des milieux aquatiques, mais aussi le reflet de la dégradation des conditions environnementales. Ces considérations conduisent à **la nécessité d'entreprendre des études sur site**, pour appréhender entre autres, **l'influence de ces paramètres** sur l'activité électrique des poissons, dans des gammes et des cinétiques de variations qui correspondent à celles relevées au sein des **écosystèmes** aquatiques.

La quatrième partie de ce travail dresse les profils de sensibilité toxicologique des aptéronotes vis-à-vis de six substances polluantes : le cyanure, le phénol, **l'atrazine**, le trichloroéthylène, le chrome hexavalent et le gazole. Les résultats et les discussions développés à partir de tests toxicologiques se répartissent globalement au sein de quatre chapitres :

- Le premier définit **la sensibilité et la rapidité des réponses** développées par les aptéronotes dans des conditions toxiques variées. Nous montrons que notre biodétecteur révèle **en moins de 35 minutes les concentrations suivantes : 35 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ de cyanure, 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de phénol, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ d'atrazine, 1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de trichloroéthylène, 2,7 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de chrome (VI) et une gamme de 1,9 à 18,4 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de gazole**. La confrontation de nos résultats avec ceux que fournissent d'autres biodétecteurs et biocapteurs rencontrés dans la littérature

exprime très clairement toute la valeur des performances enregistrées avec notre système, en termes de seuil de concentration détectée et de temps de réponse. Cette constatation est particulièrement évidente pour les tests réalisés avec le cyanure, le phénol, le trichloroéthylène et le chrome hexavalent.

- Le deuxième chapitre concerne **la fiabilité et la crédibilité de l'information** collectée, deux thèmes abordés notamment par le biais d'une analyse critique de notre traitement mathématique. Celui-ci comprend pour l'essentiel le calcul de **limites d'alarme dynamiques** et pour principale originalité, **une évaluation du poids de l'alarme**. Plusieurs voies de recherche sont proposées en vue d'une amélioration du mode de traitement des données, comme par exemple l'attribution de seuils d'alarme absolue.
- La **variabilité intraspécifique** des réponses données par *A. albifrons* constitue le troisième thème. Nous montrons d'une façon générale que cette variabilité est d'autant plus remarquable que nous sommes plus proches des seuils de concentrations **détectables**. Entre autres résultats **déterminants**, notre étude réitère avec force la **nécessité de maîtriser la reproduction** de cette espèce.
- Enfin la quatrième partie aborde un domaine de nature plus fondamentale, avec des **considérations hypothétiques sur les modes d'action toxique** qui s'exerceraient sur l'organisme-test et affecteraient sa faculté électrogène. Nous insistons aussi sur la nécessité d'éprouver la pertinence des hypothèses proposées. Plus généralement, nous exprimons et justifions l'idée que la **compréhension des mécanismes toxicologiques**, qui sont à la source des informations exploitées par les biodétecteurs et les biocapteurs, mériterait des recherches plus approfondies.

La présentation synoptique de ces résultats nous suggère plusieurs remarques, notamment au niveau des perspectives de recherches :

1. Il apparaît fondamental **d'approfondir nos connaissances sur la biologie des aptéronotes**. Dans cette optique, maîtriser la reproduction de cette espèce est une nécessité évidente, ce qui impliquerait des études sur la différenciation sexuelle des individus, sujet encore mal maîtrisé à l'heure actuelle.
D'autre part, nous nous sommes trouvés confrontés, tout au long de ce travail, à diverses interrogations, qui pourraient trouver un début de réponse à la faveur d'un approfondissement expérimental. Par exemple :
 - La sensibilité des poissons vis-à-vis de conditions toxiques variées est-elle dépendante du sexe de l'animal ?

- Existe-t-il une influence du régime alimentaire sur la sensibilité des poissons aux toxiques ?
- La variabilité **intraspécifique** des réponses enregistrées est-elle seulement imputable au fait que l'on ait recours à des poissons prélevés directement dans le milieu naturel ?

2. Un transfert sur site de la technologie développée en laboratoire est aussi une priorité, c'est même en réalité la **finalité** de ce domaine de recherche. L'urgence de la réalisation d'essais *in situ* s'est particulièrement révélée lorsque nous avons étudié l'influence de la température, du pH, de la conductivité et de la concentration en oxygène dissous sur l'activité électrogène des aptéronotes. Une lacune essentielle est apparue dans ce travail : nous ne savons pas si des gammes et des cinétiques de variation des paramètres **physico-chimiques** des eaux de surface pourraient exercer une influence suffisante pour répondre aux critères d'alarmes que nous avons définis. Nous ignorons aussi dans quelle mesure elles pourraient agir sur les aptitudes de ces organismes à détecter des conditions toxiques ? Par ailleurs, le fait que des modifications de la conductivité aient des répercussions sur l'amplitude du signal nous amène à réfléchir sur le développement d'un système de gain automatique - géré par ordinateur - du signal capturé. Ce sujet est actuellement à l'étude

Enfin nous ne saurions clôturer ce paragraphe sans réinsister sur le problème que pose la dépendance étroite de la fréquence de décharge des poissons à l'égard des changements thermiques de l'eau. Cela exige - comme nous n'avons pas manqué de le signaler - une thermorégulation performante et aussi la réalisation d'un système de corrections automatiques des variations thermiques résiduelles. A ce sujet, des essais préliminaires ont été entrepris sur un prototype placé au bord de la Moselle, à la station d'alerte de **Messein** et fonctionnant en circuit ouvert. Parallèlement des tests en laboratoire se poursuivent pour la mise au point d'un système de mesure de la température largement en-dessous d'un seuil de sensibilité du dixième de degré Celsius. L'idée est de réaliser une mesure extrêmement précise de la température de l'eau, parallèlement à la capture du signal électrique, dans chaque bac de contention. L'information électrique devra alors être corrigée, soit en utilisant l'équation qui permet le calcul du **Q10**, soit en appliquant un coefficient propre à chaque individu et calculé au préalable (ce qui ne devrait pas poser *a priori* de problème, la relation entre les deux grandeurs, **fréquence** et température, étant **parfaitement** linéaire).

3. Une réflexion sur l'analyse mathématique des données mérite aussi d'être engagée. En premier lieu, cela intéresse la fréquence de décharge, dont l'exploitation devrait prendre en compte les progrès normalement réalisés sur la maîtrise du facteur "température". D'autre part, nous avons souligné à plusieurs reprises dans de ce travail, l'existence de pics de

fréquence qui pourraient être aussi exploités. Dans une étude préliminaire, nous avons remarqué effectivement que la probabilité d'apparition de ces pics était apparemment modifiée lorsque le poisson était incommodé par la présence d'un toxique. L'exploitation de ces pics de **fréquence**, extrêmement brefs, exigerait alors une révision de la vitesse de capture de l'information électrique des poissons.

En second lieu, il serait nécessaire de progresser dans l'exploitation de la forme du signal. Actuellement, l'analyse de cette caractéristique électrique n'est pas satisfaisante. C'est la raison pour laquelle nous envisageons non plus d'étudier les rapports des amplitudes des harmoniques 2, 3, 4 et 5 à l'amplitude de la fondamentale, mais plutôt de calculer la surface des deux alternances, positive et négative, expression de la puissance instantanée du signal. Cette voie d'exploitation devrait normalement prendre en compte l'ensemble des répercussions des facteurs externes sur la forme de l'EOD. Cela exigerait à nouveau une révision du protocole de capture du signal.

Ces différentes voies de recherche sont depuis peu engagées au Laboratoire de Biologie Appliquée et méritent d'être poursuivies.

4. Enfin, **élargir le profil de sensibilité toxicologique des aptéronotes** est bien sûr un thème de recherche attendu, puisqu'à l'heure actuelle, il est limité à 6 substances polluantes. Une connaissance et une compréhension des mécanismes toxicologiques et des phénomènes d'accoutumance des organismes aux conditions toxiques sont également des sujets de préoccupation qui ne doivent pas être ignorés.

*

* *

Le biodétecteur développé dans cette étude a reçu tout récemment le nom de **GYMNOTOX**, en référence à la fois à la fonction à laquelle il est dévolu et à l'ordre taxinomique des Gymnotiformes auquel appartient *Apteronotus albifrons*.