



Etude de la toxicité d'effluents industriels et urbains dans le secteur amont de la Moselle

Etude réalisée pour le compte de l'Agence de l'eau Rhin-Meuse

Auteurs :

J. Garric, M. Bray, B. Migeon, B. Vollat, C. Richert

CEMAGREF-Groupement de Lyon

Division biologie des écosystèmes aquatiques

3, bis quai Chauveau

69336 LYON Cedex 09

Editeur : Agence de l'eau Rhin-Meuse

Février 1995

50 exemplaires

100 francs

@Agence de l'eau Rhin-Meuse

Tous droits réservés

SOMMAIRE

Préambule

Introduction

Analyses effectuées	2
. Analyses in situ	2
. Bioessais sur effluents	7
Discussion	14
. Ecotoxicité/intrinsèque des effluents	14
. Evaluation de la présence d'inducteurs	16
. Relations EROD/toxicité	17
. Proposition de classement écotoxique des effluents	18
. Interprétation des résultats in situ	19
Conclusions	22
Protocoles et Analyses	24

Etude de la toxicité d'effluents industriels et urbains dans le secteur amont de la Moselle

Préambule

La mesure de la toxicité des effluents, qu'ils soient industriels ou urbains, est une étape indispensable de la réduction des rejets toxiques, dont l'Agence de l'eau Rhin-Meuse a fait une de ses priorités depuis plusieurs années. Cette mesure est le plus souvent réalisée au laboratoire à l'aide de tests biologiques, sur des échantillons d'effluents prélevés dans des conditions représentatives de l'activité industrielle, ou des charges traitées dans les stations urbaines.

Cette démarche peut prêter à malentendu, si l'on perd de vue qu'il s'agit d'une mesure de toxicité potentielle. En effet, les conditions (température matière organique etc...) dans lesquelles on évalue cette toxicité au laboratoire sont standardisées, par souci de fiabiliser la mesure, mais n'ont en tout état de cause qu'un rapport lointain avec les conditions réelles du milieu récepteur. Cette évaluation d'une toxicité potentielle présente toutefois plusieurs avantages déterminants, en particulier le fait de permettre d'agir avant que des effets importants, difficilement réversibles, soient observés dans le milieu, et celui de permettre des comparaisons dans le temps (si les conditions d'observation des effets biologiques ne sont pas stables, on ne peut pas conclure sur l'évolution de la toxicité d'un rejet).

Toutefois, pour être tout à fait pertinentes, ces mesures de toxicité potentielle devraient pouvoir être mises en relation avec des effets sur le milieu récepteur, pas nécessairement sous la forme de proportionnalité, mais au moins sous celle de tendances ou de relations qualitatives. Il faut reconnaître à cet égard que cet effort a rarement été fait, au moins pour les formes de toxicité à moyen/long terme (chroniques).

L'évaluation de l'impact d'un rejet toxique, ou de la contamination d'un milieu, sur l'environnement, relève d'une démarche complexe et lourde, ce qui explique en partie qu'elle soit rarement entreprise (de gros efforts sont faits cependant dans certains pays, notamment les USA, le Québec etc). L'un des indicateurs d'impact souvent évoqué est un "biomarqueur", appartenant au cytochrome **P450** ; la réponse de ce biomarqueur traduit d'abord une exposition à des substances toxiques, et pas directement un impact objectivable en termes anatomiques, physiologiques ou autres.

L'ambition de cette étude était de confronter ces deux types d'information : toxicité potentielle, mesurée à l'aide de tests biologiques, et réponse d'un biomarqueur, pour voir si l'on peut espérer trouver une relation entre eux. Le nombre volontairement limité d'échantillons (5 effluents et 5 points d'observation sur le milieu) ne permet évidemment pas de tirer une conclusion parfaitement nette de cette confrontation, mais cependant d'obtenir une première série d'indications encourageantes.

L'étude a été conduite dans un secteur difficile, où ont eu lieu des polémiques assez vives autour d'un effluent particulier. Ce contexte a donné lieu à la mise en place d'un groupe de travail chargé d'évaluer la qualité de la Moselle et l'impact sur celle-ci de **l'effluent** en question. Sans que cette étude ait été directement commandée par le groupe de travail, il était espéré qu'elle lui apporte des informations utiles.

Introduction

L'étude réalisée fin 1992 et courant 1993 sur la Moselle a porté d'une part sur la mesure de l'écotoxicité intrinsèque des effluents les plus importants du secteur étudié, et d'autre part sur une évaluation de l'impact des apports polluants sur sa faune en particulier piscicole.

La mise en oeuvre d'une telle approche : évaluation biologique de la qualité de rejets industriels **et/ou** urbains, et caractérisation conjointe de la réponse des organismes du milieu reste encore originale en France. En effet, bien que recommandée par l'OCDE ^[1] depuis plusieurs années et appliquée dans différents **pays**^[2], en particulier pour la définition de normes de rejets, une telle approche nécessite la maîtrise et la réalisation d'expérimentations encore considérées par les gestionnaires comme plus complexes et coûteuses qu'une démarche analytique. L'analyse critique des informations apportées par ces différentes méthodologies ^{[3],[4]} et les expériences acquises dans plusieurs pays ^{[5], [6]} montrent cependant qu'elle apporte des informations essentielles sur la biodisponibilité, les interactions toxiques des substances présentes dans les effluents et les risques d'impact toxique à long terme sur les milieux récepteurs.

Nous avons mesuré en laboratoire la toxicité létale et sublétales sur poissons et microcrustacés de quatre effluents industriels et d'un effluent urbain. Simultanément la mesure de la potentialité d'induction d'une activité enzymatique de détoxification à cytochrome **P450** a été effectuée. Cette même mesure a été réalisée sur poissons prélevés **in situ**, sur des stations proches des rejets étudiés. Enfin nous disposons d'informations sur la qualité de la faune benthique d'oligochètes et la contamination chimique des sédiments par plusieurs polluants majeurs les plus courants ((**HAPs, PCBs et métaux**)^[7].

la contamination chimique des sédiments par plusieurs polluants majeurs les plus courants .

Le présent rapport a pour objet de résumer l'ensemble des résultats acquis ^[8] et d'en proposer une synthèse.

¹ OCDE. Monographie sur l'environnement. Utilisation des tests biologiques pour l'évaluation et le contrôle de la pollution de l'eau 1988.

² J.Garric, Vindimian E., and J.F. F&ard. Ecotoxicology and waste water : some practical applications. The Sci. of the Tot. Environ. **p1085-1103**, Suppl. 1993

³ E. Vindimian et J. Garric. **Bio-essais** et bii-indicateurs de **toxicité** dans le milieu naturel. Etude interagence n°17, 56 p.1993.

⁴ J. Bottetweg and J. Risselada. **Toxicity assessment** of effluents in the Netherlands : **implementation, problems and prospects**. The Sci. of the Tot. Environ. **p1105-1113**, **Suppl.1993**

⁵ F.Pedersen, Damborg A. and P. Kristensen. Danish strategy for investigating industriil effluents. The Sci. of the Tot. Environ., **p115-1122**, Suppl. 1993

⁶ U.S. Environmental Protection **Agency**. Technical support document for water quality-based toxics control. **EPA/505/2-90-001** PB 91.1991. Office of water. Washington D.C.

⁷ M. Lafont et J.C. Camus. Utilisations des **oligochètes** et des **microcrustacés** dans l'évaluation des **échanges nappe-rivière** et dans l'**appréciation** de la contamination du milieu. Application à la Moselle à l'amont de Nancy. -Rapport CEMAGREF, Agence de l'eau Rhin Meuse. **Décembre** 1993.

⁸ Rapports **intermédiaires** CEMAGREF. Evaluation de l'**écotoxicité** de divers effluents et de leur impact en riiière. Application à la Moselle à l'amont de Nancy. (**Phase1**, 2.3).

II Analyses effectuées

2.1 Analyses in situ

Des pêches électriques ont été effectuées sur 6 stations de la Moselle en amont et aval de la ville d'Epinal du 12 au 15 octobre 1992. La localisation de ces stations a été choisie afin d'encadrer les rejets étudiés et se rapprocher des stations de prélèvements d'invertébrés (voir carte).

La situation des stations de pêche est résumée dans le tableau ci-dessous :

Nom	N°	Situation	Caractéristiques	Correspondance/ stations invertébrés
Saint Etienne les Remire- mont	401.	Aval confluence Mose- lotte.	Station amont de "référence" : amont tous rejets étudiés.	
Pouxoux	402	Amont confluence Volo- gne. Aval point 51000 RNB [9]. Distance à 401 ≅ 12.5 km.	Aval Remiremont. Amont tous rejets étu- diés.	Aval proche station 1 Eloyes
Archettes	403	Aval confluence Vologne, amont Epinal. RNB :51000-53000 Distance à 402 ≅ 5.5 km.	Aval rejets étudiés 1 et 2.	Entre station 1 Eloyes et 2 Dinoze
Chavelot	404	Aval Epinal. RNB: 54100 Distance à 403 ≅ 15 km.	Aval proche rejets étu- diés 3,4	Chavelot
Igney	405	RNB54100-54500 Distance à 404 ≅ 6 kms.	Aval proche rejet étudié 5	Amont station 4 Bainville
Velle sur Mo- selle	406	RNB 56000 Distance à 405 ≅ 36 km.	Aval "récupération"	Velle sur Moselle

Tableau n°1 : Description des stations de prélèvement de poissons.

Sur ces stations trois espèces de poissons : chevaine (*Leuciscus cephalus*), barbeau (*Barbus barbus*) et hotu (*Chondrostoma nasus*), ont été retenues pour la mesure de l'activité EthoxyRésorufine-O-Dééthylase (EROD), activité enzymatique de détoxification à cytochrome P450 1 A1.

Cette activité enzymatique, considérée comme un biomarqueur de la contamination du poisson par des polluants du type hydrocarbures aromatiques^[10], PCBs coplanaires ou dioxines, est induite chez les organismes soumis à ces polluants.

L'induction de cette activité est en particulier signalée dans la bibliographie chez les poissons en présence de rejets d'effluents d'industries papetières^[11] ,12]. Compte tenu des

⁹Réseau National de Bassin

¹⁰ Goksoyr A and Forlin L. The cytochrome p450 system in fish, aquatic toxicology and Environmental monitoring. Aquatic toxicology, 22, p287-312, 1992.

¹¹ In Andersson T. Sublethal physiological effects of pulp and paper mill effluents on fish. A literature review. National Swedish Environmental Protection Board. REPORT 3366, 49 p, 1987.

caractéristiques de cet indicateur biochimique (alarme précoce de risque toxique, détection de polluants persistants et bioaccumulables) son utilisation pour la surveillance des **écosystèmes** aquatiques est proposée par différents auteurs ^[3]. Néanmoins peu d'informations sont disponibles concernant les interactions possibles et en particulier l'effet antagoniste **d'autres** polluants organiques ou métalliques sur ce système ^[13].

2.1.1 Rappel de la méthodologie

Dans la mesure du possible, 10 poissons de chaque espèce, mâles et femelles **sont** prélevés par pêche électrique. Les homogénats du foie prélevé sur chaque individu **sont** congelés et ramenés au laboratoire pour la mesure de l'activité enzymatique EROD par spectrofluorimétrie selon un protocole déjà décrit **[annexes]** ^[14].

Les résultats de l'activité mesurée pour chaque poisson sont exprimés en picomole de résorufine par milligramme de protéines et par minute.

2.1.7 Résultats

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus sur toutes les stations et s'affranchir des variations connues de la mesure de l'activité **EROD** en fonction du sexe, ces données sont transformées en taux d'induction.

Ce taux d'induction calculé pour chaque individu est égal à la valeur **d'EROD** pour cet individu divisée par la moyenne des activités EROD des individus de même sexe et de même espèce mesurées sur la station dite de référence.

Dans la mesure où il n'a pas été possible de trouver les 3 espèces étudiées sur la station 401, nous avons considéré la station 402 comme station de référence. Cette station est également amont de tous les rejets étudiés, et nous disposons de mesures d'activité EROD sur les 3 espèces. De plus les activités EROD des chevaines prélevés sur cette station sont comparables aux résultats obtenus sur la station 401.

Les tableaux suivants résumant pour chaque espèce les données EROD mesurées (moyenne, écart type) et les taux d'induction (moyenne, écart type) calculés pour chaque station.

¹² Andersson T., **Fortin** L., Hardig J. et A. Larsson. Physiological **disturbance** in flh living in **coastal** water **polluted** with bleached kraft pulp **mill** effluent. Can. J. Fish Aquat. Sci., 45, **p1525-1536**. 1988.

¹³ Gagne F. and C. Blaise. Hepathic metallothionein **level** and mixed **function** oxydase **activity** in fingerling rainbow **trout** after **acute exposure** to **pulp** and paper **mill effluents**. Wat. **Res.**, 27, 11, p 1169-1682 1993

¹⁴ Vindimian E., Namour P., Migeon B. and J. Garric. In **situ** pollution induced cytochrome **p450 activity** of freshwater fish. Aquat. Toxicol., 21, **p255-266**. 1991.

Barbeau						
	401	402	403	404	405	406
EROD pmol./mn/mg.prot	-	13.2 ± 17.7	11.7 ± 9.9	30.0 ± 27.0	a.9 ± 6.7	16.3 ± 21.3
Taux Induction	-	1.00 +0.9	1.2 +1.1	4.8 +4.2	0.8 +0.8	2.0 +3.1

Chevaine						
	401	402	403	404	405	406
EROD pmol./mn/mg.prot	9.5 ± 6.2	10.6 ± 9.6	29.1 ± 22.7	36.4 ± 17.6	207.4 ± 207.4	42.3 ± 58.8
Taux Induction	0.8 ± 0.5	1.0 ± 0.7	5.0 ± 5.2	4.1 + 3.1	20.5 + 43.2	4.5 + 4.4

Hotu						
	401	402	403	404	405	406
EROD pmol/mn/mg.prot.	-	13.8 ± 14.8	12.3 ± 10.5	37.6 ± 39.6	50.1 ± 34.2	77.1 ± 134.8
Taux Induction	-	1.0 ± 0.8	1.6 ± 1.5	4.0 ± 3.2	3.9 ± 1.9	18.0 ± 44.0

Tableau n° 2 : Résultats des mesures de l'activité EROD in situ.

Les valeurs d'activité EROD mesurée sur les stations amont sont du même ordre de grandeur ou plus faibles [15,16] que celles déjà observées sur ces mêmes espèces prélevées dans des stations dites "de référence", non soumises à des rejets directs de polluants susceptibles d'être inducteurs. Le choix de ces "références" paraît donc satisfaisant. De même les taux d'induction calculés sur les stations "polluées" présentent des valeurs et varient dans des rapports identiques à ceux déjà observés en aval de rejets industriels [14].

Les taux d'induction mesurés sont variables suivant les individus, avec des taux individuels pouvant être très élevés (jusqu'à 140 fois le taux de base) pour quelques femelles chevaine et hotu des stations les plus aval. Les résultats sont plus homogènes pour le barbeau, avec des taux d'induction n'excédant pas 12.

Cette variabilité individuelle élevée est conforme aux observations de terrain que nous avons pu déjà réaliser.

A partir des valeurs de taux d'induction calculées, les différentes stations sont comparées entre elles.

¹⁵ Erod pmol/min/mg protein moyenne, écart type sur Stations amont Durance
B. barbuis:18.0,22.5; L. Cephalus 20.6, 20.1; C.Nasus 37.5, 40.4.

¹⁶Monod G., Devaux A. and J.L. Rivière. Effect of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhône. Sci. Total Environ., 73, p189-201. 1988

Les données (brutes **et/ou** après transformation logarithmique) ne présentant pas un caractère de normalité, cette comparaison a été effectuée au moyen du test statistique non paramétrique de Mann Whitney (homologue au test t de comparaison de moyenne, permettant de comparer entre eux deux échantillons indépendants) calculé à l'aide du logiciel statistique NCSS [17].

Dans un premier temps nous avons tenu compte de l'ensemble des données disponibles, y compris des valeurs individuelles les plus élevées, mâles et femelles des trois espèces confondues.

Le tableau suivant présente les probabilités d'avoir affaire à deux échantillons identiques, station par station. Nous retiendrons comme stations statistiquement différentes de la station témoin celles pour lesquelles la valeur de p calculée est **<0.05** (en italique dans les tableaux suivants).

	402	403	404	405	406
401	0.78	0.1	0.00	0.03	0.03
402		0.07	0.00	<i>0.01</i>	<i>0.00</i>
403			<i>0.00</i>	<i>0.21</i>	<i>0.03</i>
404				0.21	0.30
405					0.74

Tableau n° 3 : Analyse de l'effet station sur le taux d'induction EROD.

A partir de ces résultats 2 groupes de stations sont nettement différenciées :

- le groupe des 2 stations amont des rejets étudiés, St Etienne les Remiremont et **Pouxoux**,
- le groupe des stations aval d'Epinal avec des activités EROD significativement plus élevées que celles des stations les plus amont.

Enfin la station 403 (Archettes), la plus proche **aval** Vologne pour laquelle les réponses obtenues sont variables suivant l'espèce étudiée. Seule la mesure de l'activité EROD sur l'espèce Chevine met en évidence une induction significativement différente de celle mesurée sur les poissons prélevés sur les stations amont. Mesurées sur les **hotus** ou les barbeaux les activités EROD ne sont pas différentes de celles des poissons de la station 402.

Afin de mettre en évidence d'éventuelles réponses spécifiques, le même traitement a été réalisé pour chacune des espèces pêchées.

Les résultats sont reportés dans les tableaux suivants :

Barbeau

	403	404	405	406
402	0.87	0.02	0.46	0.37
403		0.02	0.33	0.88
404			<i>0.01</i>	0.08
405				0.15

Tableau n° 4a : Analyse par espèce de l'effet station sur le taux d'induction EROD.

Nous ne disposons pas d'informations sur la station 401 pour cette espèce, absente de la zone de pêche. Seule la station 404, aval d'Epinal, se différencie significativement des autres stations en particulier de la zone amont d'Epinal. Les taux d'induction mesurés sur les autres stations ne sont pas différents entre eux, et en particulier des valeurs de "références".

Chevaine

	402	403	404	405	406
401	0.65	0.04	0.00	0.01	0.00
402		0.04	0.00	0.01	0.00
403			0.82	0.55	0.76
404				0.50	0.94
405					0.65

Tableau n° 4b : Analyse par espèce de l'effet station sur le taux d'induction EROD.

Les taux d'induction observés sur cette espèce sont en moyenne plus élevés que ceux mesurés sur le barbeau ou le hotu. Cette observation avait déjà pu être soulignée lors de travaux précédents [14]. Ils permettent de discriminer un groupe de stations amont de la Vologne (401, 402) où les individus présentent une induction significativement plus faible que dans toutes les autres zones échantillonnées, et un groupe de stations aval Vologne où les réponses sont significativement plus élevées.

Hotu

	403	404	405	406
402	0.43	0.00	0.00	0.00
403		0.00	0.01	0.03
404			0.65	0.6
405				0.94

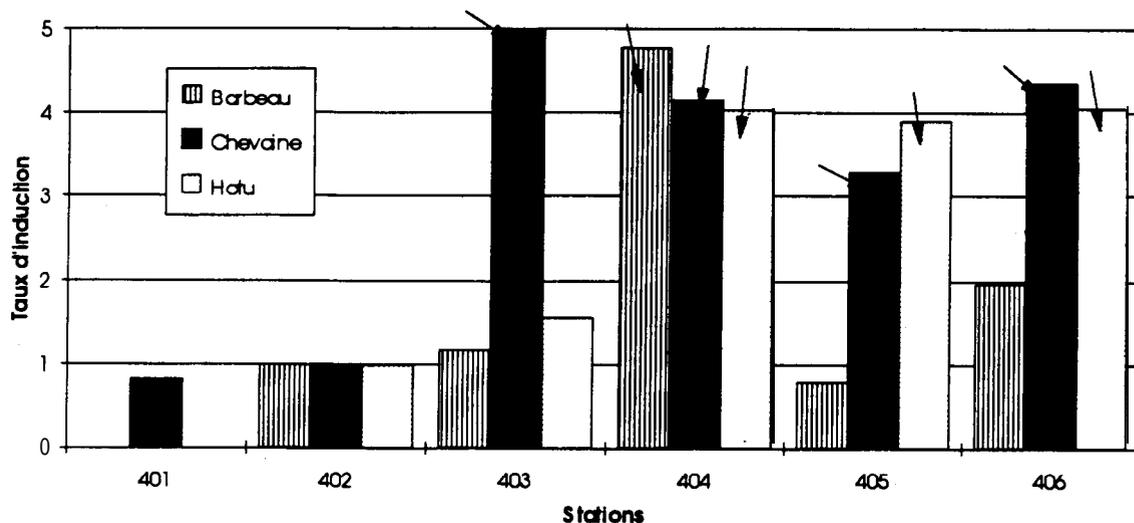
Tableau n° 4c : Analyse par espèce de l'effet station sur le taux d'induction EROD.

Calculés à partir des données EROD sur cette espèce, les taux d'induction obtenus se différencient significativement selon deux groupes de stations, un groupe de stations en aval d'Epinal plus induites et un groupe amont comprenant ici les zones amont et aval Vologne que l'on ne peut discriminer (la station 401 n'est pas représentée ici, du fait de l'absence de cette espèce).

Afin de vérifier que les résultats les plus extrêmes mesurés sur quelques individus n'entraînaient pas de biais, les mêmes traitements ont été effectués, en écartant les valeurs les plus élevées (taux d'induction >40, 3 données écartées), difficiles à expliquer. Dans ce cas les probabilités d'avoir des échantillons identiques varient de façon insignifiante dans 4 cas, ce qui ne modifie pas les conclusions précédentes.

Le profil des variations du taux d'induction moyen, en ne tenant compte que des résultats homogènes (taux d'induction <40), mesuré par espèce sur le linéaire est illustré dans le graphique suivant.

Variations de l'Induction EROD sur les stations étudiées



Giraphique n° 1 Taux d'induction par station et par espèce.

Les flèches signalent les **réponses** significativement **différentes** de la station **témoïn** (402)

Ces graphiques mettent en évidence :

Les flèches signalent les réponses significativement différentes de la station

- des variations par espèce du taux d'induction de l'activité EROD selon les stations,
- 2 zones de stations, plus ou moins discriminées suivant les espèces, une zone amont Vologne et une zone aval, avec une situation **particulièrement** marquée, quelle que soit l'espèce considérée, en aval proche d'Epinal (404) et de deux des rejets d'effluents étudiés (n° 3 et 4).

• une situation toujours "inductrice" même sur la station la plus aval (406) à une trentaine de kilomètres du dernier rejet étudié, alors même que les informations disponibles ne laissent pas supposer de rejets industriels importants proches de ce secteur.

3.3 Bioessais sur effluents

Conjointement aux études de terrain, des essais de toxicité ont été menés sur 4 effluents industriels et 1 effluent urbain déversés dans le secteur étudié (cf. carte et tableau n°1), entre le 10 mars et le 30 juin 1993.

4 bioessais ont été mis en oeuvre afin d'évaluer la toxicité intrinsèque des rejets :

- un essai de toxicité létale jusqu'à 48h sur *Daphnia magna*,
- un essai de toxicité chronique reproduction sur *Ceriodaphnia dubia*,
- un essai de survie et croissance **embryolarvaire** sur *Brachydanio rerio*
- un essai d'induction d'activité EROD sur truitelles arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss*).

2.2.1 Méthodologie

Les échantillons moyen 24h sont livrés au laboratoire quelques heures après prélèvement (<12h) où ils sont immédiatement homogénéisés et répartis en récipients plastiques avant conservation au froid :

- T° < 7°C pour les essais d'induction (durée 96h)
- T < -18°C pour les essais de toxicité **sublétale**.

Aucun pré-traitement particulier n'est effectué avant les essais, hormis une aération des solutions d'essais pour la mesure d'induction EROD, afin d'assurer une oxygénation suffisante. Dans les autres essais la dilution effectuée suffit à la réoxygénation des solutions.

Simultanément un essai de toxicité létale sur daphnie est mis en oeuvre, et une fraction de l'effluent réservée pour analyses chimiques.

Les 3 essais sont ensuite réalisés suivant les protocoles décrits en annexe avec un renouvellement quotidien des concentrations d'essai, après remise à température d'essai.

Les résultats de toxicité létale 24h sur daphnie ont permis d'établir la gamme de concentrations pour les essais sublétaux.

2.2.2 Traitements des données

Lorsque cela était possible les données ont été traitées afin de calculer la plus faible concentration d'essai provoquant un effet statistiquement significatif (LOEC : Lowest Observed Effect Concentration) et la concentration sans effet observable correspondante (NOEC : No Observed Effect Concentration).

Ces concentrations significatives LOEC et NOEC sont déterminées par comparaison des différents lots en utilisant des test statistiques paramétriques ou non paramétriques suivant les cas. Pour ce faire nous avons suivi les procédures décrites par l'US EPA (1 989)^[18] pour les essais sur Cériodaphnie et ELS en particulier. Les tests statistiques nécessaires à la détermination des LOEC et NOEC ont été réalisés à l'aide du logiciel Toxstat ^[19].

Par ailleurs, les paramètres statistiques décrits plus haut ont été complétés d'une modélisation des données par simulation itérative qui permet la détermination d'ICp (pourcentage d'effluent entraînant une inhibition de p% par rapport au témoin) par différentes méthodes : interpolation linéaire, régression linéaire ou régression non-linéaire. Ces méthodes nous ont permis, lorsque le jeu de données était suffisant, de calculer les concentrations inhibitrices de 10 et 50% du critère étudié (CI10, CI50) pour les essais cériodaphnie et ELS.

2.2.3 Tvoe d'eff luents étudiés.

5 effluents ont été étudiés dont 3 effluents d'industries en liaison avec la fabrication ou le traitement du papier (Mosl sur la Vologne, Mos2 et Mos4 sur la Moselle). Les procédés industriels mis en oeuvre ne comprennent pas de blanchiment au chlore, phase connue pour produire des hydrocarbures chlorés et autres sous-produits chlorés induisant des toxicités létales et sublétales importantes ainsi que des composés inducteurs des activités monooxygénases à cytochrome P450.

Les informations disponibles sur ces rejets sont résumées dans le tableau n°5.

Deux des effluents étudiés (Mos2 et Mos5) sont issus d'industries citées comme utilisant des substances colorantes. Nombreuses de ces substances sont des composés à base de substances de type azobentène, benzidine, susceptibles d'être cancérigènes et /ou mutagènes.

Les valeurs de débit moyen (Qeff) des effluents rejetés sont ponctuelles, et n'ont pour objectif que de donner un ordre de grandeur du rejet par rapport au milieu récepteur. A partir de cette valeur et des données de débit moyen sur 20 ans (Qm20) ou à l'étiage (Qe), il est possible de calculer un taux de dilution (Qm20/ Qeff ou Qe/Qeff) et une concentration théorique des eff luents dans le milieu (1 00xQeff/Qm20).

¹⁸U.S. E.P.A. Short term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms. 2nd Ed. EPA/600/4-89/001, mars 1989.

¹⁹ version 3.0 (Gulley D.D., Boelter A.M., Bergman H.L. 1989), gracieusement fourni par T. Norberg-King (US. EPA Duluth)

Nom	Type	Informations disponibles.	Epuraton	Débit moyen (Q _{eff.})	Taux dilut. Conc %	
					a	(v/v) b
(Mos1)	Papeterie	Pas de blanchiment au chlore	Pas de traitement	8 5 m ³ /h (Vologne)	1400 0.07	212 0.48
(Mos2)	Papeterie	Pas de blanchiment au chlore. Utilisation de colorants	Epuraton primaire	490m ³ /h	240 0.41	37 2.72
(Mos4)	Production de pâte à papier	Pas de blanchiment au chlore	Epuraton primaire et secondaire (boues activées)	311m ³ /h	382 0.26	60 1.72
(Mos3)	Station épuration urbaine	Fonctionnement en limite de possibilités. Rejet en limite de norme		715m ³ /h	166 0.60	25 3.98
(Mos5)	Textile	Utilisation de colorants	Décantation	118m ³ /h	1000 0.11	150 0.70

Tableau n°5. Quelques caractéristiques des effluents étudiés.

a: taux de dilution et concentrations théoriques d'effluent (%) calculées à partir du module inter- annuel sur 20 ans (Q_{m20}=118800m³/h) de la Moselle à Archettes.

b: taux de dilution et concentrations théoriques (%) d'effluents calculées à partir du débit d'étiage mensuel de fréquence 1/5 (an) (Q_e =18000 m³/h) de la Moselle à Archettes.

7.7.4 Données physico-chimiques

Dès l'arrivée des échantillons divers paramètres physico-chimiques ont été mesurés (laboratoire de chimie. CEMAGREF). Les résultats sont présentés ci-dessous.

Paramètres Conc. mg/l	Mos1	Mos2	Mos3	Mos4	Mos5
Aspect	Blanchâtre	Blanchâtre	jaunâtre	trouble orangé	violet
pH	6.6	6.7	7.6	7.7	12.3
O ₂	5.9	10.5	8.6	6.7	3.1
Conductivité	330	270	650	2090	3350
MES	86	18	10	8	35
DCO	480	85	55	310	1140
HCO ₃ ⁻	-	35	285	620	nd ₁
Cl ⁻	41	23	55	290	15
SO ₄ ⁻	32	73	62	378	67
NO ₂ ⁻	0.53	0.23	0.03	0.10	nd ₁
NO ₃ ⁻	8.2	6.8	<0.4	<0.4	nd ₁
PO ₄ ⁻⁻	0.15	0.06	33.7	8.0	nd ₁
NH ₄ ⁺	3.6	0.02	32.6	0.10	9.7

Tableau n° 6. Physico-chimie des effluents. (ndl : non déterminé, impossible)

Les effluents Mos4 et-5 se distinguent par des DCO particulièrement élevées. L'effluent 5 du fait de son pH élevé et de sa coloration n'a pas permis la détermination de certains paramètres. L'effluent 3 présente une concentration élevée en azote ammoniacal, correspondant à une proportion d'ammoniac non dissocié, toxique, d'environ 1%, ~0.3mg/l NH₃ , (20°C). De telles concentrations sont susceptibles d'entraîner des effets sublétaux et létaux sur les organismes aquatiques (poissons en particulier).

2.2.5 Résultats des essais de toxicité

2.2.5.1 Toxicité létale aiguë.

Les CI 50 24 et 48h sur *D. magna* et *Ceriodaphnia dubia* et leur évolution au cours du temps de conservation pour Mos1 et 2, mesurées à partir des CI50 ceriodaphnia, sont présentées dans le tableau n°7.

On remarquera que les 2 effluents suivis dans le temps montrent une diminution de leur toxicité aiguë, mais qui apparaît comme peu importante (CI 50 dans un rapport <2 en 10 jours), à non significative si l'on considère les intervalles de confiance des CI calculées.

Effluent	Daphnia magna		Ceriodaphnia
	CI50 24h ^a	CI50 48h ^a	CI50 24h ^a
Mos1 t ^d = 0 t = 2 t = 9 t = 13	55 (40-90) ^b	15 (5-24)	40 (23-68)
			45 (30-69)
			56 (40-80)
			75 (61-92)
Mos2 t = 0 t = 6 t = 8 t = 20	62 (37-100)	50 (26-91)	59 (44-77)
			72 (54-97)
			79 (66-94)
			92 (nc) ^c
Mos3	NT		-
Mos4	NT	-	-
Mos5	12 (11.9-12.1)	6 (6-6.5)	-

Tableau n° 7. Toxicité létale aiguë des effluents vis à vis de *D. magna* et *C. dubia*

a concentration exprimée en pourcentage d'effluent

b intervalle de confiance

c non calculable

d durée de conservation en jour

NT non toxique

2.2.5.2 Toxicité létale et sublétales à moyen terme

Les informations concernant cette toxicité de type chronique sont issues des résultats des essais de reproduction sur la ceriodaphnie et de survie des embryons et larves de *Brachydanio rerio*.

L'essai ceriodaphnie est basé sur le suivi de 'la reproduction parthénogénétique de 10 individus par concentration en 7 jours d'essai. Les résultats sont exprimés en nombre de jeunes viables nés par mère en 7 jours.

L'essai ELS est basé sur le suivi de la mortalité d'embryons et de larves de danios (30 individus par concentration, 3 réplicats) au cours des 10 jours d'essai. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'éclosion embryonnaire ou de survie larvaire.

Tous les essais ont été réalisés de manière satisfaisante, en particulier les critères de validité chez les témoins ont été respectés [18].

Les gammes de concentrations d'essai (en pourcentage d'effluent dans la solution d'essai) ont varié suivant les effluents et les essais mis en oeuvre en fonction de la toxicité aiguë initiale mesurée :

- Ceriodaphnie :

0.5, 1.2, 2.7, **6.1(Mos5)**

1.1, 2.3, 4.8, **10, 20.8(Mos1, Mos2)**

20.8, 30, 43.3, 62.4, 90 (Mos3, Mos4). Pour l'effluent **Mos3**, 70% des organismes sont morts en 3 jours à 62.4%.

- ELS Brachydanio

1.1, 2.3, 4.8, **10.0, 20.8 (Mos1, Mos2)**

14.8, 20.8, 30.0, 43.3, 62.4, 90 (**Mos3, Mos4**)

0.5, 1.2, 2.7, 6.1, 14.0 (**Mos5**)

Le tableau n°8 résume les paramètres de toxicité qu'il a été possible de calculer pour chacun des essais.

	Mos1	Mos2	MOS3	MOS4	Mos5
Reproduction C. dubia					
LOEC	2.3	2.3		20.8	1.2
NOEC	1.1	1.1	43.3		0.5
CI10	1.2 (0.5-1.5)	1.3 (1.1-1.4)	-	-	
CI50	7.1 (2.1-14.5)	3.6 (2.9-4.3)	-	22.3 (16.8-28.7)	2.6 (1-7.4)

Survie embryolarvaire B.terio					
LOEC	10.0	>20.8	62.4	>90	6.1
NOEC	4.8	-	43.3	-	2.7
CI10	5.8 (5.1-6.8)	-	42.8 (18-60)	-	3.0 (2.6-3.2)
CI50	10.6 (9.0-13.0)	-	59 (45-68)		4.7 (4.5-5.0)

Tableau n°8. Résultats de toxicité sur les effluents. (Concentrations exprimées en % d'effluent)

Le choix des gammes d'essai n'a pas été pertinent pour 2 des effluents testés:

- **Mos3** où il n'a pas été possible de mettre en évidence d'effet subléthal sur la reproduction des céridaphnies. Seul un effet léthal aux deux plus fortes concentrations a été observé dès le 3ème jour du test.

- **Mos2** pour lequel aucun effet embryolarvaire n'a été obtenu sur la gamme testée.

Enfin aucun effet toxique n'a été observé vis à vis de l'essai ELS, même à la concentration d'essai la plus élevée de l'effluent **Mos4** (90%).

2.2.5.3 Induction de l'activité enzymatique monooxygénase à Cyt P450 EROD.

La mesure d'induction de l'activité enzymatique EROD est effectuée sur des prélèvements de foie réalisé sur des poissons exposés durant 96h à différentes concentrations d'effluent, suivant le protocole de dosage déjà cité. Seuls les poissons vivants en fin d'essai sont analysés. Les résultats sont présentés sous deux formes :

- en activité enzymatique exprimée en picomoles de résorufine par minute et par milligramme de protéines (**pmol./min/mg prot.**)

- en taux d'induction de l'activité EROD, calculé par rapport à l'activité moyenne des poissons témoins.

Lors de ces essais un lot "témoin positif" est également suivi, après une injection intrapéritonéale d'un inducteur puissant du **CytP4501A1**, la **βNaphthoflavone** à raison de **20mg/kg** environ. Ce suivi a permis de s'assurer de la qualité du lot de poissons utilisé.

Les gammes de concentration d'effluent utilisées sont les suivantes :

-10, 20.8, 43.3, 90.0 (**Mos1, Mos2**). Pour l'effluent **Mos2**, on a observé 70% de mortalité en 72h à la concentration d'essai la plus élevée (90%). La mesure de l'activité EROD a du être effectuée après 72h d'exposition sur les truitelles restantes à cette concentration.

-20.8, 30.0, 43.3, 62.4 (**Mos3**). A 62.4% on note également 90% de mortalité des organismes.

-30.0, 43.3, 62.4, 90.0 (**Mos4**)

-0.5, 1.1, 2.3, 4.9 (**Mos5**).

Les résultats EROD et taux d'induction, moyenne et écart type obtenus par concentration sur chaque effluent sont présentés ci-dessous.

Conc. % effluent	Mos1 Erod Taux induc.	Mos2 Erod Taux induc.	Mos3 Erod Taux induc.	Mos4 Erod Taux induc.	Conc. % effluent	Mos5 Erod Taux induc.
0	5.0 (± 2.0) 1	6.2 (± 1.4) 1	2.4 (± 2.0) 1	3.2 (± 1.3) 1	0	2.3 (± 0.9) 1
10	4.1 (± 3.7) 0.8 (± 0.7)	7.1 (lt3.1) 1.1 (± 0.5)			0.5	5.7 (± 3.5)* 5.3 (± 3.1)
20.8	7.2 (± 4.2) 1.4 (± 0.8)	9.1 (± 2.3)* 1.5 (± 0.4)	4.1 (± 4.0)* 1.7 (± 0.6)		1.1	7.1 (± 8.10)* 6.6 (± 7.2)
30.0			6.5 (± 6.5)* 2.7 (± 1.9)	17.2 (± 14.3)* 4.5 (± 4.2)	2.3	14.1 (± 14.7)' 13.1 k(2.9)
43.3	3.2 (± 2.6) . 0.6 (± 0.5)	5.5 (± 2.2) 0.9 (± 0.3)	4.5 (± 3.7)* 1.9 (± 1.5)	9.1 (± 5.8)* 2.8 (± 1.7)	4.9	20.5 k(13.3)' 19.1 (± 11.7)
62.4				31.5 k(21.6)' 9.7 (± 6.3)		
90.0	10.1 (15.4) . 0.5 (± 0.1)	5.2 (± 1.8) 0.8 (± 0.2)		38.4 (± 21.3)* 11.9 (± 6.2)		
βNF EROD	464.7 (± 162.5)	432.0 (± 121.1)	481.2 (± 94.5)	365.4 k(252.6)	βNF	401.8 (± 107.9)

Tableau n°9. Mesure de l'activité enzymatique EROD (pmol/min/mg prot.) et taux d'induction correspondant obtenus sur les 5 effluents testés.

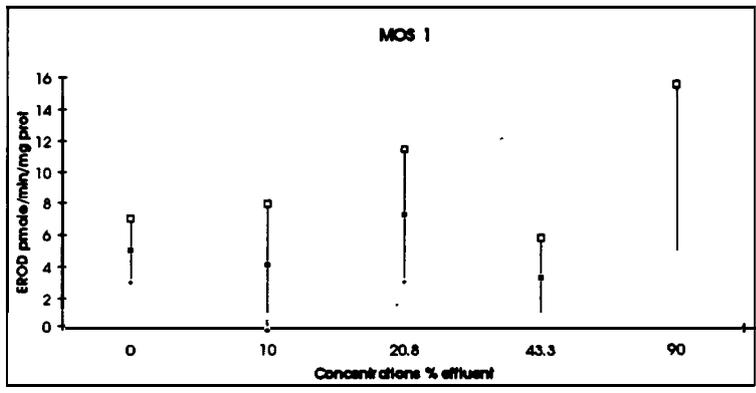
* Activité significativement différente des témoins (p<0.05)

L'examen du tableau montre que les activités **basales** de tous les lots de truites témoins sont du même ordre de grandeur; l'analyse statistique des activités EROD des poissons, obtenues après injection à la **β-naphtoflavone** a permis de s'assurer qu'il n'y avait pas non plus de différence significative d'induction entre les lots.

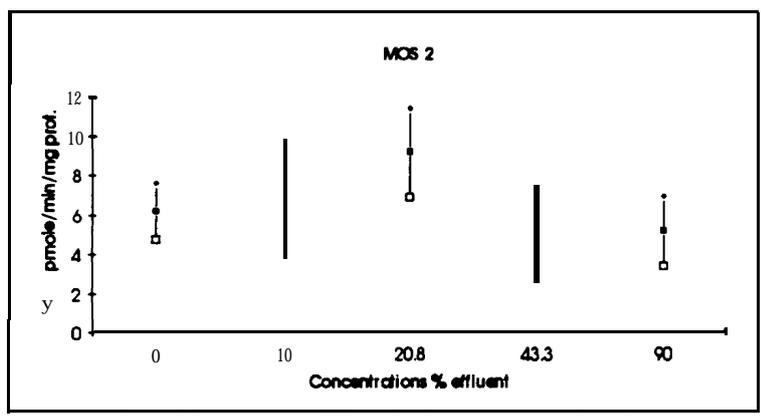
Sur les graphiques **2a à 2e** nous avons reporté la variation de l'activité EROD moyenne, mesurée lors des essais sur chacun des effluents.

Hormis pour l'effluent **n°5**, on n'observe pas de relation dose-effet systématique sur les effluents testés, l'effluent **Mos1** à 43.3% induisant plutôt une inhibition de l'**activité** enzymatique.

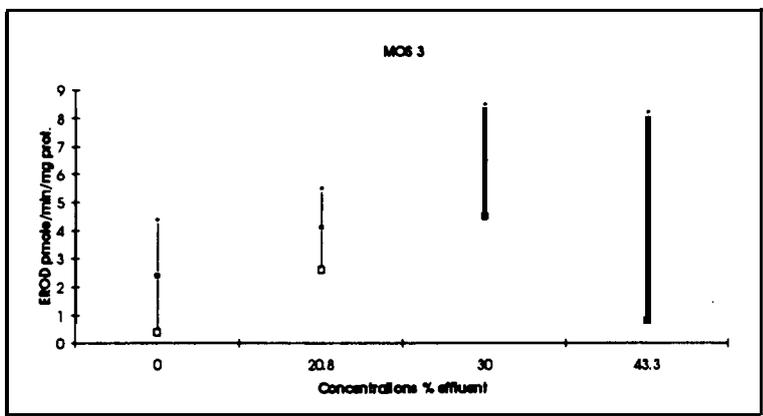
Néanmoins tous les effluents **analysés ont montré, à** des concentrations variables, un effet inducteur après une période d'exposition de 4 jours, avec une mention particulière pour l'effluent de teinturerie qui provoque une induction élevée dès la plus faible concentration d'essai (0.5%).



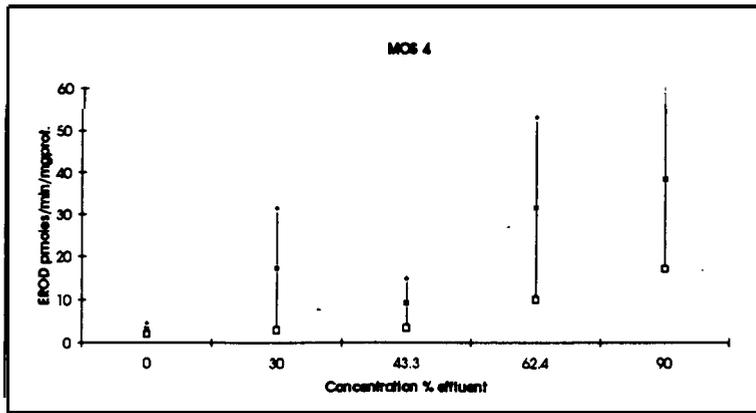
Graphique 2a. Effet inducteur de MOS1



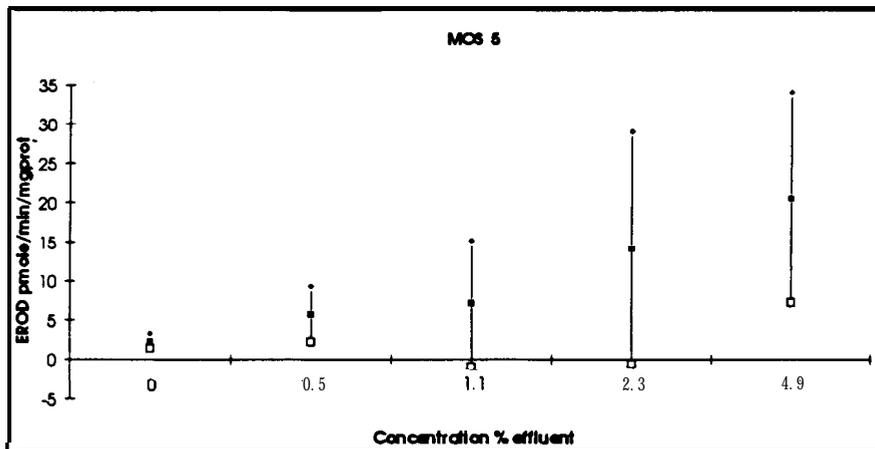
Graphique 2b. Effet inducteur de MOS2



Graphique 2c. Effet inducteur de MOS3



Graphique 2d. Effet inducteur de MOS4



Graphique 2e. Effet inducteur de MOS5

III Discussion

3.1 Ecotoxicité intrinsèque des effluents

Nous disposons d'un ensemble d'informations qui décrivent les relations doses-effet des différents effluents étudiés, sur des critères de mortalité à court et moyen terme, et des critères de subléthalité.

Ces données permettent de classer les effluents entre eux par rapport à leur potentialité toxique. Dans le tableau suivant nous avons résumé les paramètres de toxicité, CI50 et LOEC qu'il a été possible de mesurer sur les différents échantillons.

Les valeurs des taux d'induction calculés à partir des activités EROD significativement supérieures aux activités des lots témoins sont également reportées, pour la première concentration d'effluent testé induisant cet effet significatif.

Conc. % effluent	Mos1 Papeterie	Mos2 Papeterie	Mos3 Station d'épuration	Mos4 Pâte à papier	Mos5 Textile
CI50 24h Daphnie	55	62	NT	NT	12
CI50 reprod.Ceriodaph.	7	4	nd	22	3
LOEC reprod.Ceriodaph.	2	2	90<, >43	21	1
CI50 ELS	11	nd	59	nd	6
LOEC ELS	10	>21	62	>90	5
UT ^c	43.5	43.5	1.6	4.8	83.3
CI5024h/CI50 reprod.	8	16	>1	>4.5	4
CI5024h/LOEC	28	31	>1.6 ^a	>4.5	12
Taux induction ^c	2.0	1.5	1.7	4.5	5.3

Tableau n° 10. Paramètres de toxicité des effluents.

^a CI5024h/LOEC ELS^b Unité Toxique (100/LOEC)^c Ind. Eff

NT non toxique

nd non déterminé

Concernant les données de toxicité, ce tableau met en évidence :

- la plus grande sensibilité de l'essai cériodaphnie par rapport à l'essai ELS vis à vis de ce type d'effluent, pour apprécier une toxicité sublétales à moyen terme. Une telle tendance à une toxicité spécifique en fonction des différents types d'effluents a déjà été signalée [2,20]. Cette remarque milite pour la mise en oeuvre d'une batterie d'essais, en particulier lorsque l'on réalise pour la première fois une évaluation de la toxicité d'un effluent. Dans un second temps, le choix de l'essai le plus sensible pourra alors être plus sûrement proposé.

- la différence importante entre les concentrations toxiques aiguës 24h et les concentrations toxiques à moyen terme.

Les rapports des CI 50 **aiguë/chronique** pour l'essai ceriodaphnie (le plus sensible) varient de 16 à 4 pour **Mos2** et **Mos5** respectivement. Si l'on considère les mêmes rapports, mais calculés à partir de la LOEC (qui provoque dans le cas des effluents étudiés toujours plus de 10% d'effet sur le critère mesuré, voir tableau n°7), on observe des concentrations toxiques à moyen terme, affectant les populations, jusqu'à 30 fois plus faibles que les concentrations induisant des seules mortalités aiguës. Ce résultat met en évidence l'extrême importance de la mesure de la toxicité chronique dans un objectif de protection du milieu récepteur. Cette remarque est encore renforcée par le "comportement" toxique de certains effluents. En effet, les rapports de concentrations toxiques (aiguë/chronique) les plus élevés sont obtenus pour des effluents présentant, justement, les toxicités aiguës faibles.

- la présence d'une toxicité chronique "résiduelle" à la sortie de station d'épuration urbaine.

- enfin la comparaison, même prudente, des plus faibles concentrations toxiques de ces effluents mesurées en laboratoire (LOEC reprod. ou survie ELS) et des concentrations d'effluents théoriques susceptibles d'être présentes dans le milieu récepteur, montre (tableau n°1) que ces valeurs sont dangereusement proches pour certains d'entre eux, d'un facteur -10 en période normale, et quasiment égales en débits d'étiage de fréquence 1/5 an (effluents 2 et 5 en particulier), ou dans un rapport <10 (**Mos1** et **Mos4**).

Effluent	LOEC ^a	Conc. milieu ^a . théorique. Pour un Q moyen sur 20 ans	Conc. milieu ^a . théorique. Pour un Q étiage mensuel de fréquence 1/5 ans
Mos1	2.3	0.07	0.48
Mos2	2.3	0.41	2.72
Mos3	62.4	0.26	1.72
Mos4	20.8	0.60	4.00
Mos5	1.2	0.11	0.70

Tableau n° 11. Risques d'impact toxique in situ des effluents analysés.

^a Concentration en % d'effluent dans le milieu (V/V)

3.2 Evaluation de la présence d'inducteurs

Tous les effluents testés ont induit une réponse significative de l'activité enzymatique EROD après 96h d'exposition (cf. tableau n°9). Ce résultat permet de confirmer le choix de cette durée d'expérimentation (durée des essais de toxicité létale), suffisante en exposition de contact pour permettre la mise en évidence d'inductions significatives en laboratoire. Des inductions après de courte durée d'exposition ont également été observées avec des poissons traités à la β -Naphthoflavone, pour lesquels une induction significative de l'activité EROD est mesurée après 24h [21], ou avec des poissons directement exposés à différentes concentrations d'effluents d'industries papetières[13]. Néanmoins les intensités et les profils de réponse sont différents suivant les effluents considérés. En particulier, on n'observe pas de relation dose-effet simple (ce qui ne permet pas d'établir de LOEC et NOEC) hormis pour les deux effluents induisant les activités EROD les plus élevées, Mos5 et Mos4. Malgré pour ce dernier une diminution de la réponse à 43.3% d'effluent, mais qui n'est pas significativement différente de la mesure à 30%.

Pour ces effluents on constate des taux d'induction particulièrement élevés pour des concentrations très faibles d'exposition, similaires aux inductions obtenues en laboratoire avec des effluents d'industries de pâte à papier susceptibles de contenir des inducteurs puissants [13, 22]. Pour l'effluent Mos5, une hypothèse à confirmer de l'origine de cette induction, pourrait être en partie la présence dans le rejet de molécules colorantes, de structure proche de substances telles que le 3,3',4,4' tétra chlore-azobenzènes (polychloro-azobenzène). Ces substances qui contaminent des préparations commerciales d'herbicides dérivés de la 3,4 dichloroaniline ont été décrites comme inductrices des P450 IA du rat [23].

Dans les autres cas, les taux d'induction sont moins élevés et les profils très variables, avec en particulier des diminutions de l'induction aux concentrations les plus élevées. De tels phénomènes d'antagonismes et/ou d'inhibition de l'activité EROD par des métaux lourds, des concentrations élevées d'inducteurs (tel le 3,3',4,4' TCB) ou des acides résiniques ont été signalés par de nombreux auteurs [24, 25, 26].

²¹P.J. Kloepper-Sams and J.J. Stegeman. The temporal relationships between P450 protein content, catalytic activity and mRNA levels in the teleost *Fundulus heteroclitus* following treatment with β -Naphthoflavone. Arch. Biochem. Biophys., 288, p525-535. 1989.

²²E. Mather-Mihaich and R.T. Di Giulio. Oxidant-mixed function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached Kraft mill effluent. Arch. Envir. Contam. Toxicol., 20, p 391-397. 1991.

²³Bunce N.J., Choong D.K.M., Landers J.P. and T.R. Zacharewski. Competitive binding of chlorinated azobenzenes to the Ah receptor protein, Environ. Toxicol. Chem., 8, p25-30. 1989

²⁴L.C. Förlin, C. Haux, L. Karlsson-Norrgrén, P. Run and A. Larsson. Biotransformation enzyme activities and histopathology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) treated with cadmium. Aquat. Toxicol. 8, p51-64. 1986

²⁵E. Monosson and J.J. Stegeman. Cytochrome P450 E (P4501A) induction and inhibition in winter flounder by 3,3',4,4' tetrachlorobiphenyl: comparison of response in fish from Geirges Bank and Narragansett Bay. Environ. Toxicol. Chem., 10, p765-774. 1991.

. . Ces mêmes variations d'activité EROD ont été **déjà observées**^[13], lors d'expositions de truites arc-en ciel dans des conditions semblables à nos expérimentations, à des effluents contenant des contaminants organiques et inorganiques. De tels mélanges peuvent expliquer des phénomènes d'interactions complexes, variables aux concentrations étudiées. Les mêmes auteurs suggèrent, à partir de leurs résultats que diverses espèces chimiques peuvent interagir dans leur expression sur des réponses d'induction ou de dépression de phénomènes biochimiques spécifiques telle l'induction d'activité monooxygénase EROD ou la synthèse des métallothionéines. Nos résultats soulignent également la nécessité de mettre en oeuvre des recherches sur la compréhension de ces phénomènes d'interaction, si l'on souhaite disposer d'un diagnostic sûr, concernant la présence de contaminants inducteurs biodisponibles dans les rejets et les milieux récepteurs au moyen d'analyses biochimiques de ce type.

Quoi qu'il en soit il est possible de proposer un classement de ces effluents, mais sans tenir compte des concentrations d'essai, dans la mesure où nous n'avons pas dans tous les cas de relations simples entre concentration d'effluent et activité EROD mesurée. Pour ce faire, nous considérons les taux d'induction observés pour la première concentration d'effluent testé induisant une augmentation significative de l'activité EROD par rapport au témoin. Cette valeur, bien que choisie de manière arbitraire, nous paraît cependant représentative du risque associé à ces rejets, de dissémination dans le milieu de substances inductrices plus ou moins puissantes ou en concentrations les plus élevées.

3.3 Relations EROD/toxicité

La comparaison des rapports concentrations toxiques **aiguës/concentrations** toxiques à moyen terme et des concentrations significativement inductrices mesurées pour les mêmes effluents montrent qu'il n'y a pas de corrélation entre ces deux informations. Ainsi sur les 5 effluents étudiés, Mos1 et **Mos2** qui se signalent par les ratios de toxicité les plus élevés ne présentent pas, à concentrations d'exposition égales, des taux d'induction particulièrement élevés; et inversement pour **Mos4**.

Un rapport élevé permet de suspecter la présence de substances pas ou peu toxiques en exposition à court terme, mais susceptibles d'entraîner à des concentrations beaucoup plus faibles, des effets à plus long terme dans le milieu, comme cela peut-être le cas avec des xénobiotiques bioaccumulables, plus ou moins métabolisés tels que des substances inductrices type **PCBs** et **PAHs**. Néanmoins, il apparaît que les mesures de toxicité à moyen terme sensu stricto mises en oeuvre, reproduction, survie larvaire, ne suffisent pas pour rendre compte de la présence de ces xénobiotiques inducteurs.

Enfin, il est intéressant de remarquer que ces profils toxiques différents, mais qui soulignent également le fait qu'il ne semble pas exister de corrélation entre la toxicité létale ou sublétale et la présence d'inducteurs, sont pourtant ceux de trois effluents issus d'industries, que nous ne différencions ici (en l'absence de toute connaissance plus fine des **process** mis en oeuvre) que par la présence ou non d'une épuration biologique. Le cas de **Mos5** est plus particulier, puisque sont associées simultanément une toxicité chronique élevée et une forte activité inductrice. Ce résultat renforce l'hypothèse de la présence de substances ou de complexes inducteurs tout à fait spécifiques, en relation avec les process industriels mis en oeuvre, de nature différente de ceux présents dans les effluents d'industries papetières (**Mos1** et **Mos2**) et de pâte à papier (**Mos4**) étudiés.

²⁶ K.J. Lehtinen, A. Kierkegaard, E. **Jakobsson**, and A. **Wändell**. Physiological **effects** in fish exposed to effluents from **mills** with six different bleaching processes. *Ecotoxic. Environ. Saf.*, 19, **p33-46**.

En conclusion, l'information sur l'impact de ces effluents vis à vis de l'écosystème récepteur, apportée par ces différentes méthodes d'analyses biologiques ne sont pas redondantes. Elles ne concernent pas nécessairement le même type de molécule, non plus que le même type de risque toxique.

3.4 Propositions de classement écotoxique des effluents

Nous disposons de plusieurs informations en terme de concentrations d'effluents concernant:

- la toxicité proprement dite (en particulier toxicité sublétales ou à moyen terme),
- une réponse biologique "d'adaptation" à une contamination chimique (sans préjuger des conséquences "toxiques à long terme" potentielles),
- le taux de dilution dans le milieu que l'on peut traduire en terme de risque d'exposition pour le milieu à une concentration toxique donnée .

Ces données (tableau 12) permettent de classer les effluents entre eux (dans un ordre d'effet décroissant) pour chacun des paramètres considérés. Il ne s'agit bien entendu que d'un classement relatif des effluents les uns par rapport aux autres, éventuellement utile dans une optique de définition de priorité d'action.

	Mos1	Mos2	Mos3	Mos4	Mos5
Tox aiguë	2	3	4.5	4.5	1
Tox Chronique	2.5	2.5	5	4	1
Induction	3	5	4	2	1
Exposition milieu	4	1	5	3	2

Tableau n° 12. Classement des effluents.

Ces valeurs font ressortir sans ambiguïté deux extrêmes : d'une part l'effluent **Mos3** (station d'épuration urbaine) qui présentent un danger et un risque minima, et l'effluent **Mos5** qui à l'opposé se révèle le plus dangereux et fait courir un risque maximum au milieu.

Le jugement vis à vis des effluents **Mos2**, 3 et 4 dépendra de l'information prise en compte. L'effluent **Mos4** se signale en particulier du fait de ses potentialités inductrices, tandis que les effluents **Mos1** et **Mos2** en particulier, du fait de son classement exposition, présentent des risques certains d'effets toxiques *in situ* .

Cette proposition doit néanmoins être considérée avec prudence, d'une part parce qu'il ne s'agit que d'une image à l'instant t, des caractéristiques toxiques de ces effluents, et nous ne savons rien de leur évolution au cours d'une période plus longue, d'autre part parce que la notion de dilution et de facteur de risque, ne peut être manipulée que modulo la bioaccumulation de substances rémanentes (non inductrices et non détectées) susceptibles d'être rejetées dans le milieu.

3.5 Interprétation des résultats in situ

3.5.1 Variabilité spécifique de la réponse de l'activité EROD

Même si la mesure de l'activité EROD apparaît comme une méthode intéressante pour la biomonitoring à la fois des rejets et du milieu récepteur (détection d'exposition à des substances rémanentes biodisponibles), et d'un usage de plus en plus répandu, de nombreux facteurs biotiques et abiotiques (espèces, maturité sexuelle, âge, température)^[10, 27] sont susceptibles d'entraîner de larges variations dans les résultats de tels suivis.

Dans cette étude en particulier, la réponse spécifique des poissons pêchés in situ permet ou non de différencier plusieurs zones du milieu étudié (graphe n°1). Le barbeau notamment présente des réponses très spécifiques, qui avaient déjà été soulignées lors d'une étude précédente [28] où cette espèce semblait montrer une sensibilité particulière à la pollution, avec une inhibition de l'activité EROD sur la station la plus proche du rejet polluant. Ici la réponse de cette espèce sur le profil étudié est également particulière, dans la mesure où elle présente un taux d'induction maximal en aval des rejets Mos3 et 4 (station d'épuration et usine de pâte à papier), puis devient ensuite non significative, inversement aux réponses des autres espèces, même en aval proche du rejet Mos5 (textile), qui présentait au laboratoire des effets toxiques et inducteurs remarquables. L'hypothèse reste à vérifier d'une possible inhibition de l'activité catalytique EROD ou de l'induction du Cyt P4501A (phénomène d'hépatotoxicité) chez cette espèce, en présence justement de concentrations élevées de xénobiotiques. De telles inhibitions aux fortes doses d'inducteurs ont été mises en évidence par différents auteurs [26, 29].

Cet effet inhibiteur de l'effluent Mos5, vis à vis de la truite-arc-en ciel en 96h, n'a cependant pas été mis en évidence en laboratoire, même aux concentrations d'exposition les plus élevées.

Inversement, le cheveine et dans une moindre mesure le hotu montrent des taux d'induction EROD toujours significativement élevés en aval des rejets étudiés. Le cheveine en particulier permet de caractériser la situation de pollution de la station 403 en aval des rejets 1 et 2, sensiblement moins inducteurs que les rejets suivants. Cette espèce ubiquiste, assez résistante à la pollution, apparaît ainsi comme un bon candidat "d'espèce sentinelle" dans la mesure où, à l'inverse du barbeau, elle est susceptible de présenter des activités EROD élevées en présence d'une large gamme de situations de pollution.

3.5.2 Analyse des relations causes-effets

Nous disposons d'un ensemble d'informations à différents niveaux :

- la qualité chimique du milieu, représentée en particulier par les concentrations du sédiment en PCBs et HAPs et en métaux, les plus couramment dosés dans ces milieux,
- la potentialité toxique de quelques effluents majeurs rejetés dans le milieu,

²⁷ T. Andersson and L. Förlin. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. *Aquat. Toxicol.*, 24, p1-20. 1992

²⁸ E. Vindimian, P. Namour, B. Migeon and J. Garric. In situ pollution induced cytochrome P450 activity of freshwater fish : barbel (*Barbus barbus*), chub (*Leuciscus cephalus*) and nase (*Chondrostoma nasus*). *Aqua. Toxicol.*, 21, p 255-266, 1991.

²⁹ P. Lindström-Seppä, A. Oikari and O. Hänninen. Pulp and paper mill effluents affect activities in caged and feral fish in lake Saimaa. In *Cytochrome P450 biochemistry and biophysics*. Ed. I. Shuster Taylor and Francis. London. 1989

- la réponse biologique du milieu récepteur, représentée par :
 - l'induction de l'activité EROD mesurée in situ sur différentes espèces,
 - une donnée de nature écologique, sur la structure des communautés d'oligochètes^[7] en substrat sableux, l'indice IOBS = 10S.T⁻¹ (S = nombre d'espèces d'oligochètes dans un échantillon de sédiment, T = pourcentage du groupe dominant de tubificidae avec ou sans soies capillaires).

Le tableau et le graphique ci-dessous résument ces informations sur les 9 stations étudiées :

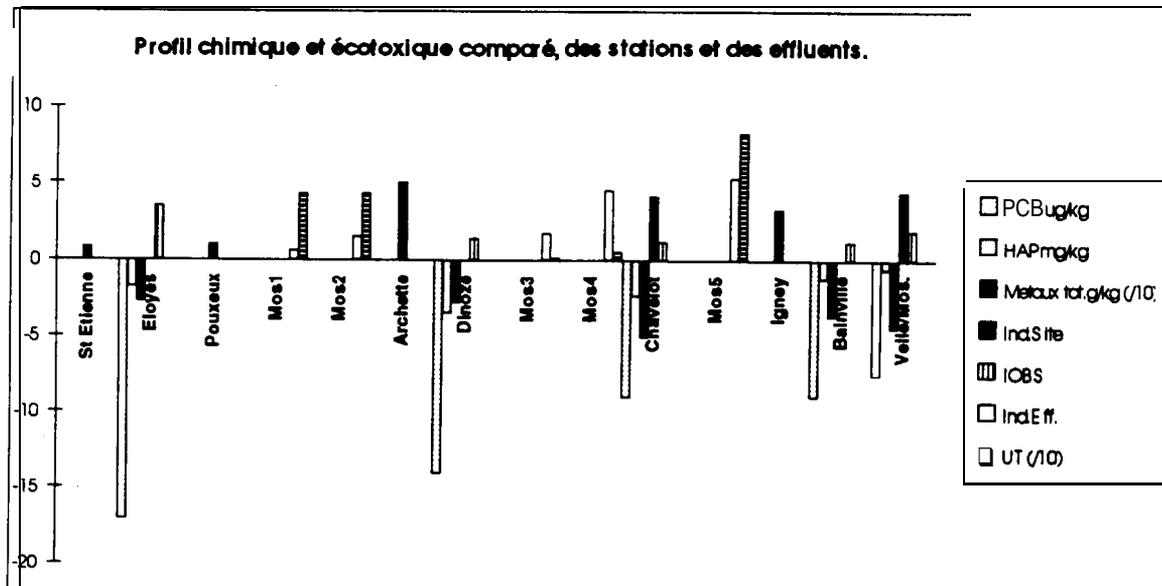
Stations	St Etienne 401 ^a	Eloyes (1) ^b	Pou- xeux 402 ^a	Ar- chette 403 ^a	Di- noze (2) ^b	Cha- velot 404 (3) ^{ab}	Ignéy 405 ^a	Bainville (4) ^b	Velle/ Mos 406 (5) ^{ab}
PCBs tot. µg/kg MS.		17.1			14	9		9	7.6
HAPS tot. mg/kg MS		1.81			3.5	2.4		1.3	0.6
Métaux tot. mg/kgMS		276			281	506		372	447
Taux d'induction ^c	0.8		1	5		4.1	3.3		4.4
Indice IOBS		3.5			1.4	1.2		1.2	1.9

Tableau n°13. Qualité chimique et biologique des stations étudiées.

a : station EROD

b : station analyse micropolluant et indice oligochètes.

c : taux d'induction de l'espèce chevaine.(Ind site)



Graphique n°3. Profil chimique et écotoxique des stations étudiées.

Ce graphique montre (cf résultats tableaux n°10 et 13) qu'il n'y a pas de corrélation entre les activités biologiques mesurées et les concentrations en PCBs et HAPs totaux mesurées dans les sédiments étudiés.

Concernant l'induction EROD, ce fait pourrait être expliqué en partie par la non biodisponibilité de ces contaminants dans les sédiment vis à vis des espèces de poissons étudiés, même pour des espèces de comportement plutôt benthique comme le barbeau.

Il faut également noter que la contamination rémanente, mesurée dans les sédiments est due essentiellement à des **PCBs di-ortho** substitués (**PCBs180, 153, 138, 101**)^[30] non susceptibles d'être des substrats inducteurs du **P450 1A** (du fait de l'encombrement stérique des chlores en position **ortho** qui empêche toute configuration coplanaire). Les concentrations des congénères mono-ortho substitués dosés (PCB 118, 28) sont par ailleurs faibles, inférieures à **0.10 µg/kg MS**. De plus l'induction par ces congénères mono-ortho (PCB1 18, PCB1 05) est rapportée comme contradictoire chez le **poisson**^[31].

Par contre, dans le cas des **HAPs**, hormis le benzo (ghi) pérylène qui semble être non inducteur chez la carpe, les autres composés dosés (dont le benzo a pyrène et le fluoranthène) provoquent des inductions de l'activité EROD et de la protéine **cyt P450 1A** chez ce même poisson exposé en laboratoire à des sédiments contaminés par des concentrations de l'ordre de quelques dizaines de microgrammes par **kg**^[32]. Ce qui indique que ces contaminants du sédiment peuvent être biodisponibles et actifs pour cette espèce dans les conditions d'expérimentation, alors que nous n'observons pas de réponses similaires sur les espèces étudiées **in situ**.

Il apparaît donc qu'une information de contamination chimique du compartiment sédiment, en général considéré comme un système intégrateur des pollutions existantes, même pour des contaminants spécifiques, ne peut être aisément interprétée en terme d'effet biologique prévisible, en particulier pour la faune piscicole.

Sur ce site également, même les variations de l'indice de qualité "oligochète" qui identifie 3 zones distinctes :

- une zone station "Eloyes" de qualité acceptable
- une zone stations Dinozé, Chavelot, Bainville, fortement perturbée,
- une zone station **Velle** sur Moselle dite "de récupération",

ne concordent pas avec la variation de la charge totale des sédiments en micropolluants métalliques ou organiques (M. Lafont) [7].

Par contre les variations de cet indice, de même que celles du taux d'induction de l'activité EROD ne sont pas contradictoires avec la "qualité" des rejets toxiques étudiés. En effet l'indice oligochète montre une chute drastique et permanente en aval des rejets étudiés, et n'amorce une remontée que sur la station la plus éloignée.

Concernant l'activité EROD, celle-ci augmente fortement pour le chevaine, puis pour les trois autres espèces en aval des rejets, avec une situation critique pour les trois espèces étudiées, en particulier en aval du rejet de l'usine de pâte à papier **Mos4**, qui a présente en laboratoire des effets inducteurs caractérisés. Pour les trois espèces, l'induction à la station 405, en aval du rejet de production textile **Mos5** diminue, de manière significative ou non, selon les espèces, pour remonter ensuite sur la station la plus éloignée. Ce résultat semble contradictoire avec l'effet inducteur remarquable de cet **effluent** aux concentrations testées en laboratoire, hormis si l'on admet la possibilité d'un effet inhibiteur à long terme de ce rejet sur le système **P450** des poissons étudiés, et en particulier sur le barbeau, en relation avec sa toxicité élevée .

~Analyses de micropolluants sur des **sédiments** dans le Bassin Rhin Meuse. **M** ; ai 1993. U.L.P Lab. d'Hydrologie.

³¹M.E.J. van der Weiden. Relative **potencies** of **polychlorinated dibenzo-p-dioxins**, dibenzofurans and biphenyls, **based on P450 1A** induction in the mirror **carp** (*Cyprinus carpio*). In Cytochrome **P4501A** induction in **carp** as a **biological** indicator for the aquatic contamination of **chlorinated** polyaromatics. Thesis 1993. **Univ** Utrecht NL.

³²M.F.L.Van der **Weiden**,H.J.H.**Tibosch**, R., **Bleuminck**,T.L.,**Sinnige**, C. van de Gucht,W.Seinen and **M. Van der Berg**. Cytochrome **P450 1A** induction in the **common carp** (*Cyprinus carpio*), following exposure to contaminated sediment with halogenated **polyaromatics**. Chemosphere, **vol.27**, n°7 1993.

Il faut de plus remarquer que l'on n'enregistre pas de "récupération" significative du milieu sur la dernière station, pourtant située à 35kms environ du dernier rejet identifié et connu sur cette portion de cours d'eau. La mesure de l'activité EROD, contrairement à ce que semble indiquer l'indice oligochète, signale encore un effet significatif lié à la présence de **contaminants** inducteurs biodisponibles pour le poisson.

3.5.3 Impact des effluents et état du milieu

La situation de terrain étudiée est complexe, dans la mesure où, même si les sources toxiques sont définies dans l'espace, il s'agit d'une situation "multi-sources" pour laquelle les effets spécifiques d'un effluent par rapport à l'autre ne peuvent être identifiés avec les mesures mises en oeuvre in **situ**. En effet, d'une part les populations, poissons ou invertébrés, sont soumises au fil du cours d'eau à un effet cumulé dans le temps des différents rejets, d'autre part la mobilité des populations de poisson peut être source de confusion.

En première analyse, les caractéristiques des effluents Mos1 et **Mos2** sont cohérentes avec les impacts observés in **situ**, sur les plus proches stations aval (Archettes et Dinozé) : induction caractérisée sur une seule espèce, et chute importante de l'indice oligochète, en relation avec un impact toxique significatif dans le milieu.

De même l'effet inducteur de **Mos4** peut être relié avec la situation d'induction significative sur les trois espèces de poisson étudiées, mesurée à Chavelot.

Enfin **Mos5**, effluent particulièrement inducteur et toxique pourrait expliquer la situation de dégradation permanente constatée jusqu'à plus de 30kms du rejet.

IV Conclusions

La sensibilité des analyses biologiques effectuées a permis de discriminer les 5 effluents étudiés selon leur toxicité et leur potentialité inductrice. La connaissance plus précise des caractéristiques de ces effluents (chimie, nature des processus, type d'épuration) serait nécessaire pour avancer plus loin dans les causes possibles de ces effets toxiques très différents.

La comparaison des concentrations toxiques et des rapports de débits **effluents/milieu** récepteur met en évidence l'existence d'une pression toxique réelle sur ce milieu. Ceci est du reste confirmé par les mesures biologiques in **situ** qui mettent en évidence un impact biologique mesurable, tant au niveau des individus que des populations.

Enfin d'une manière plus générale, cette étude met en évidence **et/ou** rappelle plusieurs éléments importants à prendre en considération lors d'une analyse de l'écotoxicité d'effluents et de l'évaluation de l'état du milieu récepteur :

- l'inexistence de corrélation entre la toxicité létale court terme, la toxicité sublétales à moyen terme et la potentialité d'induction de l'**activité** enzymatique de détoxification EROD des rejets complexes,

- la sensibilité très différente des espèces vis à vis de la toxicité des rejets mesurée en laboratoire, avec une sensibilité particulièrement marquée du microcrustacé céridaphnie, d'autant plus intéressant qu'une relation positive a **été** démontré entre les résultats des essais de toxicité chronique sur cette espèce et la structure des communautés **benthiques**^[33,34].

- la variabilité de l'induction de l'activité enzymatique EROD en particulier en fonction de l'espèce étudiée,

³³K.W. Eagleson, D.L. Lenat, L.W. Ausley and F.W. Winbome. Comparison of measured instream biological responses with responses using the Ceriodaphnia dubia chronic toxicity test. Environ. Toxicol. Chem. 9, p1019-1028. 1990.

³⁴K.L. Dickson, W.T. Waller, J.H. Kennedy and L.P. Ammann. Assessing the relationship between ambient toxicity and instream biological response. Environ. Toxicol. Chem. 11, p1307-1322. 1992.

• l'importance certaine mais encore inexpliquée des effets conjoints des différents xénobiotiques présents dans les rejets et *in situ*, sur la réponse des systèmes biochimiques et en particulier de l'activité EROD.

Elle souligne également la nature différente des informations obtenues, leur hiérarchisation et leur complémentarité en fonction de l'objectif à atteindre :

• les données physico-chimiques sur les sédiments du milieu, seulement indicatrices d'une charge globale en **contaminants** rémanents en vue d'une "cartographie **physico-chimique** du milieu", restent insuffisantes pour suivre **et/ou** prévoir l'évolution de la qualité biologique d'un milieu. Elles ne permettent pas non plus une identification des sources.

• les données concernant l'écotoxicité des effluents, en particulier les données de toxicité sub létale, qui si elles ne modifient pas nécessairement le classement "toxique" des effluents entre eux, sont indispensables pour l'établissement de normes de rejet effectivement "protectrices" pour le milieu récepteur.

• les données sur les effets biologiques mesurés *in situ* qui sont bien entendu fondamentales pour apprécier la toxicité "en vraie grandeur" sur le milieu récepteur.

Néanmoins, avec ces outils, la signification et l'utilisation des informations obtenues est différente :

- les indicateurs biochimiques spécifiques de certains polluants, telle l'EROD, utilisés à la fois pour caractériser des sources toxiques en laboratoire et des situations *in situ*, permettent de proposer des premières relations de cause à effet et de tracer dans le milieu la biodisponibilité de ces xénobiotiques, qui n'induisent pas nécessairement d'effet "toxique" caractérisable par les moyens **actuellement disponibles in situ**.

- les indicateurs biologiques, tel l'indice oligochète nous donnent une information sur la qualité écologique générale du milieu. Mais avec ceux-ci, compte tenu de leur nature par essence très intégratrice des caractéristiques biotiques et abiotiques du milieu, il n'est pas aisé de déterminer des relations de causes à effet. Aller plus avant dans l'explicatif à partir de ces seules informations nécessiterait en particulier une connaissance exhaustive de ces caractéristiques dans le milieu étudié, où la mise en place d'une démarche expérimentale au laboratoire.

Quoiqu'il en soit cette étude montre que l'on dispose actuellement, en particulier pour un milieu de qualité passable, tel celui étudié ici, d'une panoplie d'outils biologiques suffisamment sensibles pour permettre dès à présent la caractérisation des sources polluantes potentielles et la confirmation de leur toxicité *in situ*.

Néanmoins, il reste de nombreuses questions méthodologiques à résoudre pour permettre une interprétation certaine des résultats obtenus, en vue de l'établissement d'une part d'un diagnostic pertinent de la qualité d'un milieu, et d'autre part des relations causes - effet, en particulier avec les outils biochimiques.

Ceux-ci, s'ils sont sensibles et spécifiques de certains toxiques, sont également plus difficilement interprétables en situation complexe, du fait des nombreuses interactions dues aux paramètres biotiques (variabilité individuelle) et abiotiques (caractéristiques des milieux **et/ou** des mélanges) susceptibles de masquer ou de modifier d'éventuelles relations **dose-réponse**.

De même, une meilleure connaissance des réponses des **communautés** d'invertébrés benthiques, basée sur l'étude systématique de relation doses-effet, vis à vis des polluants majeurs des milieux étudiés, s'avère indispensable pour permettre de valoriser les informations que ces bioindicateurs peuvent apporter quant à la caractérisation des causes de perturbations *in situ*.

Protocoles et Analyses

1. **Protocole de l'essai sur Cériodaphnie.**
2. **Protocole de l'essai embryo-larvaire sur poisson zèbre.**
3. **Protocole de l'essai d'induction d'enzyme de détoxification sur truite.**

1. Protocole de l'essai sur *Cériodaphnia dubia*

1 Principe de l'essai:

Cet essai consiste à mesurer la toxicité chronique d'une substance soluble ou d'un eaux vis à vis d'un microcrustace cladocère *Ceriodaphnia dubia* dans des conditions d'essai semi-statiques (renouvellement périodique du milieu) et durant 7 jours.

2 Organismes d'essai et conditions d'élevage

2.1 Organismes d'essai

Les organismes utilisés pour la réalisation de l'essai sont issus de mères âgées de plus de 7 jours, conservées dans des conditions d'élevage identiques à celles de l'essai.

L'essai est initié avec des Cériodaphnies âgées de moins de 18 heures. Celles-ci donneront leur première portée environ 72 heures après leur naissance. Trois portées sont habituellement produites par les Cériodaphnies du lot témoin au cours d'un essai de 7 jours.

2.2 Conditions d'élevage

L'élevage est réalisé à 25°C(±1°C) dans une eau reconstituée EMD (20% eau minérale, 80% eau ultrapure) qui servira également d'eau de dilution durant l'essai)

2.3 La nourriture apportée

La nourriture employée consiste en un mélange de levure de boulanger, de deux souches d'algues cultivées au laboratoire, et d'une suspension de nourriture poisson. Elle est préparée de la manière suivante:

- Levure: une suspension de 5,0 g/l est préparée à partir de levure lyophilisée. Pour cela, 200 mg de levure sont agitées par bullage (air filtre 0,22µ) dans 40 ml d'eau ultra-pure (Milli-Q). Après une heure de bullage, la suspension est filtrée sur un tamis à maille de 30 à 40 µ. La solution ainsi préparée doit être utilisée le jour même, voir le lendemain si elle a été conservée au réfrigérateur (4°C).
- Algues: *Selenastrum capricornutum* et *Chlorella vulgaris* sont cultivées en milieu synthétique stérile LC.

Les cultures axéniques de ces deux souches d'algues se font dans les conditions suivantes:

en récipients fermes (ou "batch"), avec un bullage continu (air filtre 0,22 µ) et sous éclairage continu (intensité lumineuse d'au moins 2000 lux).

Les algues servant de nourriture proviennent d'une culture en phase exponentielle de croissance et sont mises à décanter durant 12 heures au réfrigérateur avant d'être remises en suspension par agitation dans le milieu d'essai ou d'élevage.

- Suspension de 5g/l de nourriture pour poisson (TROUVIT 000) est aérée pendant 72h. Après décantation 2h, le surnageant est utilisé.

La quantité de nourriture apportée à l'élevage (identique à celle utilisée durant les essais) se fait dans les proportions suivantes:

- 2,50 ml de suspension de levure / litre de milieu
- 2,50 ml de suspension nourriture poisson / litre de milieu
- 60⁶ cellules de *Selenastrum capricornutum* / l. de milieu
- 120.1 0⁶ cellules de *Chlorella vulgaris* / l. de milieu

Remarque: les dénombrements de cellules algales se font à l'aide d'une cellule de Malassez

3 Plan expérimental

3.1 Recommandations

Le nombre de lots (1 lot=10 Cériodaphnies) à mettre en oeuvre pour réaliser un essai varie selon la substance à tester; pour un toxique, il faut prévoir un lot témoin et au moins 5 concentrations du produit. Celles-ci sont choisies à l'issue d'un essai préliminaire selon une progression géométrique.

3.2 Déroulement de l'essai

- Le **Calendrier** les renouvellements de milieu avec apport de nourriture et de toxique se répartissent de la manière suivante :

Jours	n°	Renouvellement
Vendredi	0	+
Samedi	1	(+)
Dimanche	2	(+)
Lundi	3	+
Mardi	4	+
Mercredi	5	+
Jeudi	6	+
Vendredi	7	-

- Préparation de la nourriture** (par chacun des lots)
dans des fioles de 50 ml sont ajoutés successivement :
 - 1.25 ml de suspension de levure
 - 1.25 ml de suspension de nourriture poisson
 - 30 10⁶ cellules de *Selenastrum capricornutum*
 - 60 10⁶ cellules de *Chlorella vulgaris*
 - Les fioles sont ensuite complétées à 50 ml avec l'eau de dilution puis convenablement agitées.

- Préparation des concentrations:**

Dans une fiole de 500 ml sont successivement ajoutés :

- les 3/4 du volume d'eau nécessaire à la dilution,
- les 50 ml de mélange nutritif,
- le volume nécessaire d'effluent,
- ajustement à 500ml et agitation.

Après avoir été reparti également dans les dix récipients, ce mélange est porté à 25°C

- Mise en place:** les jeunes Cériodaphnies (âgées de moins de 18 heures) sont distribuées à raison d'un animal par récipient, à l'aide de pipettes Pasteur à bout rond en essayant de réduire au minimum la manipulation des Cériodaphnies et en transférant le plus petit volume possible de milieu. Les récipients sont alors bouchés et placés dans l'armoire thermostatée

Pour obtenir des jeunes Cériodaphnies (âgées de moins de 18 heures), il suffit d'isoler un nombre suffisant de mères (portant des embryons dans la poche incubatrice) le jeudi soir. On obtient alors le lendemain des jeunes pouvant servir à l'essai.

- Suivi de l'essai:** les jours où le calendrier prévoit un renouvellement, on procède à la préparation des milieux comme au premier jour. Ces milieux sont répartis dans des récipients propres. Les récipients d'essais sont sortis de l'armoire, et à l'aide d'une pipette Pasteur, chaque individu est transféré dans un nouveau récipient contenant la même dilution de toxique. Celui-ci sera alors bouché et placé dans l'armoire thermostatée. Le contenu des anciens récipients est filtré par aspiration et le filtrat (100µ) est observé sous loupe binoculaire afin de compter les jeunes Cériodaphnies.

- **Fin de l'essai** : le jour n°7, les **réipients-essais** sont sortis de l'armoire et les **Cériodaphnies** adultes sont **transférées** dans d'autres **réipients** à l'aide d'une pipette Pasteur. Le contenu des **réipients** d'essais est filtré comme **décrit** plus haut.

Si, **après** avoir comptabilisé les dernières naissances, les conditions de **validité** de l'essai ne sont pas remplies, il est possible de prolonger l'essai durant 24 heures pour valider éventuellement l'essai.

Enfin, le **7ème** (ou le 8ème jour de l'essai), les **Cériodaphnies** adultes sont **transférées** sur des lamelles individuelles. Après ajout d'une goutte de fixateur, la taille de chaque **Cériodaphnie** est mesurée entre le front (au niveau de l'oeil) et la base de l'**épine** caudale **après** observation sur un lecteur de microfiche.

3.3 Réipients

Les **réipients** utilisés sont en **polystyrène** cristal d'une **capacité** de 100 ml. Si pour un composé ou un eau teste, il y a risque **d'adsorption**, les **réipients** peuvent être conditionnés en recevant, 24 heures avant, une concentration de toxique **équivalente** à celle de l'essai.

3.4 Conditions physico-chimiques de l'essai

- **qualité de l'eau de dilution**, l'eau de dilution est la même que celle **utilisée** pour l'élevage, à savoir le milieu EMD. Les **caractéristiques** de cette eau sont les suivantes :
 $\text{pH}=8.0 \pm 0.2$
 $\text{dureté}=80-100 \text{ mg CaCO}_3/\text{l}$
- **photopériode** : 18 heures de lumière, 6 heures **d'obscurité**, (note L/D=18/6)
- **intensité d'éclairage** : entre 300 et 500 lux
- **température** : $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$
- **oxygène dissous** : tout au long de l'essai, le taux d'oxygène dissous doit rester **supérieur** à 60% de saturation.

3.5 Mesures biologiques effectuées

- le nombre de **mères** vivantes subissant l'essai est enregistré **à** chaque changement de milieu.
- le nombre de jeunes nés ainsi que le nombre d'oeufs **non-éclos** sont enregistrés tous les jours.
- le dernier jour de l'essai, la taille de chaque mère est **mesurée**.
 Les techniques utilisées pour faire les deux dernières mesures sont **décrites** dans le paragraphe 3.2).

4 Conditions de validité de l'essai

Pour que l'essai soit **considéré** comme valide les conditions suivantes doivent être remplies:

- le nombre de morts dans le lot **témoin** ne pas **excéder** 20%
- au moins 60% des **mères témoins** doivent avoir produit un minimum de 3 portées
- le nombre de jeunes produits par **mère** vivante dans les **témoins** doit être ≥ 15 en fin d'essai.

2. Protocole de l'essai embryo-larvaire sur poisson zèbre

1 Principe de l'essai

L'essai embryo-larvaire ou E.L.S.(Early Life Stage) consiste à mesurer la **toxicité** d'une substance soluble ou d'un effluent dans les conditions de l'essai, vis à vis des stades **embryo-larvaires** de *Brachydanio rerio* (ou poisson **zèbre**). A cet effet on recherchera les **éventuels** effets inhibiteurs de ces substances ou effluents sur **l'éclosion**, la survie et le **développement** larvaire.

Pour notre **étude**, cet essai sera **réalisé** dans des conditions **semi-statiques** (renouvellement **périodique** du milieu) et durant 11 jours.

2 Organismes d'essai et conditions d'élevage:

3.1 Organismes utilisés pour l'essai:

Les essais sont réalisés à partir d'embryons de poisson zèbre (*Brachydanio rerio*) de moins de 4h (stade blastula). Les oeufs doivent provenir d'un lot de poisson qui a **été** maintenu au moins deux semaines au laboratoire dans une eau de **qualité** piscicole reconnue, d'une **dureté calcique** de 100 ± 20 mg de CaCO₃, à $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ et d'un pH compris entre **7,5** et **8,2**. Le milieu de stabulation doit être aéré de **manière** continue et les conditions **d'éclairage** doivent être semblables à celles de l'essai (L/D=14/10).

2.2 Conditions d'élevage:

Environ 80 geniteurs (rapport **mâle/femelle** ~ 2) sont stockés dans des aquariums de 80 litres d'eau de caractéristiques suivantes :

- dureté: 100 ± 20 mg de CaCO₃.
- température: $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$.
- pH compris entre **7,5** et **8,5**.
- **débit** de renouvellement d'eau environ 24 l/h, aération du bac permanente.
- conditions d'éclairage: L/D=14/10

2.3 Récolte des oeufs

Le soir **précédant** le **démarrage** de l'essai, des bacs de ponte (bacs en verre recouverts d'un grillage de plastique sombre) sont placés au fond des aquariums. Le lendemain, environ **2h30 après** l'allumage de la **lumière**, les bacs de ponte sont **recupérés délicatement** et les oeufs sont repartis dans les **réceptacles** d'essais à l'aide d'une pipette.

2.4 Nourriture apportée:

Les poissons adultes sont nourris 4 fois par jour avec une **préparation** du commerce (flocons SERA). Trois fois par semaine, ils reçoivent des nauplies **d'artémia**.

Durant les essais, les larves sont nourries (**à** partir du **5ème** jour) avec une autre **préparation** du commerce qui est **distribuée** à l'aide d'une microspatule à raison d'environ 70 **mg/j./30** larves. Comme la population d'alevins diminue dans certains **lots**, il est **nécessaire** d'adapter les **quantités** de nourriture **distribuées** afin **d'éviter** une surcharge organique pouvant perturber l'essai.

3. Plan expérimental

3.1 Recommandations

Le nombre de lots (1 **lot=30** larves) à mettre en oeuvre pour **réaliser** un essai varie selon la substance à tester; pour un toxique, il faut **prévoir** un **bt témoin** et au moins 5 concentrations du produit. Celles-ci sont **choisies** à l'issu d'un essai **préliminaire** selon une progression **géométrique**.

3.2 Déroulement de l'essai

- **Mise en place** : disposer d'au moins 3 récipients par concentration. **Préparer au moins 500ml** de chaque solution d'effluent dilué à la concentration voulue (**à 26°C**) et les **répartir** dans chaque **récipient** à raison de 160 ml de solution d'essai (ou d'eau de dilution pour les témoins), **puis répartir** 50 oeufs de *Brachydanio rerio* (**âgés** de moins de 4 h.) à l'aide d'une pipette. Les récipients-essais sont **alors** dii de façon **aléatoire** dans une armoire thermostatée (**26°C +/- 1 °C**).
- **Suivi de l'essai**: après **24h.**, noter le nombre d'oeufs blancs (oeufs non **fécondés**), les **éliminer** et ramener le nombre d'embryon à 30 par récipient. Tous les jours, les milieux sont **renouvelés** (95% maximum) par siphonnage. Noter une fois par jour: les **éclosions**, les mortalités, les larves anormales (**éliminer** les larves mortes **après** comptage). Alimenter les larves comme décrit au paragraphe 2.4)
- **Fin de l'essai**: le 1 **1^{ème}** jour, le milieu est additionné de MS-222 afin d'immobiliser les alevins qui seront ensuite mesurés.

3.3 Récipients

Les **récipients** utilisés sont en verre d'une **capacité** de 300 ml. Si pour une substance ou un effluent teste il y a risque **d'adsorption**, les récipients peuvent être conditionnés en recevant, 24 heures avant, une concentration de toxique équivalente à celle de l'essai.

3.4 Conditions physico-chimiques de l'essai:

- **qualité de l'eau de dilution** :
dureté = 250 ± 25 mg de CaCO₃
pH compris entre 7,5 et 8,5
conductivité = 600 +/- 50 uS à 20°C
- **photopériode** L/D=14/10
- **température**: 26°C ± 1 °C
- **oxygène dissous** : supérieur ou égal à 90% de saturation

3.5 Mesures effectuées

A chaque renouvellement de milieu, un certain nombre de mesures sont effectuées,

- **Mesures physico-chimiques** : tous les jours, avant renouvellement du milieu, la **température**, le taux **d'oxygène** dissous des milieux d'essai sont mesurés et doivent rester conformes aux conditions **définies** plus haut. Le pH, la conductivité et éventuellement la concentrations en ion ammonium, sont mesurés, au moins dans un récipient du lot **témoin** et dans un **récipient** des concentrations de toxique maximale et minimale **testées**.
 - **Mesures biologiques** : chaque jour sont notés le nombre d'oeufs **éclos** ou morts, le nombre de larves mortes ou anormales.
En fin d'essai la taille des alevins est **mesurée** (20 mesures par **récipient**).

4. Conditions de validité de l'essai:

Pour que l'essai soit **considéré** comme valide les conditions suivantes doivent être remplies pour les **lots** témoins:

- taux de **mortalité** des oeufs à 24h < 30%
- taux d'éclosion > 95%
- durée du **développement** embryonnaire, **décal d'éclosion**, à 26°C comprise entre 3 et 5 jours

3. Protocole de l'essai induction d'enzyme de détoxification sur truite:

1. Principe de l'essai

Cet essai consiste à mesurer l'incidence d'une substance soluble ou d'un effluent, dans les conditions de l'essai, sur la phase 1 du **métabolisme** de détoxification de poissons. Cet effet est **apprécié** par la mesure de l'activité enzymatique de détoxification cytochrome P-450 **dépendante Ethoxy-Résorufine-O-Dééthylase** ou EROD, des hépatocytes de truitelles arc-en-ciel (*Onchotynchus mykiss*).

2. Organismes d'essai et conditions d'élevage

2.1 Espèce utilisée pour l'essai

Les poissons utilisés sont des truitelles arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss*), provenant de pisciculture. La taille moyenne est de 6 cm, avec un poids moyen de 2,5 g.

2.2 Conditions de maintenance des poissons

Les poissons destinés à l'essai sont maintenus au moins deux semaines au laboratoire dans une eau de qualité piscicole reconnue, d'une **dureté calcique** d'environ 265 mg de CaCO₃, à 16°C $\pm 1^\circ\text{C}$, avec un pH compris entre 7,0 et 8,2. Le milieu de stabulation est aéré de manière continue et les conditions d'éclairage sont semblables à celles de l'essai (**L/D=14/10**).

En cas d'apparition de mycose cutanée, les truitelles subissent deux bains de Vert de Malachite (**dose=2,5ml/100l** de milieu) espacés de 2 jours. L'essai ne peut avoir lieu que quinze jours **après** le dernier bain.

2.3 Nourriture apportée:

Les truitelles sont nourries à l'aide d'un aliment du commerce, standard pour **salmonidés** à raison de 2% de leur poids par jour et distribuée en 3 rations.

3 Essai avec contamination par contact:

3.1 Principe

Les truitelles sont contaminées par voie **transcutanée** et surtout branchiale, durant 96 heures d'exposition à différentes concentrations d'une substance ou différentes dilutions d'un effluent.

Selon la norme AFNOR (**NFT 90-305**) concernant ce type d'essai avec renouvellement quotidien du milieu, on utilise un volume de 10 l. pour 5 truitelles de 6 cm (**2,5 g**).

Nous utilisons des récipients d'essai **thermostatés** de 20 litres (tapissés de **polyéthylène**) dans lesquels sont maintenues 10 truitelles.

Le dispositif expérimental comprend 6 aquariums, un bt témoin "négatif" (eau pure), un **témoin positif** (injecte à la **B-Naphtoflavone 50mg/kg**) et 4 **lots** contaminés (concentrations croissantes de toxiques).

3.2 Déroulement de l'essai

- Mise en place : Avant le **début** de l'essai les truitelles sont **acclimatées** aux conditions du laboratoire pendant 2 semaines au moins.
- Après la mise en place des **différentes** dilutions d'essai, l'**oxygène dissous** est **contrôlé** (au moins **> 5mg/l**), l'aération est mise en place, puis les poissons sont disposés dans chaque aquarium.
- Les poissons "**témoins positifs**" reçoivent une injection intra **péritonéale** de 50 μl de B-Naphtoflavone puis sont mis en aquarium .

Suivi de l'essai : chaque jour les mortalités éventuelles sont comptabilisées (les poissons morts sont éliminés) et les milieux sont renouvelés par siphonnage. Les éventuelles modifications du comportement ou de l'aspect des truitelles sont également notées : nage, mobilité, position, prise de nourriture, couleur.

Fin de l'essai : au terme des 96 h de l'essai, les truitelles sont sacrifiées, le foie est prélevé, lavé, homogénéisé et congelé individuellement dans l'azote liquide puis conservé à une température minimale de -70°C. Quelques fragments de branchies peuvent être conservés dans du formol (10%) pour analyse histologique éventuelle.

3.3 Préparation des solutions injectées

Solution de B-Naphtoflavone : Une solution de 5ml de B-Naphtoflavone dans de l'huile d'arachide (du commerce) est préparée afin de disposer d'une dose individuelle de 50mg/kg dans 50 µl d'huile. La solution de B-Naphtoflavone ainsi préparée est agitée pendant 2 à 4 heures puis portée à 60°C, au bain-marie avant injection. Cette substance est connue pour sa forte activité inductrice des monooxygénases cytochrome P-450 dépendantes

3.4 Conditions physico-chimiques de l'essai

- qualité de l'eau de dilution : il s'agit d'une eau de qualité piscicole : eau de forage (dureté = 40°f) additionnée d'eau de forage osmosée jusqu'à obtenir une dureté de 265 mg/l de CaCO₃.
- pH compris entre 7,0 et 8,2
- température : 16°C ± 1 °C
- oxygène dissous : supérieur ou égal à 70% de saturation
- photoperiode: L/D=14/10

3.5 Mesures effectuées

Le deuxième jour de l'essai, un certain nombre de mesures sont effectuées :

Mesures physico-chimiques : la température, le taux d'oxygène dissous des milieux d'essai sont mesurés et doivent rester conformes aux conditions définies plus haut. Le pH est mesuré dans l'aquarium témoin et dans les aquariums correspondants aux concentrations maximales et minimales.

Mesures biologiques : chaque jour noter les mortalités et toute modification du comportement, de l'aspect des truitelles : nage, mobilité, position, prise de nourriture, couleur. En fin d'essai avant sacrifice, la taille et le poids de chaque truitelle sont mesurés, puis le prélèvement des organes est effectué (noter la couleur du foie, le volume et la couleur de la vésicule biliaire).

3.6 Condition de validité

Le taux de mortalité dans le lot témoin doit être inférieur à 10%.