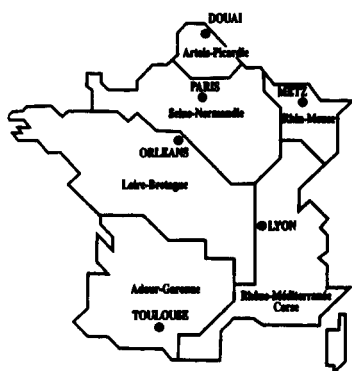


# EVALUATION DE LA GENOTOXICITE DES EFFLUENTS

## Etude comparative des tests d'Ames et micronoyaux Triton



Document réalisé sous la direction des Agences de l'Eau  
et du Ministère de l'Environnement  
Chargé d'étude : Centre des sciences de l'environnement  
Auteur : Fabrice Godet  
Etude réalisée sous la direction du Professeur Paule Vasseur  
Laboratoire de toxicologie  
Centre des sciences de l'environnement  
1, rue des Récollets  
BP 4025  
57040 METZ Cedex 1  
Février 1994  
250 exemplaires  
"C" Agences de l'eau  
Tous droits réservés

La génotoxicité vis à vis des milieux aquatiques apparaît de plus en plus comme un thème important en raison des conséquences possibles de cette forme particulière de toxicité : mutation voire carcérogène.

La première partie de l'étude est consacrée à une revue bibliographique des essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'étude de la génotoxicité d'échantillons de l'environnement hydrique : eaux destinées à la potabilisation, effluents.

La seconde partie a consisté à comparer les performances du test d'Ames et du test "micronoyaux" sur larves de Pleurodèle sur 5 effluents industriels et municipaux.

Le test "micronoyaux" s'est révélé être un outil de choix pour la détection du potentiel génotoxique de ces échantillons.

Ce test est apparu :

- sensible sans nécessiter d'étape d'extraction et de concentration des micropolluants, plus représentatif des conditions d'exposition dans l'environnement, facile à mettre en oeuvre, mais il gagnerait à ce que la lecture des frottis soit automatisée.

Le test d'Ames nécessite le plus souvent une concentration des échantillons testés ; il est bien adapté pour tester de faibles volumes d'échantillons. Il s'est avéré plus particulièrement sensible aux micropolluants des effluents de papeterie.

La confrontation des résultats du test "micronoyaux" aux données d'analyse sur l'un des effluents (traitement de surface) a amené à aborder les interactions entre métaux dans la troisième partie de l'étude. Il en ressort notamment les points suivants :

- le fer trivalent est génotoxique pour les larves de triton, le chrome III et le chrome VI ne sont pas systématiquement génotoxiques, un effet d'additivité a été mis en évidence entre Fe III et Cr VI, le zinc n'est pas génotoxique pour le triton.

Le test "micronoyaux" s'est ainsi avéré assez performant, permettant d'étudier des matrices complexes. Son protocole actuel, notamment la lecture des frottis tend cependant à le réserver à des études particulières plutôt qu'à du travail de routine.

# SOMMAIRE

PAGES

INTRODUCTION

## CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### ESSAIS DE GENOTOXICITE *IN VITRO* ET *IN VIVO* APPLICABLES A L'ENVIRONNEMENT HYDRIQUE.

I-1 INTRODUCTION	2
I-2 METHODES DE CONCENTRATION DES ECHANTILLONS.	
I-3 MILIEUX ENVIRONNEMENTAUX HYDRIQUES ETUDIES.	
I-3.1 Eaux naturelles et eaux d'alimentations	4
I-3.2 Les rejets industriels	6
I-3.3 Sédiments et boues de station d'épuration	7
I-4 COMPARAISON DES PERFORMANCES DES ESSAIS <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> VIS A VIS DE MUTAGENES CONNUS.	8
I-5 DISCUSSION	9
I-6 CONCLUSION	

## CHAPITRE II :

### EVALUTION DE LA GENOTOXICITE D'EFFLUENTS COMPLEXES A L'AIDE DU TEST D'AMES ET DU TEST MICRONOYAU SUR LARVES DE TRITON

II-1 INTRODUCTION	14
II-2 MATERIEL ET METHODES	
II-2.1 Les effluents étudiés	
II-2.2 Préparation de l'extrait organique et du lyophilisat	
II-2.3 Dosage des métaux	15
II-2.4 Le test d'Ames	16
II-2.4.1 Principe du test	
II-2.4.2 Protocole	
II-2.4.3 Interprétation des résultats	17
II-2.4.4 Concentrations en effluent testées	
II-2.5 Le test micronoyau sur larves de triton	18
II-2.5.1 Principe du test	

II-2.5.2 Elevage des larves	
II-2.5.3 Protocoles expérimentaux (standard et simplifié)	
II-2.5.4 Traitement statistique des résultats	19
II-2.5.5 Concentrations en effluent testés	20
<b>II-3 RESULTATS</b>	
II-3.1 Résultats du test d'Ames	
II-3.1.2 Les effluents bruts	
II-3.1.3 Extraits organiques et lyophilisats	22
II-3.2 Résultats des tests tritons	
II-3.2.1 Essais réalisés avec le protocole standard	
II-3.2.2 Essais réalisés avec le protocole simplifié	23
<b>II-4 DISCUSSION</b>	27
<b>II-5 CONCLUSION</b>	
<b>CHAPITRE III :</b>	
<b>IMPLICATION DES METAUX CHROME, FER ET ZINC DANS LA GENOTOXICITE DES EFFLUENTS BI, BII ENTREE ET BIII : ETUDE D'INTERACTION.</b>	
<b>III-1 INTRODUCTION</b>	28
<b>III-2 BIBLIOGRAPHIE SUR LA GENOTOXICITE DES METAUX CHROME, FER ET ZINC.</b>	
III-2.1 Le chrome	
III-2.1.1 Génotoxicité du chrome	
III-2.1.2 Processus de réduction de CrVI en CrIII	31
III-2.2 Le fer	32
III-2.2.1 Fer et viabilité cellulaire	
III-2.2.2 Incorporation cellulaire du fer	
III-2.2.3 Génotoxicité et carcinogénicité liées au fer	33
III-2.3 Le zinc	34
III-2.4 Conclusion	
<b>III-3 ESSAIS MIS EN OEUVRE.</b>	35
III-3.1 Essais réalisés avec le test d'Ames	
III-3.1.1 Concentrations des métaux testés	
III-3.1.2 Préparation des solutions de métaux	36

III-3.1.3 Modalités des plans d'interaction étudiés	37
III-3.1.4 Réalisation des essais d'interaction I et II	
III-3.2 Essais réalisés sur larves de pleurodèle	
III-3.2.1 Etude de l'effet d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques	
III-3.2.2 Etude de l'effet des métaux CrIII, CrVI, FeIII et ZnII	38
III-3.2.3 Etude de l'effet d'un mélange polymétallique Chrome/Fer/Zinc	39
III-3.2.3.1 Concentrations des métaux testés dans chaque plan d'interaction	
III-3.2.3.1 Modalités des plans d'interaction étudiés	
III-4 RESULTATS	40
III-4.1 Résultats des tests d'Ames	
III-4.2 Résultats des essais micronoyaux sur larves de pleurodèle	41
III-4.2.1 Effets du mélange d'hydrocarbures aromatiques	
III-4.2.2 Effets des métaux CrIII, CrVI, FeIII, et Zn testés en concentrations croissantes	
III-4.2.3 Résultats des essais d'interaction	43
III-4.2.3.1 Interaction CrVI/FeIII/ZnII	
III-4.2.3.2 Interaction CrIII/FeIII/ZnII	
III-5 DISCUSSION	44
III-5.1 Sources de variations des résultats des essais triton	
III-5.1.1 Sensibilité des larves de pleurodèle	
III-5.1.2 Variabilité liée à la lecture des frottis	45
III-5.2 Les essais d'interaction	47
III-6 CONCLUSION	49
CONCLUSION GENERALE	50
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	

## **FASCICULE 2**

### **TABLEAUX, FIGURES ET ANNEXES**

#### **TABLEAUX ET FIGURES**

**CHAPITRE I** : Tableaux 1 à 8

**CHAPITRE II** : Tableaux 9 à 13. Figures 1 à 16.

**CHAPITRE III** : Tableaux 14 à 30. Figures 17 à 28.

#### **ANNEXES**

**Annexe I** : Norme AFNOR NF T90325, 1985. Essais des eaux : détection en milieu aquatique de la génotoxicité d'une substance vis-à-vis de batraciens, *Pleurodeles waltl* et *Ambystoma mexicanum*. Essai des micronoyaux.

**Annexe II** : Résultats des tests d'Ames sur effluents bruts, extraits organiques et lyophilysats

**Annexe III** : Résultats des essais triton réalisés sur les effluents

**Annexe IV** : Résultats des test d'Ames réalisés dans le cadre de l'étude d'interaction sur les métaux.

**Annexe V** : Résultats des essais triton réalisés dans le cadre de l'étude d'interaction sur les métaux.

**Annexe VI** : Résultats bruts des trois numération réalisées pour tous les lots de l'essai 7b FeIII/CrIII/ZnII.

## Avant-propos

La mesure de la toxicité des effluents au moyen de tests biologiques aura connu plusieurs périodes de développement des concepts, en parallèle à l'évolution des techniques : toxicité aiguë, toxicité chronique, et plus récemment stratégie de mesure, avec par exemple la méthodologie "TRE/TIE" de l'EPA, mais aussi génotoxicité. Ce dernier thème apparaît comme très important, si l'on en croit le nombre de publications qui se rapportent à ce sujet, mais en même temps singulièrement ambigu. Il est aussi à manier avec précaution, en raison des fantasmes qu'il peut éveiller.

Qu'est-ce en effet que la génotoxicité ? Les deux éléments du terme renvoient d'une part à la toxicité - dont on considèrera qu'elle est comprise -, et d'autre part au génome. Dans ce domaine, les choses sont moins claires, puisqu'il peut s'agir d'altérations touchant ou non des cellules de la reproduction. Si l'une de ces cellules est concernée par l'altération, il peut y avoir apparition ou disparition de caractères transmissibles (capacités métaboliques par exemple). Dans le cas contraire, il y a une simple altération fonctionnelle du génome, et l'altération n'est alors pas transmissible (inhibition de la synthèse d'une enzyme par exemple).

Les conséquences d'un effet génotoxique sont souvent obscures : il peut y avoir cancérogenèse ou pas. Et en-dehors des mutations, les conséquences ne sont pas plus claires : que signifie concrètement la présence de micronoyaux dans des cellules sanguines ?

Cette difficulté d'appréhension des problèmes tient pour une part non négligeable à l'état somme toute rudimentaire de nos connaissances, elles-mêmes liées à des supports expérimentaux insuffisants, ou du moins pas explicatifs par eux-mêmes. Ainsi par exemple a-t-on prêté une valeur prédictive (qu'il a peut-être) au test d'Ames, réalisé sur une bactérie dotée d'un seul chromosome, alors que ce type d'organisme, par nature, n'est pas susceptible de développer de cancer, et que son matériel génétique n'est ni organisé, ni protégé de la même manière que celui d'organismes dits supérieurs.

De plus, les fonctions métaboliques assurées par le foie ou son équivalent chez les organismes pluricellulaires n'existent pas chez les organismes unicellulaires, obligeant à recourir à un artifice pour représenter ces fonctions lors de la conduite d'un test bactérien.

Dans le domaine aquatique, après un premier stade où l'on disposait exclusivement de tests sur organismes unicellulaires (Ames, puis SOS chromotest), sont apparus de nouveaux moyens d'étude sur organismes entiers. En France, Jaylet et ses collaborateurs ont développé des tests sur batraciens (triton = pleurodèle, crapaud = xenope), aux Pays-Bas Van der Gaag a pour sa part travaillé sur poisson (Nothobranchius). Actuellement, l'ensemble de ces tests coexistent et sont disponibles, sans que l'on sache précisément s'ils sont équivalents, donc concurrents, ou complémentaires, et comment. Au niveau théorique, il y a des différences entre une mutation réverse (restitution d'un caractère perdu par mutation : cf test d'Ames), un échange de chromatides (déplacement de portions de chromosomes : cf test Nothobranchius), ou une clastogénèse (fragmentation de chromosomes au cours de la division cellulaire : cf test de Jaylet sur pleurodèle, ou le test xenope). Mais cette différence théorique recouvre-t-elle une différence pratique ? En d'autres termes, a-t-on des réponses divergentes de ces différents tests à un même produit, substance chimique ou effluent ?

On le voit, cette question de la génotoxicité est d'un abord plus complexe que la toxicité aiguë, réponse de type "tout ou rien", dont les conséquences pour le milieu sont simples à appréhender, et de portée somme toute limitée. Il en va de même, dans une moindre mesure, pour la toxicité subaiguë ou chronique, où les phénomènes se présentent de façon plus graduelle (croissance, reproduction). Les modèles et les protocoles expérimentaux doivent encore évoluer pour qu'on puisse dresser une représentation cohérente de la génotoxicité. Cette complexité, ou cette ambiguïté, comme les conséquences possibles pour l'écosystème d'atteintes du patrimoine génétique, justifient que soit poursuivi un effort important de recherche. Ceci étant, la question peut se poser de l'implication des agences de l'eau dans cet effort, leur rôle étant en première

analyse plutôt de fournir des moyens de protection des milieux aquatiques. Pour que ce rôle puisse être assumé, il faut certes que les connaissances scientifiques soient suffisamment développées, mais cela devrait se faire préférentiellement dans le cadre d'organismes dont la recherche est la mission principale.

Cependant, n'y a-t-il pas quelque chose à faire sans attendre que les connaissances soient complètes (si tant est qu'elles le soient un jour) ? Une issue provisoire, pour les agences, consisterait alors à disposer d'un outil permettant de "trier" les effluents en fonction d'une génotoxicité potentielle, c'est à dire sans chercher à évaluer l'impact réel avec précision. Cela permettrait d'avancer de manière pragmatique, sans empêcher l'évolution des connaissances. L'utilisation des tests de génotoxicité existants, dans cette perspective, semble tout à fait logique. Encore faut-il choisir le ou les tests les plus pertinents.

En d'autres termes, y a-t-il des effets génotoxiques observables sur effluents ? dans le milieu ? Que valent les tests existants dans ce domaine ? Comment doit-on les préconiser ? Sur la base de ces informations, y a-t-il lieu de proposer une action particulière des agences de l'eau ?

Initialement, le test micronoyaux sur pleurodèle a été proposé pour évaluer la toxicité de substances chimiques, comme d'ailleurs le test d'Ames. Mais en définitive des questions du même ordre se posent dans l'environnement, à propos des effluents, voire de certains compartiments du milieu. Cependant, la similitude n'est évidemment pas parfaite, et les protocoles des tests sont nécessairement à aménager pour qu'on puisse tester ces échantillons complexes.

L'étude présentée ici n'a pas la prétention de répondre d'emblée et définitivement à toutes ces questions. Elle a été conçue en 1988, et menée de 1989 à mi 1993, sur une base plus modeste, quoique déjà ambitieuse :

- choix d'un test : il s'agissait de comparer les performances de deux tests, Ames (mutation réverse sur la bactérie *S. typhimurium*) et micronoyaux pleurodèle (triton) vis à vis de 5 effluents ;
- protocole : le test micronoyaux pleurodèle durant 12 jours, avec des interventions quotidiennes qui rendent difficiles son utilisation en routine, il s'agissait de savoir s'il était possible d'aménager le protocole pour diminuer la charge de travail, sans modifier la sensibilité du test ;
- synthèse des observations d'effets génotoxiques sur différentes sortes d'échantillons, en particulier les effluents ;
- première approche sur la dimension du problème en France, à travers l'application de ces deux tests sur quelques effluents relativement typés : effluent urbain, traitement de surface, chimie (composés aromatiques, solvants chlorés), pâte à papier.



## CONCLUSION GENERALE

Le rejet de molécules à caractère mutagène et cancérigène dans notre environnement et ses conséquences à long terme pour la stabilité des écosystèmes et la santé humaine a conduit à une prise de conscience de la communauté scientifique et des autorités compétentes.

Depuis une vingtaine d'années, les travaux pour tenter d'évaluer ou de prévoir l'impact de tels rejets sur notre environnement se sont multipliés. Les méthodes d'essais mises en oeuvre pour l'étude de la génotoxicité des milieux environnementaux hydriques complexes sont nombreuses et souvent calquées sur les essais utilisés pour l'étude de la génotoxicité sur mammifères. Peu de tests *in vivo* ont été développés sur des modèles relevant des systèmes hydriques.

Les essais recensés sont le plus souvent des essais *in vitro* sur bactéries (test d'Ames) ou cellules eucaryotes (cellules CHO). Cependant, un souci croissant d'évaluer au mieux l'impact des rejets complexes et, de se rapprocher des conditions de l'environnement a conduit au développement d'essais *in vivo* sur organisme entier.

Il nous est donc apparu nécessaire de dresser un bilan des avantages et des inconvénients des nombreuses méthodes d'essai disponibles et, de sélectionner les mieux appropriées à l'environnement hydrique.

L'analyse bibliographique réalisée au début de ce travail souligne l'intérêt d'utiliser en parallèle, un test *in vitro* tel que le test d'Ames ou un essai sur cellules eucaryotes (mammifères, poissons) et un test *in vivo* sur triton ou sur la moule marine. Les essais *in vitro* sont intéressants pour le dépistage en série, et les tests *in vivo* pour leur plus grande représentativité. Cette stratégie, a été appliquée à l'étude de la génotoxicité d'effluents complexes.

Le test d'Ames a été retenu car il est classiquement utilisé en "screening" et qu'il a déjà prouvé son intérêt pour des études environnementales. Le test triton a été choisi quant à lui pour sa pertinence liée (1) au modèle biologique utilisé (2) aux conditions d'exposition se rapprochant des conditions environnementales.

Les travaux de Jaylet *et al.* (1986 et 1987) ont mis en évidence la bonne sensibilité des larves de pleurodèle à détecter des composés génotoxiques cependant ; ce test est encore peu employé pour l'étude de la génotoxicité des effluents complexes.

Notre objectif était donc d'étudier les performances de ce test par rapport à celles du test d'Ames, dans le cadre du contrôle ou du suivi de la génotoxicité d'effluents complexes mais aussi de tester une version allégé du protocole du test triton.

Notre étude a été réalisée à partir d'effluents issus de l'industrie chimique (échantillons C, EI et EII), de l'industrie du papier (échantillon D, production de pâte à papier) et de la métallurgie (échantillons BI, BII, BIII). L'échantillon A a été prélevé à l'entrée d'une station d'épuration urbaine.

Les échantillons étudiés ont été testés bruts ou dilués (test d'Ames et test triton) et après extraction et concentration des polluants (test d'Ames).

Le test micronoyau sur larves de pleurodèle s'est révélé un outil de choix pour l'étude de la génotoxicité des effluents complexes.

Il a permis de mettre en évidence la génotoxicité de six effluents, testés bruts ou dilués, sur les huit étudiés : BI, BIIentrée, BIII (traitement de surface), C, EI et EII (chimie). Le test d'Ames a permis lui aussi de détecter la présence de micropolluants mutagènes dans les effluents BI et BIII (bruts) ; il s'est révélé spécifiquement sensible à l'effluent de papeterie (D) après extraction organique et concentration des polluants.

Ces résultats soulignent l'intérêt du test micronoyau sur pleurodèle. Il est applicable à des échantillons bruts ou dilués dans des conditions d'exposition proches de celles de l'environnement. Au contraire, le test d'Ames demande le plus souvent une préconcentration des micropolluants pour détecter leur potentiel génotoxique. Nos résultats montrent également que le spectre de sensibilité d'un essai n'est jamais suffisamment large pour faire face à toutes les situations ; ceci vient étayer une recommandation classique en toxicologie d'utiliser des essais complémentaires plutôt qu'un seul essai.

Dans le cadre d'une stratégie d'étude de la génotoxicité des effluents complexes, nous propèserions la démarche suivante consistant à :

1°) dans une première étape tester par le test d'Ames l'extrait organique et le lyophilisat des échantillons. Il n'est pas nécessaire de tester l'échantillon brut car celui-ci répond généralement négativement sur Ames.

2°) dans une deuxième étape, tester sur triton les échantillons non mutagènes sur Ames.

Cette démarche présente l'avantage d'être performante tout en satisfaisant aux contraintes économiques de limiter le coût des essais.

Par ailleurs les qualités du test micronoyau triton peuvent encore être améliorées sur le plan technique par :

1°) le renouvellement un jour sur deux du milieu d'essai, au prix cependant d'une légère perte de sensibilité

2°) l'automatisation de la lecture des frottis.

Il est apparu que la réponse des lots de larves au B(a)P était variable, celle-ci traduisant une différence de capacités métaboliques des organismes. Dans ces conditions, il semblerait judicieux d'introduire, dans la réalisation du test, un deuxième contrôle positif constitué par un composé mutagène direct. Il serait également intéressant qu'un composé métallique puissent être retenu comme contrôle positif lorsque l'origine de l'échantillon testé laisse supposer qu'il peut contenir des métaux. En effet l'utilisation d'une molécule organique comme contrôle positif pour des essais faisant intervenir des métaux peut être discutable. En fait, le problème du choix des contrôles positifs en mutagénèse fait toujours l'objet de discussions.

Un autre point, indépendant de la sensibilité des organismes, est la variabilité des résultats liée à la lecture des frottis. Cette variabilité étant due à la répartition non homogène des cellules à micronoyau sur le frottis.

Dès lors, l'amélioration qui nous semble prioritaire, est la mise au point de la lecture automatisée des frottis. Cette solution permettrait non seulement d'améliorer la précision des résultats en augmentant le nombre de cellules comptées, mais aussi de réduire le coût de réalisation du test. En attendant, le compromis que nous proposons est de compter les frottis témoins en triplicat pour cerner au mieux l'intervalle de confiance et de se reporter à l'examen des données brutes lorsque les conclusions sont ambiguës.

Connaître les potentialités génotoxiques d'un effluent est une information importante mais elle est encore plus intéressante si l'on peut en établir les causes. L'identification du ou des composés responsables de l'effet observé permettrait d'assurer une meilleure prévention et de mettre en oeuvre les traitements d'épuration adéquats. Seule l'association entre analyse toxicologique et physico-chimique peut aboutir à ce résultat.

C'est ce que nous avons réalisé pour tenter d'expliquer la génotoxicité des effluents BIIentrée, BI et BIII qui contenaient des métaux tels que le fer, le chrome III et VI et le zinc. Les hydrocarbures aromatiques (benzène, xylène et toluène) identifiés dans l'effluent BIII ont été mis hors de cause aux dilutions testées.

Tableau 31: Bilan des résultats de génotoxicité obtenus avec le test d'Ames et du test triton pour les métaux fer, chrome et zinc.

Essais	AMES		TRITON											
	I	II	2	3		4	5		6		7			
				a	b		a	b	a	b	a	b	c	
Eléments et concentrations étudiés	Fe 2.5 CrVI 1-5 Zn 1	Fe 50 CrIII 5.5-50 Zn 1	CrIII 0.1 à 5	CrVI 0.1 à 5	0.01 à 10	Zn 0.01 à 10	Fe 0.5 à 13.5	13.5*	Fe 0.6 CrVI 1 Zn 0.75	Fe 50 puis 25 CrIII 5 puis 2.5 Zn 1.5 puis 0.75	12.5 2.5	25 2.5	12.5 2.5 0.75	
Fe	-	-					-	-	-	-	-	+	-	+
CrIII		-	-										+	-
CrVI	+ (5)			+	-				-	+				
Zn	-	-		(0.1)		-			-	-		-	-	-
Fe Zn	-	-							-	-		-	+	
Fe CrIII		-										+	+	+
Fe CrVI	+								+	+				
CrIII Zn		-											-	-
CrVI Zn	+								-	-				
Fe CrIII Zn		-									+		+	+
Fe CrVI Zn	+								+	+				+

Notes : Les concentrations sont exprimées en µg/boîte pour le test d'Ames et en mg/l pour le test triton. \* concentration dont le précipité a été filtré.  
( ) concentration positive.

Nous avons résumé l'ensemble des résultats des essais de génotoxicité sur métaux dans le tableau 31. Il apparaît que le fer est clastogène chez le triton aux concentrations testées de 0,6 et 12,5 mg/l ; les effets du chrome III et du chrome VI sont moins évidents.

Des résultats positifs n'ont été trouvés qu'une fois sur trois environ aux concentrations de 2,5 mg/l pour CrIII et de 1 mg/l pour CrVI.

Sur la base des résultats du test triton, il semble que la génotoxicité de l'effluent BIIentrée (positif sur triton et négatif avec Ames) contenant du chrome III (10 mg/l) et du fer en forte concentration (105 mg/l) puisse être attribuée en majeure partie au fer III. En revanche, les propriétés clastogènes des effluents BI et BIII (positif sur Ames et triton), contenant principalement du fer (10 à 20 mg/l) et du chrome VI (20 à 40 mg/l), nous semblent s'expliquer par l'additivité des effets de ces métaux.

Une certaine variabilité apparaît dans la réponse des larves à la génotoxicité du fer et du chrome . Ainsi, lorsqu'une réponse négative est obtenue pour Fe III et Cr VI un effet d'interaction entre ces métaux peut être observé. C'est ce que nous avons obtenu pour la modalité FeCr de l'essai 6a.

Cette variabilité de réponse des larves peut vraisemblablement être imputée à l'état physiologique et à des conditions métaboliques qui peuvent différer selon les lots d'organismes.

Dès lors, lorsqu'un effet d'interaction est mis en évidence entre FeIII (0,6 mg/l) et CrVI (1 mg/l) celui-ci n'est peut-être que le reflet de la génotoxicité du fer qui s'exprimerait d'autant plus facilement que les organismes sont sensibilisés par l'action conjointe d'une autre substance toxique.

Actuellement, la législation sur les rejets industriels régit les niveaux de concentration du fer et du chrome. Les normes de rejet de ces métaux dans les effluents épurés sont de 5 mg/l pour Fe et 0,1 mg/l pour CrVI (Journal Officiel du 16 novembre 1985). Il est intéressant de souligner que la concentration en fer (0,6 mg/l) que nous avons utilisées dans nos essais est très inférieure à la limite réglementaire.

Or, nos résultats montrent qu'un métal tel que le fer, dont on considère qu'il ne présente pas de risques majeurs pour l'environnement, peut devenir problématique lorsqu'il se trouve associé à du chrome hexavalent.

La mise en évidence de propriétés génotoxiques propres au fer vient s'ajouter aux questions actuelles des hygiénistes et toxicologistes sur la réelle innocuité de ce métal.

Il est évident que les effets d'interaction qui peuvent être révélés par les essais biologiques devront être pris en compte, au cours des décennies à venir, pour l'établissement des normes de rejet. Un réel effort de recherche devra être fait dans ce sens pour définir quelles associations de polluants sont à éviter. Dans ce contexte, le test triton nous semble être un outil performant pour la mise en évidence des interactions entre polluants.