



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

v3 70573

# THESE

présentée à l'Université de METZ  
en vue de l'obtention du grade de:

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ**

MENTION : SCIENCES DE LA VIE  
SPECIALITE : ECOTOXICOLOGIE

par

**Mohamed BENYAHIA**

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19910245
Cote	S/M3 91/12
Loc	Magasin

**ETUDE DE LA CONTAMINATION DU BIVALVE D'EAU DOUCE  
*DREISSENA POLYMORPHA* PAR LE PLOMB.  
BIOACCUMULATION, DISTRIBUTION TISSULAIRE ET ELIMINATION DU METAL.  
INCIDENCE DE PARAMETRES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES.**

Soutenu le 25 juin 1991 devant le jury composé de:

Président:	Mr B. El KAIM	Professeur à l'Université Paris VI
Rapporteurs:	Mme N. DHAINAUT	Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille
	Mr J.L. MOREL	Professeur à l'E.N.S.A.I.A de Nancy
Directeur de thèse:	Mr J.C. PIHAN	Professeur à l'Université de Metz
Examineur:	Mr M. KHALANSKI	Ingénieur chercheur, Direction des Etudes et Recherches E.D.F.

## AVANT-PROPOS

*Le travail exposé dans ce mémoire a été réalisé au Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Metz. Il a été dirigé par le Professeur J.C. PIHAN, Directeur du laboratoire. Que celui-ci veuille bien trouver ici l'expression de ma profonde gratitude pour m'avoir confié ce sujet de recherche qui s'insère dans l'approfondissement de la connaissance de l'écotoxicologie des métaux lourds chez Dreissena et de son utilisation en biomonitoring. Qu'il soit sincèrement remercié pour mon initiation à la recherche, et la confiance qu'il m'a accordée en me laissant toute liberté pour présenter mon travail à l'extérieur chaque fois que ce fut possible. Son encourageante attention, sa cordiale autorité, ses conseils et critiques constructives m'ont aidés tout au long de ce travail. Je le remercie très vivement et l'assure de ma profonde reconnaissance.*

*J'adresse mes remerciements à monsieur M. NOURISSON Professeur Emérite à l'Université de Metz et ancien directeur du Laboratoire d'Ecologie, pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé à mon arrivée au laboratoire.*

*Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Madame le Professeur N. DHAINAUT de l'université de Lille et à Monsieur le Professeur J.L. MOREL de l'ENSAIA INPL de Nancy qui, malgré leurs charges, ont accepté avec bienveillance et intérêt le travail de rapporteur. Je les prie de trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour avoir bien voulu juger mon travail.*

*Je suis très sensible à l'honneur que me fait le Professeur B. ELKAIM de l'Université de Paris VI en acceptant de présider mon jury de thèse. Je le remercie très sincèrement et le prie de croire à ma profonde reconnaissance.*

*J'adresse mes très vifs remerciements à Monsieur M. KHALANSKI, Ingénieur Chercheur à la Direction des Etudes et Recherches EDF (Chatou) pour avoir accepté, avec bienveillance, de siéger dans mon jury.*

*Il m'est particulièrement agréable d'exprimer mes remerciements et ma gratitude aux personnes qui, à divers titres, m'ont aidé dans la réalisation de mes recherches et de ce mémoire :*

*- Monsieur C. CROCHARD, Maître de conférence à l'Université de Metz et Madame M.-N. BEAUVAIS pour leur collaboration étroite dans la réalisation de l'étude histochimique et microanalytique.*

*- Messieurs Ph. WAGNER et J.F. POINSAINT pour leur précieuse aide sur le terrain lors des campagnes de récolte des dreissènes.*

*- Madame M. OLLIVIER pour son aide enthousiaste et efficace dans la documentation et sa collaboration dans la mise au net de la liste bibliographique. Qu'elle veuille bien recevoir mon amicale reconnaissance.*

*- Monsieur M. RIBETTE pour sa cordiale et efficace collaboration dans la réalisation des photos qui illustrent ce mémoire. Je lui exprime mes remerciements amicaux.*

*- Madame D. BEAUFILS pour sa gentillesse et son aide quotidienne. Je lui adresse ici mes vifs remerciements.*

*C'est avec un grand plaisir que je remercie très vivement mes amis : L. GIAMBERINI, F. GUEROLD, A. MAAROUF, R. MARZOU, A. MOUABAD, A. TOURARI.*

*Mes remerciements vont également à L. LEGLIZE pour avoir aimablement mis à ma disposition son matériel informatique et pour les discussions fructueuses que nous avons eues.*

*Je ne saurais oublier toutes les personnes du laboratoire qui m'ont offert leur amitié, aidé de leur soutien à diverses périodes de la réalisation de ce travail. Qu'elles soient assurées de ma profonde et amicale reconnaissance.*

*Enfin, à ma famille sans qui je n'aurais pu espérer faire de la recherche et à Juliette, je veux faire connaître mon affectueuse gratitude.*

*Les recherches faisant l'objet de ce mémoire ont pu être réalisées grâce à une bourse du M.E.N. du Maroc et au soutien financier des contrats de recherche CNRS-PIREN (ATP Ecotoxicologie) et EDF CPN-Cattenom.*



# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

1

## CHAPITRE I: ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I-1- <u>LE PLOMB DANS L'ENVIRONNEMENT.</u></b>	<b>5</b>
I-1-1- QUELQUES DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES.	5
I-1-2- PRODUCTION, CONSOMMATION ET UTILISATIONS.	5
I-1-3- LES REJETS DE PLOMB DANS L'ENVIRONNEMENT.	12
I-1-4- ASPECTS REGLEMENTAIRES ET NORMES.	20
<b>I-2- <u>CONTAMINATION DES SYSTEMES AQUATIQUES.</u></b>	<b>21</b>
I-2-1- ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUES.	23
I-2-2- ASPECTS BIOLOGIQUES.	32
<b>I-3- <u>ASPECTS DE LA BIOACCUMULATION ET DE LA DETOXICATION METALLIQUE     <u>CHEZ LES MOLLUSQUES AQUATIQUES.</u></u></b>	<b>34</b>
I-3-1- CONCEPTS GENERAUX.	34
I-3-2- PRISE DU METAL.	37
I-3-3- FACTEURS INFLUENÇANT LA PRISE ET L'ACCUMULATION.	41
I-3-4- EFFETS SUBCELLULAIRES ET BIOCHIMIQUES.	45
I-3-5- TRANSPORT, STOCKAGE ET ELIMINATION.	50
<b>I-4- <u>SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE ET PRESENTATION DU TRAVAIL.</u></b>	<b>55</b>

## CHAPITRE II: APPROCHE EXPERIMENTALE

### **II-1- MATERIELS BIOLOGIQUES.**

59

II-1-1- <i>DREISSENA POLYMORPHA</i> .	59
II-1-2- CHOIX ET CARACTERISTIQUES DE LA STATION DE REFERENCE.	61
II-1-3- RECOLTE DES ECHANTILLONS DE DREISSENES.	63
II-1-4- <i>CHLORELLA VULGARIS</i> .	63
<b>II-2- <u>METHODOLOGIE DE CONTAMINATION ET DE DECONTAMINATION.</u></b>	<b>63</b>
II-2-1- STABILISATION ET ACCLIMATATION.	63
II-2-2- DISPOSITIF EXPERIMENTAL.	65
II-2-3- PREPARATION DE LA NOURRITURE ALGALE.	67
II-2-4- DEFINITION DES PROTOCOLES DE CONTAMINATION ET DE DECONTAMINATION.	68
<b>II-3- <u>NIVEAUX D'ANALYSE ET TECHNIQUES UTILISEES.</u></b>	<b>71</b>
II-3-1- NIVEAUX D'ANALYSE.	71
II-3-2- TECHNIQUES UTILISEES.	72
<b>II-4- <u>EXPRESSION ET TRAITEMENT DES RESULTATS.</u></b>	<b>78</b>

<b>CHAPITRE III: ETUDE DES PROCESSUS DE CONTAMINATION ET DE DECONTAMINATION</b>
---

<b>III-1- <u>LE PLOMB DANS LE MILIEU EXPERIMENTAL</u></b>	<b>84</b>
<b>III-2- <u>TOLERANCE DES DREISSENES AU PLOMB.</u></b>	<b>87</b>
<b>III-3- <u>ETUDE DE LA CONTAMINATION PAR LE PLOMB.</u></b>	<b>90</b>
III-3-1- CONTAMINATION PAR VOIE DIRECTE.	90
III-3-1-1- Exposition continue à plusieurs concentrations en plomb.	90
III-3-1-2- Exposition cyclique au plomb.	98
III-3-1-3- Influence du facteur nutritionnel.	100
III-3-2- CONTAMINATION PAR VOIE TROPHIQUE.	104
III-3-3- COMPARAISON ENTRE LES 2 VOIES DE CONTAMINATIONS DIRECTE ET TROPHIQUE.	106
III-3-4- CONTAMINATION GLOBALE (DIRECTE + TROPHIQUE).	109

<b><u>III-4- INCIDENCE DE QUELQUES PARAMETRES DU MILIEU SUR LA CONTAMINATION</u></b>	
<b><u>DIRECTE.</u></b>	111
III-4-1- INFLUENCE DE L'EDTA.	112
III-4-2- INFLUENCE DES PHOSPHATES.	118
III-4-3- EFFET DE LA TEMPERATURE.	121
III-4-4- INFLUENCE DU ZINC.	127
<b><u>III-5- ETUDE DE LA VARIABILITE ET INFLUENCE DE LA SAISON.</u></b>	132
III-5-1- VARIABILITE DES RESULTATS DE BIOACCUMULATION.	132
III-5-2- INFLUENCE DE LA SAISON SUR LA BIOACCUMULATION.	137
<b><u>III-6- BIOACCUMULATION DANS LES ORGANES ET LOCALISATION TISSULAIRE DU PLOMB.</u></b>	146
III-6-1- BIOACCUMULATION DU PLOMB DANS LES ORGANES.	146
III-6-2- LOCALISATION TISSULAIRE DU PLOMB.	151
<b><u>III-7- ETUDE DE LA DECONTAMINATION.</u></b>	165
III-7-1- DECONTAMINATION AU NIVEAU DE LA PARTIE MOLLE TOTALE.	166
III-7-1-1- Influences des conditions de contamination.	166
III-7-1-2- Influence de la saison.	170
III-7-1-3- Incidence des paramètres du milieu: EDTA et Température.	172
III-7-2- DECONTAMINATION AU NIVEAU DES ORGANES.	174
III-7-3- DISCUSSION.	176
<b><u>SYNTHESE ET PERSPECTIVES.</u></b>	180
<b><u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.</u></b>	185
<b><u>ANNEXES.</u></b>	202

## INTRODUCTION

Au cours des siècles, l'homme a appris à modeler le monde physique selon ses besoins et, à aucune époque, il ne l'a fait avec autant de succès que depuis la révolution industrielle. Les produits de la technologie humaine ont contribué dans une large mesure à son bien-être.

Mais ces bienfaits n'ont pas été obtenus sans contrepartie car les procédés technologiques mis en oeuvre ont inévitablement entraîné des conséquences autres que celles directement recherchées. Ils ont en particulier créé de nouvelles conditions, de nouveaux échanges au sein des écosystèmes, modifiant les cycles biogéochimiques et produisant de plus en plus de substances résiduelles d'origine naturelle ou de synthèse. De ce fait, ils ont considérablement accru les risques de déséquilibre des systèmes écologiques.

L'homme dans son entêtement à vouloir fabriquer et stocker à tout prix, produit des déchets qui ne peuvent être résorbés. La difficulté majeure à laquelle l'humanité est confrontée désormais est l'évaluation correcte du coût (intégrant le coût de la pollution) des progrès technologiques. Autrement dit le prix à payer pour les effets néfastes par rapport aux bénéfices connus.

Parmi les nombreux agents polluants produits par l'activité humaine, les métaux lourds constituent un exemple de bouleversement des cycles géochimiques conduisant à une augmentation significative de leurs concentrations dans les écosystèmes.

Du fait des besoins croissants en eau liés à un large éventail d'activités humaines, notamment l'exploitation de ressources métalliques, les systèmes aquatiques deviennent particulièrement exposés à ce type de pollution. Le problème de la pollution des eaux représente de nos jours l'un des aspects les plus inquiétants de la dégradation de l'écosphère.

La prise de conscience de cette pollution métallique aquatique a conduit à l'élaboration de programmes d'études sur l'accumulation des métaux dans les écosystèmes aquatiques tant au niveau biotique qu'abiotique. Parallèlement à ces études en milieu naturel donnant une vision réelle et globale des processus de contamination, des études de laboratoire réalisées sur un organisme ou une population, malgré les simplifications inhérentes à l'approche expérimentale, permettent une

meilleure compréhension et une approche beaucoup plus explicative des processus de contamination.

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à la contamination expérimentale de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* par le plomb. Nous avons choisi le plomb car il s'agit d'un micropolluant très souvent rencontré dans les eaux soumises à une pollution en association avec le zinc et le cadmium. Il s'agit de surcroît d'un élément xénobiotique n'intervenant dans aucun processus biochimique connu, et donc indésirable, même à de faibles concentrations.

Le choix de *Dreissena polymorpha* découle de travaux antérieurs réalisés in situ sur le niveau de contamination métallique et la faculté de bioindicateur de quelques espèces de mollusques d'eau douce de la rivière Moselle (Nord-est, France) (Laboratoire d'écologie Metz, 1981; 1985).

La dreissène est un bivalve filtreur fixé donc continuellement en contact avec le milieu environnant et de ce fait bien placé pour refléter une contamination. Cette espèce est largement répandue dans les systèmes aquatiques d'Europe, elle est en outre douée d'un grand pouvoir accumulateur de micropolluants (Lab. Ecol. Metz, 1981; 1985; Léglize et Crochard, 1987). Tous ces arguments militent en faveur de l'utilisation de *D. polymorpha* dans les études de bioaccumulation à l'instar de *Mytilus edulis* en milieu marin.

Dans ce travail, nous nous sommes orientés plus particulièrement vers l'étude des cinétiques de bioaccumulation et d'élimination du plomb par la dreissène en fonction de paramètres du milieu (température, EDTA, phosphates, Zinc), du mode de contamination (voie directe ou trophique) et de la saison. Nous avons également recherché la localisation du métal dans l'organisme, le mode de transport et les sites d'accumulation.

Le premier chapitre de ce mémoire est consacré à l'analyse bibliographique de la contamination de l'environnement par le plomb. Une part importante est réservée à l'impact sur les systèmes aquatiques et aux différentes modalités de contamination des organismes aquatiques, en particulier les mollusques. Dans la fin de ce chapitre, nous présentons une synthèse bibliographique en mettant en exergue les principaux aspects en relation avec notre objectif de recherche, à savoir les processus de bioaccumulation et d'élimination des métaux chez les mollusques aquatiques.

La méthodologie suivie pour la réalisation de la partie expérimentale, les matériels et les techniques utilisés ainsi que le traitement des données recueillies sont présentés dans le 2<sup>e</sup> chapitre.

Le chapitre 3 est consacré à la présentation et à la discussion des résultats des processus de contamination et de décontamination, en relation avec les paramètres pris en compte.

Dans la fin de ce mémoire nous présentons un exposé synthétique de l'ensemble de nos résultats, tout en précisant les thèmes à développer et les orientations de recherches envisagées.

**CHAPITRE I: ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE.**

## **I-1- LE PLOMB DANS L'ENVIRONNEMENT.**

### **I-1-1- QUELQUES DONNEES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LE PLOMB.**

Le tableau 1 résume les propriétés physico-chimiques du plomb. Ce métal fait partie des éléments du groupe IV (C, Si, Ge, Sn et Pb) de la classification périodique. Le caractère électropositif dans ce groupe augmente avec le nombre atomique et le plomb est franchement métallique comparé au Carbone et Silicium. Le plomb, à la différence du C et Si, ne forme pas de liaison avec un autre atome identique et montre une nette décroissance de la covalence. Il possède des états stables d'oxydation de +2 et +4.

Les éléments du groupe IV forment des organodérivés, le plomb forme des composés alkyl et aryl. A l'exception des nitrates et acétates, la majorité des sels de plomb (+2) sont insolubles dans l'eau.

Le plomb est classé comme un accepteur intermédiaire entre les acides forts et faibles dans ses interactions avec des ligands (tableau 2). Un accepteur fort est caractérisé par une faible polarisabilité, faible électronégativité, une grande densité de charge positive (état d'oxydation élevé et faible rayon) et la formation de liaisons ioniques. Les caractères inverses sont valables pour un accepteur faible qui forme essentiellement des liaisons covalentes. Le plomb ressemble par son comportement chimique au groupe des alcalino-terreux divalents, plutôt qu'à son propre groupe, exception faite de la faible solubilité de ses sels, tels que les hydroxydes, sulfates et phosphates.

Le plomb est un métal bleuâtre ou gris argenté mou et lourd. Il se présente principalement comme un mélange de deux isotopes  $Pb^{206}$  et  $Pb^{208}$ . Il est très malléable mais ne possède pas de ténacité et se contracte considérablement au refroidissement. Le plomb métallique est peu soluble dans l'eau et les acides dilués. Par contre, il se dissout dans les acides concentrés chauds (nitrique, sulfurique).

### **I-1-2- PRODUCTION, CONSOMMATION ET UTILISATION.**

#### **- Généralités :**

Le plomb est l'un des plus vieux métaux connus par l'homme. Son utilisation à des



**Tableau 1: Propriétés physico-chimiques du plomb.**

---

Poids atomique.....	207.2
Nombre atomique.....	82
Point de fusion .....	327.4°C
Coef.de conductibilité thermique.....	K= 27
Ebullition à 760 mm de pression .....	1613°C
chaleur spécifique .....	0.03 cal/g/°c
Chaleur lat. de fusion.....	5.4-6.26 cal/g/°c
Coef.de dilatation linéaire(17 à 100°C).....	0.0000293
Densité à 20°C .....	11.35
Densité à 327.4°C solide .....	11.005
Densité à 327.4°C liquide.....	10.686
Densité à 550°C.....	10.418
Volume atomique.....	18.27
Conductivité électrique à 0°C .....	50500 mho
Charge de rupture.....	1.4 kg/mm <sup>2</sup>
(p.vit.tract.0.5mm/mn t°.20°C)	
Charge de rupture.....	1.7 kg/mm <sup>2</sup>
(p.vit.tract. 25mm/mn)	
Charge de rupture R à t°C.....	$R = \frac{1.5(327-t)^2}{10^5}$
Module de traction (environ).....	1700 kg/mm <sup>2</sup>
Limite élastique (environ).....	0.2 kg/mm <sup>2</sup>
Dureté Brinell.....	3.2 - 4.5
(bille de 10mm chargée à 100kg pdt 30sec.)	

---

**Tableau 2: Classification des accepteurs et donneurs d'électrons (adapté d'après Pearson,1968, In: Metal pollution in the aquatic environment,1984).**

---

<u>Accepteurs forts</u>	<u>Intermédiaires</u>	<u>Accepteurs faibles</u>
H <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Be <sup>2+</sup> Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> , Al <sup>3+</sup> , Cr <sup>3+</sup> , Co <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup> , As <sup>3+</sup>	Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup> , Ni <sup>2+</sup> Cu <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , <u>Pb</u> <sup>2+</sup>	Cu <sup>+</sup> , Ag <sup>+</sup> , Au <sup>+</sup> , Tl <sup>+</sup> Hg <sup>2+</sup> , Pd <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pt <sup>2+</sup> , CH <sub>3</sub> Hg <sup>+</sup>

---

<u>Donneurs forts</u>	<u>Intermédiaires</u>	<u>Donneurs faibles</u>
H <sub>2</sub> O, OH <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , Cl <sup>-</sup> PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> O <sup>2-</sup>	Br <sup>-</sup> , NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	SH <sup>-</sup> , S <sup>2-</sup> , RS <sup>-</sup> , CN <sup>-</sup> , SCN <sup>-</sup> , CO, R <sub>2</sub> S, RSH

---

fins utilitaires ou ornementales remonte à la plus haute antiquité. Le plomb fut utilisé comme mesure de poids, instrument monétaire ou encore dans les canalisations d'eau et comme matériau de construction.

Après avoir utilisé le plomb pendant près de cinq millénaires, on estime qu'au seuil du XIXe siècle, l'humanité avait consommé au maximum 5 millions de tonnes de ce métal, chiffre équivalent à la consommation mondiale actuelle d'une année. Cette comparaison souligne l'ampleur de la révolution industrielle au siècle dernier.

#### **- Production et consommation :**

Le plomb est un métal assez répandu sur le globe. On retient en général comme concentration moyenne dans l'écorce terrestre 16 ppm avec 8 ppm pour les roches basiques et 20 ppm pour les roches acides.

Les principaux minerais de plomb sont la Galène (PbS) et la Cérusite (PbCO<sub>3</sub>). Il existe aussi d'autres minerais plombifères tels que: l'anglésite (sulfate de Pb), la wulfénite (molybdate), la pyromorphite (chlorophosphate) et la crocoïte (chromate), etc...

Il faut noter par ailleurs que les ressources en certains métaux ne sont pas indépendantes de l'extraction du plomb. Ainsi, on se trouve bien souvent en présence de gisements mixtes plomb-zinc-cuivre. En outre, l'Argent est un sous-produit quasi-constant de l'extraction du plomb.

La production globale de plomb par les mines et les fonderies a été relativement élevée et croissante durant ce siècle. Elle a totalisé  $9,6 \times 10^6$  tonnes entre 1900-1909, atteignant  $27,7 \times 10^6$  tonnes durant la période 1960-1969. La production s'est élevée ensuite à  $38.10^6$  tonnes durant les années 70. Le tableau 3 donne la production mondiale minière et métallurgique du plomb en 1971. Les principaux pays producteurs sont les USA, l'URSS, l'Australie, le Canada, la Yougoslavie, la Suède, l'Espagne et la France.

#### **- Utilisations Industrielles du Pb :**

Le plomb se distingue par une série de propriétés originales qui font que ses applications dans le domaine économique sont diversifiées. Ces propriétés sont essentiellement l'inertie chimique devant les acides dilués ou concentrés et les agents habituels de corrosion atmosphérique ou aqueuse, une forte densité, un faible point de

**Tableau 3: Production et consommation du monde, de la CEE et de la France en 1971. (Extrait de: la pollution par le Pb et ses dérivés, 1974)**

Production minière mondiale.....	3471000 t
Production minière CEE et pays associés.....	126100 t
Production minière française.....	29800 t
Production métallurgique mondiale.....	3852700 t
Production métallurgique CEE et pays associés.....	663200 t
Production métallurgique française.....	216500 t
Consommation mondiale.....	3876100 t
Consommation CEE et pays associés.....	788700 t
Consommation française totale.....	243000 t

**Tableau 4: Evolution de la consommation de plomb par classe de produit aux USA (en 10<sup>3</sup> tonnes). (D'après Moore et Ramamoorthy, 1984)**

Classe de produit	1960	1970	1974	1978	1979
Produits métalliques...	336.1	319.4	289.6	221.9	237.3
Accumulateurs.....	326.1	539.5	774.4	879.3	814.3
Colorants.....	89.6	89.8	108.3	91.6	90.8
Produits chimiques.....	151.5	253.8	228.3	178.5	186.9
Divers.....	30.1	37.1	47.0	61.4	28.9
TOTAL.....	933.4	1239.6	1447.6	1432.7	1358.2

fusion, une ductilité élevée, un indice de réfraction élevé du silicate de Pb, la coloration stable et vive de nombreux sels et l'activité toxique de certains sels.

Parmi les utilisations les plus importantes du plomb et de ses composés, nous pouvons distinguer deux ensembles :

a- Plomb métallique et alliages:

Le plomb est particulièrement utilisé dans la fabrication des batteries d'accumulateurs. C'est l'emploi le plus important puisqu'il représente environ 44 % de la consommation mondiale et 60 % de la consommation totale aux USA en 1979 (Tableau 4).

Dans l'industrie du bâtiment, le plomb est utilisé sous forme de tôle plombée ou feuilles de Plomb comme matériau de revêtement des toitures. Les canalisations anciennes sont le plus souvent en plomb, mais bien qu'il offre de nombreux avantages dans ce domaine, on évite actuellement son utilisation du fait du danger présenté par le saturnisme hydrique.

L'industrie des munitions consomme également beaucoup de plomb. En effet, la consommation pour cet usage représentait en 1960 aux USA, 11,8 % de la consommation totale du Pb métallique et de ses alliages; elle est passée en 1974 à 26,5 % et à 22,4 % en 1979 (Moore et Ramamoorthy, 1984).

Le plomb est utilisé pour le gainage des câbles souterrains ou sous-marins. Cette gaine assure l'étanchéité et constitue un blindage électrique utile.

Le plomb est employé aussi comme protection contre les rayonnements. Les principales applications sont la radiologie médicale, les centrales nucléaires et la fabrication de télévision-couleur.

Le plomb est également employé dans les réseaux de distribution de gaz et sert aussi comme écran aux vibrations et pour l'isolation sonore.

L'industrie automobile consomme une certaine quantité de plomb, celui-ci étant particulièrement employé pour la garniture des freins, le plombage des pistons, pour la fabrication des radiateurs, dans les batteries et comme matériau antivibration.

b- Les composés du plomb:

Certains composés organiques et inorganiques du plomb sont particulièrement utilisés par les industries pétrolières et celles des peintures et vernis.

L'industrie pétrolière emploie des composés alkyles, à savoir le plomb tétraéthyle et tétraméthyle comme additifs antidétonnants dans les carburants; la limite maximale d'adjonction dans les essences est de 0,64 g/l. Les concentrations moyennes utilisées actuellement varient entre 0,3 et 0,5 g/l selon les pays. A cet égard, des mesures anti-pollution ont été prises pour réduire la teneur et les émissions de plomb des carburants. Mais des contraintes techniques subsistent encore et limitent l'extension de l'utilisation de l'essence sans plomb et des procédés anti-pollution.

Aux USA, en 1975, 75 % de la consommation totale en plomb étaient utilisés pour les additifs antidétonnants et la fabrication des batteries.

L'industrie pétrolière utilise également des dérivés organiques du plomb pour améliorer les qualités physiques de certaines huiles de graissage.

En cristallerie, le plomb est employé sous forme d'oxydes qui confèrent au cristal sa limpidité, son éclat, son indice de réfraction et le timbre.

L'industrie des peintures consomme une quantité appréciable de composés inorganiques de plomb, principalement des chromates et certains silicates de plomb. Pour les peintures de protection des métaux, le principal pigment utilisé est l'oxyde rouge ou minium ( $Pb O_4$ ).

Le plomb entre également dans la fabrication des objets en porcelaine, céramique et faïence. Ces objets sont très généralement recouverts d'émaux à base de silicates complexes de plomb. Ces émaux assurent la dureté des surfaces et la longue conservation, ils apportent aussi un effet esthétique (éclat, coloration). En ce qui concerne les céramiques, faïences et porcelaines entrant en contact avec des denrées alimentaires, des législations pour le contrôle de la qualité des émaux ont été établies à cause de certains cas d'intoxication constatés. La norme américaine est la suivante : "Tout article culinaire émaillé, exposé à l'attaque d'une solution d'acide acétique à 4 % pendant 24 h à température ambiante, ne doit libérer un taux de plomb soluble supérieur à 7 ppm .

**Tableau 5: Les émissions annuelles de plomb par les sources naturelles. (D'après Nriagu, 1979)**

Sources	Production globale (10 <sup>6</sup> tonnes)	Emissions globales annuelles (10 <sup>3</sup> tonnes)
Poussières du sol.	500 (6-1100)	16 (0.19-35)
Feux de forêts.	36 (2-200)	0.5 (0.04-2.8)
Particules volcanogéniques.	10 (6.5-150)	6.4 (4.2-96)
Végétation.	75 (75-1000)	1.6 (1.6-21)
Embruns de sels marins.	1000 (300-2000)	0.02 (0.01-0.05)
TOTAL.		24.5

**tableau 6: Evolution de la consommation globale et de l'émission de plomb dans l'atmosphère. (d'après Nriagu, 1979)**

Période	Consommation (en 10 <sup>6</sup> tonnes)	Emission (en 10 <sup>3</sup> tonnes)
pre-1850	55	2420
1850-1900	25	1100
1901-1910	10.7	471
1911-1920	11.2	493
1921-1930	14.2	1120
1931-1940	14.6	1639
1941-1950	14.9	1672
1951-1960	24	2694
1961-1970	33	3704
1971-1980	38	4265
TOTAL	241	19578

En France, il n'existe pas de norme similaire, mais l'emploi des objets culinaires émaillés est réglementé par le décret du 15 avril 1912, confirmé par le décret du 15 août 1937 (Rapport AFEE, 1976)

Certains sels de plomb sont utilisés comme molluscicides, fongicides et anti-bactériens. L'arséniate de plomb a été employé comme insecticide en agriculture. Sa principale utilisation a été la lutte contre les doryphores. Ce composé n'est plus guère utilisé en agriculture.

Les différentes utilisations du plomb sont très nombreuses et touchent des domaines très divers. Nous pouvons rappeler d'autres secteurs où le plomb est employé en petite quantité : joaillerie de fantaisie, instrument de musique, plomb de scellement, miroiterie etc...

### I-1-3- LES REJETS DE PLOMB DANS L'ENVIRONNEMENT.

En général, il est possible de distinguer deux sources de diffusion du plomb dans l'environnement :

- l'une d'origine géologique naturelle,
- l'autre d'origine anthropique.

L'origine naturelle est due aux activités volcaniques, à des poussières des sols, des feux de forêts ou à des embruns de sels marins. Le tableau 5 donne le tonnage des émissions annuelles de plomb par les sources naturelles. Les poussières du sol représentent la source principale du plomb atmosphérique d'origine naturelle suivie des émissions volcaniques. Ces émissions constituent le niveau de base de la concentration en plomb dans l'atmosphère.

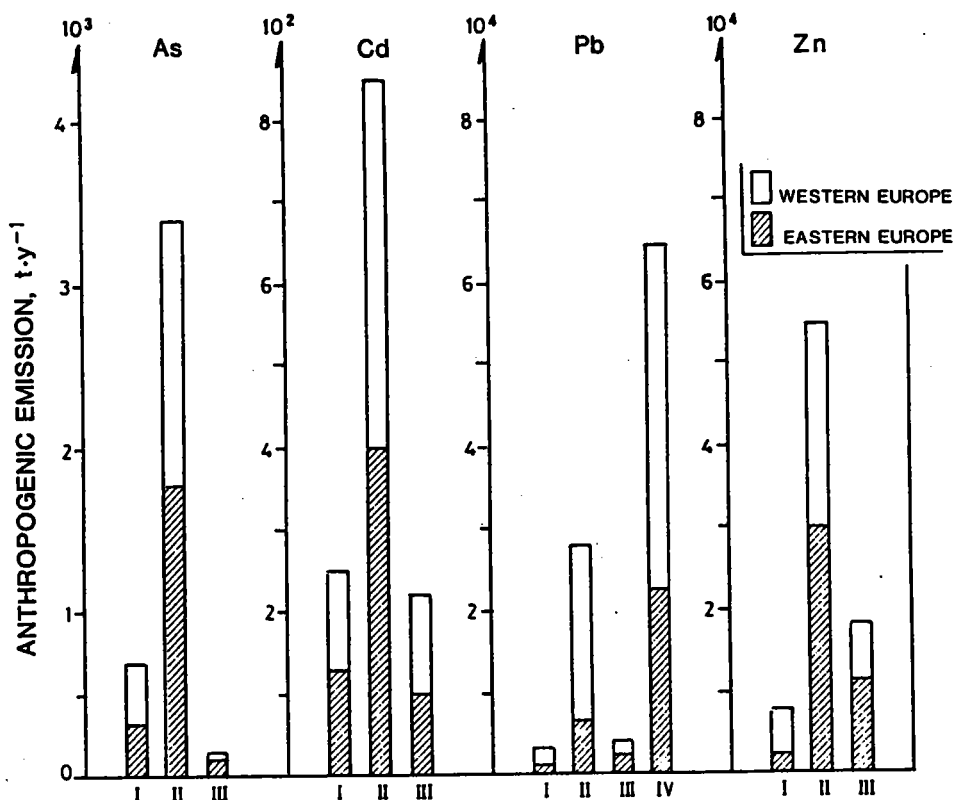
L'origine anthropique est de loin la plus importante. Le plomb est rejeté dans l'environnement sous forme d'émissions dans l'atmosphère ou d'effluents miniers et industriels.

#### **a- Les rejets atmosphériques:**

Les rejets de plomb dans l'atmosphère ont considérablement augmenté durant ce siècle. Ils ont atteint  $4,265.10^6$  tonnes durant les années 1971-1980 (Tableau 6).

**Tableau 7:** Les émissions de plomb anthropogénique par type d'activité dans l'atmosphère en 1975. (d'après Nriagu, 1979)

Sources	Production globale (en 10 <sup>6</sup> tonnes)	Emissions (en 10 <sup>3</sup> tonnes)
Mines, métaux non ferreux .....	16 .....	8.2
Production primaire de métaux non ferreux:		
Cuivre .....	7.9.....	27
plomb .....	4.0.....	31
nickel .....	0.8.....	2.5
zinc .....	5.6.....	16
Production secondaire de métaux non ferreux .....	4.0.....	0.77
Production de fer et acier .....	1300 .....	50
Applications industrielles.....	-- .....	7.4
Combustion de charbon.....	3100 .....	14
Combustion des huiles.....	2800 .....	273
Combustion du bois .....	640 .....	4.5
Combustion des déchets.....	1500 .....	8.9
Manufacture des phosphates fertilisants .....	118 .....	0.05
Divers .....	-- .....	5.9
<b>TOTAL .....</b>		<b>449</b>



**Fig.1:** Emissions anthropogéniques de métaux en Europe en 1984 (d'après Pacyna & Münch, 1987).  
 I: Combustion de combustible fossile; II: Production de métaux non ferreux; III: Autres sources; IV: Combustion d'essence.



Le tableau 7 montre la production globale et les émissions de plomb par secteur d'activité en 1975. La combustion des huiles et de l'essence représente plus de 50 % de l'ensemble des émissions anthropogéniques. La deuxième source majeure comprend la production de métaux non ferreux et la production de fer et d'acier.

Pacyna et Münch (1987) ont étudié les émissions atmosphériques de certains métaux lourds dont le plomb en Europe occidentale et Europe de l'Est. Leurs estimations montrent que la combustion des carburants est la source majeure d'émissions de plomb, malgré les limitations de son utilisation dans l'essence. La production de métaux non ferreux occupe la seconde position (fig.1). D'après ces auteurs, ces estimations réalisées en 1984 seront encore valables pour au moins cinq autres années, sachant que la production de plomb dans toute l'Europe ne changera pas de façon significative et que des changements majeurs dans les technologies de production ne sont pas prévus dans les quelques années à venir (Pacyna et Münch, 1987).

Les conditions atmosphériques jouent un rôle déterminant dans la distribution et le devenir des aérosols de métaux lourds. Après rejet dans l'atmosphère, les aérosols subissent des transformations physico-chimiques telles que l'agglomération de particules fines, l'adsorption d'autres métaux à la surface des particules et le changement de spéciation chimique. Ils sont par la suite dispersés par les mouvements des masses d'air.

La nature chimique des aérosols de plomb est incomplètement connue. Ter Haar et al. cités par Ravera (1974) ont trouvé dans des particules de plomb, principalement des carbonates de plomb, des oxycarbonates et des oxydes.

D'autres auteurs rajoutent à cette liste d'autres composés inorganiques tels que :  $\text{PbSO}_4$  et  $\text{PbClBr}$  (Heichel et Hankin cité par Förstner et Wittman, 1981).

La taille des aérosols de plomb émis par les véhicules semble assez constante et se situe entre 0.12 et 0.31  $\mu\text{m}$ , d'après les résultats du projet ILZRO cité par Ravera (1974).

Une importante littérature existe sur les concentrations de métaux dans l'air de différentes régions du monde. Les concentrations de plomb atmosphérique trouvées varient selon les milieux où les mesures ont été faites (milieu industriel, milieu urbain ou milieu rural).

**Tableau 8: Concentration du plomb dans l'air en  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ .  
(modifié d'après Ravera, 1974)**

lieu	valeurs moyennes
zone de circulation:	
Paris	6.5 *
Londres	8.7 *
Bruxelles	4.0 *
Zone metropolitaine:	
CEE	<2 **
Paris	0.4 - 6.5
Liège	0.98
Los Angeles	4.55 **
Zone rurale (CEE)	
" marine (Roscoff)	0.02 - 0.06 *
" montagneuse (3500 m)	0.02 - 0.03 *
" désertique (Los Alamos)	0.14 **

\*: moyenne mensuelle. \*\*: moyenne annuelle.

**Tableau 9: Apport atmosphérique direct du plomb dans les  
grands lacs américains (en tonnes/an).  
(modifié d'après Reid et Lulis, 1987)**

Lacs	Redéposition sèche	Redéposition humide	Redéposition totale
Supérieur	47	187	234
Michigan	83	457	540
Huron	86	318	404
Erie	52	173	225
Ontario	42	174	216

**Tableau 10: Plomb atmosphérique et flux de redéposition dans  
les cellules polaires. (modifié d'après Patterson,  
1987)**

Lieu	[Pb] atmos. $\text{ng}/\text{m}^3$	Flux net actuel $\text{ng}.\text{cm}^{-2}.\text{an}^{-1}$	Flux net ancien $\text{ng}.\text{cm}^{-2}.\text{an}^{-1}$
Cellule polaire nord	0.2 - 0.5	3	0.03
Cellule polaire sud	0.006	0.02	0.002

Le tableau 8 montre quelques exemples de teneurs moyennes en plomb dans l'atmosphère de différents milieux. Nous pouvons constater que c'est dans l'atmosphère des villes que les concentrations sont les plus élevées.

Le temps de persistance dans l'atmosphère des aérosols de plomb est estimé en moyenne à deux semaines (Garrels et al., 1975). Ces aérosols sont par la suite redistribués à la surface de la terre et des océans, soit par simple redéposition, soit par entraînement par les précipitations. Nous reportons à la figure 2 un schéma résumant les différentes voies atmosphériques et le devenir des particules de métaux lourds.

Plusieurs travaux ont porté sur les taux de redéposition du plomb au niveau du sol, des lacs et océans.

Reid et Lulis (1987) ont étudié les redépositions sèches et humides du plomb au niveau des grands lacs américains. D'après ces auteurs, l'apport atmosphérique est la source majeure d'introduction du plomb dans les grands lacs. Le tableau 9 résume l'apport atmosphérique de plomb par redéposition directe (voie sèche) ou par les précipitations (voie humide) dans les grands lacs américains.

En Hongrie centrale, de 1983 à 1986, le taux de redéposition au niveau du sol a été de 5,0 à 11,9  $\text{mg.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$  (Meszaros et al., 1987). Ce taux de redéposition, d'après ces auteurs, est similaire à celui trouvé dans les forêts de conifères à l'est des USA (6,9 à 14,7  $\text{mg.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ ), la redéposition en Allemagne paraît un peu plus élevée (13 à 29  $\text{mg.m}^{-2}.\text{an}$ ).

Dans les cercles polaires, malgré l'éloignement de toute source de contamination, des études récentes (Patterson et al., 1987 ; Boutron, 1988) montrent que les teneurs en plomb ont considérablement augmenté par rapport au niveau de base géologique (tableau 10).

#### **b- Rejets par les effluents miniers et industriels:**

L'exploitation des gisements de plomb a toujours occasionné des problèmes d'environnement, notamment les effluents, tels que l'eau de drainage des mines, les eaux polluées provenant du traitement des minerais et les eaux de ruissellement des orages ou averses. Il s'ajoute à cela, le dépôt des résidus stériles qui constituent un risque en cas d'infiltration.

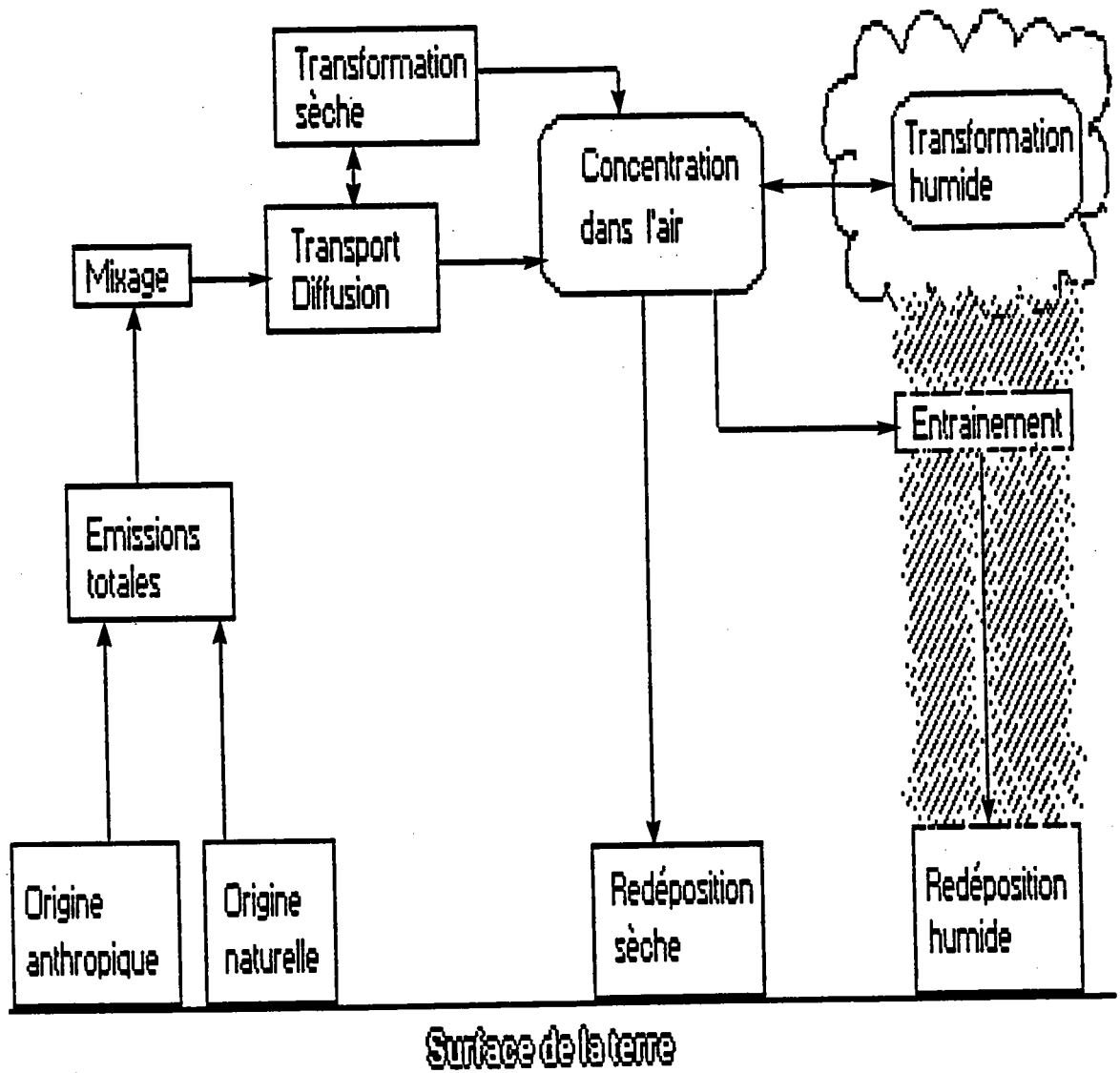


Figure 2: Voies atmosphériques majeures pour les aérosols de métaux lourds. (d'après Schroeder, 1987)

Il est à signaler à ce propos, l'étude de Faucherre et al. (1985) sur le degré de pollution de l'eau, du sol et de la végétation par les crassiers de la mine de plomb de Carnoules (Gard, France). La contamination du sol et des plantes selon ces auteurs est due essentiellement à l'irrigation par les eaux de la rivière Amous fortement polluées en aval de la confluence avec la rivière Reigous qui reçoit les canaux de drainage de la mine et les eaux de ruissellement (tableau 11). Les auteurs signalent aussi la disparition de la faune aquatique dans cette partie aval de la rivière.

Au voisinage d'autres mines, des concentrations de 200 mg/Kg ont été trouvées (Thompson et Crerar, 1980), allant jusqu'à dépasser 300 mg/kg comme par exemple dans les sols du bassin versant de l'orne (affluent de la Moselle, nord-est de la France) (Bonney et Bourg, 1984).

Comme nous l'avons vu plus haut, le plomb est très largement utilisé par les industries. L'industrie de production primaire et secondaire des métaux non ferreux est certainement la plus polluante. Dans les années 70, dans le nord de la France, l'usine Pennaroya de production de plomb et de zinc rejetait dans ces effluents jusqu'à 50 tonnes/jour de métaux lourds (Bogusz, 1987).

Par l'installation d'une station d'épuration des effluents avec l'assistance technique et financière de l'Agence de bassin Artois-Picardie, cette pollution a été réduite. Le tableau 12 résume la diminution des charges métalliques dans les effluents de l'usine Pennaroya.

D'après cet auteur, les rejets en Pb dans les effluents seront au maximum de 1,5 mg/l et moins de 30 Kg de Pb par jour.

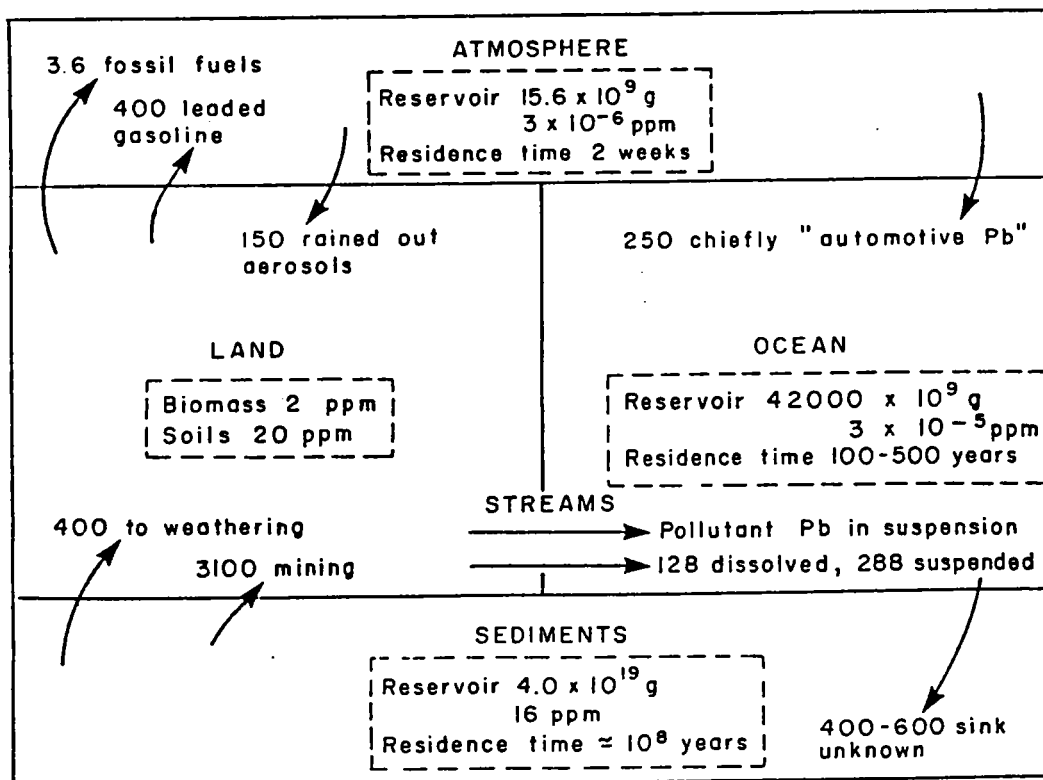
En définitive, le cycle biogéochimique du plomb a été profondément bouleversé par les apports anthropogéniques. L'estimation quantitative du cycle du plomb dans l'environnement, illustrée par la figure 3, montre que les activités minières et les émissions atmosphériques représentent les sources majeures de contamination de l'environnement. Les retombées du plomb atmosphérique constituent la source la plus importante du plomb dans des écosystèmes aquatiques marins et d'eau douce (Moore et Ramamoorthy, 1984; Boyle, 1987).

**Tableau 11:** Teneurs en plomb dans des sols cultivés contaminés par la mine de Carnoules (Gard, France) (d'après Faucherre et al, 1985)

sol non pollué	148 ppm Pb
sol pollué par irrigation	782 ppm Pb
sol pollué par les dépôts des poussières de crassiers	5802 ppm Pb

**Tableau 12:** Charges en plomb dans les effluents de l'usine Pennaroya en kg/jour. (d'après Bogusz, 1987)

Année	charges en plomb	pH de l'effluent
1970	5000	2 à 10
1986	200 à 1000	4 à 9



**Figure 3:** Estimation quantitative du cycle du plomb dans l'environnement (en  $10^6$  Kg/an.). (d'après Garrels et al., In Moore et Ramamoorthy, 1984.)

I-1-4- ASPECTS REGLEMENTAIRES ET NORMES.

- Air :

Nous reportons dans le tableau ci-après, les tolérances maximales pour la concentration de plomb dans l'air ambiant pour certains pays. Les valeurs indiquées représentent une moyenne sur une durée de 24 heures.

(D'après O.M.S., 1975 ; In Rapport AFEE, 1976)

- U.S.A ..... 2  $\mu\text{g Pb/m}^3$  (limite fixée par le State Air Preserver Board).
- U.R.S.S ..... 0,7  $\mu\text{g Pb/m}^3$  sauf Pb tétraéthyle.
- " ..... 1,7  $\mu\text{g Pb/m}^3$  sulfure de Pb.
- Tchécoslovaquie ..... 0,7  $\mu\text{g Pb/m}^3$  sauf Pb tétraéthyle.

En ce qui concerne le milieu professionnel, les concentrations maximales admissibles pour les teneurs en plomb dans l'air des ateliers ont été imposées dans la plupart des pays. En 1969, ces valeurs pour différents pays ont été les suivantes :

R.F.A. ....	0,20 $\mu\text{g/m}^3$
U.S.A. ....	0,20
Hongrie .....	0,02
Pologne .....	0,05
R.D.A. ....	0,20
Royaume-Uni .....	0,15
Tchécoslovaquie .....	0,06
U.R.S.S. ....	0,01
Yougoslavie .....	0,15

(D'après O.M.S., 1975 In Rapport AFEE)

Ces valeurs concernent des adultes en bonne santé, travaillant 8 heures par jour dans l'environnement considéré. Mais, d'après des enquêtes sanitaires, ces limites seraient dépassées dans un grand nombre d'ateliers de la majorité des pays (Rapport AFEE, 1976).

- Eaux :

Le Conseil des Communautés Européennes recommande dans sa directive du 16 juin 1975, une valeur de 50  $\mu\text{g/l}$  pour les eaux de surface destinées à la production d'eau alimentaire.

Pour l'eau de boisson, le Conseil des Communautés (1980) et l'O.M.S. recommandent une valeur maximale admissible de 50  $\mu\text{g/l}$ . Dans le cas de canalisations en plomb, la teneur ne devrait pas être supérieure à 50  $\mu\text{g/l}$  dans un échantillon prélevé après écoulement. Si l'échantillon prélevé directement ou après écoulement dépasse fréquemment 100  $\mu\text{g/l}$ , des mesures doivent être prises (CEE, 1980). En 1985, l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (U.S. E.P.A.) a proposé de réduire cette limite à 20  $\mu\text{g/l}$  (Levin, 1987).

- Sols et boues de station d'épuration :

La valeur limite de concentration du plomb dans les sols est de 300 mg/Kg de matière sèche.

La teneur en plomb des boues d'épuration destinées à l'utilisation agricole ne doit pas dépasser 1200 mg/Kg de matière sèche (CEE, 1986). Les quantités maximales de ces boues permises en épandage sont calculées en fonction des teneurs en métaux lourds et cela sur la base d'une moyenne de 10 ans. Pour le plomb, la valeur limite pouvant être introduite dans les sols cultivés est 15 Kg/ha/an (CEE, 1986). Signalons à ce propos la revue de Pihan et al. (1986) sur la contamination métallique des sols et de la production agricole irrigués par les eaux résiduaires en particulier sous climat aride.

## **I-2- CONTAMINATION DES SYSTEMES AQUATIQUES.**

Aux effluents miniers et industriels entrant directement dans les systèmes aquatiques, s'ajoutent les apports atmosphériques qui rejoignent les systèmes aquatiques, soit par redéposition directe, soit par entraînement par les précipitations et les eaux de ruissellement.

Ces différents flux de plomb entrant dans un système aquatique s'accompagnent de divers phénomènes physico-chimiques et biologiques, aboutissant à une répartition du métal entre les différents compartiments de l'écosystème aquatique. A cet égard,



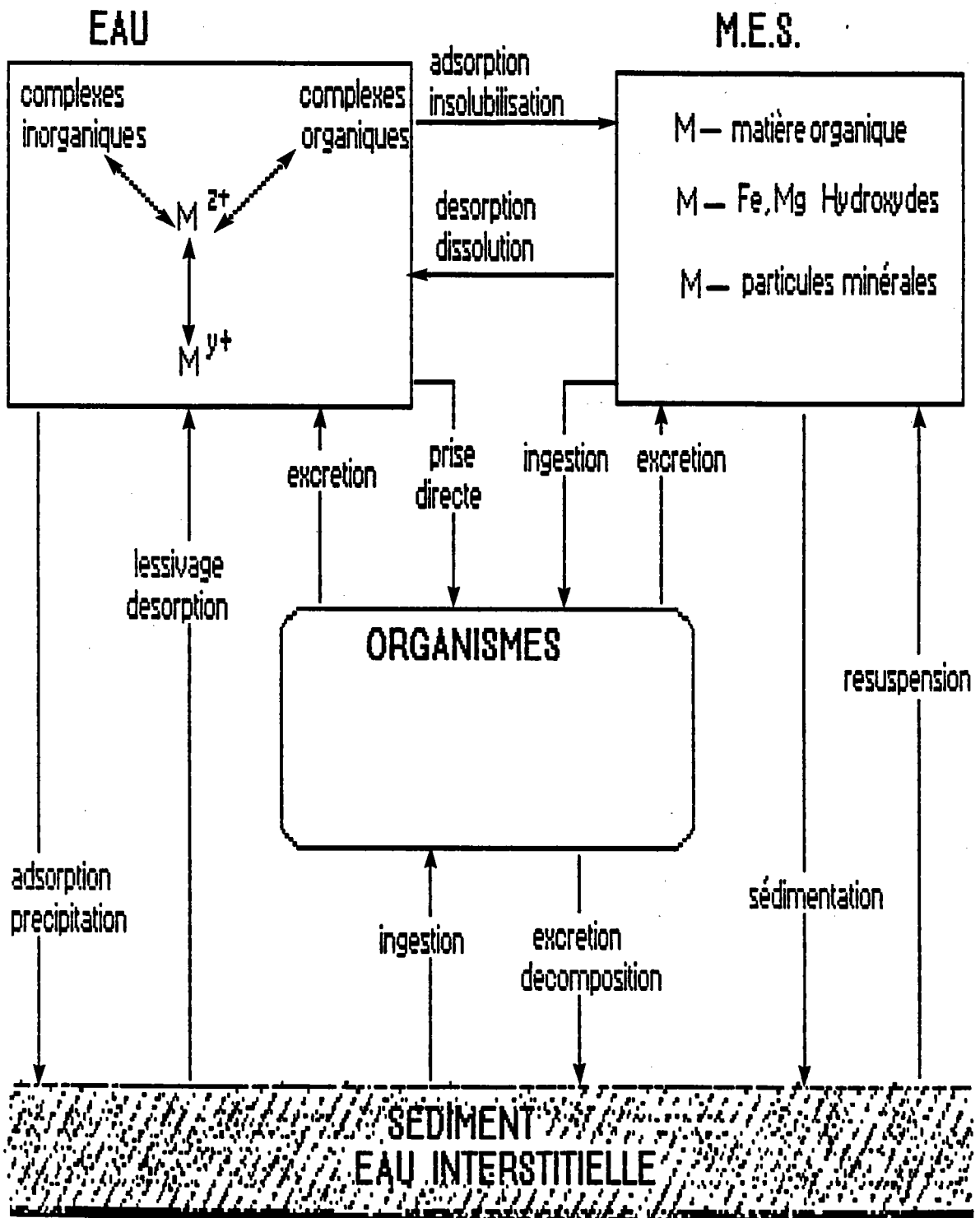


Figure 4: Répartition du plomb dans les systèmes aquatiques avec les principaux échanges entre les divers compartiments.

nous distinguerons un aspect physico-chimique et un aspect biologique de la contamination.

### I-2-1- ASPECTS PHYSICO-CHIMIQUES.

Le comportement du plomb dans les eaux naturelles est une combinaison d'équilibres de précipitation et de complexation par des ligands organiques et inorganiques.

Dans la phase dissoute, le plomb peut exister sous forme d'ion hydraté, de complexes organiques et inorganiques. Il peut être associé par adsorption à des matières en suspension et, par des phénomènes de coprécipitation et de sédimentation, rejoindre le sédiment.

La figure 4, qui illustre la répartition du métal dans un système aquatique, nous permet de distinguer une phase dissoute, une phase particulaire et le sédiment. Le compartiment biologique sera traité ultérieurement. Notons toutefois qu'il n'y a pas de limite stricte entre les formes dissoutes et particulaires du métal. La fraction colloïdale représente un continuum entre les deux extrêmes et est de plus très mal définie.

La limite opérationnelle entre les 2 fractions est la filtration à travers un filtre de porosité 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### - Le plomb dans la phase dissoute :

La spéciation du plomb dissous (filtrable à travers 0,45  $\mu\text{m}$ ) dépend de plusieurs paramètres du milieu, tels que le pH, le potentiel redox, la capacité de complexation du milieu, à savoir les complexants inorganiques ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{NO}_3^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{OH}^-$ , etc...) et les complexants organiques (ac. humique, fulvique, etc...). Le degré de mobilité du plomb dépend de l'état physico-chimique de ces complexes (constantes de stabilité).

Dans l'eau de mer par exemple à pH 8,1-8,2, les espèces dominantes sont  $\text{PbOH}^+$ ,  $\text{PbCl}^+$  et  $\text{Pb}^{2+}$  (Abdullah et Royle, 1972). L'espèce  $\text{Pb(OH)}_2$  ne domine qu'à pH = 9-10. A pH = 8,5 avec une concentration de chlorures entre 0,35 et 56,2 g/l,  $\text{Pb(OH)}^+$  est la seule espèce majeure (Hahne et Kroontje, 1973 cité par Moore et Ramamoorthy, 1984). A pH = 6,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Pb(OH)}^+$  sont présents à des concentrations égales.

Dans les eaux douces, les formes inorganiques rencontrées sont  $\text{Pb}(\text{OH})^+$ ,  $\text{Pb}(\text{HCO}_3)^+$ ,  $\text{PbCO}_3$  et  $\text{Pb}^{2+}$ .

Le plomb forme aussi des chélates avec des ligands organiques contenant des atomes capables de donner des doublets d'électrons: le soufre d'un groupe thiol, l'azote d'un groupe aminé ou l'oxygène de l'hydroxyle ou d'un carbanion ( $\text{COO}^-$ ).

Dans les eaux marines, seulement 10 % de la fraction dissoute sont complexés par des ligands organiques (acides humiques, fulviques), ceci à cause des faibles concentrations de ces ligands (0,2 à 0,3 mg/l). Les 90 % restant sont sous forme de complexes inorganiques labiles (Raspor et al., 1984).

Dans les eaux douces, plus chargées en matières organiques dissoutes, ces formes organiques du plomb dissous sont plus importantes (Mouvet, 1984; Raspor et al., 1984).

Le plomb se fixe davantage sur les acides humiques, la présence de Ca à des concentrations élevées augmente la fraction labile du plomb par compétition sur les sites des acides humiques (Campbell et Evans, 1987).

En ce qui concerne les concentrations en plomb dissous dans les eaux naturelles, les valeurs rencontrées dans la littérature sont très variables. Outre les différences existant entre les biotopes, divers paramètres peuvent influencer ces valeurs: le traitement des échantillons, les techniques analytiques ainsi que les problèmes de contamination.

En général, dans les eaux marines profondes, les concentrations moyennes en plomb sont  $< 0,05 \mu\text{g/l}$ . Dans certaines zones côtières soumises à une pollution, les concentrations sont nettement plus élevées:  $> 0,15 \mu\text{g/l}$  (Patterson et al., 1976). Abdullah et Royle (1972) ont trouvé des concentrations de plus de 0,3 à  $5 \mu\text{g/l}$ .

Dans les eaux douces, il est plus difficile d'établir une moyenne globale des concentrations compte tenu de la diversité des cours d'eau, de la nature des formations géologiques traversées et de l'influence des activités anthropiques dont l'impact est beaucoup plus important dans les eaux continentales que dans les eaux marines (Förstner, 1981). En moyenne, elles sont  $\leq 3 \mu\text{g/l}$ . Cependant, des niveaux plus élevés peuvent être atteints près des agglomérations ou des routes. Par exemple, dans certaines rivières du sud de la France, les concentrations varient entre 3,5 et  $53 \mu\text{g/l}$  (Servant et Delapart, 1979, cités par Moore et Ramamoorthy, 1984).

Dans les rivières en zones industrielles, les concentrations peuvent dépasser 100  $\mu\text{g/l}$ , par exemple dans la rivière Orne située en zone sidérurgique dans le nord-est de la France (rapports Lab. Ecologie Metz, 1981; 1985; Mouvet, 1984).

**- Le plomb dans la phase particulaire :**

De nombreuses études menées "in situ" dans les systèmes aquatiques montrent l'importance de la phase particulaire dans la distribution du plomb.

La concentration des matières en suspension est très variable dans les eaux naturelles, très faible dans certaines eaux marines de moyenne profondeur (inférieur à 0,1 mg/l), elle peut être de 10 à 100 mg/l dans les eaux de rivières et dépasser 1 à 10 g/l dans les milieux estuariens.

L'origine de ces matières en suspension est diverse, elle peut être lithogénique (argile, silice,...), biogénique (matière organique détritique ou vivante) et anthropogénique inorganique (oxydes de fer, d'Al, Mn).

Cette phase particulaire est un véritable piège pour les métaux, notamment le plomb (Mc Duffie et al., 1976; Nriagu et al., 1981; Mouvet, 1984; Breder et al., 1985; Pfeiffer et al., 1986). Plusieurs phénomènes sont à l'origine de la fixation du plomb sur les matières en suspension :

- Phénomènes de sorption : qui peuvent être physiques (physiosorption) par attraction électrique dépendant notamment de la charge des particules, ou chimiques (chimiosorption), par échange ionique.

- Phénomènes d'insolubilisation : par coprécipitations avec des hydroxydes de Fe et Mn, notamment sous conditions oxydantes. Dans ce cas, si les conditions deviennent réductrices, le plomb fixé par les hydroxydes sera mobilisé et passera dans la phase dissoute.

Par conséquent, les caractéristiques physico-chimiques du milieu, notamment le potentiel redox, le pH, la salinité et le carbone organique dissous sont les paramètres les plus influents (Förstner, 1981).

La taille des particules joue également un rôle primordial. En effet, la fixation est plus importante dans les particules fines (Mc Duffie et al., 1976 ; Förstner, 1981).

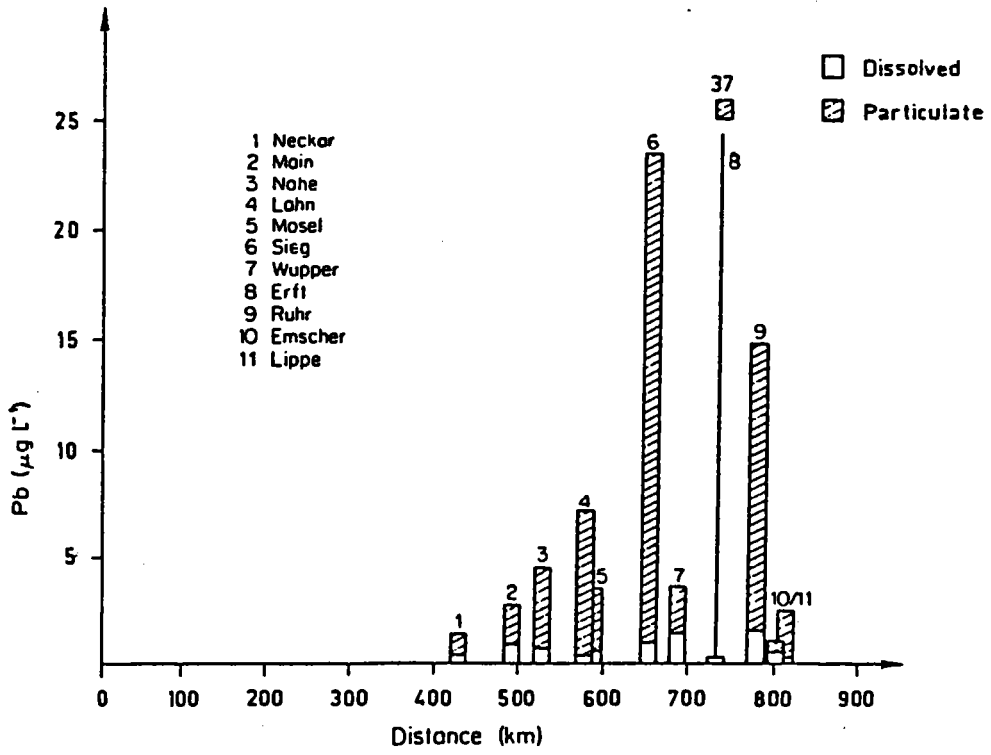


Fig.5: Plomb dissous et particulaire dans les affluents du rhin.  
(d'après Breder et al, 1985)

Des études menées sur le lac Ontario (Nriagu et al., 1981) montrent que plus de 60 % du Pb est sous forme particulaire. Mouvet (1984) rapporte que 96 % du plomb se trouve sous forme particulaire dans la rivière Meuse et 90 % dans la rivière Orne fortement polluée par les rejets sidérurgiques (nord-est de la France).

Dans le Rhin par exemple, la majeure partie du plomb est sous forme particulaire. Le rapport plomb particulaire/plomb dissous dans la partie supérieure du Rhin (lac de Constance - Bâle) est de 2.8 , il est de 7.1 dans la région de Coblenche, et de 9.5 dans la partie basse du Rhin (Emmerich). Dans certains affluents du Rhin tels que: Sieg, Erft et Ruhr, ces rapports atteignent respectivement 22.2 , 15.4 et 27.9 (fig.5), (Breder et al., 1985).

Dans les zones estuariennes, 69 % du plomb est présent dans la fraction particulaire (Moore et Ramamoorthy, 1984). Cette fraction particulaire conditionne la disponibilité des traces métalliques dans la phase aqueuse et assure une grande partie de leur transport (Mc Duffie, 1976 ; Nriagu et al., 1981). Resley et al. (1980), cités par Moore et Ramamoorthy (1984), rapportent que 90 % de la charge métallique du Mississippi sont transportés dans la phase particulaire.

#### **- Le plomb dans les sédiments :**

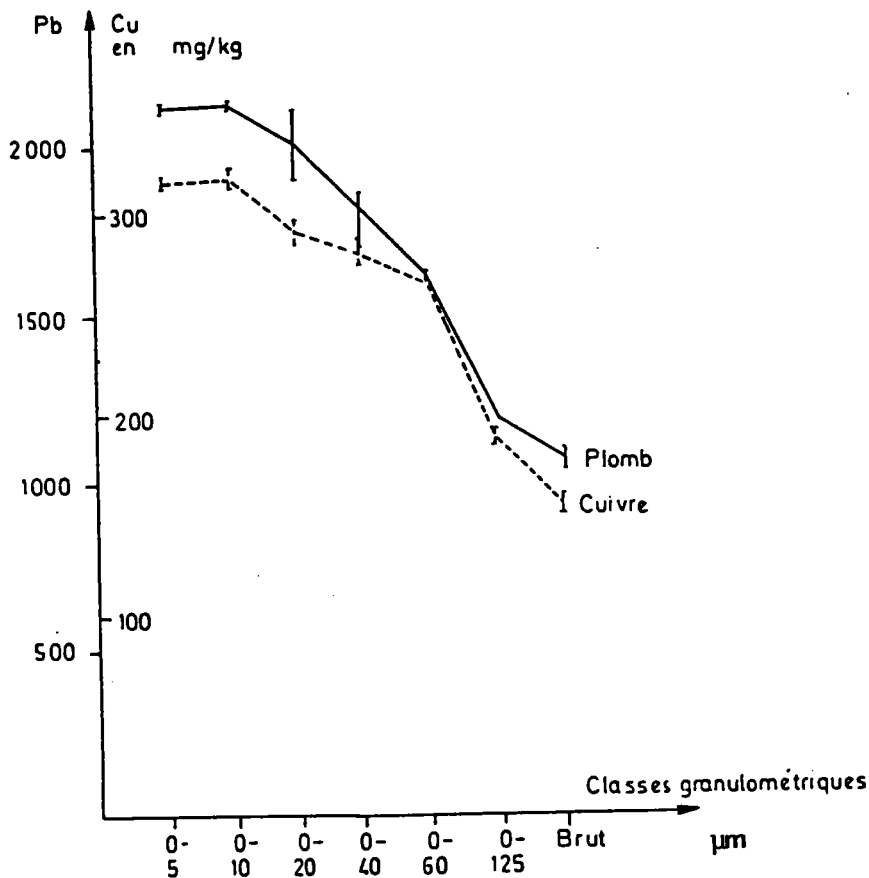
En milieu aquatique, les particules en suspension sont en partie à l'origine de la formation des sédiments. Ainsi, par sédimentation, le plomb fixé sur les particules se retrouve dans ce compartiment. Notons aussi que le plomb dissous peut s'adsorber directement à l'interface eau-sédiment.

En France, les premiers contrôles systématiques des teneurs métalliques dans les sédiments sont réalisés depuis 1977. De même, depuis 1981, des analyses de sédiments sont effectuées dans le cadre de l'inventaire de la qualité des eaux de surface (Robbe, 1981).

Toutes les recherches menées sur les écosystèmes aquatiques montrent le rôle majeur de stockage des métaux lourds joué par les sédiments. De nombreux paramètres influencent ce pouvoir d'accumulation, notamment la granulométrie, la teneur en matière organique du sédiment et les conditions hydrodynamiques par leur action sur l'interface eau-sédiment.

**Tableau 13: Niveaux de contamination de sédiments marins et d'eau douce par le plomb (en mg/kg poids sec) avec les sources de pollution. (compilé par Moore et Ramamoorthy, 1984)**

Lieu	moyenne (valeurs extrêmes)	Source polluante
<b>Sédiment d'eau douce:</b>		
Lac Coeur d'Alene (USA)	370 (3000-6300)	activité minière
Creek, Montana (USA)	295 (40-1710)	mine abandonnée
Rivière Illinois (USA)	28 (3-140)	industrielle et municipale
Lacs arctiques (Canada)	20 (10-33)	naturelle
<b>Sédiments marins:</b>		
Detroit Long island (USA)	-- (200-350)	industrielle
Plateau continental (S-E, USA)	<4	naturelle
Mer Baltique	-- (2-400)	industrielle
Sorffjord (Norvège)	11400 (720-70000)	mines et hauts fourneaux



**Figure 6: Variation des teneurs métalliques de sédiments fluviaux en fonction de la granulométrie.**

(d'après Robbe, 1981).

Comme le montre la figure 6, le plomb se concentre plus dans les fractions fines du sédiment. Les concentrations les plus élevées ont été obtenues dans la fraction < 16  $\mu\text{m}$  dans les sédiments de la mer Wadden en Hollande (Salomons et De Groot, cités par Förstner, 1981). Nriagu et Coker (1980) ont trouvé qu'environ 5 à 10 % du plomb dans les sédiments du lac Ontario sont fixés à de la matière organique. Les acides humiques et fulviques représentent respectivement 9 % et 1 à 4 % de cette matière organique.

Les niveaux de contamination des sédiments par le plomb sont très variables selon les biotopes. Le bruit de fond géochimique serait de 2 à 50 mg/Kg selon la nature des couches géologiques (Moore et Ramamoorthy, 1984), alors que les concentrations maximales rencontrées dépassent 6000 mg/Kg comme le montre le tableau 13.

Dans les sédiments du Rhin par exemple, des concentrations de plus de 500 mg/kg ont été enregistrées (fig.7). Le facteur d'enrichissement par rapport au niveau de base géochimique était de 18 en 1978 (Breder et al., 1985). Pour la Moselle allemande (affluent du Rhin) des teneurs de 753 mg/kg et de 726 mg/kg ont été trouvées respectivement pour les années 1977 et 1978 (fig.8) (Breder et al., 1985).

Le métal piégé dans les sédiments est temporairement soustrait de la phase aqueuse. La remobilisation de ces quantités importantes accumulées peut se produire et représenter un risque potentiel pour l'écosystème.

La remobilisation du métal dépend principalement des facteurs suivants :

- \* L'augmentation de la concentration en sels. Les cations alcalins et alcalino-terreux pourront entrer en compétition avec les ions métalliques sorbés par les particules solides (par exemple dans les estuaires, mélange eau douce + eau de mer),

- \* Changement des conditions redox, habituellement en conjonction avec une baisse du potentiel oxygène dans le cas d'une eutrophisation avancée. Les hydroxydes de Fe et Mn sont partiellement ou complètement dissous, libérant les métaux lourds préalablement coprécipités ou adsorbés,

- \* Baisse de pH, entraînant une désorption des métaux par compétition avec les ions  $\text{H}^+$  ou par dissolution des carbonates et hydroxydes,

- \* Augmentation de la concentration des agents complexants naturels ou synthétiques qui mobilisent les métaux et forment des complexes solubles, ayant parfois une grande stabilité.



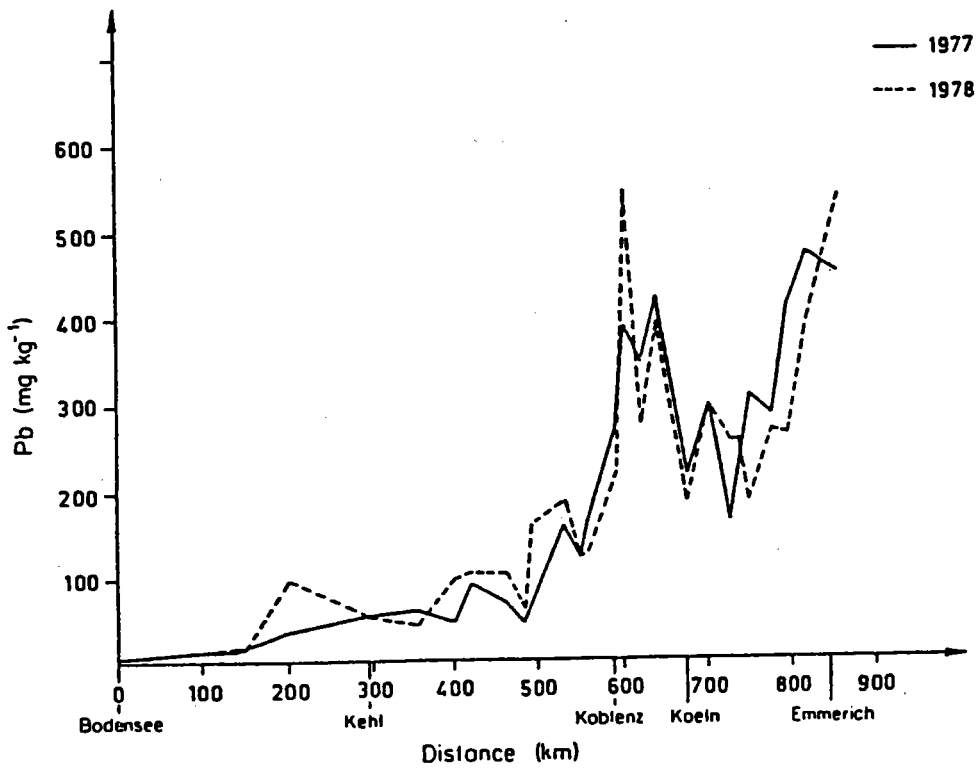


Fig.7: Evolution des teneurs en plomb dans les sédiments du rhin de l'amont vers l'aval. (Breder et al., 1985)

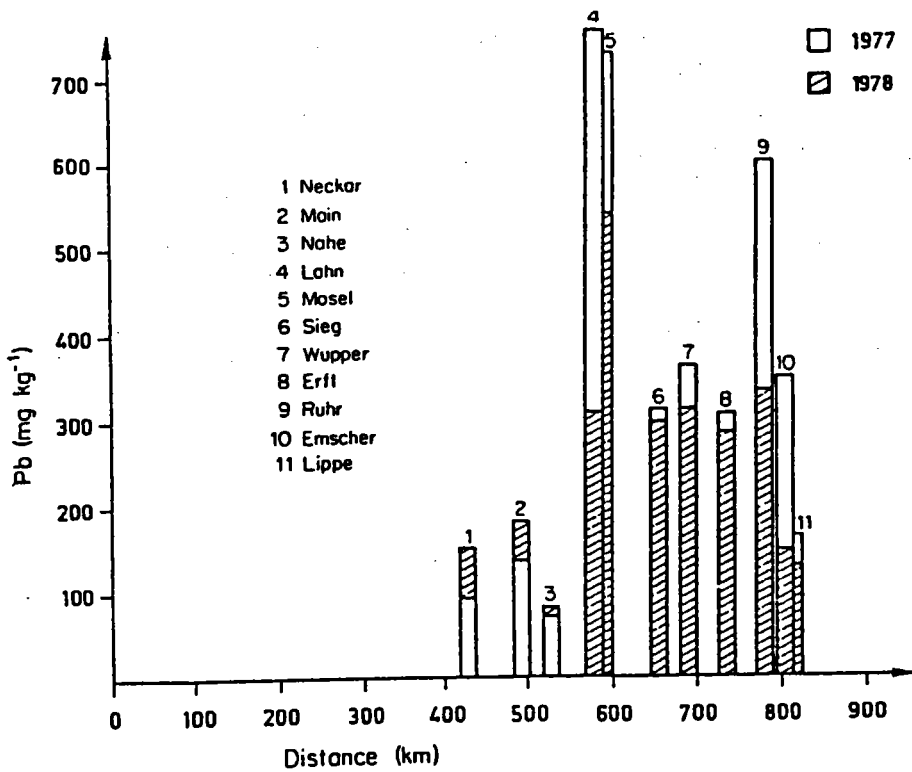


Fig.8: Plomb dans les sédiments des affluents du rhin pendant les années 1977 et 1978. (d'après Breder et al., 1985)

Parallèlement à leur rôle de stockage, les sédiments sont le siège de transformations chimiques du plomb. La biométhylation du plomb (sous forme d'acétate de plomb) par des bactéries anaérobies pour produire du plomb tétraméthyle a été observée par Schmidt et Huber (1976). Le taux de production a été estimé à 2,5  $\mu\text{g}$  Pb/jour. La biométhylation a été reproductible sous les conditions suivantes :

- concentration de  $\text{Pb}^{2+}$  contrôlée (1 à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),
- faible concentration en composés sulfurés pour éviter la précipitation du Pb sous forme de  $\text{PbS}$ ,
- âge de l'inoculum de 6 à 7 semaines.

En outre, l'addition de  $\text{Me}_3\text{Pb}^+$  aux bactéries du sédiment augmente la vitesse de réaction qui produit plus de  $\text{Me}_4\text{Pb}$ .

Le  $\text{Me}_4\text{Pb}$  peut être formé en incubant du sédiment contenant du plomb. L'addition de sels  $\text{Me}_3\text{Pb}^+$  et de nitrate ou chlorure de plomb augmente la production de  $\text{Me}_4\text{Pb}$ . Cependant, des espèces pures de bactéries isolées ne sont pas capables de méthyler les sels de plomb  $\text{Pb}^{2+}$ .

Jarvie et al. (1975) rejettent toute méthylation microbienne dans un sédiment et argumentent en faveur d'une alkylation chimique.

Huber et al. (1978) ont fourni une estimation approximative du rapport du  $\text{Me}_4\text{Pb}$  produit chimiquement et biologiquement. D'après ces auteurs, 15 à 19 % du  $\text{Me}_4\text{Pb}$  total est produit par voie biologique.

Une étude plus récente (Thompson et Crerar, 1980) montre qu'environ 0,03 % du plomb ajouté au sédiment sous forme  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  subit une méthylation biologique. D'après ces auteurs, la capacité de méthylation est indépendante de la teneur en plomb du sédiment et sa contribution à la remobilisation du plomb est très faible.

Il est à souligner par ailleurs, que la biométhylation du plomb a été observée dans des conditions anaérobies "in vitro" et que des précautions doivent être prises dans l'extrapolation de ces données aux systèmes naturels (Moore et Ramamoorthy, 1984).

## I-2-2- ASPECTS BIOLOGIQUES.

La contamination des systèmes aquatiques par des métaux lourds peut être détectée et suivie dans l'eau, les matières en suspension et le sédiment. Si ces deux derniers compartiments jouent un rôle important dans la répartition du plomb au sein des systèmes aquatiques, les organismes vivants représentent un compartiment actif dans le stockage de ce polluant (fig.4).

Tout organisme vivant constitue une cible potentielle d'accumulation pour le métal. Cependant, les différences interspécifiques entraînent des variations très importantes.

Or, si tous les organismes sont des cibles potentielles pour l'accumulation du plomb en milieu aquatique, certaines espèces peuvent être qualifiées de bioconcentrateurs ou de bioaccumulateurs, ceci en conséquence de leurs particularités anatomiques, physiologiques ou comportementales.

Ces espèces accumulent le métal à des niveaux très élevés par rapport aux concentrations dans l'eau, mais en plus, renseignent directement sur la fraction biodisponible du métal. Ce qui est une information d'une extrême importance que les compartiments matières en suspension ou sédiments, ne peuvent fournir. En outre les teneurs en métaux accumulées par l'organisme sur une certaine période peuvent renseigner sur l'histoire plus ou moins récente de la pollution d'un écosystème particulier.

Cependant, pour qu'un organisme accumulateur de polluants puisse être considéré comme bioindicateur de pollution métallique, il faut qu'il réponde à certaines exigences définies par Phillips (1977):

- L'organisme doit être abondant et représentatif du site de prélèvement,
- Il doit avoir une taille et un comportement facilitant les prélèvements,
- Il doit posséder un grand pouvoir d'accumulation et présenter une corrélation simple entre sa concentration en métaux et celle de l'eau,
- Il doit résister à de fortes concentrations métalliques et pouvoir être employé dans des expériences de laboratoire.

Parmi les organismes testés pour le biomonitoring, les mollusques aquatiques

Parmi les organismes testés pour le biomonitoring, les mollusques aquatiques occupent une position de choix, en particulier les mollusques bivalves. Ils ont été utilisés avec succès dans des programmes de biomonitoring des métaux lourds, d'abord en milieu marin, dans le cadre du programme "The Mussel Watch" introduit en 1976 par l'Agence E.P.A. et utilisant *Mytilus edulis* (Goldberg, 1975; Goldberg et al., 1978; Farrington et al., 1983).

Les mollusques, en tant que bioindicateurs de contamination métallique, ont fait l'objet de nombreux travaux dont la plupart ont été répertoriés dans une série de synthèses bibliographiques (Phillips, 1977; Leland et al., 1979). Ces études concernent la mesure des niveaux de contamination de différentes espèces. D'une manière générale, ce sont les mollusques marins qui ont été les plus étudiés.

En ce qui concerne les mollusques d'eau douce, les espèces les plus utilisées dans les études de contamination métallique sont les Unionidae, Dreissenidae et Corbiculidae (Karbe et al., 1975; Forester, 1980; 1981; Lab.Ecol.Metz, 1981; 1985; Graney et al., 1983; Blas et Karbe, 1985; Leglize et Crochard, 1987; Benyahia et al., 1988; Abaychi & Mustafa, 1988; Herwig et al., 1989; Salanki & V.-Balogh, 1989).

Les données recueillies des différentes études de biomonitoring dans les décennies passées montrent une grande variation biologique des teneurs métalliques selon divers paramètres biotiques et abiotiques (taille, sexe, saison, site de prélèvements...). Ceci illustre la complexité des processus écotoxicologiques, et a incité au développement de travaux sur les mollusques aquatiques non plus comme support analytique, mais en vue de mieux comprendre les processus de bioaccumulation des métaux lourds, leur transport et leur distribution dans l'organisme.

En relation directe avec notre objectif de recherche, nous avons choisi de présenter une synthèse des processus intervenant dans la contamination métallique des animaux aquatiques en particulier les mollusques .

### I-3- ASPECTS DE LA BIOACCUMULATION ET DE LA DETOXICATION CHEZ LES MOLLUSQUES AQUATIQUES.

#### I-3-1- CONCEPTS GENERAUX.

Les systèmes vivants ont développé en association avec une grande variété d'ions métalliques, plusieurs éléments chimiques devenus essentiels pour le fonctionnement des cellules.

Il a été avancé par exemple, que le rôle fondamental du fer et du cuivre associés à des enzymes dans les processus de respiration, indique que les cellules ont dû développer la faculté de manipuler ces ions avant d'élaborer un métabolisme aérobie (Fridovich, 1978).

L'association entre les métaux traces et les cellules est très complexe, impliquant une large gamme de potentiel redox et d'activités de ligands. Ainsi, la présence des ions ferriques est limitée sous les conditions physiologiques par le produit de solubilité de l'hydroxyde de fer ( $10^{-38}$  mole/l) et les cellules ont dû développer un certain nombre de voies pour surpasser cette limitation. Les ions ferriques sont transportés et métabolisés en association avec des protéines, telles que la transferrine et la ferritine qui alimentent en cet élément l'hémoglobine ou le système cytochrome oxydase. En fait, le métal est si essentiel que sa rétention pour ne pas fuir l'organisme, est un des mécanismes primaires de défense (Weinberg, 1978).

Cependant, ces éléments essentiels se trouvent à l'état de trace et la capacité des cellules à manipuler ces métaux est très limitée. Or, dans le groupe des métaux traces, il n'y a pas que les éléments essentiels. Ce groupe identifie aussi des éléments métalliques qui n'interviennent dans aucun processus physiologique connu, mais qui sont présents à des teneurs très limitées (Pb, Cd, Hg, Au, Ag...).

Or, que se passe-t-il alors si les concentrations des éléments essentiels et non essentiels augmentent dans l'environnement ? Les organismes aquatiques et en particulier les mollusques ont-ils élaboré un système de protection contre ces excès de métaux ? Autrement dit, ont-ils un système de détoxification ?

**- Bioaccumulation et détoxification :**

**\* Bioaccumulation :**

Il est évident que les systèmes vivants doivent être bioaccumulateurs de certains éléments (dans le cas qui nous intéresse, ce sont les métaux) afin de survivre. Par usage commun, le terme bioaccumulateur a acquis un sens plutôt différent. Dans ce contexte, un bon bioaccumulateur est un organisme qui concentre un élément xénobiotique ou polluant à un niveau qui le rend facilement détectable et corrélé à la concentration dans l'environnement. Le concept, par conséquent, possède 2 composantes: l'une de prise et l'autre de rétention. Les 2 composantes devraient montrer d'une manière idéale une proportionnalité directe avec la concentration de l'élément disponible dans l'environnement.

Les voies de la prise de métal (directe ou trophique), les sites d'accumulation (intestin, glande digestive, rein, gonade) et la vitesse de turn-over de ces éléments accumulés diffèrent d'un animal à l'autre. Il est, par conséquent, difficile d'affirmer que la résultante de ces diverses activités est la teneur du corps qui montre une proportionnalité avec les niveaux de l'environnement (Simkiss et Taylor, 1981; Simkiss et al., 1982). La difficulté avec l'abandon de ce concept, cependant, est que la proportionnalité est communément observée pour un grand nombre d'espèces de bivalves au moins en première approximation (Schulz-Baldes, 1974; Phillips, 1976 a et b; Phillips, 1977; Spehar et al., 1978; Simkiss et al., 1982; Tan et Lim, 1984; Talbot, 1987; Benyahia et al., 1988; Pihan et al., 1988; Chan, 1988).

Un modèle statistique a même été élaboré pour estimer la concentration dans l'eau à partir de la concentration dans les moules (Popham et D'Auria, 1981). Talbot (1987) dans une étude "in situ" a calculé une valeur critique pour la concentration du plomb dans les eaux marines (1.27  $\mu\text{g/l}$ ) en se basant sur la relation liant les concentrations dans l'eau à celles dans *Mytilus edulis*, et propose l'utilisation de cette valeur critique comme critère de qualité des eaux marines pour le plomb.

**\* Détoxification :**

Certains critères doivent être adoptés avant de conclure si un système de détoxification existe. Ces critères sont les suivants (Simkiss et al., 1982) :

- 1 - Il faut que l'organisme montre une tolérance croissante aux effets du toxique.
- 2 - Que l'activité de détoxication augmente en présence du toxique.
- 3 - Que l'activité de détoxication soit compartimentée ou polarisée dans certains tissus ou cellules pour séquestrer le toxique et protéger l'organisme.
- 4 - Que le toxique soit excrété ou éliminé sous une forme non toxique par cette activité détoxifiante.

Bien qu'il y ait relativement peu de cas qui répondent à tous ces critères, quelques éléments y répondent partiellement. Une très longue exposition (quelques siècles) d'une population de *Scrobicularia plana* à des produits de roches métallifères montre un doublement de la CL50 par rapport à celle d'individus de population normale (Bryan, 1976). Dans sa revue sur l'adaptation génétique des organismes aquatiques aux métaux lourds, Klerks & Weis (1987) énumèrent quelques espèces de mollusques qui ont montré une certaine résistance aux métaux lourds. Ces études n'ont pas permis, dans tous les cas, de démontrer s'il y a une composante génétique dans cette résistance.

L'exposition de *Mytilus galloprovincialis* au cuivre (Viarengo et al., 1980) et au cadmium (Viarengo et al., 1985; 1987); ainsi que l'exposition de branchies isolées de *Mytilus edulis* et de *Crassostrea virginica* respectivement au mercure et au cadmium (Roesijadi, 1982; Roesijadi et Klerks, 1989) induit la formation de protéines spécifiques qui fixent le métal dans les tissus. Ces protéines sont identifiées comme étant des métallothionéines.

Chez *Anodonta cygnea* et *A. anatina*, exposées au cadmium pendant 12 semaines, dans la fraction cytosolique des branchies, du manteau et de l'intestin moyen, le Cd est associé à des protéines de haut poids moléculaire et à une fraction protéique de poids moléculaire apparent de 11 KD. Cette fraction augmente avec l'exposition et est interprétée comme des métallothionéines (Hemelraad et al., 1986).

Chez le gastéropode *Littorina littorea*, l'exposition au cadmium induit la formation de 2 protéines semblables aux métallothionéines dès que les protéines de haut P.M. deviennent saturées (Noël-Lambot et al., 1980). Chez un autre gastéropode *Patella vulgata* ces protéines fixant le cadmium, contiennent moins de 10% de zinc et de cuivre (Noël-Lambot, 1980).

L'interprétation directe de ces expériences serait que certains métaux non essentiels peuvent induire des protéines spécifiques, ce qui indiquerait un système de détoxication.

L'explication alternative serait que les métaux d'une réactivité identique à celle du Cd et du Hg pourraient, dans certaines conditions, déplacer les éléments essentiels tels que le Zn et le Cu de leurs protéines normales (Viarengo et al., 1985). Ces éléments déplacés pourraient induire la synthèse de nouvelles protéines dans un métabolisme métallique normal.

Ces métallothionéines ne sont pas le seul système de détoxication. Le métal peut être incorporé à des granules de pyrophosphates (Mason et Simkiss, 1982) ou des dépôts cristallins de carbonates (Marshall et Talbot, 1979) ou dans des vésicules intracellulaires (Coombs, 1977; Schulz-Baldes, 1977; George, 1980; George, 1982; Loring et Prosi, 1986).

Ces observations suggèrent un système de détoxication. Il est, par conséquent, évident que le concept de détoxication au vu des supports expérimentaux possède une bonne base physiologique. Par contraste, l'approche de la bioaccumulation semble marcher comme un système opérationnel. La bioaccumulation a émergé dans la littérature comme une description d'un phénomène, plutôt que la définition d'un mécanisme. Il est possible, comme le rapporte Simkiss et al. (1982), que les deux approches aient été associées et que les données de bioaccumulation aient été expliquées comme le résultat d'un système de détoxication.

### I-3-2- LA PRISE DU METAL.

#### a- Prise à partir de la solution:

Les mécanismes de prise du métal par les cellules ne sont pas encore complètement élucidés. Certains résultats indiquent que les métaux traversent les membranes essentiellement par un processus de transport passif (George et Viarengo, 1985). Les études de Simkiss (1983) suggèrent que certains complexes inorganiques du métal ( $MX^n$ ) traversent la membrane par liposolubilité. Cependant, ce modèle simplifié ne semble pas applicable à tous les métaux.



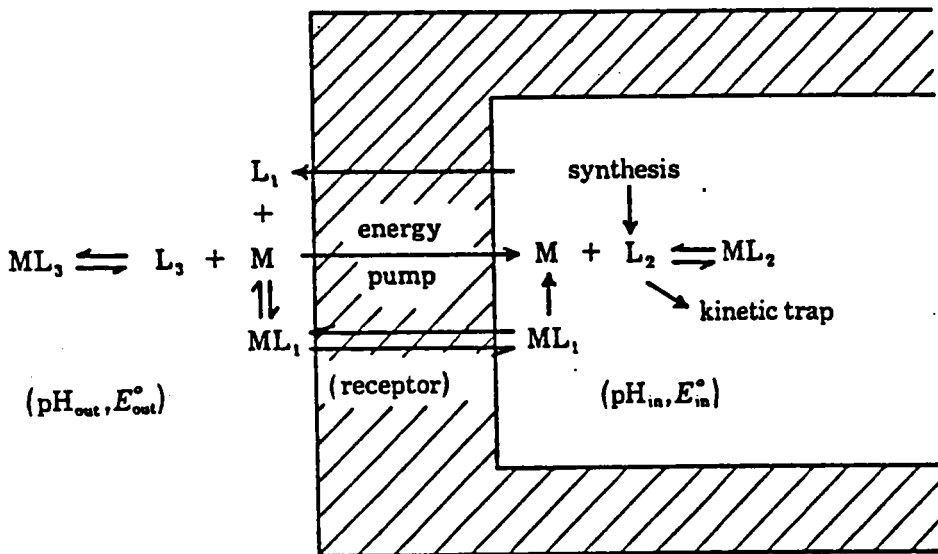


Figure 9: Diagramme illustrant la prise d'un métal et son accumulation par la cellule.(d'après Williams, 1981)

La cellule est envisagée comme synthétisant un ligand  $L_1$  qui transporte le métal à travers la membrane. Dans le cytoplasme un second ligand  $L_2$  fixe le métal et empêche la diffusion inverse (piégeage). Le métal dans l'environnement peut être fixé à des ligands naturels  $L_3$ . La succession de ligands de forces croissantes est alors nécessaire pour le transfert du métal dans la cellule.

Gutnecht (1981) a mesuré le transport du complexe  $\text{HgCl}_2$  à travers une bicouche lipidique artificielle (black-membranes). Il a obtenu un coefficient de diffusion d'approximativement  $10^{-4}$  m/s, ce qui est 20 fois supérieur à la perméabilité à  $\text{H}_2\text{O}$  et  $10^6$  fois supérieur à celle de  $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ . Il s'agit dans ce cas, d'une simple diffusion de molécules neutres électriquement. Les résultats de Boudou (1982) confirment ceux de Gutnecht pour le  $\text{HgCl}_2$  et sont étendus à un autre dérivé du mercure qui est le  $\text{CH}_3\text{HgCl}$ .

Carpene et George (1981) cités par Simkiss et Mason (1984), arrivent à des résultats similaires concernant le cadmium. Ils concluent que le cadmium pénètre dans la branchie isolée de *Mytilus edulis* par diffusion passive sous forme de complexe  $\text{CdCl}_2$ .

Les résultats de Holwerda et al. (1989) concernant la fixation du Cd par des branchies isolées de *Anodonta anatina* confirment l'aspect passif de la pénétration puisque l'utilisation d'inhibiteurs métaboliques n'affecte pas la prise du métal. En outre l'utilisation d'ions bloquant les canaux à calcium (lanthane et samarium) entraîne une réduction de 40 % de la prise de Cd. Il est possible que d'autres métaux tels que le plomb soient capables de traverser la membrane de cette manière par parasitisme des canaux calciques (Les rayons ioniques du  $\text{Pb}^{2+}$  et du  $\text{Ca}^{2+}$  sont très proches).

Toujours selon Holwerda et al. (1989) l'accumulation d'une bonne partie du Cd (+ de 50%) par les branchies d'*Anodonta anatina* ne peut cependant pas être expliqué par le transport à travers les canaux calciques et fait intervenir d'autres mécanismes: endocytose ou transport par des ligands membranaires.

En effet, Williams (1981), d'un point de vue thermodynamique, a montré que le transport d'un élément métallique à travers la membrane fait intervenir des ligands membranaires de forces croissantes qui aboutissent au transfert de l'élément (fig.9).

L'interaction du métal avec les composants membranaires a aussi été signalée pour le plomb et le cadmium (Nieboer et Richardson, 1980; Viarengo, 1985). En effet selon ces auteurs, le plomb interagit avec les groupes phosphates de la bicouche lipidique avant d'être complexé par des ligands intracellulaires. De plus le métal peut perturber la balance ionique en altérant les caractéristiques de la perméabilité membranaire (Bouquegneau et Gilles, cités par Viarengo, 1985).

**b- Prise à partir des particules:**

Chez les bivalves, il est difficile de déterminer l'importance relative de la prise à partir de la solution et celle à partir des particules (inorganiques ou alimentaires), étant donné que la distribution environnementale des métaux est très complexe. La taille des particules retenues et la capacité d'ingestion déterminée par le taux de filtration (lui-même dépendant de la tension d'oxygène, de la température, des matières en suspension, de l'état physiologique, etc...), jouent un rôle déterminant.

Signalons que Schulz-Baldes (1974) a trouvé que la prise du plomb par la nourriture (état particulaire) est légèrement inférieure à celle par l'eau (état dissous) chez *Mytilus edulis* (respectivement 23,5 % et 29 % du plomb disponible). Par contre Amiard-Triquet et al. (1987a) et Martoja R. et al. (1988) ont trouvé que chez l'huître *Crassostrea gigas* l'accumulation de l'argent par voie trophique est très faible par rapport à la voie directe. Chez *Macoma balthica*, l'utilisation de radio-isotopes  $Zn^{65}$  et  $Cd^{100}$  a montré que la prise par voie directe est la plus importante (Harvey et Luoma, 1985). De même Riisgard et al. (1987) ont montré que la prise de Cd par voie trophique chez *Mytilus edulis* est insignifiante, (0,15 % de Cd pris pendant une exposition de 162 heures).

La prise de particules n'est pas limitée au tube digestif, les cellules épithéliales des branchies et du manteau prennent des particules d'hydroxyde de métal par un processus de pinocytose (George, 1980; Martoja M. et al., 1988). Le meilleur exemple étudié est la prise de l'hydroxyde de fer par *Mytilus edulis* (George et al., 1976), ainsi que l'étude "in vitro" de la prise de la ferritine par des branchies isolées (George et al., 1976).

Le plomb, cadmium et calcium ont été identifiés dans les vésicules de branchies de *Mytilus* (George, 1980). De même, Loring et Prosi (1986) ont aussi observé des vésicules membranaires, contenant des granules de plomb, dans les branchies de *Mytilus edulis*. Il s'agirait dans ce cas d'une prise par pinocytose.

Il semble que dans l'environnement, la contamination par le plomb particulaire soit importante, sachant que la majorité du métal dans les systèmes aquatiques se trouve sous cette forme. En effet, plusieurs auteurs soulignent l'importance de la fraction particulaire du plomb dans la contamination des bivalves en milieu naturel (Phillips, 1977; Pertoldi Marietta et al., 1979; Loring et Prosi, 1986).

Pertoldi Marletta et al. (1979) dans une étude "in situ", ont montré une corrélation très significative entre la teneur en plomb des matières en suspension  $> 0.8 \mu\text{m}$  et la concentration dans les parties molles de *Mytilus galloprovincialis* avec un facteur de concentration d'environ 2300. Un résultat comparable a été trouvé par Loring et Prosi (1986) chez *Mytilus edulis*. De même, Abaychi et Mustafa (1988) ont trouvé que les concentrations en plomb dans les tissus de *Corbicula fluminea* sont mieux corrélées avec la fraction échangeable du métal particulaire qu'avec le métal dissous. Ces résultats indiquent qu'au moins une bonne partie du plomb chez ces bivalves est d'origine particulaire.

La prise du métal à partir des particules (alimentaires ou inorganiques) ou de la solution, bien que l'importance respective des 2 voies soit discutée et variable selon le métal et l'espèce testée, montre que les 2 modes de contamination existent et participent à la charge métallique de l'organisme. La capacité des bivalves (organismes filtreurs) à répondre à ces différentes voies d'absorption du métal est un avantage considérable dans leur utilisation en tant que bioindicateurs par rapport à d'autres organismes utilisés pour le biomonitoring tels que les bryophytes par exemple (Mouvet, 1984; Benyahia, 1985; Mouvet et al., 1986).

Ces différents systèmes de prise (endocytose, parasitisme de pompes ioniques, diffusion de complexes lipophiles ou chélation par des ligands membranaires) agissent souvent selon une cinétique de premier ordre, ainsi la quantité de métal entrant dans l'organisme est proportionnelle à son niveau dans l'environnement (Phillips, 1976; 1977; George, 1980; Simkiss et al., 1982; Simkiss et Mason, 1984; Amiard et al., 1987). Le degré de déviation de la proportionnalité directe étant une expression du degré d'interaction avec la membrane cellulaire ou le mucus (George, 1980); ce qui amène à penser que la vitesse de transport d'un métal dépend du nombre de collisions entre le métal et la surface de l'organisme. Ceci nous permet de souligner encore une fois l'intérêt des bivalves filtreurs qui, en échantillonnant continuellement l'environnement aquatique, augmentent ainsi le contact eau / organisme.

### I-3-3- FACTEURS INFLUENCANT LA PRISE ET L'ACCUMULATION.

#### a- Facteur du milieu:

Les facteurs du milieu, tels que température, salinité, potentiel redox, pH, matière organique et la présence d'autres métaux, agissent sur la spéciation du métal, la

physiologie de l'organisme et, par conséquent, peuvent influencer la prise et l'accumulation du métal.

L'accumulation du plomb au laboratoire par *Mytilus edulis* (Phillips, 1976a) et par l'huître *Saccostrea echinata* (Denton et Burdon-Jones, 1981) semble indépendante de la température. Cependant, les résultats "in situ" de Bryan (1973) montrent que les concentrations en plomb chez *Pecten maximus* et *Chlamys opercularis* sont plus faibles quand la température de l'eau est élevée.

Des résultats similaires obtenus "in situ" ont été rapportés par Orren et al. (1980) chez *Choromytilus meridionalis* et par Popham et D'Auria (1982) chez *Mytilus edulis* qui montrent une corrélation négative entre la température de l'eau de mer et les concentrations en plomb dans les organismes. Par contre les résultats "in situ" de Chabert et Vicente (1980) chez le gastéropode *Monodonta turbinata* suggèrent une corrélation positive entre les concentrations en Pb dans les organismes et la température de l'eau de mer sur une année. Mais dans ce cas d'autres facteurs concomitants interviennent tels que le facteur trophique et l'état physiologique des organismes.

Toujours selon Phillips (1976a), la baisse de salinité réduit l'accumulation du plomb chez *Mytilus*, à l'inverse, Denton et Burdon-Jones (1981) ont observé une augmentation de l'accumulation du plomb à faible salinité chez *Saccostrea echinata*.

La présence d'autres métaux dans le milieu, tels que Cd, Zn et Cu ne semble pas modifier l'accumulation du plomb chez *Mytilus edulis* (Phillips, 1976a). Un résultat identique a été rapporté par Elliott et al. (1985) chez *Mytilus edulis planatus* qui montre que la bioaccumulation du plomb n'est pas affectée par la combinaison des trois métaux Cd, Cu et Zn. Selon Coombs (1977), l'accumulation du plomb chez *Mytilus edulis* entraîne une augmentation significative du Mn et du Cu dans le manteau et la masse viscérale et une diminution du calcium dans les reins. Il note par ailleurs que les teneurs en fer et en zinc demeurent constantes.

Luoma et Bryan (1978) ont pour leur part souligné l'importance du rapport Pb/Fe dans les sédiments de surface sur le niveau d'accumulation du plomb par le mollusque *Scrobicularia plana*. Une observation contradictoire a été enregistrée par Brown (1978) sur un crustacé isopode *Asellus meridianus* avec un antagonisme entre le plomb et le cuivre.

La présence d'agents chélatants naturels ou artificiels (humate, alginate, pectinate, citrate ou EDTA, NTA...) peuvent agir sur l'accumulation. Les effets sont variables selon les

espèces et le métal. Ainsi, comme le rapporte Coombs (1977), la présence de citrate augmente de 3 à 4 fois l'accumulation du plomb chez *Mytilus edulis*. Par contre, les complexants de haut P.M. tels que les humates, alginates et pectinates n'augmentent pas de façon aussi importante l'accumulation. Toujours selon Coombs (1977) si la complexation augmente de façon significative l'accumulation du plomb, sa distribution tissulaire n'est pas modifiée.

Pour le cadmium par exemple, chez *Mytilus* (George et Coombs, 1977), l'EDTA, les humates, citrates et alginates favorisent l'accumulation, qui semble dans ce cas indépendante du P.M. des complexants. Par contre, Gutierrez-Galindo (1980) pour le même métal et chez la même espèce trouve que l'EDTA diminue fortement l'accumulation.

Chez *Anodonta anatina* (Holwerda et al., 1988) et *Macoma baltica* (Mc Leese et Ray, 1984), l'accumulation du Cd est fortement réduite par l'EDTA. Le même résultat a été observé pour le zinc chez *Dreissena polymorpha* (Maarouf, 1988) et pour le cuivre chez *Venerupis decussata* (Stephenson et Taylor, 1975). Des résultats similaires ont été rapportés pour le Co<sup>58</sup> et le Zn<sup>65</sup> en présence de NTA et d'EDTA chez *Unio mancus* (Ravera et al., 1973).

#### **b- Conditions physiologiques:**

Comme les paramètres environnementaux, les conditions physiologiques de l'organisme peuvent influencer l'accumulation du métal.

Des variations saisonnières dans la teneur en métal des organismes ont été observées et étudiées par plusieurs auteurs (Bryan, 1973; Phillips, 1976a; Zarogian et al., 1979; Cossa et al., 1980; Orren et al., 1980; Boalch et al., 1981).

Concomitante à ces variations saisonnières, la taille des organismes influence le contenu en métal particulièrement pendant la période de maturation des gonades (Simpson, 1979; Cossa et al., 1980; Orren et al., 1980; Popham et D'Auria, 1983).

Boyden (1974; 1977), Popham et D'Auria (1983), Boalch et al. (1981), Amiard et al. (1986) ont établi pour quelques métaux dont le plomb, une relation Log-Log entre la concentration du métal dans les parties molles et le poids sec chez *Mytilus edulis*. Cette relation à pente négative montre que plus le poids des parties molles est important, plus la concentration du métal est faible.

En revanche, si l'on considère la charge métallique par individu en fonction du poids sec, la relation obtenue montre une pente positive, ce qui indique que la charge s'accroît en fonction du poids (Boyden, 1974; 1977; Cossa, 1980; Popham et D'Auria, 1983). Cependant, la baisse de concentration du plomb, quand le poids augmente, est souvent faible (Amiard et al., 1986) et ce phénomène n'est pas général. Popham et D'Auria (1983) ont observé chez la même espèce: *Mytilus edulis*, une relation inverse, c'est-à-dire que la concentration du plomb dans les parties molles augmente avec le poids pour des moules de classe de taille > 25 mm.

Chez l'huître *Crassostrea virginica*, la charge en plomb est corrélée positivement au poids sec de l'organisme. En revanche, la concentration en plomb ne montre pas de relation significative avec le poids sec des tissus (Zarogian et al., 1979).

Newman et Mc Intosh (1983) ont trouvé que chez un gastéropode d'eau douce *Physa integra*, la concentration en plomb est indépendante de la taille de l'animal. Par contre, chez un autre gastéropode *Campeloma decisum*, la concentration en plomb diminue quand la taille de l'animal augmente (Newman et Mc Intosh, 1983). Chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*, mise en situation de contamination "in situ", les animaux de classe de taille 15 mm montrent des concentrations plus faibles que celles des animaux de classe de taille supérieure (20 mm) (Léglize et Crochard, 1987). Il semblerait que pour ces deux classes de taille, la concentration du métal soit corrélée positivement à la taille de l'organisme.

Selon Popham et D'Auria (1983), chez *Mytilus edulis*, les concentrations en plomb sont corrélées positivement à la taille des moules dans les zones polluées en plomb. Par contre, dans les eaux contenant de faibles concentrations en plomb, les concentrations dans les moules apparaissent indépendantes de la taille des organismes.

A la lumière des données bibliographiques citées, il semble difficile d'établir des relations générales entre la concentration du métal et la taille ou le poids d'un organisme. En fait, les observations sont variables selon le métal, sa concentration dans le milieu et l'espèce testée (Boyden, 1977).

### I-3-4- EFFETS SUBCELLULAIRES ET BIOCHIMIQUES.

#### a- Effets biochimiques:

Le plomb est un agent à spectre large qui exerce des effets prononcés sur bon nombre de systèmes cellulaires (Fowler, 1978). Comme d'autres métaux lourds (Cd, Hg), il présente une grande affinité pour les éléments donneurs d'électrons (S, N, O). Quand le métal traverse la membrane, il réagit avec les composants cytosoliques et se trouve généralement complexé de différentes manières (fixation sur les groupes soufrés, chélation, formation de sels) par des substrats d'activités enzymatiques ou par les enzymes elles-mêmes.

Le métal peut se fixer sur les groupes fonctionnels des protéines comme les groupes imidazoles, sulfures, carboxyles, amines et peptides (Vallee et Ulmer, 1972; Viarengo, 1985). Il résulte de ces interactions que certaines activités enzymatiques sont affectées.

L'effet exercé peut être différent selon que l'activité est testée après une exposition "in vivo" au métal, ou "in vitro" par addition à la solution d'incubation (Jackim, 1974; Viarengo, 1985). Par exemple chez le poisson, le plomb inhibe l'alkaline phosphatase "in vitro", avec au contraire stimulation après une exposition "in vivo" (Jackim, 1974).

En outre, dans plusieurs cas, les animaux exposés "in vivo" montrent des variations contradictoires par rapport à l'activité enzymatique de la même voie métabolique (Viarengo, 1985), ce qui a pour conséquence de rendre l'interprétation délicate.

L'exposition au plomb d'un gastéropode d'eau douce *Viviparus viviparus* entraîne une nette diminution des phospholipides dans tous les organes, alors que la concentration des sulfolipides augmente dans la glande digestive et le manteau (Bolognani Fantin et al., 1982). Chez ces mêmes animaux, les activités de l'ATPase et des diaphorases  $\text{NADH}^+$  dépendante diminuent, alors que la Lactate déshydrogénase (LDH) et Glucose-6-phosphate déshydrogénase (G-6-PDH) sont stimulées (Bolognani Fantin et al., 1982).

Par contre chez *Mytilus edulis* (Gilfillan et al., 1985) l'activité de la G-6-PDH est significativement réduite par une augmentation de la teneur en plomb de l'animal.



Chez un autre bivalve marin *Donax trunculus* (Mizrahi et Achituv, 1989) exposée au plomb, la LDH et la Cytochrome oxydase montrent une légère inhibition et seulement à des concentrations élevées du métal.

D'autres enzymes telles que l'Aspartate Aminotransférase (AAT) chez *Mytilus edulis* (Gilfillan et al., 1985) ainsi que la Malate déshydrogénase et l'enzyme digestive  $\alpha$ Amylase chez *Donax trunculus* (Mizrahi et Achituv, 1989) ne semblent pas être affectées par l'exposition au plomb.

Chez des larves d'odonates anisoptères, une longue exposition (6 semaines) au plomb entraîne une forte inhibition de l'activité des enzymes oxydatives (Succinique déshydrogénase et Cytochrome c réductase) dans le tissu nerveux, l'intestin moyen et le rectum (Meyer et al., 1986).

Cependant malgré la variabilité, dans certains cas, certaines enzymes montrent des réponses caractéristiques de l'intoxication métallique (par exemple, l'inhibition de la Levulinate déshydrogénase chez des poissons exposés au plomb) et peuvent donc être considérées comme des indicateurs potentiels de toxicité sublétales (Jackim, 1974).

Dans les composants cytosoliques, il existe une classe de protéines de faible poids moléculaire (6800-7000) caractérisées par leur grande affinité pour les cations métalliques et un grand contenu en cystéine (30-35 %) (Kagi et Nordberg, 1979; Roesijadi, 1980). Ces métallothionéines ont été détectées chez des invertébrés aquatiques contaminés et non contaminés (Roesijadi, 1980).

Leur rôle physiologique peut être lié au contrôle du métabolisme du cuivre et du zinc. Elles agissent par fixation des excès de métaux traces qui pénètrent dans la cellule et permettent une redistribution de ces métaux traces essentiels entre les apoenzymes appropriés.

Quand des métaux comme le cadmium, le mercure, ou un excès de cuivre pénètrent dans la cellule, ils sont capables de déplacer le zinc des thionéines Cu-Zn normalement présentes dans le cytosol (Viarengo et al., 1985). Cet effet tampon des thionéines existantes représente une première étape dans le processus de l'homéostasie des métaux lourds (Viarengo, 1985).

Si la concentration des métaux dans la cellule est élevée et le pool physiologique des thionéines Cu-Zn saturé, alors les cations en excès peuvent stimuler la synthèse de nouvelles thionéines par action au niveau ribosomal ou nucléaire (Viarengo, 1985; Aoki et Suzuki, 1986; Baer et Benson, 1987; Viarengo et al., 1987). De cette manière, bien que la concentration dans la cellule soit anormalement élevée, la plupart du métal est présent sous forme non toxique fixé aux thionéines néosynthétisées.

Une importante bibliographie traite de la présence et du rôle des métallothionéines chez les organismes aquatiques, nous nous contenterons de citer les revues de Noël-Lambot et al. (1978), de Roesijadi (1980) et de Cosson (1987).

En ce qui concerne le plomb, dans aucune bibliographie consultée, il n'est fait mention d'association entre le plomb et les métallothionéines. Il semblerait que pour ce métal, les métallothionéines n'interviennent pas dans le processus de détoxication.

#### **b- Effets sur le noyau et le métabolisme nucléaire:**

Le métal peut interagir avec les protéines nucléaires, altérant les structures de la chromatine ou l'activité des enzymes impliquées dans le métabolisme de l'ADN ou l'ARN.

"In vitro", le plomb forme des complexes avec les groupes phosphates des nucléotides et acides nucléiques (Vallee et Ulmer, 1972; Eichhorn, 1973). Il induit l'hydrolyse de l'ARN (Matsushita et Ibuki, 1960; Farkas, 1968) et inhibe la fixation de l'ARNt sur les ribosomes (Farkas et al., 1971).

Des inclusions intranucléaires formées de complexes Pb-protéines ont été observées dans les cellules rénales de souris (Goyer, 1971; Moore et al., 1973).

Il est intéressant de noter que l'exposition nucléaire au plomb peut aussi conduire à une caryomégalie, polyploïdie et des mitoses anormales. Muro et Goyer cités par Fowler (1978) ont rapporté que dans les cellules de moelle osseuse de souris nourries avec 1 % d'acetate de plomb, l'incidence sur les anomalies chromosomiques est 13 fois plus grande que chez les témoins. Ces auteurs notent aussi une incidence 5,4 % plus grande sur les cassures chromosomiques et une augmentation de 12 % des fragments chromosomiques dans les cellules.

Il a été trouvé aussi qu'une injection de dose faible 5  $\mu\text{g/g}$  de plomb augmente temporairement la synthèse de l'ADN d'un facteur de 45 dans le rein de souris (Choi et Richter, 1974). Ce phénomène est précédé par une augmentation générale de la synthèse de nouveaux ARN et de protéines.

Il est clair, à partir de ces observations, que le plomb peut interagir avec les noyaux cellulaires "in vivo" et est capable de produire des altérations fonctionnelles et morphologiques dans les processus nucléaires des organes cibles.

### **c- Effet sur les mitochondries:**

Il est connu depuis longtemps que les mitochondries peuvent accumuler de grandes concentrations de calcium par un processus de transport actif. D'autres cations métalliques, tels que Mg, Mn, Ba, Sr sont aussi activement accumulés (George, 1982).

L'accumulation du plomb dans les mitochondries a été observée surtout dans les cellules rénales. Le plomb se trouve sous forme de granules (Walton, 1973; Fowler, 1978).

Cette accumulation est énergie-dépendante (Walton, 1973) et selon Brierley et Knight, cités par George (1982), ce processus actif est lié au transport des phosphates.

Les résultats "in vivo" et "in vitro" démontrent que le plomb inhibe la phosphorylation oxydative (Vallée et Ulmer, 1972; Walton, 1973; Fowler, 1978; George, 1982). Cependant, les données ne permettent pas une clarification des interactions moléculaires qui sont à la base des interférences exercées sur la phosphorylation oxydative. Walton (1973) a proposé un mécanisme en 2 étapes expliquant l'effet du plomb sur les mitochondries :

1) par analogie avec le calcium, le plomb est accumulé activement et l'énergie devant servir à la synthèse de l'ATP est ainsi déviée pour l'accumulation du plomb. Ce détournement d'énergie interfère avec le maintien d'un gradient ionique à travers les barrières membranaires de la mitochondrie.

2) le plomb mitochondrial est susceptible d'hydrolyser l'ATP et de former des complexes avec quelques groupes SH critiques d'enzymes mitochondriales ou de réagir avec des anions de la matrice mitochondriale, tels que les phosphates.

L'exposition au plomb entraîne aussi une réduction du rapport P/O mitochondrial (Fowler, 1978).

Le plomb est aussi connu pour l'inhibition des enzymes mitochondriales responsables de la synthèse de l'hème (ALA synthétase et ferrochélatase) qui compte en partie pour la dépression du contenu mitochondrial de la Cytochrome  $aa_3$  dans les mitochondries empoisonnées par le plomb (Rhyne et Goyer, 1971).

D'autre part, il a été démontré que l'inhibition de l'activité mitochondriale causée par le plomb peut être réversible par l'addition de manganèse ou magnésium au milieu d'incubation (Viarengo, 1985). Un tel résultat justifierait l'opinion que les sites critiques ne seraient pas des groupes sulfures (Viarengo, 1985).

A partir des données présentées, il apparaît qu'un seul mécanisme ne peut expliquer les différents effets spécifiques exercés sous différentes conditions expérimentales, même si l'effet général est le même, c'est-à-dire l'inhibition de la phosphorylation oxydative.

Par ailleurs, les mitochondries sont aussi un site possible de peroxydation lipidique (Vallée et Ulmer, 1972; Buss et Gibson, 1979). L'intervention du métal dans ce processus peut être considéré comme un effet général de l'altération de la physiologie de cet organite (Viarengo, 1985).

#### **d- Effet sur le système membranaire:**

Le plomb interfère avec le système membranaire en se complexant avec les groupes phosphates désorganisant ainsi les structures membranaires (Vallée et Ulmer, 1972). A ce propos une diminution importante des phospholipides a été observée chez un gastéropode aquatique exposé au plomb (Bolognani Fantin et al., 1982).

Au niveau de la membrane plasmique, le plomb inhibe le système  $Na^+/K^+$  ATPase, perturbant la balance ionique et altérant les caractéristiques de la perméabilité membranaire (Bouquegneau et Gilles cités par Viarengo, 1985). Un autre exemple illustrant l'interaction de métaux lourds avec les membranes cellulaires, a été étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les résultats montrent qu'il y a inhibition de la capacité de transport  $H^+/K^+$  de la membrane cellulaire, qui pourrait conduire à sa dépolarisation, donc à l'inhibition de diverses fonctions de transport et compromettre

ainsi les facteurs déterminant de la cinétique de prise du métal (Ahlers et Rösick, 1986; White et Gadd, 1987).

S.-Rozsa et Salanki (1990) ont testé l'effet du plomb sur les membranes de neurones de mollusques gastéropodes. Leurs résultats montrent que le métal modifie les courants ioniques et l'effet des neurotransmetteurs (ACh, Dopamine et Hydroxytryptamine) au niveau de la membrane neuronale. Ces modifications sont interprétées, selon le type de neurone, comme une action directe du métal sur les canaux ioniques spécifiques, ou sur les récepteurs à neurotransmetteurs; ou encore par une altération de certains processus intracellulaires responsables de la régulation de la perméabilité membranaire (S-Rozsa et Salanki, 1990).

Au niveau du REG et REL, l'effet le plus général est la peroxydation lipidique (Buss et Gibson, 1979). Par ailleurs, de nombreuses données indiquent une réduction du contenu cellulaire en cytochrome P<sub>450</sub> (Fowler, 1978) et une augmentation de la vitesse catabolique de la Cytochrome (Penning et Scoppa, 1977).

Généralement, l'activation de la peroxydation lipidique par le métal dans les zones hydrophobes où opère la Cytochrome P<sub>450</sub> associée aux effets de dénaturation du métal, pourraient être la principale cause de transformation de la Cytochrome en une forme labile facilement dégradable par les lysosomes (Viarengo, 1985).

### I-3-5- TRANSPORT, STOCKAGE ET ELIMINATION.

La pénétration du métal dans un organisme s'effectue à travers les tissus directement en contact avec le milieu environnant. En ce qui concerne les Mollusques bivalves, les voies possibles de pénétration sont le manteau, les branchies et le tube digestif.

Les études expérimentales d'exposition métallique permettent, en suivant la distribution tissulaire du métal en fonction du temps, de donner des informations sur l'importance relative des différentes voies d'accumulation.

Ces données de distribution tissulaire montrent que pour les métaux, tels que Pb, Cd, Fe, Zn et Cu, les concentrations les plus élevées sont toujours présentes au niveau des reins. Mais, les concentrations relatives dans les autres tissus et les proportions dans les reins ne sont pas les mêmes pour tous ces métaux (George et Pirie, 1980). Pour le

plomb, l'organe principal d'accumulation est le rein (Schulz-Baldes, 1974; 1977; Coombs, 1977; George et Pirie, 1980). Ceci suggère un transport interne du métal des branchies et du tractus digestif vers le rein.

#### **a- Transport et stockage:**

Une littérature assez importante traite de la distribution tissulaire des métaux, tels que Fe, Cu, Zn et Cd chez les bivalves (Hobden, 1967; George et al., 1978; George et Pirie, 1979; George et al., 1979; George et Pirie, 1980; George, 1983; Hemelraad et al., 1986; 1987; Holwerda et al, 1988). Cependant, très peu de travaux concernent celle du plomb. Les études les plus détaillées à notre connaissance sont celles de Schulz-Baldes (1974; 1977) et de Coombs (1977) sur *Mytilus edulis*.

L'exposition de *Mytilus edulis* au plomb montre dans les 50 premières heures, une accumulation dans les branchies et l'hémolymphe, tandis que l'accumulation dans les reins est encore faible. Dans les jours suivants, la tendance s'inverse indiquant une forte accumulation dans les reins, par rapport aux autres tissus (Schulz-Baldes, 1977). Le liquide péricardial montre des concentrations élevées en Pb, ce qui indique un passage du métal à ce niveau; ce liquide est ensuite dérivé via le canal rénopéricardial jusqu'au rein, où les cellules excrétrices prennent alors le métal et le stockent sous forme de granules (Schulz-Baldes, 1977). Ces données indiquent clairement un transport interne du plomb chez *Mytilus*.

Au niveau de l'hémolymphe, George (1980) rapporte qu'en présence d'ions métalliques divalents, les protéines sanguines s'agrègent, facilitant par conséquent leur phagocytose par les amœbocytes circulants. A ce propos Cheng et Sullivan (1984) ont montré qu'une exposition au plomb (de 1 à 5 ppm) d'amœbocytes de *Crassostrea virginica* n'altère pas leur capacité phagocytaire. Le plomb est ainsi transporté chez *Mytilus* par les amœbocytes dans des vésicules intracellulaires limitées par des membranes, via l'hémolymphe jusqu'aux tissus de stockage (Coombs, 1977; George, 1980).

Il semble donc que chez *Mytilus edulis* les 2 modes de transport interne du plomb interviennent à savoir la fixation et le transport par les amœbocytes ou directement sous forme dissoute dans l'hémolymphe. Des résultats similaires concernant le transport interne du cadmium chez *Mercenaria mercenaria* ont été rapportés par Robinson et al. (1985).

La microanalyse a permis de montrer que le contenu de ces vésicules intracellulaires est formé de plomb, associé au phosphore, soufre et calcium (Coombs, 1977; Schulz-Baldes, 1977; George, 1980; 1982).

Des dépôts extracellulaires de plomb associé au Ca dans un rapport équiatomique ont été aussi observés dans les branchies de *Mytilus edulis* (Marshall et Talbot, 1979). Ces dépôts cristallins extracellulaires contiennent des carbonates. Il a été proposé que le plomb se présente sous forme de granules de carbonates complexes associé au calcium (Marshall et Talbot, 1979).

Ainsi, la principale forme d'accumulation du plomb est l'emprisonnement de granules métalliques dans les cellules rénales, branchiales et dans les amœbocytes. La présence de dépôts extracellulaires a été aussi rapportée. Ces différents mécanismes d'accumulation, par emprisonnement du métal dans des structures membranaires (vésicules) ou par déposition extracellulaire en un précipité stable, assurent une détoxification par compartimentation du métal, l'isolant ainsi des composants cytoplasmiques (Coombs, 1977; Schulz-Baldes, 1977; George, 1980; Brown, 1982; George, 1982).

#### **b- Elimination:**

Les voies possibles d'élimination du métal sont l'excrétion par le tube digestif, par les urines ou par les téguments (branchies, manteau).

Chez *Mytilus*, la perte du métal dans les fèces est importante pour les formes particulières ou colloïdales. Ces fèces peuvent contenir des cellules intestinales mortes et des organites ayant accumulé le métal ou des granules métalliques excrétés (George, 1980). Chez *Scrobicularia*, par exemple, qui accumule fortement le métal particulaire, la perte dans les fèces est, dans ce cas, la voie majeure d'excrétion (George, 1980).

La déposition des métaux dans le byssus chez *Mytilus* peut être une voie significative pour certains métaux, tels que As, Co et V. Elle représente la voie majeure pour le fer (George et al., 1976; George, 1980). Pour le plomb, la déposition dans le byssus et la coquille est une voie d'importance mineure (George, 1980).

Bourgoin (1990) a rapporté un cas d'incorporation du plomb dans la couche de nacre de la coquille de *Mytilus edulis*, ce qui peut être interprété comme un exemple de détoxification et d'élimination du métal des tissus mous. Un résultat similaire a été trouvé

chez un gastéropode aquatique (Everard et Denny, 1984).

Au niveau du rein, où généralement les concentrations les plus élevées sont rencontrées, l'élimination du plomb s'effectue par exocytose des granules métalliques ou par éjection des parties apicales des cellules excrétrices rénales, voire parfois des cellules entières chargées en granules de plomb, dans les urines (Schulz-Baldes, 1977; George, 1980; Brown, 1982).

Ces amas de granules excrétés peuvent aussi être pris et accumulés par des amœbocytes, dont l'excrétion se fait par diapédèse à travers les téguments (manteau, branchies).

Chez d'autres bivalves, tels que les huîtres qui possèdent un rein peu développé, l'élimination d'amœbocytes chargés de métal par la surface du corps constitue une voie importante d'excrétion (Coombs, 1977; George et al., 1978; George, 1980). Ce processus est moins efficace et plus lent que l'excrétion par les urines ou les fèces, ce qui expliquerait les teneurs relativement plus grandes des huîtres comparées aux moules du même site (George, 1980).

L'élimination du métal est généralement un processus lent par rapport à l'accumulation. Les données montrent que même après une période de dépuraction au moins aussi longue que la contamination, les concentrations dans les organismes restent élevées par rapport aux teneurs des animaux non contaminés (Schulz-Baldes, 1974; Zarogian et al., 1979; Newman et McIntosh, 1983; Loring et Prosi, 1986).

Chez *Mytilus edulis*, Schulz-Baldes (1974) trouve que le taux de décontamination dépend de la concentration interne du métal, autrement dit de l'importance de la contamination initiale. Il trouve aussi que le taux de décontamination dans le rein est 4 à 5 fois plus élevé que dans les autres tissus.

Loring et Prosi (1986), après exposition de *Mytilus* et *Littorina* au plomb, observent qu'après 25 jours de dépuraction, *Mytilus* contient encore 78 % de la charge métallique initiale et 51 % pour *Littorina*.

Le temps de résidence du plomb dans l'organisme est variable selon les espèces et les conditions expérimentales (George, 1980). Chez l'huître *Saccostrea echinata*, le temps de résidence du plomb est similaire dans tous les tissus et le temps de demi-vie se situe entre 26 et 34 jours (Denton et Burdon-Jones, 1981). La température et la salinité ne



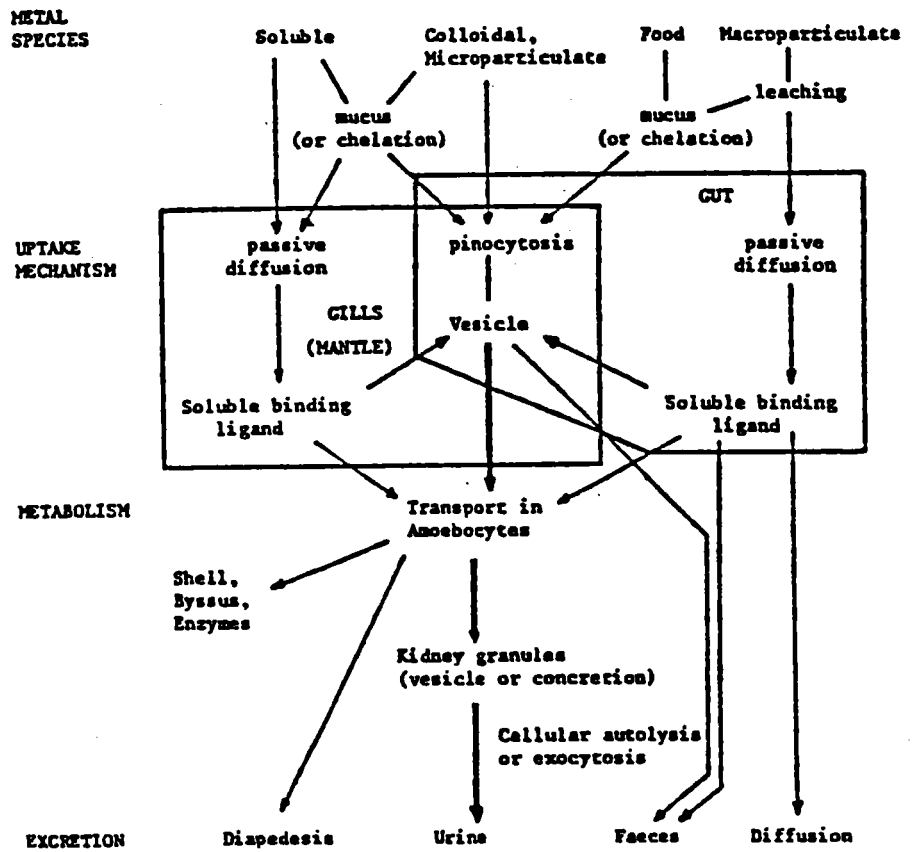


Figure 10: Voies d'accumulation, de métabolisme et d'élimination des métaux chez *Mytilus edulis*.  
(d'après George, 1980)

semblent pas avoir d'effets sur l'élimination du plomb.

Chez une autre huître *Crassostrea virginica* le temps de demi-vie du plomb a été estimé à 38,5 jours (Zarooglan et al., 1979).

D'autres facteurs peuvent influencer la capacité de dépuraton, tels que le cycle sexuel et le poids de l'organisme (Simpson, 1979). La présence d'agents chélatants, par exemple, l'EDTA dans le milieu de décontamination peut favoriser la dépuraton (Gutierrez-Galindo, 1980; Benyahia et al., 1988; Maarouf, 1988, Pihan et al., 1988).

Nous reportons à la figure 10 une compilation d'après George (1980) des voies d'accumulation, d'élimination et le métabolisme des métaux chez l'un des bivalves le plus étudié pour ces phénomènes: *Mytilus edulis*.

#### **I-4 SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET PRÉSENTATION DU TRAVAIL**

Les processus de bioaccumulation et d'élimination sont importants à étudier au moins pour les raisons suivantes:

- Ils donnent une indication directe sur la pollution et aussi des indications sur les conséquences écologiques de la contamination.
- Ils permettent d'identifier les sites cellulaires intervenant dans les processus spécifiques de régulation éventuelle de certains cations et les voies de détoxification.

Les données sur la prise, l'accumulation et l'élimination des métaux par les organismes aquatiques, en particulier les mollusques aquatiques, sont très divergentes. Par conséquent, toute tentative de généralisation des propriétés de ces systèmes ne couvrirait pas toutes les situations. Il y a cependant quelques phénomènes qui sont souvent observés:

- Une proportionnalité entre la concentration du métal dans l'organisme et celle dans le milieu, quels que soient la voie et le mécanisme de prise du métal.
- Les plateaux de saturation ne sont pas toujours atteints, ce qui peut être dû au stockage du métal dans un pool non échangeable ou parfois aux conditions expérimentales.

- Une influence de la matrice physico-chimique du milieu sur l'accumulation.
- Une variabilité assez importante de l'accumulation en fonction de la physiologie de l'animal (cycle sexuel, poids etc...)
- L'existence d'un organotropisme, indiquant que le métal s'accumule dans des tissus et des cellules spécifiques.
- L'absence de régulation métabolique de la prise de métaux xénobiotiques contrairement aux métaux traces essentiels (Cu,Zn) pour lesquels une régulation métabolique a été observée dans des expositions à de faibles concentrations Amiard-Triquet et al., 1986; 1987; Amiard et al., 1987; Chan, 1988; Phillips et Rainbow, 1988).
- L'élimination du métal est plus lente que l'accumulation. La demi-vie biologique peut être variable selon l'importance de la contamination initiale et les conditions expérimentales. La décontamination totale est rarement observée.

Si ces divers phénomènes sont fréquemment rapportés, ils proviennent cependant d'études différentes s'intéressant à tel ou tel aspect particulier, par conséquent les résultats ne sont pas strictement comparables.

Certaines études ont été menées "in situ" dans le but d'évaluer le niveau de contamination de l'écosystème et utilisant les organismes comme support analytique. D'autres réalisées au laboratoire, avec des conditions de contamination proches de celles de l'environnement afin d'établir des relations, liant les teneurs dans les organismes aux concentrations dans le milieu, de manière extrapolable à l'environnement et possédant un caractère prospectif.

D'autres encore ont utilisé des concentrations plus élevées pour amplifier les phénomènes afin de suivre le métabolisme et les mécanismes de détoxification du métal. Il n'y a que très peu d'études globales traitant des divers points soulevés plus haut chez une même espèce et pour un ou plusieurs métaux à la fois. Le seul précédent à notre connaissance concernant le plomb est constitué par les travaux de Schulz-Baldes (1974; 1977) chez *Mytilus edulis*.

Nous avons donc orienté notre travail vers l'étude des différents aspects de la contamination et de la décontamination du plomb chez le bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Notre objectif est d'établir les cinétiques d'accumulation et d'élimination du métal (administré par voie directe et trophique), de tester les facteurs (biotiques et abiotiques) agissant sur ces processus et de déterminer la distribution

tissulaire du plomb. Nous analysons ensuite quelques uns des phénomènes soulignés plus haut en vue d'en déterminer les répercussions sur la validité de l'utilisation de la dreissène comme bioindicateur de pollution métallique. La figure 11 résume les différents points spécifiques de cette étude.

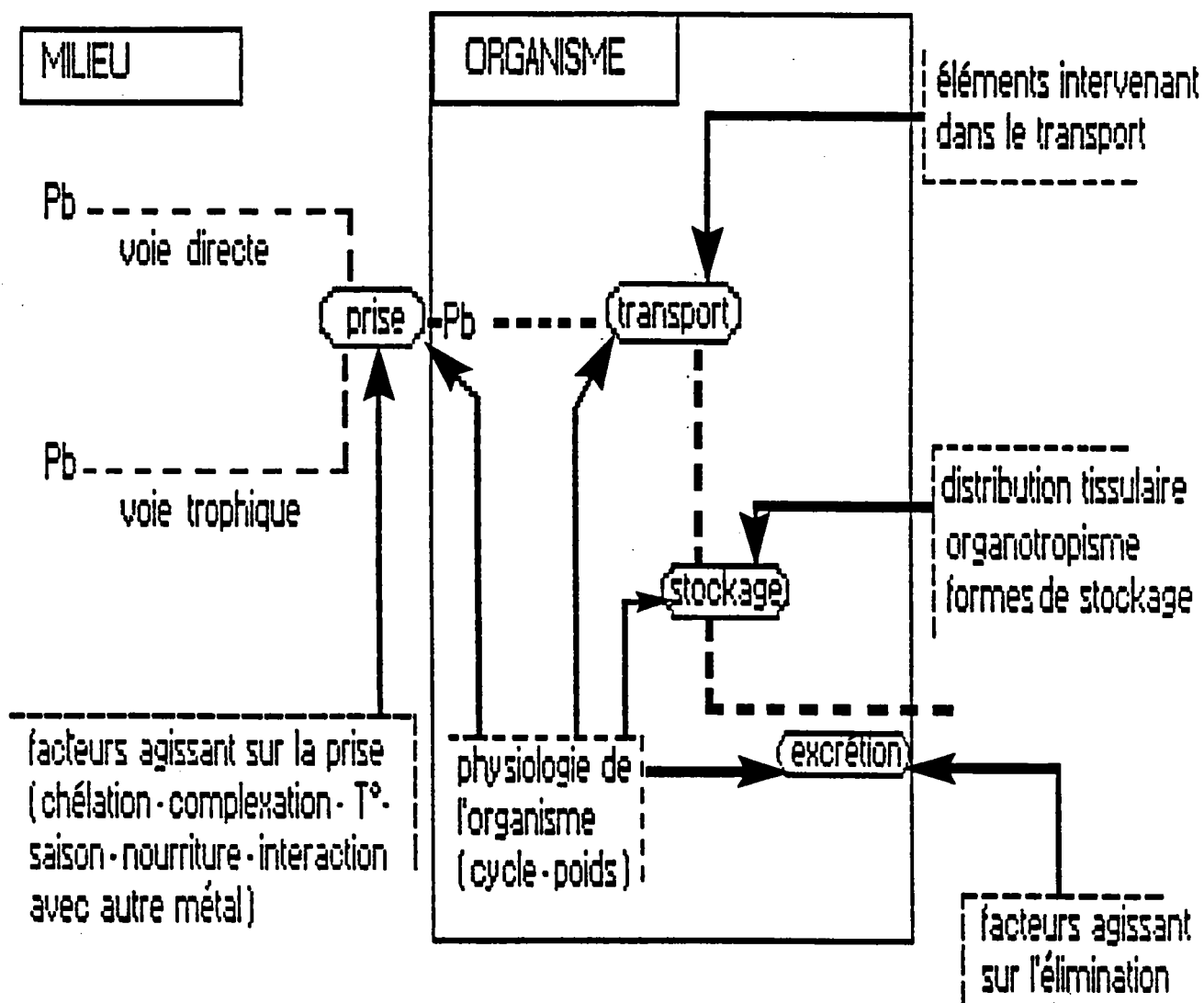


Figure 11: Schéma résumant les différents aspects étudiés et les principaux paramètres pris en compte.

**CHAPITRE II: APPROCHE EXPERIMENTALE.**

## II-1- MATERIELS BIOLOGIQUES

### II-1-1- DREISSENA POLYMORPHA

La moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (Pallas), communément appelée moule zébrée ou moule migratrice, est un Eulamellibranche de la famille des Dreissenidae (fig.12).

*Dreissena polymorpha* est une espèce qui a connu une expansion importante, au cours du siècle dernier, dans tous les systèmes d'eau douce d'Europe. Une étude récente de Hebert et al. (1989) signale son apparition même dans les grands lacs canadiens, où elle semble en passe de devenir l'espèce dominante du benthos. La possession d'un stade véligère libre et mobile et d'un appareil byssal actif, lui permettant de se disperser puis de se fixer dans des sites normalement inoccupés par d'autres bivalves, constituent des éléments importants du succès de l'espèce (Morton, 1969a).

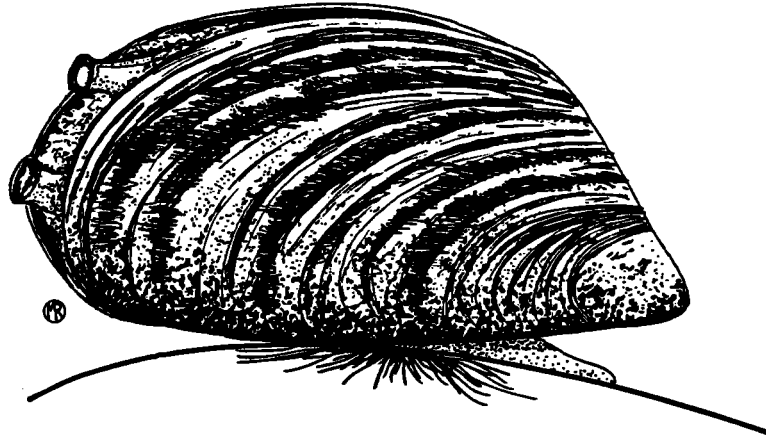
*Dreissena polymorpha* n'est cependant pas confinée dans les eaux courantes, elle colonise aussi les eaux relativement calmes: lacs et réservoirs, (Morton, 1969a). C'est une espèce qui vit en colonies dans lesquelles des individus de tous âges sont réunis en agrégats très denses, fixés à des supports très divers.

Une littérature abondante traite de la biologie et de l'écologie de *Dreissena polymorpha*. Parmi ces nombreuses études, nous nous contenterons de citer en particulier les travaux de Morton (1969a; b; 1971); Stanczykowska (1964; 1968; 1977); Walz (1978), Hebert et al. (1989) et la revue de Testard (1991).

La morphologie et l'anatomie générale des dreissènes rappelle celles des Mytilidés. Ces similarités indiquent soit un ancêtre commun soit des phénomènes de convergence (Morton, 1969a). A ce propos le rein de *Dreissena* a fait l'objet d'une étude anatomique comparative avec les Mytilidés (Giamberini, 1987), ainsi que la gonade et le cycle sexuel (Tourari, 1988).

Le matériel utilisé dans le présent travail provient de la rivière Moselle (Nord-Est, France) où l'espèce est très abondante et facile à récolter. Ceci est un avantage non négligeable qui nous permet de disposer de quantités suffisantes d'individus sans pour autant dépeupler les stations de référence.

(A)



(B)

2 mm

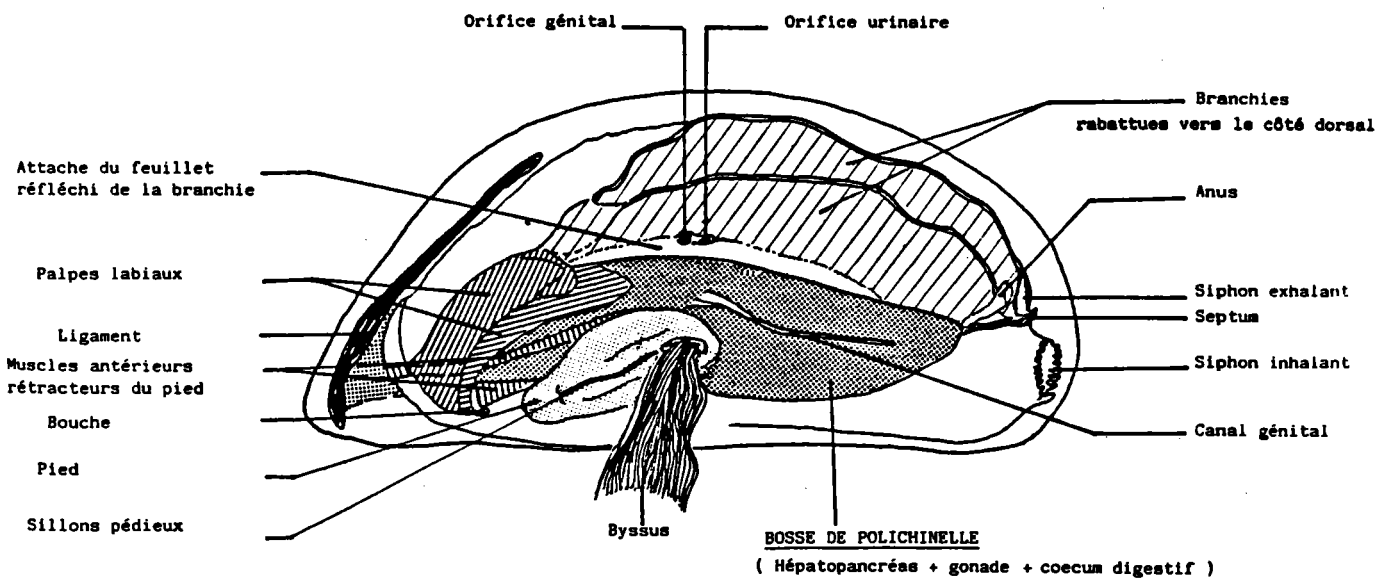


Figure 12: Morphologie externe et interne de la dreissene.

(A): Dreissene vue sur le vivant, côté droit.

(B): Organisation interne, coquille gauche enlevée.

Des études antérieures biologiques et analytiques réalisées "In situ" (Lab. d'Ecologie Univ.Metz, 1981; 1985; Légilze et Crochard, 1987) ont montré l'intérêt de l'espèce dans le biomonitoring des micropolluants métalliques. Ces résultats nous ont amenés à envisager des expérimentations d'expositions métalliques en laboratoire dans une optique complémentaire et comparative avec les études "In situ". En outre, la parenté systématique avec les Mytilidés, organismes très largement utilisés dans les études de contamination métallique en milieu marin, milite en faveur de l'utilisation de la dreissène comme organisme test et conforte ainsi le choix de cette espèce.

#### II-1-2- CHOIX ET CARACTERISTIQUES DE LA STATION DE REFERENCE.

Pour mener nos expérimentations d'exposition au plomb, il a fallu d'abord trouver une population naturelle de dreissènes non soumise à une pollution métallique, pouvant servir de référence et de témoin.

A la lumière des résultats de travaux antérieurs sur le niveau de contamination métallique de la Moselle (Lab. Ecologie Metz, 1981; 1985), il apparaît que la rivière peut être divisée en deux zones (fig.13):

- Une zone à l'amont de la confluence avec l'Orne (affluent de la Moselle très fortement soumis à des rejets sidérurgiques), qui est peu ou pas contaminée.
- Une zone à l'aval de cette confluence qui est polluée.

Dans le secteur amont, la station de Villey-le-Sec située au sud de la ville de Nancy (fig.13) est celle qui est la plus satisfaisante. Plus à l'amont, la qualité de l'eau serait encore meilleure mais la prospection n'a pas révélé d'existence de populations importantes de dreissènes. La station de référence se trouve ainsi à une dizaine de Km à l'aval du centre sidérurgique de Neuves-Maisons. Il faut signaler aussi une activité de traitement de surface (laminage et décapage) dans le cours supérieur de la Moselle, toutefois leur implantation les place très en amont de Villey-le-Sec.

Malgré ces quelques inconvénients et au vu des concentrations en plomb et en zinc rencontrées dans l'eau, les matières en suspension et dans les dreissènes, la station de Villey-le Sec a été retenue comme station témoin. Dans le tableau 14 nous donnons les caractéristiques physico-chimiques et les teneurs métalliques des dreissènes de cette station.



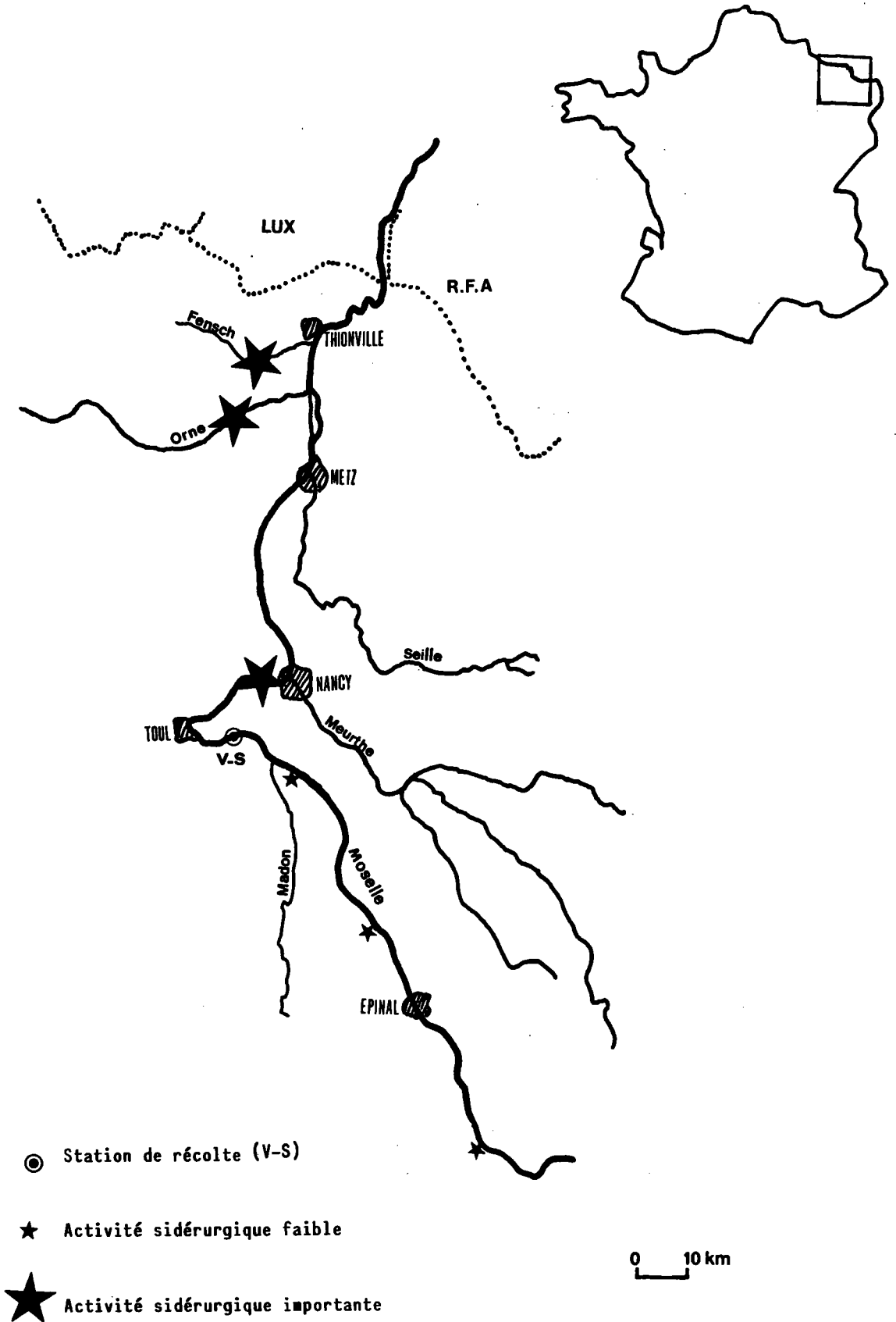


Figure 13: Localisation de la station témoin de récolte des dreissenés: Villey-le-Sec. (V-S)

### II-1-3- RECOLTE DES ECHANTILLONS DE DREISSENES

Des échantillons sont prélevés à la station de référence en nombre suffisant, déterminé au préalable selon le protocole de l'expérimentation. Les animaux sont détachés de leur support par section du byssus, mesurés et seule la classe de taille 18-22 mm est retenue. Ceci nous permet d'éviter les effets dus à l'hétérogénéité d'âge et de taille des échantillons. Cette classe de taille correspond à des individus d'environ 2 ans d'âge et est la plus abondante tout au long de l'année (Léglize, commun. personnelle).

Les animaux sont par la suite placés dans des bacs isothermes et ramenés au laboratoire. Un échantillon d'eau de la station est aussi prélevé pour les analyses physico-chimiques dont les métaux.

### II-1-4- CHLORELLA VULGARIS

Cette algue phytoplanctonique unicellulaire de la classe des Chlorophycées est très commune dans les écosystèmes limniques. La taille des cellules varie selon le moment du cycle entre 2 et 10  $\mu\text{m}$  environ. *Chlorella* a été souvent utilisée dans de nombreuses expérimentations en écotoxicologie (Mugel et Férard, 1978; Boudou, 1982; Férard, 1987). Sa culture intensive est relativement facile à réaliser en laboratoire car elle ne présente pas de grandes exigences nutritionnelles.

En raison des caractéristiques de cette algue, à savoir sa taille proche de la taille préférentielle de la dreissène (Morton, 1971; Stanczykowska, 1977; Ten Winkel et Davids, 1982; Sprung et Rose, 1988) et sa culture intensive relativement facile à mettre en oeuvre, nous l'avons retenue pour nos expérimentations de nutrition des dreissènes et de contamination par voie trophique.

## II-2- METHODOLOGIE DE CONTAMINATION ET DE DECONTAMINATION

### II-2-1- STABULATION ET ACCLIMATATION

Après récolte des échantillons de dreissènes, une deuxième mesure plus précise de la taille est effectuée au laboratoire.

Tableau 14: Physico-chimie de l'eau et teneurs en métaux dans les dreissenes de la station de récolte à Villey-le-sec. (nombre d'échantillons analysés=30)

Paramètres	Minimum	Moyenne	Maximum
pH	7	7,6	8,0
O2 %	75	90	100
Ca++ (mg/l)	41	50	70
Mg++	10,2	12,4	15,4
Na+	6,75	13,5	38
K+	1,70	1,8	2,0
Cl-	31,0	78,1	81,6
SO4--	37,5	60,0	90,0
PO4---	0,10	0,45	1,25
NO3-	2,5	5,5	7,92
HCO3-	105	152	170
MEST	8,0	15,2	30,0
Perte au feu %	12,5	23,0	53,3
Pb total (µg/l)	1,5	3,3	4,5
Pb dissous	0,5	1,6	2,9
Zn total	28,4	37,2	45,4
Zn dissous	16,0	22,3	30,5
Métaux dans les dreissenes en µg/g P.sec (5 ind./éch.)			
Pb p. molles	2,2	7,0	11,0
Pb coquilles	1,5	3,2	4,6
Zn p. molles	145	165	180
Zn coquilles	17	24	32

Tableau 15: Evolution de la concentration initiale en plomb dans les dreissenes en fonction du temps de stabulation. (nombre d'individus par analyse=20)

Temps de stabulation en heures	Concentration en Pb en µg/g poids sec
0	10,9 ± 3,1
24	8,6 ± 1,5
48	6,4 ± 0,7
72	6,8 ± 0,8
96	6,5 ± 0,6
120	6,4 ± 0,5

Après cette sélection, le lot de dreissènes est mis à stabuler dans de l'eau du réseau déchlorée par filtration sur du charbon actif. Cette étape est très importante car elle permet d'éliminer les métaux adsorbés sur les animaux et de favoriser la purge du tube digestif qui peut contenir des particules alimentaires chargées en métaux; ce qui risque d'introduire une source de variation avec une surestimation de la charge métallique initiale.

Généralement une stabulation de 2 à 3 jours est suffisante (Tab.15). Cette étape permet aussi aux animaux de s'acclimater aux conditions de laboratoire avant d'être exposés au métal.

## II-2-2- DISPOSITIF EXPERIMENTAL

En milieu aquatique, toute expérimentation de contamination directe pose le problème de la constance de la concentration du contaminant durant la période d'exposition. Dans le milieu naturel, l'importance des volumes et la dynamique du système minimisent le rôle de ce paramètre, ce qui assure sa stabilité pendant de longues périodes.

Dans une enceinte expérimentale, la décroissance constatée des concentrations du métal dans le milieu est due à deux mécanismes:

- Pertes liées aux conditions de contamination: adsorption sur les parois de l'enceinte, précipitation et volatilisation dues au pH du milieu, à la concentration introduite et à l'aération.
- Fixation du métal par les organismes, qui dépend de l'importance de la biomasse (rapport biomasse/volume du milieu).

Plusieurs travaux ont mentionné, analysé ces problèmes et proposé divers dispositifs expérimentaux (Warren et Davis, 1971; Benoit et al., 1982; Mc Clurg, 1984; Barghigiani et al., 1983; Benyahia, 1985). Différents protocoles peuvent être envisagés pour minimiser la diminution de la concentration en métal dans l'eau:

- Des systèmes "ouverts" avec renouvellement permanent du milieu contaminé. Ils sont applicables pour des expérimentations de durée relativement courte et pour de faibles volumes, mais ils sont difficilement utilisables dans nos conditions expérimentales à cause des volumes utilisés entraînant un rejet important de plomb. Le contrôle des paramètres abiotiques est par ailleurs plus complexe.

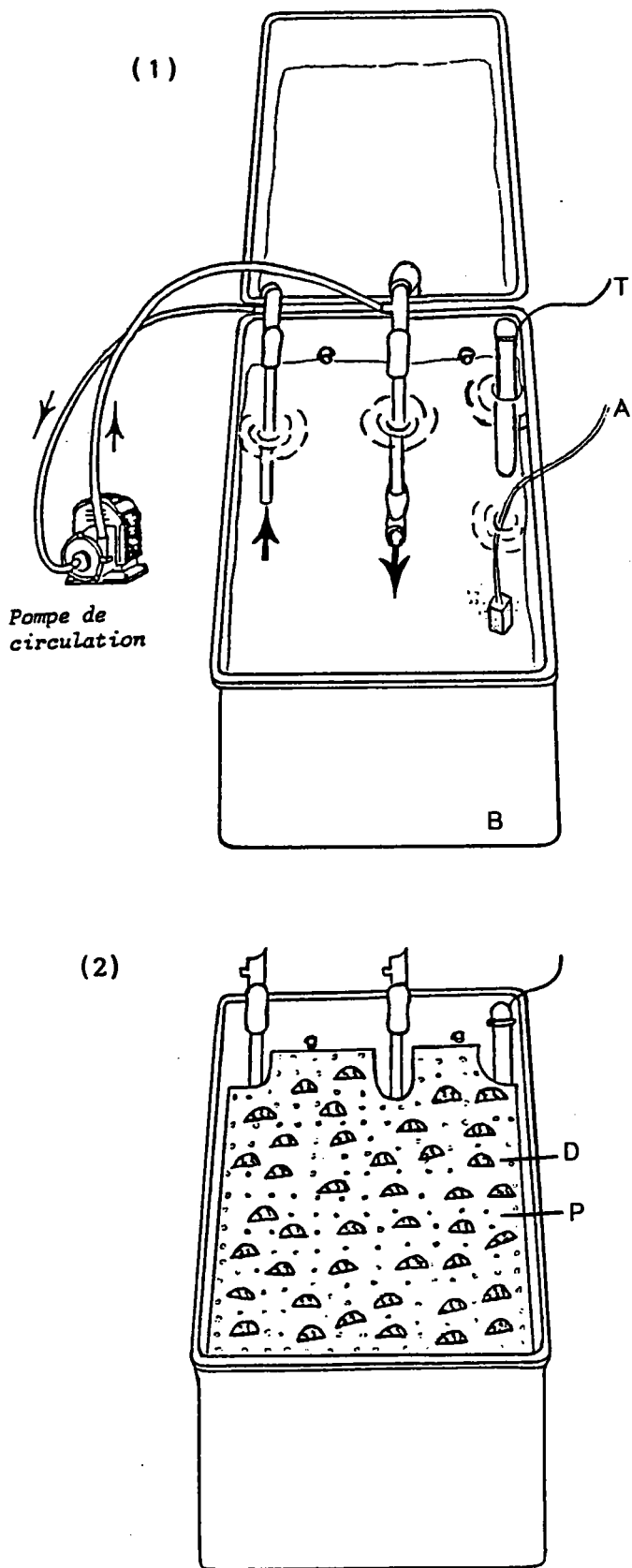


Figure 14: Dispositif expérimental utilisé pour les expériences de contamination et de décontamination.

(1): Schéma d'une unité expérimentale.

(2): Détail montrant les dreissènes en place.

A: diffuseur d'air; B: bac; D: dreissènes; P: plaque en PVC perforée; T: thermostat.

- Des systèmes "fermés" avec apports successifs de métal pour compenser les pertes. L'évolution des paramètres physico-chimiques due à la présence d'organismes (respiration, excrétion) impose cependant un changement périodique du milieu.

- Des systèmes "fermés", avec renouvellement fréquent et total du milieu contaminé.

Des raisons pratiques (agencement du local expérimental, disponibilités en matériel) et des raisons théoriques (souci de minimiser le stress subi par les dreissènes lors de chaque renouvellement), nous ont amenés à retenir la troisième solution. Nous avons donc utilisé un système dynamique fermé avec renouvellement complet des milieux contaminés toutes les 24 heures.

Pratiquement, nous avons été amenés à concevoir et à réaliser des unités expérimentales comme l'illustre la figure 14. Chaque unité est constituée de deux bacs en PVC contenant chacun 15 litres. Une pompe d'aquarium (type Eheim, 6 l/mn) relie les deux bacs de la même unité, brasse le milieu et crée ainsi une circulation d'eau dans les bacs, ce qui assure une bonne homogénéité au sein de l'unité expérimentale. Dans chaque bac, nous avons installé une plaque perforée en PVC à mi-hauteur de la colonne d'eau (fig.14) qui sert de support aux dreissènes. Nous disposons ainsi pour chaque unité expérimentale, de deux enceintes ce qui nous permet d'apprécier la variabilité intra-groupe.

### II-2-3- PREPARATION DE LA NOURRITURE ALGALE

Pour étudier d'une part l'effet du facteur nutritionnel sur le processus de bioaccumulation par voie directe et d'autre part la bioaccumulation par voie trophique, nous avons été amenés à réaliser des cultures de *Chlorella vulgaris*.

Les cultures algales sont réalisées en milieu liquide et aseptique (le tableau 16 donne la composition du milieu de culture) dans une chambre thermostatée à  $20^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Les cultures sont effectuées dans des erlenmeyers d'une capacité de 2 litres. Les solutions algales sont aérées en permanence, ce qui permet une agitation en plus de l'apport gazeux et soumises à une photopériode de 16 heures d'éclairement. Afin d'éviter l'épuisement du milieu et le vieillissement des cultures, un repiquage hebdomadaire est effectué dans chaque erlenmeyer.

Au moment de chaque repiquage, des échantillons de solution sont prélevés pour la quantification de la population algale par numération au compteur de particules (Counter-coulter).

La chlorelle est une algue qui se prête bien à cette technique de comptage, car sa suspension ne forme pas d'agrégats et est très homogène. Avant la numération, nous procédons à une dilution de 1/500 (la plus couramment utilisée) dans un électrolyte standard (Isoton II). Pour chaque échantillon algal un minimum de 3 comptages successifs est effectué, de même un "blanc" de comptage (Isoton II seul) est réalisé et dont il est tenu compte dans les calculs des concentrations cellulaires.

Le reste de la solution est centrifugé. Le culot algal est recueilli et remis en suspension pour servir de nourriture aux dreissènes. Ainsi ces dernières sont nourries toutes les 48 heures avec des solutions de chlorelles âgées de 7 jours.

#### II-2-4- DEFINITION DES PROTOCOLES DE CONTAMINATION ET DE DECONTAMINATION

Nous exposerons en premier lieu les conditions communes à toutes les expérimentations et ensuite nous expliquerons les spécificités de chaque expérience en fonction du but recherché.

Nos différents essais sur les dreissènes ont été réalisés dans les conditions suivantes:

##### - Local expérimental:

La préparation des milieux ainsi que les expériences de contamination et de décontamination sont effectuées dans une salle aménagée et réservée à cet effet. La température de la salle est maintenue à 20°C . Pour une expérience réalisée à une température basse, nous avons utilisé une autre salle climatisée à 15°C.

##### - Eau du milieu et paramètres contrôlés:

Nous avons choisi comme milieu expérimental l'eau du réseau urbain déchlorée par filtration sur du charbon actif (caractéristiques physico-chimiques du milieu données au tableau 17). En comparant la composition chimique du milieu expérimental et celle de l'eau de la station de référence (tableau.14), nous constatons que l'eau du milieu présente une dureté plus élevée qui n'est pas sans incidence sur les processus de bioaccumulation.

Tableau 16: Composition chimique du milieu de culture des chlorelles (milieu L.C. modifié).

Composés	Concentrations (mg/l)
<b>Macro-éléments:</b>	
Ca (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	40
KNO <sub>3</sub>	100
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	30
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40
<b>Oligo-éléments I:</b>	
CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O	0,015
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub>	0,030
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,030
CoCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,030
Mn (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0,030
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub> , H <sub>2</sub> O	0,030
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,030
<b>Oligo-éléments II:</b>	
(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> )Fe	0,8125
FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,3125
FeCl <sub>3</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,3125

Tableau 17: Physico-chimie du milieu expérimental (eau du réseau urbain déchlorée) (n=20)

Paramètres	Minimum	Moyenne	Maximum
pH	7,8	8,2	8,6
O <sub>2</sub> %	80	90	100
Ca <sup>++</sup> (mg/l)	90	105	115
Mg <sup>++</sup> ..	6,12	7,53	8,91
Na <sup>+</sup> ..	4,2	6,51	13,8
K <sup>+</sup> ..	0,65	1,10	1,85
Cl <sup>-</sup> ..	14,2	21,2	33,6
SO <sub>4</sub> <sup>--</sup> ..	36,5	46,5	58,5
PO <sub>4</sub> <sup>---</sup> ..	0,02	0,06	0,12
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ..	3,5	5,5	12,1
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ..	256	280	305



Avant chaque changement de milieu (24 heures), l'eau du réseau est stockée dans une cuve de 300 litres où elle est aérée et amenée à l'aide de thermoplongeurs à la température voulue avant le remplissage des unités expérimentales.

Pendant toute la durée des expériences, la régulation de la température de l'eau est assurée au moyen de thermoplongeurs automatiques (type Rena-100 w) introduits dans chaque unité expérimentale. Une aération permanente est assurée par des pompes électromagnétiques (type Rena-301) et des diffuseurs (voir fig.14).

#### **II-2-4-1- Protocoles de contamination**

Trois protocoles sont définis pour étudier la contamination:

##### **A- Contamination par voie directe:**

La population de dreissènes après stabulation et acclimatation de 3 jours est répartie par lots de 200 à 300 individus dans chaque unité expérimentale.

L'ajout de plomb est réalisé à partir d'une solution mère de nitrate de plomb acidifiée à 1% d'acide nitrique (normapur 69% minimum). Le volume ajouté est calculé en fonction de la concentration voulue dans le milieu expérimental. Les concentrations en plomb utilisées sont 0.25; 0.50; 1.0 et 1.5 ppm. Les valeurs élevées ont été retenues afin d'accentuer certains phénomènes difficilement détectables aux faibles concentrations et de pouvoir estimer la bioaccumulation maximale, voire la saturation des cinétiques d'accumulation. La dynamique de bioaccumulation est suivie par des prélèvements successifs d'échantillons de dreissènes. Aucune nourriture n'est fournie pendant la durée de l'exposition.

L'influence de la matrice physico-chimique du milieu sur la contamination directe a été étudiée à travers l'effet des paramètres suivants: la température, les agents complexants comme l'EDTA et les phosphates et la présence d'un autre métal tel que le zinc.

Dans une autre série expérimentale, les dreissènes sont contaminées par voie directe mais nourries (dans des bacs en dehors du milieu de contamination) par des solutions de chlorelles de 1 à  $1,5 \cdot 10^6$  cell/ml pendant 4 heures tous les 2 jours. Elles sont

remises ensuite dans les milieux contaminés. Ceci nous permet d'étudier l'influence du facteur nutritionnel sur la bioaccumulation.

Nous avons également testé la réponse d'un lot de dreissènes à des vagues successives de contamination. Ceci est réalisé par une exposition à 30 ppb de plomb pendant 4 heures toutes les 48 heures. Nous avons choisi cette faible concentration pour rester proche des valeurs rencontrées "in situ".

#### B- Contamination par voie trophique:

Les dreissènes sont introduites dans les unités expérimentales mais ne reçoivent pas d'apport de plomb dans le milieu. Seule la consommation de chlorelles préalablement contaminées assure le transfert du métal. Les dreissènes sont nourries d'algues contaminées pendant 4 heures tous les 2 jours. Ces algues ont été auparavant exposées à 1 ppm de plomb pendant 24 heures avant le nourrissage des dreissènes. La concentration cellulaire de la suspension algale est de 1 à  $1,5 \cdot 10^6$  cellules/ml.

#### C- Contamination globale (voie directe et trophique):

Le protocole suivi est similaire à celui présenté pour la contamination directe, mais en plus les dreissènes reçoivent tous les 2 jours des chlorelles contaminées.

### II-2-4-2- Protocole de décontamination

Après les études de contamination, nous avons analysé les processus de décontamination en relation avec des paramètres abiotiques (EDTA, température) et biotique (saison). Les cinétiques d'élimination du métal sont suivies par des prélèvements périodiques de lots de dreissènes. Durant les premiers jours de décontamination nous avons augmenté le taux de renouvellement du milieu en procédant au changement total 2 fois par jour.

## II-3- NIVEAUX D'ANALYSE ET TECHNIQUES UTILISEES

### II-3-1- NIVEAUX D'ANALYSE

L'étude des processus de bioaccumulation repose sur la détection et le dosage du plomb dans les organismes. Notre analyse procède de deux approches

complémentaires:

- La première, globale, portant sur des échantillons de la population de dreissènes.

La dynamique de la contamination est suivie par des prélèvements de lots de dreissènes échelonnés dans le temps en fonction de la durée d'exposition. Ces échantillons sont destinés à l'analyse globale de la bioaccumulation. La petite taille des dreissènes ( $20 \pm 2$  mm) ne permettant pas un dosage fiable sur un individu (poids sec faible et grande variabilité), nous a amené à procéder à l'analyse par échantillons de 5 individus mélangés.

- La deuxième, vise à approfondir l'étude de la bioaccumulation au niveau de l'organisme et des organes.

Nous avons procédé dans ce cas à la dissection de lots de dreissènes pour isoler certains organes en particulier la coquille, le byssus, le manteau, les branchies et le reste des parties molles. La dissection s'est révélée très délicate à cause de la petite taille des organismes notamment pour isoler entièrement les organes tels que les branchies et le manteau, et pratiquement impossible pour séparer les organes que nous avons regroupés dans "le reste" (reins, complexe gonado-digestif et muscles).

Chaque groupe d'organes est issu de la dissection d'un lot de 10 dreissènes et est destiné au dosage du plomb. Les limites de dissection imposées par la taille des organismes font qu'une étude plus détaillée de la distribution tissulaire du plomb a nécessité le recours à des techniques de localisation histochimique.

### II-3-2- TECHNIQUES UTILISEES

Pour la quantification des processus de bioaccumulation du plomb (globale ou au niveau des organes) comme pour le dosage d'autres métaux, nous avons utilisé la spectrométrie d'absorption atomique. Pour ce qui est de la répartition tissulaire et cellulaire du plomb dans les organismes, relative à la deuxième approche, nous avons employé les techniques d'histologie et d'histochimie, complétées par la technique de microanalyse à impact laser LAMMA. Compte tenu de la spécificité des techniques mises en oeuvre, nous préférons les présenter séparément.

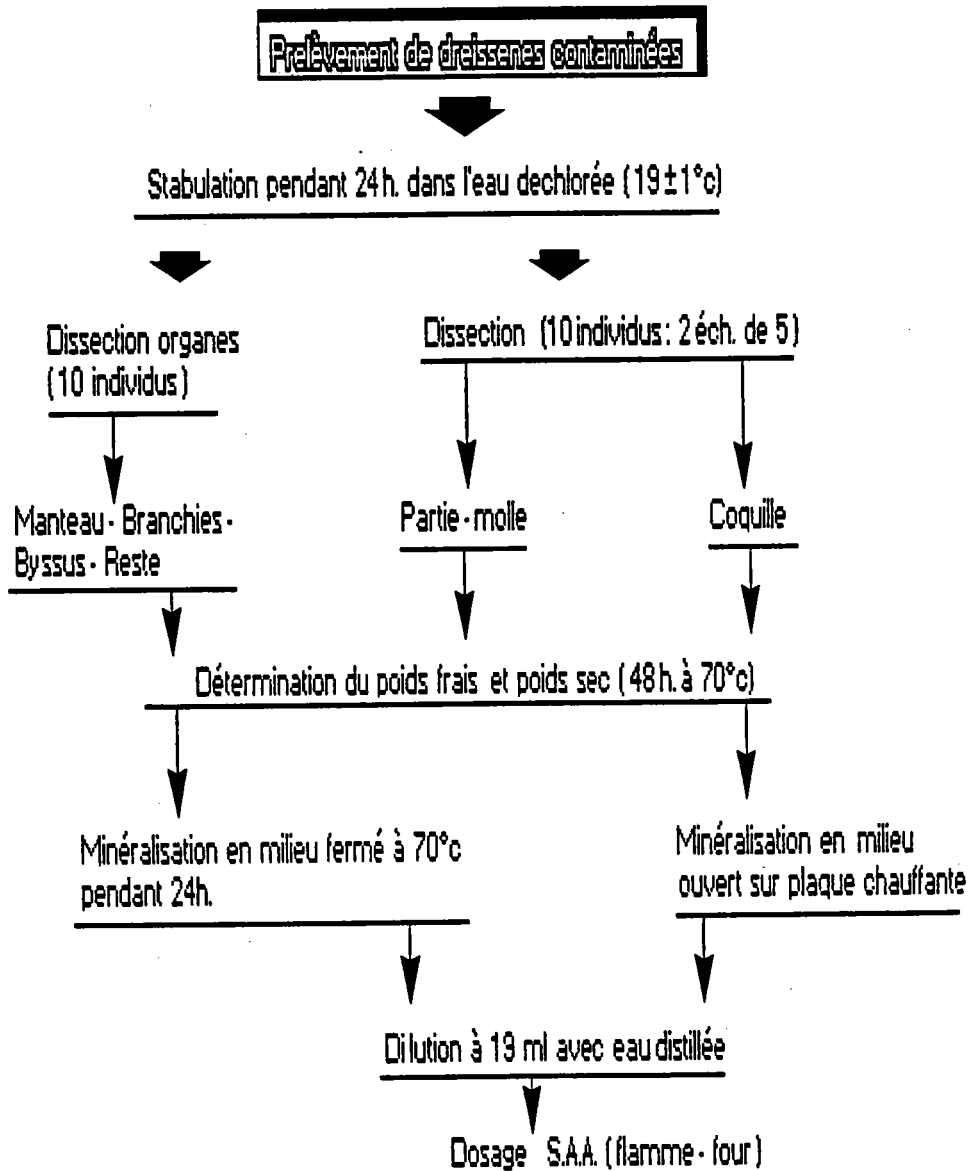


Figure 15: Mode opératoire de préparation des échantillons pour la détermination analytique des métaux.

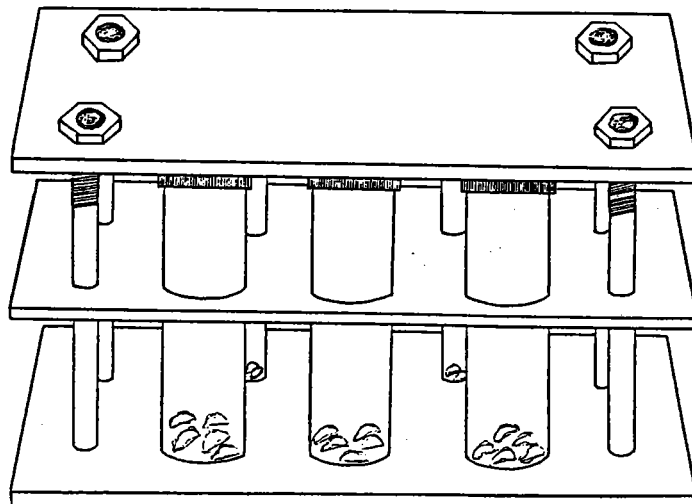


Figure 16: Portoir permettant la minéralisation à chaud des échantillons en milieu fermé.

### a- Technique de détermination analytique du plomb.

#### - Préparation des échantillons:

Les échantillons de moules préalablement disséqués, séchés et pesés (fig.15), sont minéralisés par attaque nitrique à chaud en milieu fermé. Un volume de 3 ml d'acide nitrique (normapur 69% min.-Prolabo) dilué à 50% est ajouté aux échantillons dans des tubes en polypropylène. Ces derniers sont bouchés et disposés dans des portoirs à minéralisation fermés et vissés, ce qui permet de maintenir un milieu pressurisé durant la minéralisation (fig.16) Ils sont ensuite placés dans l'étuve à 70°C pendant 24 h. Pour les échantillons d'algues utilisés pendant l'expérience de contamination trophique, les culots d'algues sont minéralisés de la même manière par addition de 0.5 ml d'acide nitrique normapur.

Ces conditions de minéralisation sont relativement simples (un seul acide, absence d'oxydant) par rapport à d'autres méthodes plus complexes (mélange d'acides  $\text{HNO}_3$  +  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , en milieu oxydant: permanganate). En outre le pression à l'intérieur des tubes augmente l'efficacité de l'attaque de la matière organique.

Deux types de vérifications ont été réalisés pour tester l'efficacité de la méthode de minéralisation:

- Ajout de quantités connues de plomb dans les tubes de minéralisation et contrôle ultérieur.
- Comparaison avec d'autres méthodes (attaque acide  $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{SO}_4$ , minéralisation en milieu ouvert).

Les contrôles se sont révélés positifs. Dans tous les cas la minéralisation est totale et les valeurs obtenues ne montrent pas de différences significatives.

La méthode retenue présente aussi l'avantage de permettre la minéralisation de plusieurs séries d'échantillons en même temps et de limiter la contamination puisque la pesée et la minéralisation se font dans le même tube. A cet égard, un témoin de minéralisation subissant le même traitement que les échantillons est systématiquement introduit dans chaque portoir afin de détecter et de quantifier une éventuelle contamination dont il sera tenu compte lors des calculs des concentrations.

Signalons aussi que les performances de cette méthode de minéralisation des dreissènes sont valables pour la plupart des métaux (Zn, Cd, Cu, Hg...).

- Dosage du plomb:

Les tubes de minéralisation sont complétés avec de l'eau distillée à 19 ml pour les minéralisats de moules et à 10 ml pour les minéralisats d'algues. Le taux final d'acidification des échantillons est alors, respectivement de 7.8 % et 5 % pour les minéralisats de moules et d'algues.

Pour les échantillons d'eau du milieu de contamination ou le surnageant algal, le dosage se fait directement après acidification à 1 % de HNO<sub>3</sub>.

Le plomb est dosé par spectrométrie d'absorption atomique. Nous disposons actuellement de deux spectromètres Perkin-Elmer:

- Pour les faibles concentrations nous avons utilisé un spectromètre d'absorption atomique sans flamme (modèle 305 B). Equipé d'un four en graphite (HGA 76), d'un injecteur automatique, et d'une lampe au deutérium pour la correction de l'absorption non spécifique. Les déterminations sont faites dans les conditions suivantes:

Intensité de la lampe au plomb (cathode creuse): 10 mA

Longueur d'onde (raie de résonance du Pb): 283.3 nm

Largeur de bande spectrale (slit): 0.7 nm

Gaz vecteur: Argon

Phase I: phase de séchage: 20 sec. à 130°C

II: phase de destruction de la matrice: 15 sec. à 700°C

III: phase d'atomisation: 4 sec. à 2300°C

Pour augmenter la sensibilité, l'opération Gaz-Stop peut être utilisée: Le courant d'argon est arrêté pendant les quelques secondes de la phase d'atomisation, favorisant ainsi la stabilisation de la vapeur atomique dans le faisceau. L'absorbance mesurée est donc plus grande et la sensibilité meilleure. La limite de détection avec cette opération est de l'ordre de 0.5 µg/l.

Le dosage est effectué par la méthode des ajouts dosés.

- Pour les concentrations plus élevées, nous disposons d'un spectromètre d'absorption atomique avec flamme (modèle 2380), équipé aussi d'un correcteur D2. Le dosage dans ce cas se fait par étalonnage interne de l'appareil à l'aide de standards préalablement préparés. Les valeurs sont données directement en

concentrations. Les conditions de dosage sont les suivantes:

Lampe à cathode creuse: 10 mA

Longueur d'onde: 217.0 nm (plus sensible que la 283.3 mais donnant un bruit de fond assez important)

Slit: 0.7 nm

Flamme Air/Acétylène oxydante, le rapport est de 40/20.

## **b-Techniques d'histologie, histochimie et microanalyse**

### **\* Histologie topographique**

L'étude histologique a porté sur 2 lots de 5 individus témoins et exposés à chaque prélèvement.

- Dissection et fixation: Le byssus est enlevé et la dreissène est extraite de sa coquille très délicatement afin de ne pas endommager la partie dorsale très fragile où se situe le complexe rénopéricardique. La partie molle ainsi recueillie est immergée dans le liquide fixateur. Les fixateurs utilisés sont le Bouin-Hollande et le Carnoy.

- Inclusion: Elle se fait dans la paraffine à 56°C, après déshydratation par une série d'alcools croissants et passage dans des bains de toluène. Des coupes sériées de 7 µm sont réalisées.

Les coupes sont déparaffinées, hydratées et colorées par le trichrome en un temps, l'hémalum-éosine ou le bleu de toluidine.

### **\* Histochimie**

La détection du plomb a été réalisée selon la méthode au chromate de potassium. Il s'agit d'une méthode de conversion: le traitement de fragments tissulaires frais ou fixés au formol, par une solution de chromate ou bichromate de potassium convertit le métal en cristaux jaunâtres de chromate de plomb. Sur ce principe, deux types de procédés opératoires ont été pratiqués (Ganter et Jolles, 1970):

- Fixation de fragments tissulaires ou de la partie molle entière par un fixateur à base de bichromate de K (liquide de Möller: Formaldéhyde à 40% + bichromate de K à 3%).

- Ou bien fixation au Carnoy, coupe à la paraffine et traitement pendant plusieurs jours par une solution de chromate de K acétylée.

Les sels de plomb apparaissent sous forme de cristaux jaunâtres sur fond variable selon la coloration adoptée: Bleu de toluidine, rouge nucléaire solide ou pas de coloration.

\* Microanalyse par Impact laser

Nous avons retenu la technique de microanalyse sous impact laser dans le but de vérifier les observations de détection histochimiques du plomb (cristaux jaunâtres de chromate de Pb), et d'effectuer des études préliminaires concernant les éléments chimiques associés au plomb dans les organites cellulaires.

La préparation des échantillons a été réalisée selon le protocole mis au point par C. Crochard (Lab. Ecologie Univ. Metz):

- Pour les vérifications des détections histochimiques, la préparation des échantillons est pratiquée de la même manière que pour l'histochimie. Les coupes réalisées pour la recherche histochimique ont pu être retaillées à la dimension voulue, montées sur des grilles doubles en cuivre et passées pour vérification au LAMMA. Comme il s'agit de sections épaisses et de surcroît colorées, la visée des points d'impact du faisceau laser est par conséquent aisée.

- Pour l'étude des localisations cellulaires, la fixation des pièces est réalisée immédiatement après dissection par congélation en deux temps: propane puis azote liquide, suivie d'une lyophilisation à -65°C ou -90°C. L'enrobage au spurr est pratiqué sous vide dans l'appareil. La coupe d'une épaisseur de 1 à 2 µm est réalisée à sec et montée dans des grilles doubles en cuivre.

Dans ce cas les coupes étant semi-fines, l'absence de coloration représente un lourd handicap pour la visualisation et le repérage des structures. Aussi, il a été nécessaire de recourir à un système de transillumination UV permettant de visualiser l'échantillon sur un écran et de cibler les points d'impact du faisceau laser d'un diamètre de 1 à 3 µm.

La microanalyse a été effectuée sur l'appareil LAMMA 500 (Leybod-Heraeus) dans deux laboratoires. D'une part, au laboratoire de spectroscopie et d'analyse LAMMA de l'université de Metz (équipe du Prof. Muller) pour la partie concernant les vérifications des résultats histochimiques en visualisation normale. Et d'autre part, à l'institut de physiologie de l'université de Düsseldorf (équipe du Prof. Kaufmann) qui possède l'appareillage de



visualisation UV pour les localisations cellulaires et les éléments associés au métal.

Le principe de l'analyse est destructeur. Chaque impact laser volatilise un microvolume de préparation et les ions générés dans le microplasma sont ensuite analysés par spectrométrie de masse. Le LAMMA 500 comprend un laser de puissance Néodyme-Yag quadruplé, un laser pilote Helium-Neon, un microscope optique, un système de visualisation UV, une chambre d'ionisation, un groupe de pompage et un spectromètre de masse à temps de vol relié à un enregistreur.

#### **II-4- EXPRESSION ET TRAITEMENT DES RESULTATS**

Les résultats de dosage du plomb dans le milieu et dans les organismes sont exprimés de la manière suivante:

Dans l'eau, les résultats sont exprimés en concentration en  $\mu\text{g/l}$  (ppb) ou  $\text{mg/l}$  (ppm).

Dans les organismes, les dosages sont exprimés par deux types de résultats: ceux relatifs à la concentration sont donnés en  $\mu\text{g Pb/g}$  de poids sec, et ceux concernant la teneur (ou contenu) sont exprimés en  $\mu\text{g Pb}$ .

Le dosage dans les organes permet le calcul de la teneur en plomb ( $\mu\text{g Pb}$ ) rapportée au contenu total de l'animal, ou de la concentration du métal dans l'organe ( $\mu\text{g Pb/g}$  poids sec organe).

Le calcul des teneurs et des concentrations est effectué soit sur des échantillons de 5 individus mélangés pour l'analyse globale, soit sur des échantillons de 10 individus pour l'analyse dans les organes.

En plus de la concentration et de la teneur en plomb, il existe d'autres paramètres qui sont fréquemment utilisés dans la littérature pour caractériser les dynamiques de bioaccumulation. Nous retiendrons le facteur de concentration (FC) et l'indice de contamination (IC) définis comme suit:

$$\text{F.C} = \frac{\text{Cm } \mu\text{g/g}}{\text{Ce } \text{mg/l}}$$

$$\text{I.C} = \frac{\text{Cm } \mu\text{g/g}}{\text{Ci } \mu\text{g/g}}$$

Cm : Concentration dans les moules.

Ce : Concentration dans le milieu

Ci : Concentration initiale dans les moules avant contamination.

Pour caractériser la décontamination, nous avons calculé le taux de décontamination défini de la manière suivante:

$$T \% = \frac{Ci - Cf}{Ci} \times 100$$

Ci : Concentration initiale correspondant au début de la décontamination

Cf : Concentration finale correspondant à la fin de la décontamination

Ce paramètre renseigne sur la quantité de métal relargué pendant une période donnée. Nous avons estimé aussi la demi-vie biologique du plomb (durée nécessaire pour éliminer la moitié de la teneur initiale du contaminant dans l'organisme). Ce critère, dérivé du premier, est souvent utilisé pour quantifier la vitesse de décontamination.

Les résultats de nos expérimentations sont constitués par des séries de valeurs brutes auxquelles nous avons appliqué des transformations mathématiques dans certains cas et des tests statistiques afin d'éprouver la validité des résultats en vue d'accroître leur exploitation et interprétation.

\* Chaque résultat est représenté par la moyenne et l'écart-type (aussi le coefficient de variation: CV), ces paramètres permettent d'apprécier la variabilité des observations. Le CV permet de connaître le pourcentage de cette variation sur l'effectif analysé. Au besoin nous procédons à une transformation logarithmique des résultats pour aider à l'homogénéité des variances en particulier pour l'application de l'analyse de variance (ANOVA).

\* Comparaisons:

- Comparaison de deux moyennes:

Le test t de Student permet de comparer deux moyennes  $m_1$  et  $m_2$ . Les 2 populations doivent être normales et de variances égales. La fonction discriminante est:

$$t = \frac{m_1 - m_2}{s \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}}$$

Le t calculé est comparé aux limites  $t_{\alpha_1}$  et  $t_{1-\alpha_2}$  (pour un risque  $\alpha = \alpha_1 + \alpha_2$  partagé en deux risques égaux  $\alpha_1 = \alpha_2$ ). Le nombre de ddl à considérer est  $n_1 + n_2 - 2$ . L'hypothèse nulle est acceptée si  $t_{\alpha_1} < t < t_{1-\alpha_2}$ .

Dans le cas où l'égalité des variances n'a pu être vérifiée (test de comparaison effectué ou non), nous avons utilisé le test de Welch dont les conditions de validité n'imposent aucune condition aux variances. La fonction discriminante est:

$$R = \frac{m_1 - m_2}{\sqrt{s_1^2/n_1 + s_2^2/n_2}}$$

La décision comme dans le cas du test t est prise en comparant R calculé aux limites  $R_{\alpha_1}$  et  $R_{1-\alpha_2}$  en fonction des ddl  $n_1-1$  et  $n_2-1$  et un paramètre supplémentaire B.

- Comparaison de variances:

Le test de Snedecor permet la comparaison de deux variances de deux populations normales. La fonction discriminante est définie par la formule:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2}$$

Dans le cas de la comparaison de 3 variance ou plus, le test de Cochran est employé. Les nombres de degrés de liberté associés à chaque estimation de variance doivent être égaux et les populations normales. La fonction discriminante est la suivante:

$$G = \frac{s^2 \max.}{\sum_i s^2_i}$$

La décision est prise en comparant la valeur de G calculée à partir des résultats expérimentaux à la limite  $G_{1-\alpha}$  ( $\alpha$  étant le risque choisi). L'hypothèse  $H_0$  de l'égalité des variances est acceptée quand  $G < G_{1-\alpha}$ .

\* Liaisons entre variables:

- Régression entre deux variables:

L'application d'une méthode de régression à 2 variables X et Y a pour objet l'étude de la liaison entre ces 2 variables et sa représentation par une équation mathématique. Cette relation permet la comparaison entre différents types de liaisons.

- Régression multiple:

Cette méthode permet par la réalisation d'un plan factoriel complet d'étudier

avec efficacité l'effet de plusieurs variables et leurs interactions sur un phénomène observé (Bois, 1984; Bois et al., 1986; Heuliet, 1986; Kaitala, 1988).

Par définition, dans un plan factoriel complet, chaque valeur donnée à une variable est associée de toutes les manières possibles à celle de toutes les autres. Ceci permet d'annuler les covariances et de rendre donc les variables orthogonales deux à deux.

Si l'on donne aux  $p$  variables de bases respectivement  $n_1, n_2, n_3, \dots, n_p$  valeurs (ou niveaux ou modalités), le nombre d'essais à effectuer dans le plan expérimental sera:  $N = n_1 \cdot n_2 \cdot n_3 \dots \cdot n_p$ .

Les modalités de chaque variable sont exprimées en notation codée, c-à-d des nombres sans dimension centrés sur 0 et écartés d'une même valeur. Dans le cas par exemple d'un plan factoriel à 3 variables de base ayant chacune 3 modalités (ou niveaux), le nombre d'essai à réaliser est  $3 \cdot 3 \cdot 3 = 27$ . Les 3 modalités de chaque variable seront notées -1, 0, +1 .

Le modèle obtenu est un polynôme de la forme:

$$Y = B_0 + B_1 X_1 + B_2 X_2 + B_{12} X_1 X_2 + B_{11} X_1^2 + \dots$$

$X_i$  étant les variables de base,  $B_i$  étant les coefficients.

Ce modèle est linéaire pour les paramètres  $B_i$  mais contient aussi des fonctions puissances des variables explicatives de base  $X_i$ . Il contient enfin des termes produits ( $X_i X_j$ ). Les termes linéaires sont interprétés comme effets principaux et les termes produits comme interactions.

Ajuster le modèle par les moindres carrés consiste à déterminer les coefficients  $B_i$  qui minimisent  $\sum e^2$ : somme des carrés des écarts des valeurs vraies aux valeurs calculées par le modèle  $Y$ .

Les  $N$  paramètres du modèle sont rangés par ordre décroissant de leur contribution à l'amélioration de la régression. Il faut déterminer ensuite si les coefficients  $B_i$  calculés sont statistiquement différents de 0. La significativité des coefficients est testée par analyse de variance. Pour chaque terme du polynôme un rapport  $F$  obtenu en divisant la contribution de chaque variable par la variance intra-groupe des moyennes des répétitions est comparé aux valeurs tabulées du  $F$  à 5 % d'erreur. Le terme est retenu si  $F$  est supérieur à la valeur tabulée. La contribution de chaque variable est la somme des carrés associée à la variable avec ici 1 ddl. La variance intra-groupe des moyennes

(erreur expérimentale) est obtenue en divisant la variance intra-groupe des échantillons par le nombre  $K$  de répétitions. Elle a  $N(K-1)$  ddl.

Pour les termes retenus, il faut veiller à ce que la variance résiduelle du modèle soit supérieure à la variance intra-groupe expérimentale. Ce dernier critère permet d'adapter la précision du modèle à la variabilité expérimentale des observations et de ne pas atteindre une précision illusoire.

Un programme informatique (Bois, 1984; Bois et al., 1986) effectue les calculs, fournit l'équation de régression et teste la significativité des coefficients.

**CHAPITRE III: ETUDE DES PROCESSUS DE CONTAMINATION ET  
DE DECONTAMINATION.**

### **III-1- LE PLOMB DANS LE MILIEU EXPERIMENTAL**

Le dispositif expérimental utilisé est un système fermé avec renouvellement total du milieu toutes les 24 heures. De ce fait, les concentrations en plomb dans le milieu ne peuvent être maintenues constantes. Nous avons donc suivi l'évolution du plomb dans le milieu pour toutes les concentrations testées et pendant plusieurs cycles de 24 heures.

Les figures 17 et 18 montrent les cinétiques d'évolution du plomb dans le milieu pour les concentrations utilisées: 250, 500, 1000 et 1500  $\mu\text{g/l}$  sur deux cycles de 24 heures avec ou sans EDTA en présence de dreissènes. Les pertes métalliques de la phase aqueuse s'expliquent en grande partie par la précipitation (favorisée par le pH légèrement basique:  $8.2 \pm 0.4$ ) et l'adsorption sur les parois du dispositif expérimental. La bioaccumulation par les dreissènes et la fixation sur les coquilles participent à cette cinétique.

Il est à noter aussi que la perte métallique est d'autant plus importante que la concentration est élevée (tableau 18). En outre pour la même concentration la perte est légèrement plus grande en début d'exposition (fig.17). Ce résultat s'explique par la saturation des sites d'adsorption sur les parois et par un ralentissement de l'accumulation par les organismes.

Compte-tenu de la décroissance des concentrations en plomb dans le milieu dont nous avons indiqué les causes, il est évident que les concentrations réelles auxquelles ont été exposées les dreissènes correspondent aux aires situées sous les courbes de cinétique par cycle de 24 heures. Nous appellerons concentrations nominales les concentrations initiales de métal (250, 500, 1000, 1500  $\mu\text{g/l}$ ). Pour les besoins de l'interprétation des résultats de bioaccumulation nous avons procédé à l'intégration de ces aires et au calcul des concentrations réelles données au tableau 19.

En relation avec l'étude de l'influence de la matrice physico-chimique sur les processus de contamination, nous avons utilisé un chélatant fort: l'EDTA. La cinétique du métal dans le milieu illustrée par la figure 18 montre que dans ce cas la perte métallique est pratiquement nulle (tableau 18). L'EDTA maintient le plomb en solution et permet d'éviter la précipitation et l'adsorption. Les concentrations réelles et nominales sont dans ce cas pratiquement égales.

Tableau 18: Pertes métalliques moyennes par cycle de 24 heures pour toutes les concentrations testées.

Concentrations nominales en µg/l	Pb 250	Pb 500	Pb 1000	Pb 1500	Pb 250 + EDTA	Pb 1000 + EDTA	Pb 1500 + EDTA
% de perte métallique après un cycle de 24 H	64	67	73	77	≈ 0	≈ 0	≈ 0

Tableau 19: Correspondance entre les concentrations nominales et les concentrations réelles dans le milieu (conc. moyennes sur plusieurs cycles de 24h).

Concentrations nominales en µg/l	Pb 250	Pb 500	Pb 1000	Pb 1500	Pb 250 + EDTA	Pb 1000 + EDTA	Pb 1500 + EDTA
Concentrations réelles dans le milieu en µg/l	122	220	425	580	≈ 250	≈ 1000	≈ 1500



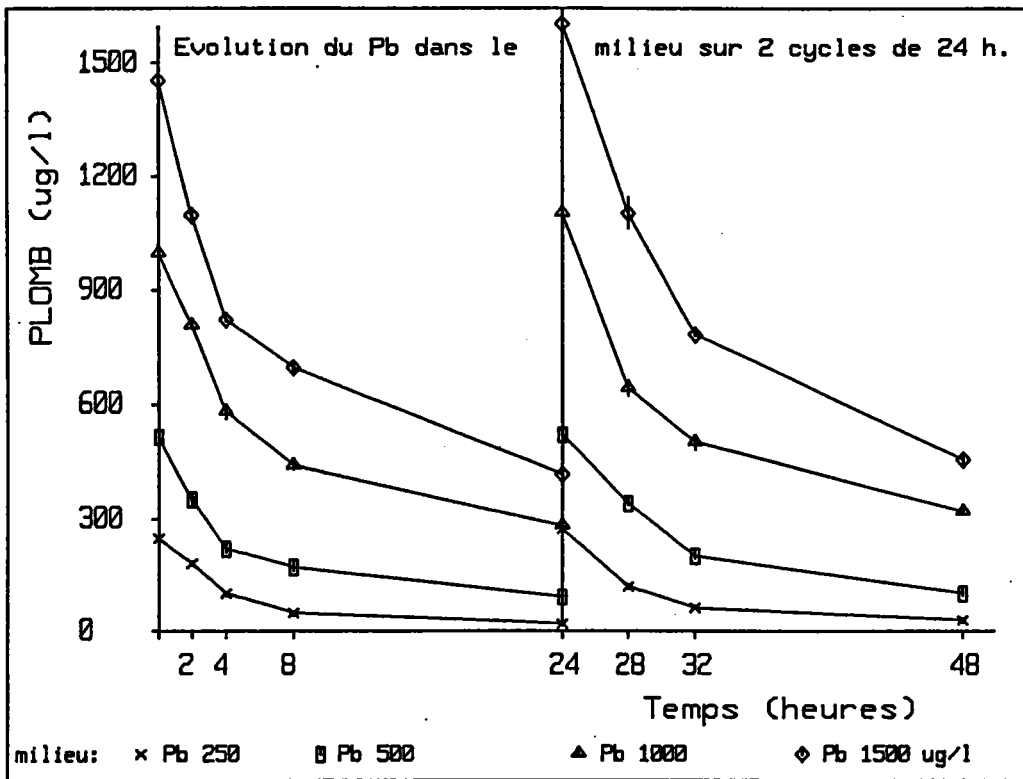


Figure 17: Evolution du Pb dans le milieu d'exposition pour toutes les concentrations testées, sur 2 cycles de 24 heures. (changement de milieu journalier)

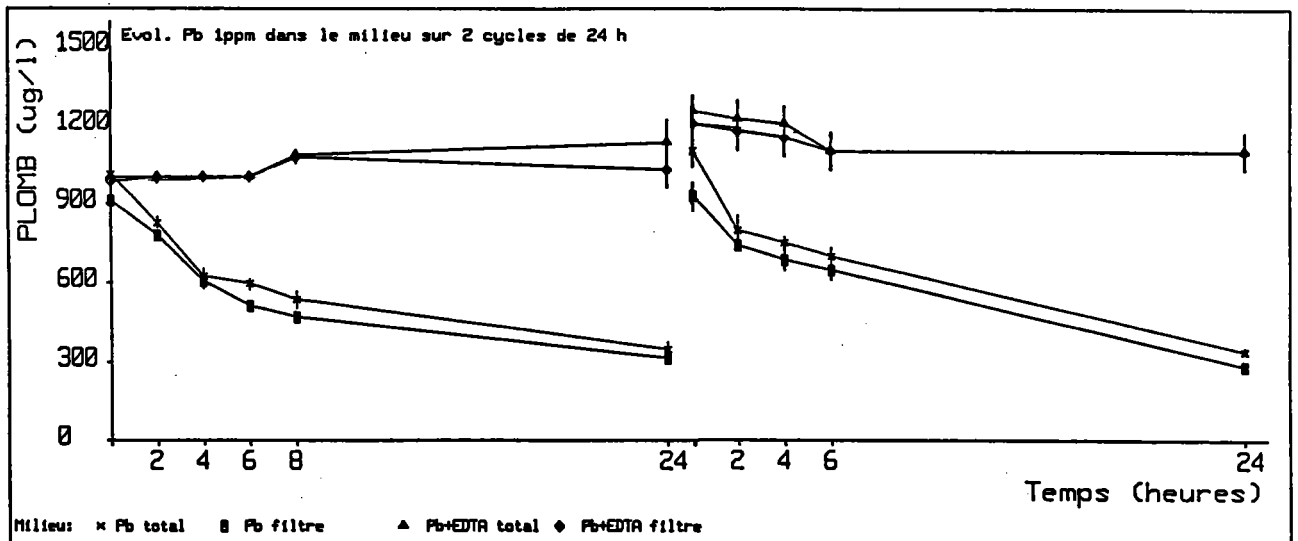


Figure 18: Evolution du Pb total et dissous, avec et sans EDTA dans le milieu d'exposition pour la concentration de 1 mgPb/l. (changement de milieu journalier)

### III-2- TOLERANCE DES DREISSENES AU PLOMB.

La toxicité d'un métal envers les bivalves peut être appréciée par des critères comportementaux ou physiologiques tels que la capacité d'enfouissement par exemple, (Eldon et al., 1980; Kaifala, 1988) ou la fermeture des valves en réponse au stress du métal (Slooff et al., 1983; Doherty et al., 1987; Kramer et al., 1989; Mouabad, 1991). Ou encore l'action sur l'activité de pompage ou le taux de filtration (Abel, 1976; Watling, 1981; Mouabad, 1986; 1991; Ebersveiller, 1988).

Il existe aussi un autre critère généralement utilisé et qui est beaucoup plus drastique puisqu'il s'agit de la toxicité létale. Le suivi de la mortalité des individus exposés permet de déterminer la concentration entraînant la mortalité de 50 % des individus sur une période donnée (test de CL50).

Dans le but de tester la toxicité du plomb sur *Dreissena polymorpha*, nous avons dans un premier temps retenu deux critères de toxicité: à savoir l'ouverture des valves (comptage biquotidien de la proportion d'individus à valves ouvertes) et le suivi journalier de la mortalité (les individus ne réagissant pas à une petite secousse sont considérés morts: test du toucher).

Lors d'essais préliminaires (réalisés en août 86) des lots de dreissènes ont été exposés à des concentrations en plomb allant de 0 à 10 mg/l pendant 15 jours sans apport de nourriture. Chaque condition d'exposition est dupliquée. Le milieu est renouvelé tous les jours, la température est de  $19 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Les résultats présentés dans la figure 19 montrent l'évolution du pourcentage d'individus à valves ouvertes (en activité apparente) en fonction du temps d'exposition. En ce qui concerne les témoins, nous avons enregistré des fluctuations pendant la première semaine, suivie d'une baisse et une tendance à la stabilisation durant la deuxième semaine de l'expérience. Le taux moyen d'ouverture sur les 15 jours est de  $54 \pm 5\%$ .

Walz (1978) dans une étude sur l'activité de filtration d'une population de dreissènes (n=174) trouve que la proportion moyenne d'individus à valves ouvertes est de 70.1 % sur 24 heures. Il constate que le taux d'ouverture valvaire est indépendant de la photopériode, de la saison et de la taille des animaux. Ses observations montrent aussi qu'il n'y a pas de rythmicité dans l'activité d'ouverture des valves ni de synchronisme chez les individus. Les taux d'ouverture que nous avons enregistrés en début d'expérience chez les témoins (65%) sont en accord avec ceux de Walz. La réduction

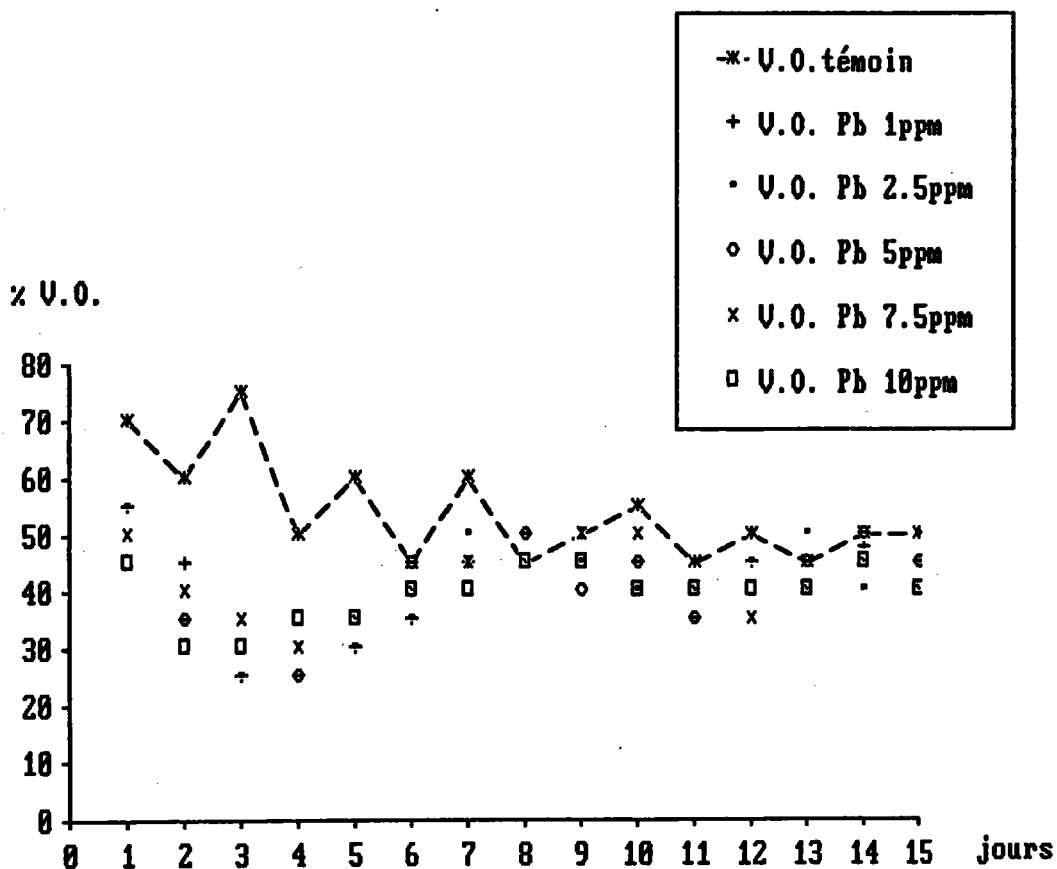


Figure 19: Proportions d'individus à valves ouvertes (V.O.) pendant une exposition de 15 jours au Pb. (comptage biquotidien)

Tableau 20: Tolérance des dreissenés au plomb exprimée en mortalité cumulée sur 15 jours (moyenne de 2 réplicats. 20 individus/essai.)

Concentrations testées (mg/l)	Mortalité cumulée (%)
0	0
1	10
2.5	20
5	25
7.5	25
10	25

observée par la suite (54%) s'explique par l'absence de nourriture dans le milieu qui a pour conséquence une baisse de l'activité de pompage. En effet les résultats de Walz ont été obtenus avec des dreissènes nourries de diatomées (*Nitzschia actinastroides*).

Chez les lots exposés, les résultats montrent une réduction importante des taux d'ouverture valvaire pendant la 1ère semaine d'exposition. On assiste par la suite durant la 2ème semaine à une "récupération" des individus exposés qui présentent alors des taux comparables à ceux des témoins. La réduction observée ne montre cependant pas de corrélation avec les concentrations en plomb dans le milieu. Pour tous les lots exposés et pour toutes les concentrations les individus présentent un taux moyen d'ouverture de  $40.5 \pm 3.5\%$ .

La "récupération" des individus exposés qui peut être expliquée par une acclimatation des animaux au métal a été aussi observée lors d'études de l'action du Zn, Pb et Cd sur le taux de filtration chez *Perna*, *Choromytilus* et *Crassostrea* (Watling, 1981) et chez *Dreissena* pour le Zn (Ebersveiller, 1988) et pour le Cd (Slooff et al., 1983).

Ce critère d'ouverture/fermeture des valves chez *Dreissena* a été utilisé avec succès pour le cuivre, le cadmium et certains composés organiques (phénol, HCH, PCP). Le seuil de réponse de la dreissène (fermeture des valves) pour le cuivre par exemple varie entre 18 et 46  $\mu\text{g/l}$  (Slooff et al., 1983). Pour le plomb et le zinc le seuil de réaction de *Dreissena* et *Mytilus* a été estimé à 500  $\mu\text{g/l}$  (Kramer et al., 1989).

Dans notre cas, nous pouvons dire qu'il y a réduction de l'activité de pompage au moins pour les premiers jours d'exposition puisque les animaux réagissent en fermant la coquille pour s'isoler du stress métallique. L'absence de corrélation entre la réponse et les concentrations en plomb dans le milieu, ainsi que la récupération apparente des individus exposés, peut être interprétée par le fait que dans le cas du plomb, le critère utilisé (ouverture / fermeture des valves) n'est pas adapté à l'appréciation de la toxicité. Il est possible qu'il y ait réduction de l'activité de pompage sans pour autant qu'elle s'accompagne de la fermeture des valves. Autrement dit, l'intensité de l'activité est liée à l'ouverture valvaire mais à un certain degré seulement. Sprung et Rose (1988) rapportent que l'activité de pompage chez la dreissène est typiquement discontinue même si la coquille reste ouverte. En effet la rétraction ou la contraction des siphons ainsi que le mode de pompage peuvent être profondément perturbés alors que les valves peuvent rester ouvertes ou entr'ouvertes. Ce résultat a été observé par Mouabad (1991) dans une étude utilisant l'anémométrie à film chaud sur la filtration de la dreissène exposée aux métaux lourds dont le plomb.

Les résultats concernant la mortalité sont donnés dans le tableau 20. Les taux de mortalité enregistrés après deux semaines d'exposition varient entre 0 et 25 %. Au-delà de 5 mg/l la mortalité n'est plus proportionnelle à la concentration du plomb dans le milieu. Par conséquent, les taux maximaux enregistrés (25%) ne permettent pas de cerner la CL50 même après 15 jours d'exposition.

L'explication de ce résultat réside dans l'évolution des concentrations et la faible solubilité du plomb dans le milieu. Nous avons en effet constaté de fortes précipitations ce qui limite la concentration du métal dans la phase aqueuse. La proportionnalité entre les concentrations nominales et celles restant en solution (auxquelles sont réellement exposés les organismes) n'est plus respectée.

Les faibles taux de mortalité trouvés indiquent aussi la grande tolérance des dreissènes vis-à-vis du plomb dans nos conditions expérimentales. Pour des métaux plus toxiques par exemple le cuivre et le mercure, la CL50 (96 heures) est respectivement de 428  $\mu\text{g/l}$  et 192  $\mu\text{g/l}$  (Mouabad, 1991). A titre de comparaison, la CL50 (168 heures) du plomb chez *Perna viridis* est de 4.46 mg/l (Tan et Lim, 1984) et chez *Mya arenaria* elle est de 8.80 mg/l (Eisler, 1977). Pour de plus longues expositions, la CL50 21 jours du plomb chez *Perna perna* et *Choromytilus meridionalis* est  $> 0.2 \text{ mg/l}$ , et pour *Crassostrea gigas* et *C. margaritacea* elle est  $> 0.5 \text{ mg/l}$  (Watling, 1981). Enfin pour le zinc, la CL50 28 jours chez la dreissène est de 10.8 mg/l (Maarouf, 1988).

### **III-3- ETUDE DE LA CONTAMINATION PAR LE PLOMB.**

Rappelons d'abord que les bivalves filtreurs se contaminent en milieu naturel par l'absorption du plomb présent dans l'eau (voie directe) et par l'ingestion d'algues ou de particules organiques en suspension (voie trophique). Notre approche repose donc sur l'analyse de ces deux voies de pénétrations.

#### **III-3-1- CONTAMINATION PAR VOIE DIRECTE.**

##### **III-3-1-1- Exposition continue à plusieurs concentrations en plomb:**

Pour quantifier la bioaccumulation directe, des lots de dreissènes ont été exposées pendant 27 jours sans apport de nourriture aux concentrations nominales en plomb suivantes: 250; 500; 1000 et 1500  $\mu\text{g/l}$ . Un autre lot de dreissènes ne reçoit pas d'apport de métal et sert de témoin. Cette série d'expériences a été réalisée en automne (septembre 86).

Les accumulations maximales atteintes dans les parties molles en fin d'exposition sont de 400; 590; 970 et 1100  $\mu\text{gPb/g}$  poids sec respectivement pour les concentrations nominales de 250; 500; 1000 et 1500  $\mu\text{g/l}$  de plomb.

Les cinétiques de bioaccumulation visualisées dans la figure 20, montrent que les concentrations en plomb dans les dreissènes évoluent proportionnellement au temps d'exposition et à la concentration du métal dans le milieu. L'allure des cinétiques n'est cependant pas identique pour toutes les concentrations testées. Les écarts associés aux moyennes sont importants et évoluent avec le temps d'exposition. Cette variation des résultats sera étudiée ultérieurement (voir III-5). L'analyse des courbes de cinétiques montre que pour les concentrations nominales de 250; 500 et 1000  $\mu\text{g/l}$  la régression est linéaire (figures 21 a,b,c). La relation présente l'équation suivante:

$$\text{Pb } (\mu\text{g/g}) = A_0 + A_1 \cdot t \quad (1)$$

$A_1$  étant le facteur de proportionnalité (pente de la droite) qui représente dans ce cas la vitesse de bioaccumulation.

$A_0$  étant la concentration initiale en plomb dans les dreissènes, et  $t$  : le temps d'exposition.

L'analyse des vitesses d'accumulation, déterminées à partir des droites de régression, montre aussi que leur évolution en fonction des concentrations réelles dans le milieu affiche une relation linéaire dont le coefficient de régression est très significatif (fig.22a).

La comparaison des concentrations réelles dans le milieu expérimental (122, 220, et 425  $\mu\text{g/l}$ ) et celle dans les dreissènes montre qu'il existe une corrélation positive dont la régression est linéaire (fig.22b) et de la forme:

$$\text{Pb}_t (\mu\text{g/g}) = A \cdot \text{Pb}_m (\mu\text{g/l}) + \text{Pb}_0 (\mu\text{g/g}) \quad (2)$$

$\text{Pb}_t$  : la concentration dans les organismes après un temps  $t$  d'exposition.

$A$  : le facteur de proportionnalité .

$\text{Pb}_m$  : la concentration du plomb dans le milieu.

$\text{Pb}_0$  : la concentration initiale en plomb dans les organismes.

Pour la concentration nominale la plus élevée, 1500  $\mu\text{g/l}$  (580  $\mu\text{g/l}$  en concentration réelle), la régression entre les concentrations dans les dreissènes et le temps d'exposition est de type logarithmique; ce qui indique une tendance à la saturation de la cinétique de bioaccumulation. En effet dès le 9<sup>e</sup> jour de contamination, nous observons l'apparition d'un plateau dans l'évolution des concentrations en plomb dans les dreissènes.

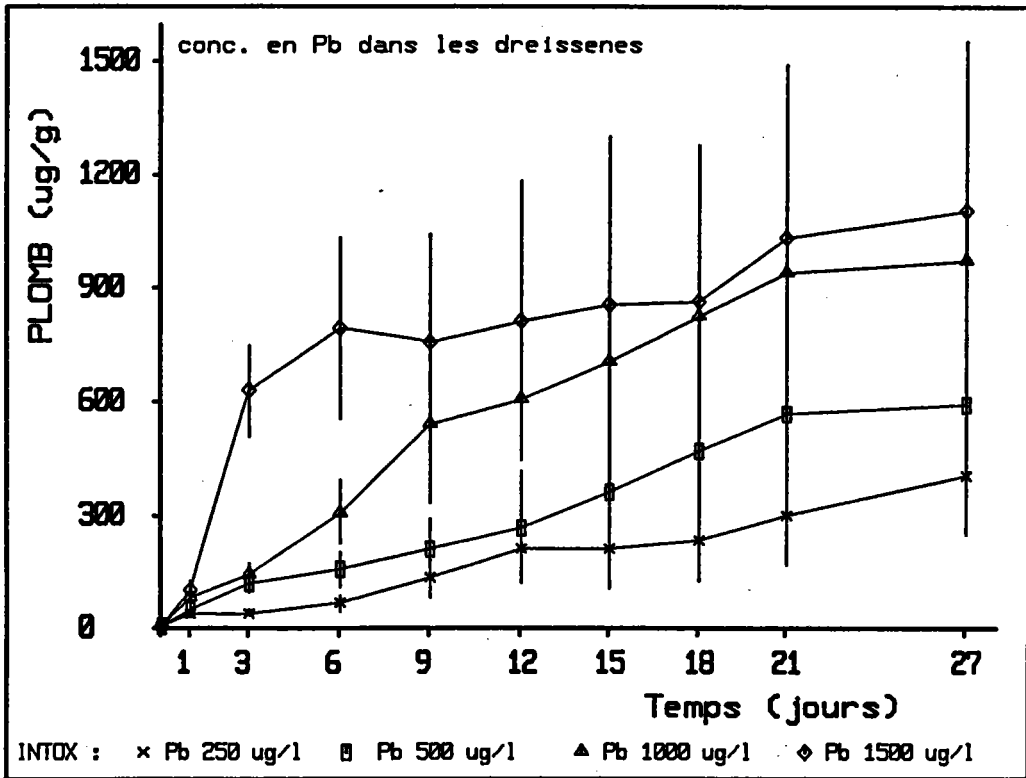


Figure 20: Cinétiques d'accumulation pour les diverses concentrations en Pb.

Figures 21a-d: Régressions entre les concentrations dans les dreissenae et le temps d'exposition pour les diverses concentrations en Pb dans le milieu.

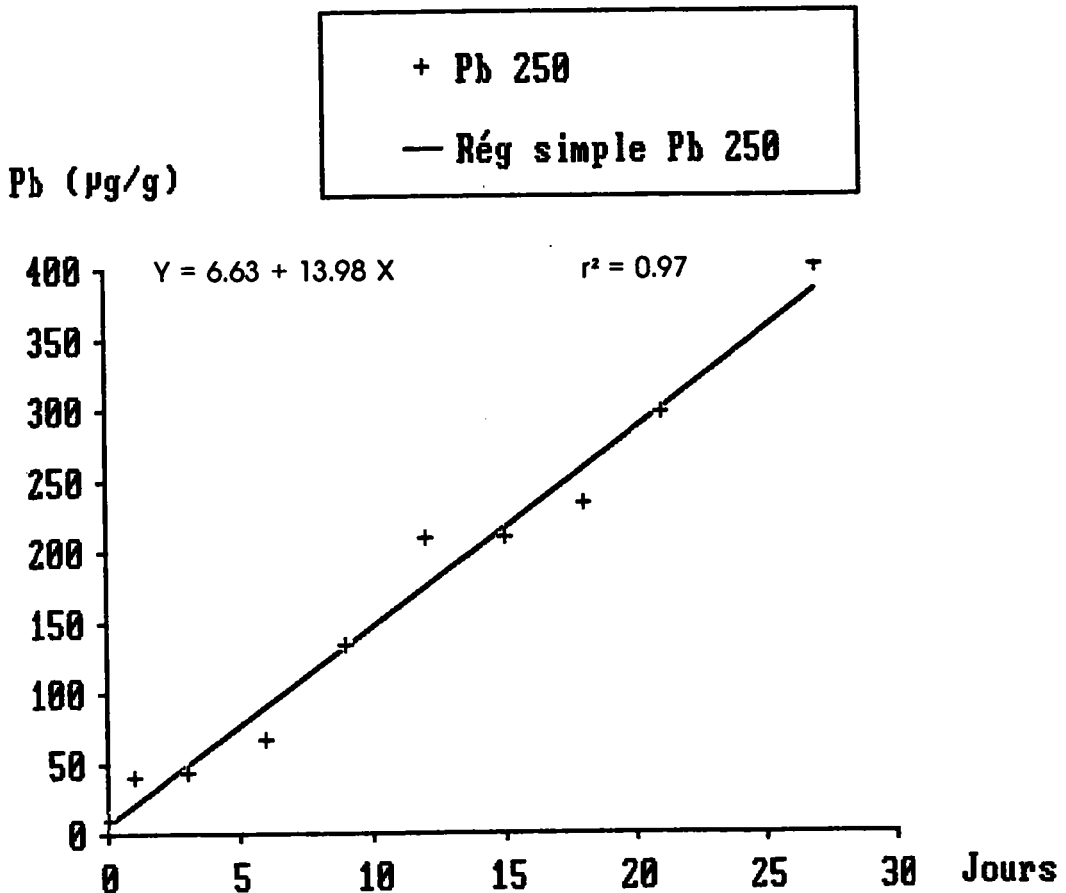


Fig 21a:

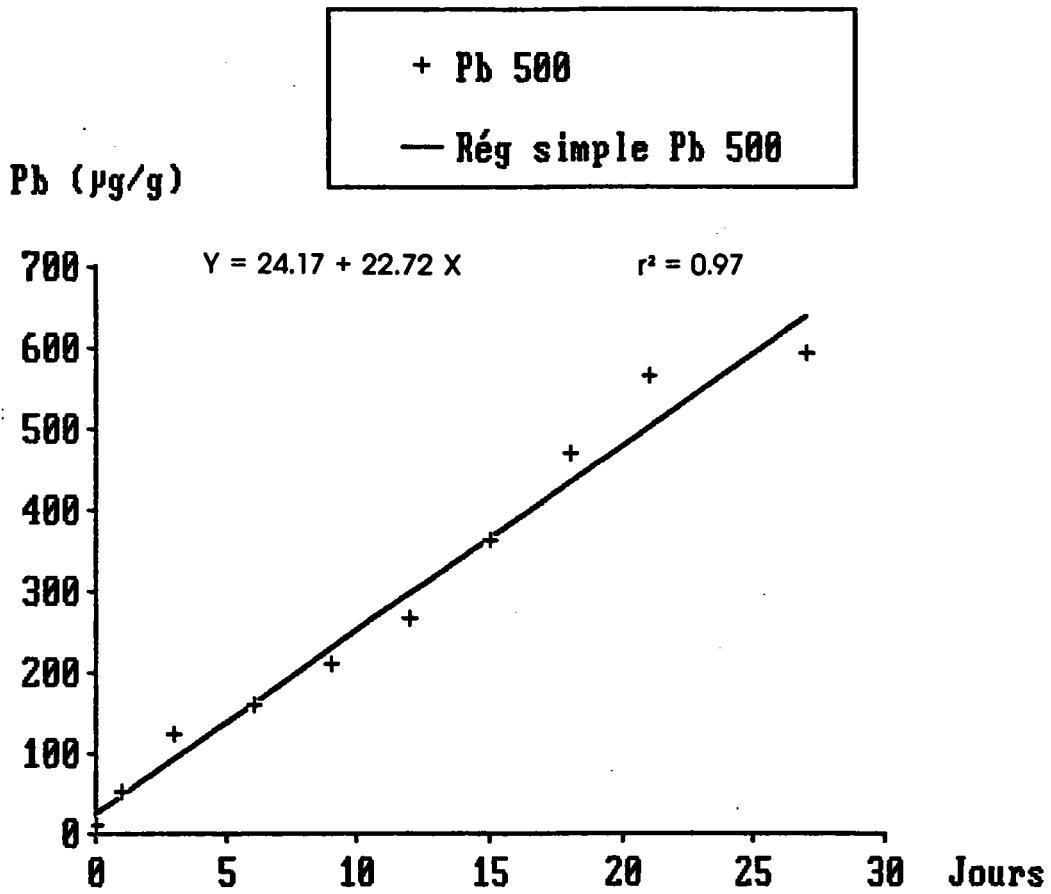


Fig. 21b:

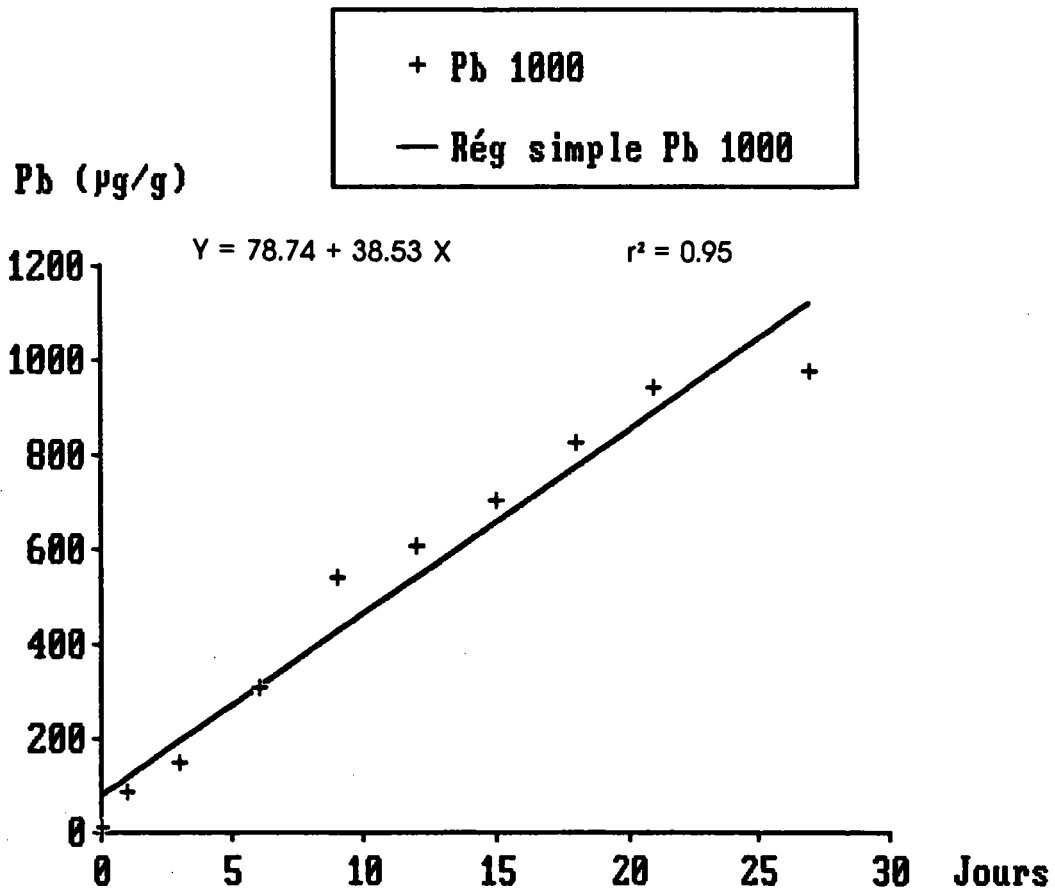


Fig. 21c:



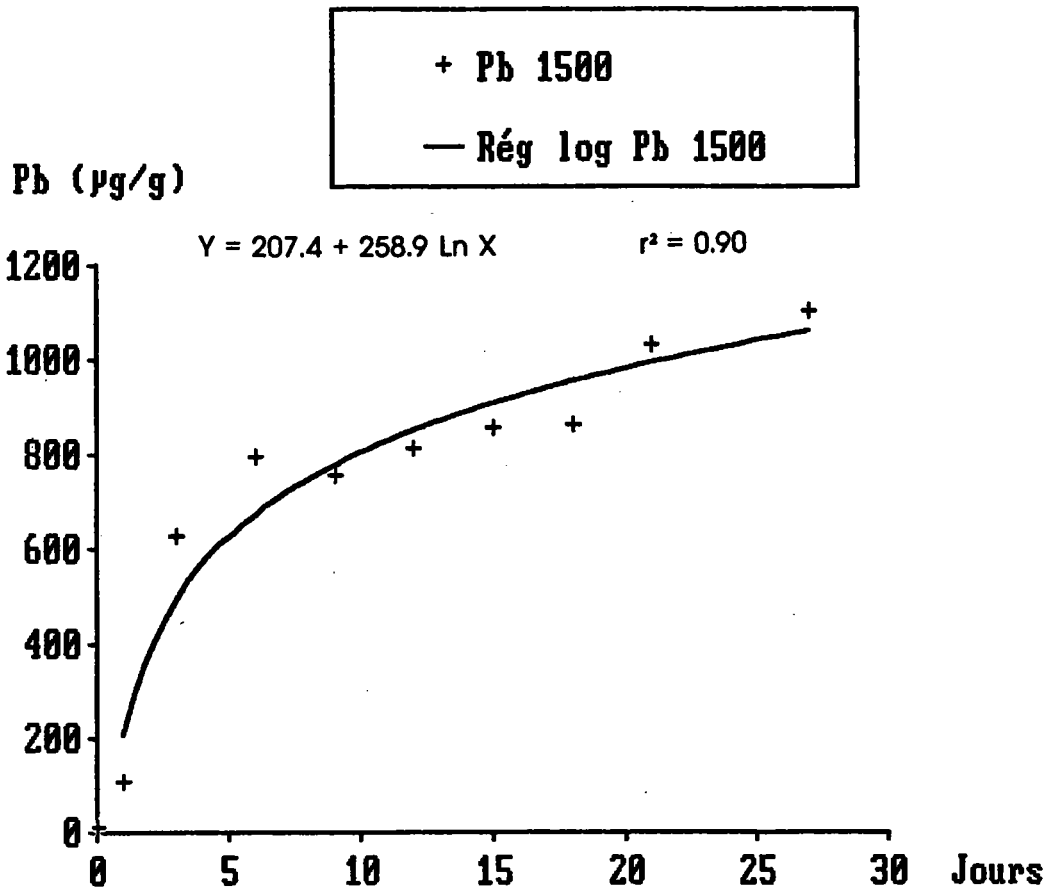


Fig. 21d:

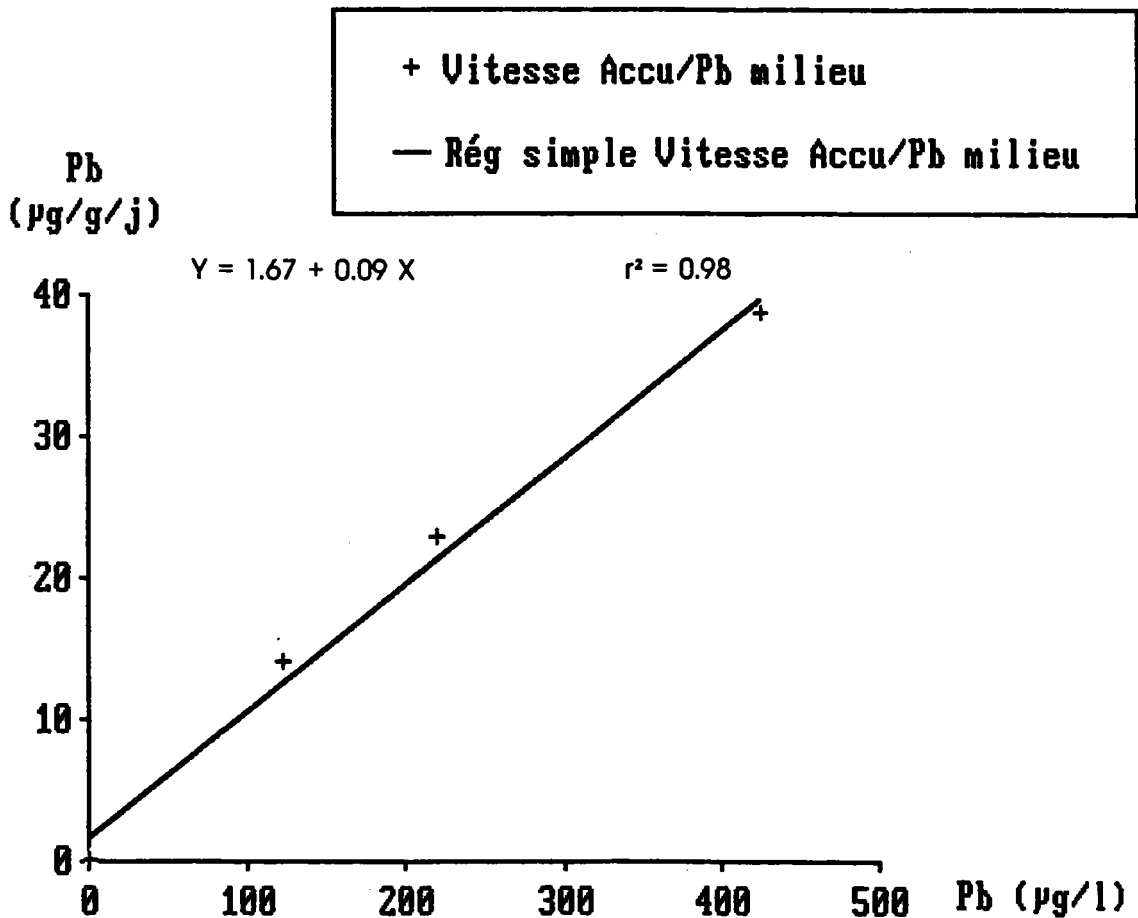


Figure 22a: Vitesse d'accumulation en fonction des concentrations réelles en Pb dans le milieu. (vitesses d'accumulation obtenues à partir des pentes des droites de régression)

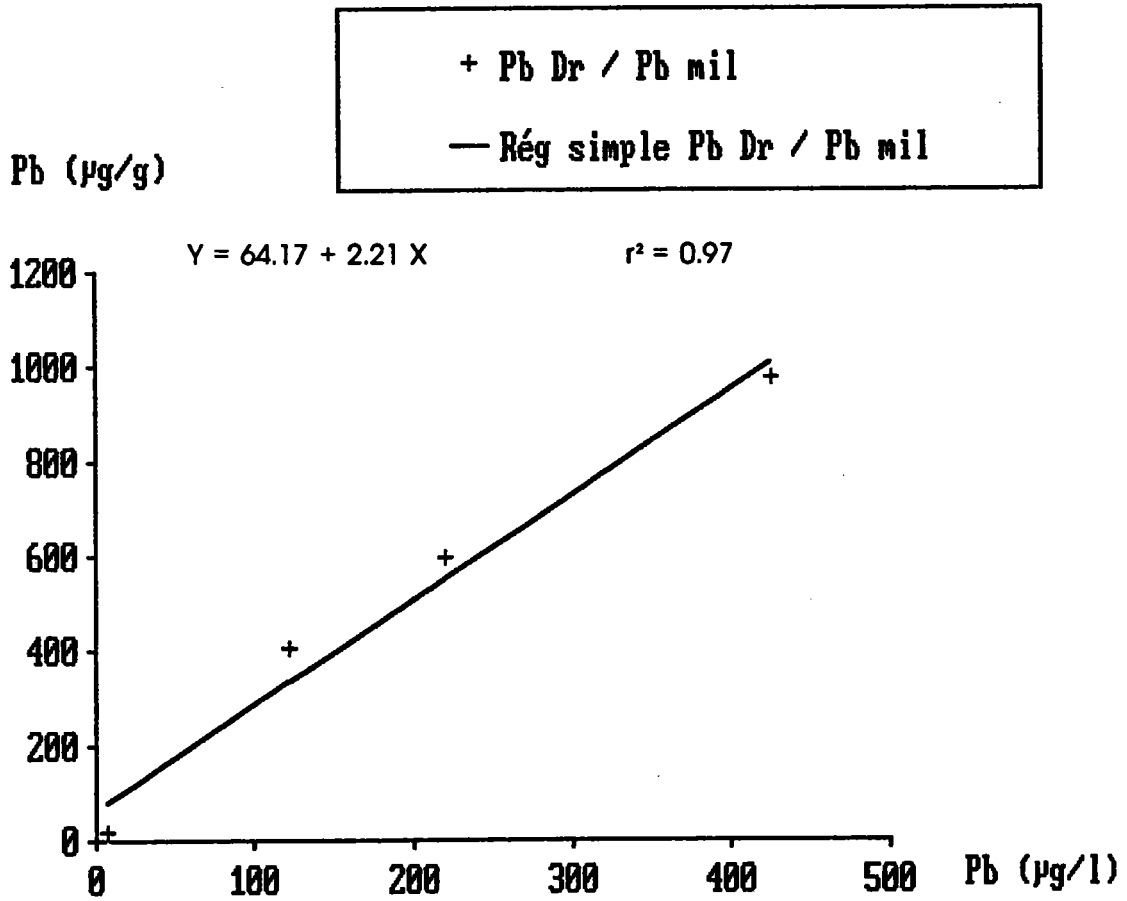


Figure 22b: Relation entre les concentrations en Pb dans les dreissenes et celles dans le milieu. (pour les conc. nominales 250, 500 et 1000 ppb).

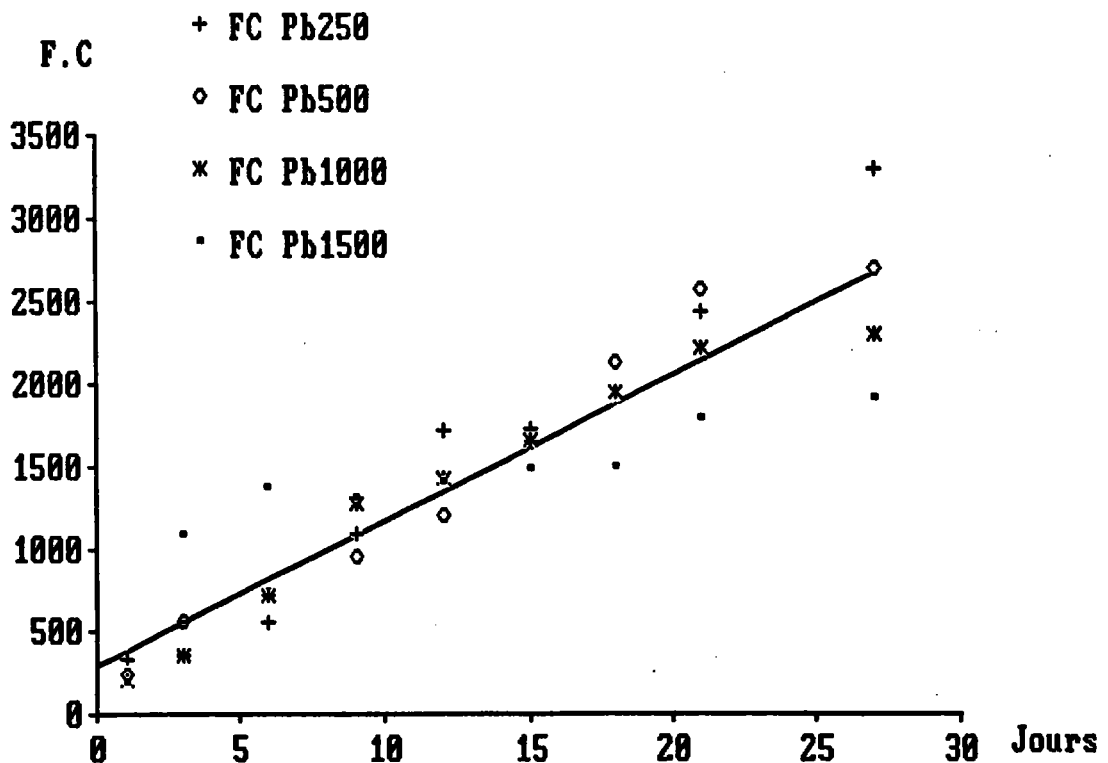


Figure 23: Evolution des F.C. en fonction du temps d'exposition pour les différentes concentrations en Pb.

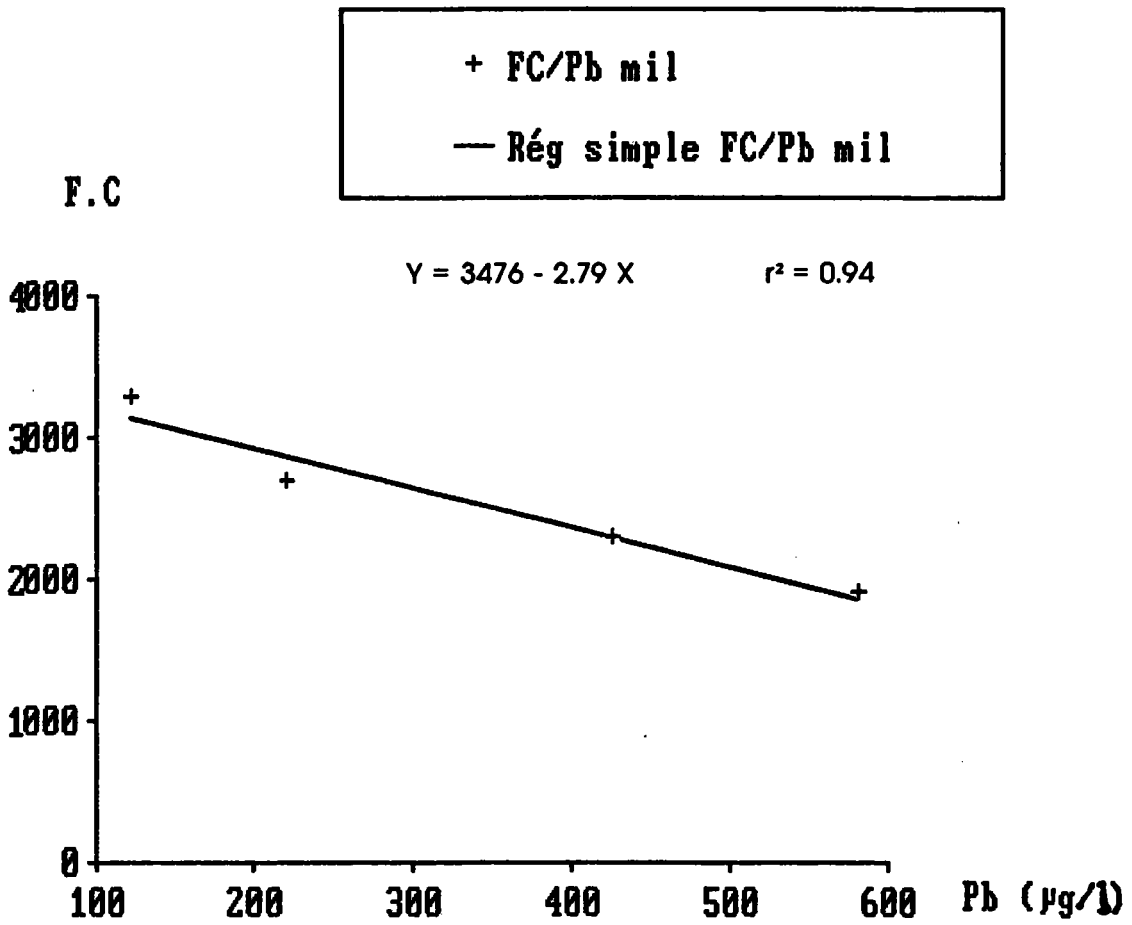


Figure 24: Relation entre les F.C. en fin d'exposition et les concentrations en Pb dans le milieu.

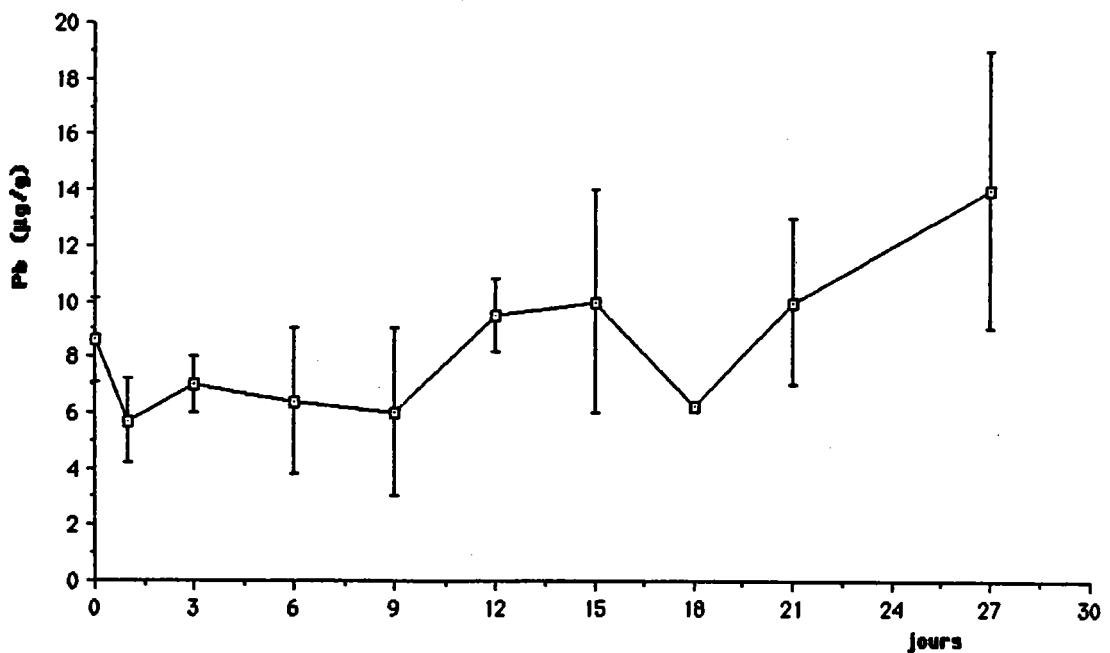


Figure 25: Evolution des concentrations en Pb dans les dreissenes témoins.

Les facteurs de concentrations (FC) qui renseignent sur la capacité de bioaccumulation, montrent aussi une évolution proportionnelle au temps d'exposition et de manière similaire aux bioaccumulations (fig.23).

Si on prend l'équation 2 et qu'on divise les 2 termes de l'égalité par la concentration en plomb dans le milieu, on aboutit à l'équation 3:

$$\frac{Pbt}{Pbm} = A \cdot \frac{Pbm}{Pbm} + \frac{Pb0}{Pbm}$$

ce qui permet d'écrire:

$$FC = A + FC_0 \quad (3)$$

$FC_0$  étant la facteur de concentration initial.

Il en résulte donc que le FC est à priori indépendant de la concentration en plomb dans le milieu. Or l'analyse des FC maximaux en fin d'exposition (27 jours) montre qu'ils sont corrélés négativement avec les concentrations en plomb dans le milieu (fig.24).

Ce résultat peut être interprété par le fait que l'augmentation des concentrations dans les organismes est certes proportionnelle à celle dans les milieux mais y est inférieure. En effet, entre la concentration réelle la plus faible dans le milieu: 122  $\mu\text{g/l}$  et la plus élevée 580  $\mu\text{g/l}$ , l'augmentation moyenne est de 4.75 alors que la variation correspondante dans les dreissènes présente un facteur d'augmentation moyen de 2.75 (400  $\mu\text{g/g}$  à 1100  $\mu\text{g/g}$ ). En outre la tendance saturante des cinétiques d'accumulation très nette pour 580  $\mu\text{g/l}$  et seulement amorcée vers la fin de l'exposition pour 425  $\mu\text{g/l}$ , laisse à penser qu'au-delà de ces concentrations et de ce temps d'exposition les teneurs métalliques dans les organismes n'évolueront guère de façon significative. Par conséquent, pour les fortes concentrations, la linéarité de la relation liant les concentrations dans le milieu à celles dans les organismes n'est plus vérifiée.

En ce qui concerne les témoins, les concentrations en plomb fluctuent sans montrer de tendance, excepté une légère augmentation vers les derniers jours (fig.25). Cette augmentation est due à la perte de poids des organismes, engendrée par le jeûne. A la fin de l'expérience, les dreissènes ont perdu en moyenne 20 % de leur poids sec initial.

### III-3-1-2- Exposition cyclique au plomb.

Les rejets de métaux dans l'environnement aquatique peuvent ne pas être continus, mais se produire régulièrement ou survenir de façon accidentelle provoquant des pics de pollution qui peuvent être très importants. L'un des avantages de l'utilisation d'organismes aquatiques (les bivalves en l'occurrence) pour le biomonitoring de la pollution métallique est leur faculté d'intégration dans le temps d'une éventuelle contamination du milieu. Ceci dépend bien entendu de la capacité de bioaccumulation de l'organisme en relation avec le temps d'exposition.

Dans ce contexte, la contamination d'un lot de dreissènes a été analysée sous des conditions cycliques d'exposition au plomb. Le but étant d'établir si la bioaccumulation dans les parties molles est proportionnelle au temps d'exposition.

Cette expérience effectuée en février 1988 a été réalisée en exposant des dreissenés pendant 4 heures à 30  $\mu\text{g/l}$  de plomb tous les deux jours pendant 33 jours.

Les données présentées dans la figure 26 montrent l'évolution des concentrations en plomb dans les parties molles. Le meilleur ajustement de la cinétique de bioaccumulation donne une régression polynomiale dont tous les coefficients sont significatifs à 95 % (fig.26). Cette cinétique d'accumulation présente deux phases distinctes:

La première phase est une cinétique de type saturante caractérisée par une bioaccumulation rapide jusqu'au 6<sup>e</sup> jour, suivie par un ralentissement de la bioaccumulation qui devient pratiquement nulle après le 6<sup>e</sup> jour et jusqu'au 21<sup>e</sup> jour. La deuxième phase montre une reprise importante de l'accumulation du 21<sup>e</sup> jour au 33<sup>e</sup> jour (fin de l'exposition).

Cette évolution est très différente des cinétiques d'accumulation généralement observées sous exposition continue au métal (voir III-3-1) en particulier aux faibles concentrations pour lesquelles la bioaccumulation est linéaire. L'analyse des teneurs en plomb par échantillon ainsi que les vitesses d'accumulation exprimées en  $\mu\text{g/g/j}$  à chaque phase de la cinétique (tableau 21) confirment cette évolution sigmoïde.

L'approche interprétative de ce résultat qui paraît singulier peut être faite selon la démarche suivante:

En supposant que pendant la phase initiale de l'accumulation le relargage du plomb est négligeable (Schulz-Baldes, 1977; Marquenie cité par Hemelraad et al., 1988),

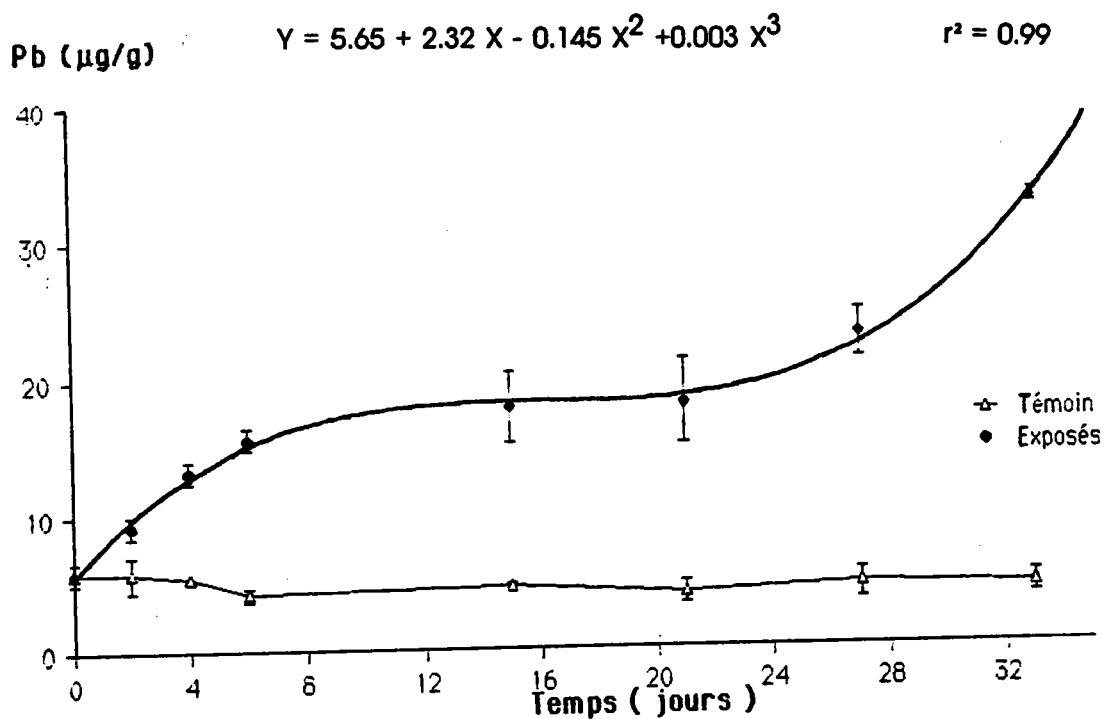


Figure 26: Cinétique d'accumulation dans les conditions d'exposition cyclique au Pb.

Tableau 21: Vitesses d'accumulation du Pb dans les conditions d'expositions cycliques.

Temps	Vitesse d'accumulation en $\mu\text{g/g/j}$
0 à 6 jours	1.64
6 à 21 jours	0.162
21 à 33 jours	1.22

on peut émettre l'hypothèse qu'entre 0 et 6 jours, le métal pénètre et s'accumule en se fixant sur des sites d'un premier pool de ligands. Lorsqu'il y a saturation de la capacité de fixation, le métal qui pénètre lors des courtes périodes d'exposition est alors relargué pendant les périodes de séjour dans l'eau propre. Il peut s'agir d'une diffusion réversible du métal au niveau de la branchie. Un résultat similaire a été observé chez *Mytilus edulis* (Elliott et al., 1985) dans une exposition cyclique au cadmium.

Le plomb n'étant pas reconnu comme élément induisant la synthèse de ligands cellulaires, la reprise de l'accumulation nécessiterait donc la libération des sites du premier pool par le transfert du métal préalablement fixé dans un autre compartiment. Il pourrait s'agir d'une prise en charge du plomb par des améobocytes et son transport interne vers des tissus de stockage tels que le rein (Schulz-Baldes, 1977; George, 1980).

Il apparaît alors que l'étape limitante de l'accumulation est d'abord la capacité de fixation du métal au niveau de ce premier compartiment représenté par les téguments, et ensuite la vitesse de transport interne (Schulz-Baldes, 1977).

Les données que nous venons d'exposer ne nous permettent pas d'aller plus loin dans l'interprétation et de proposer un mécanisme explicatif. L'analyse d'autres résultats qui seront exposés plus loin notamment l'utilisation de ligands organiques dans le milieu d'exposition, ainsi que l'histochimie devraient nous apporter des éléments d'information. Nous pouvons cependant dire dès à présent que ce résultat signifie que la proportionnalité généralement observée entre la bioaccumulation et le temps d'exposition trouve sa limite dans des conditions d'expositions cycliques.

### **III-3-1-3- Influence du facteur nutritionnel.**

Dans une série expérimentale réalisée en février 1988, nous avons testé l'effet de la nourriture sur la bioaccumulation du plomb par voie directe. Les modalités de contamination et d'apport de nourriture algale ont été rapportées au paragraphe II-2-4-1.

Il s'agit de déterminer s'il y a une influence du facteur nutritionnel sur l'allure de la cinétique et la capacité de bioaccumulation du plomb par les dreissènes.

L'apport de nourriture peut agir de deux manières sur la bioaccumulation:

1) En réduisant la perte de poids chez les organismes nourris par rapport à ceux maintenus à jeûn. La répercussion sur la bioaccumulation se fera donc par le biais du poids des organismes.

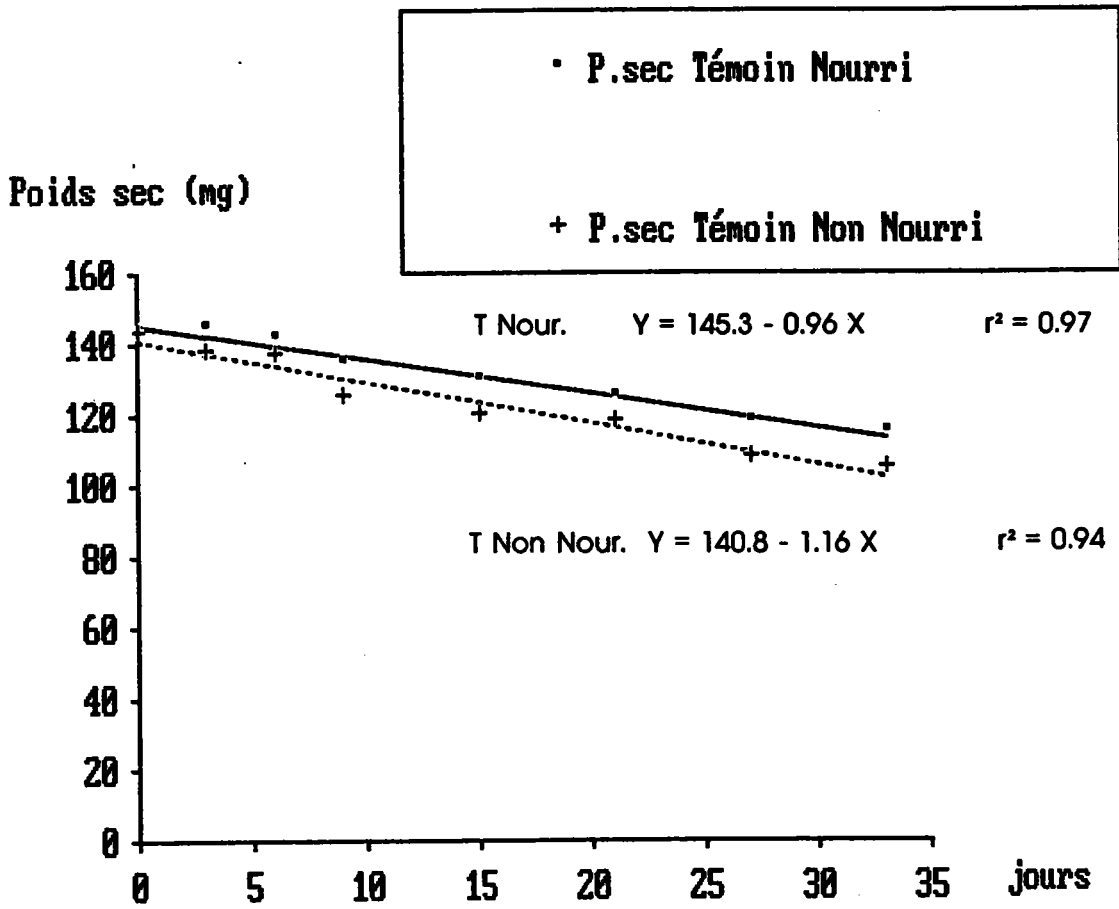


Figure 27a: Evolution des poids secs chez les témoins nourris et non nourris. (les droites de régression sont indiquées)

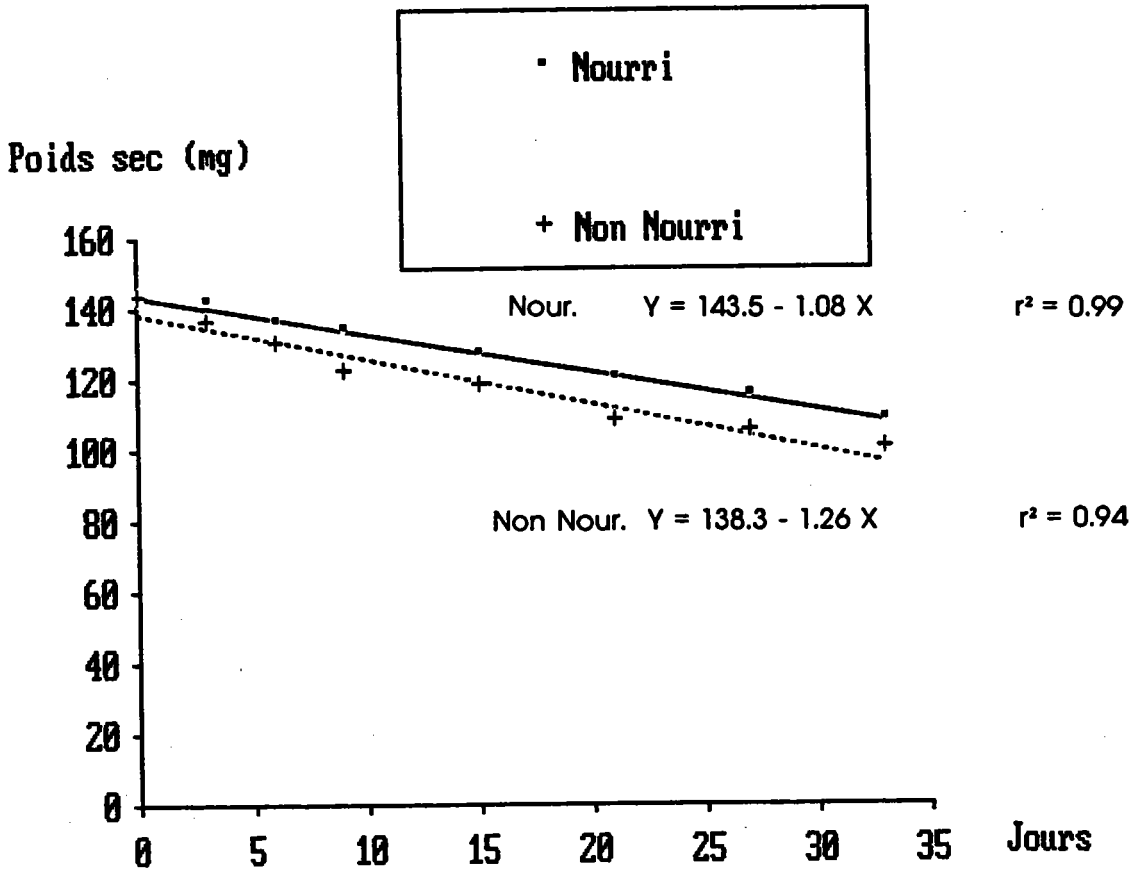


Figure 27b: Evolution des poids secs chez les animaux exposés nourris et non nourris. (les droites de régression sont indiquées)



2) En stimulant la filtration et en provoquant une augmentation de l'activité de pompage, s'accompagnant alors d'une contamination plus importante.

Selon notre protocole de contamination et de nourrissage des animaux, le 2<sup>e</sup> effet peut être considéré comme négligeable. Les dreissènes sont nourries en dehors de leur milieu de contamination dans un bac contenant uniquement la solution algale. En effet, même s'il y a stimulation du taux de filtration, le plomb étant absent du milieu de nourrissage, la contamination ne peut avoir lieu. Après remise des dreissènes dans le milieu contaminé, dépourvu de suspension algale, on peut penser que cette stimulation disparaît.

Il apparaît alors que seul le poids sec des organismes soit le facteur déterminant d'un éventuel effet sur la bioaccumulation. L'évolution des poids secs des parties molles des dreissènes nourries et non nourries a été alors suivie.

Chez les dreissènes témoins nourries et non nourries comme chez les contaminées on observe une diminution des poids secs en fonction du temps. Ce résultat montre que les conditions trophiques des dreissènes n'étaient pas optimales. On note cependant que la perte de poids est légèrement plus importante chez les lots non nourris (fig.27).

L'analyse des droites de régression liant les diminutions de poids et le temps (fig.27 a,b) permet d'apprécier l'importance de ces pertes pondérales et l'influence du plomb sur celles-ci.

Quand on compare les pentes des droites de régression entre les lots témoins nourris et les lots contaminés nourris la différence est significative (au seuil de 95 %). Par contre la comparaison entre les témoins non nourris et les contaminés non nourris ne montre pas de différences significatives.

Le plomb ne montre pas d'effet significatif sur la perte de poids des dreissènes exposées non nourries, par contre chez les dreissènes nourries l'effet est significatif. Ce résultat semble montrer qu'il y a une interaction synergique entre le plomb et la nourriture sur la diminution du poids sec des dreissènes.

Cette donnée qui paraît paradoxale peut être interprétée par le fait que le plomb n'agit pas directement sur la perte de poids, mais indirectement en réduisant le taux de filtration (Watling, 1981; Mouabad, 1991) des dreissènes nourries. Ceci s'accompagne d'une prise de nourriture moins importante que chez les témoins nourris et par conséquent une perte de poids légèrement plus grande. Il apparaît alors que le facteur

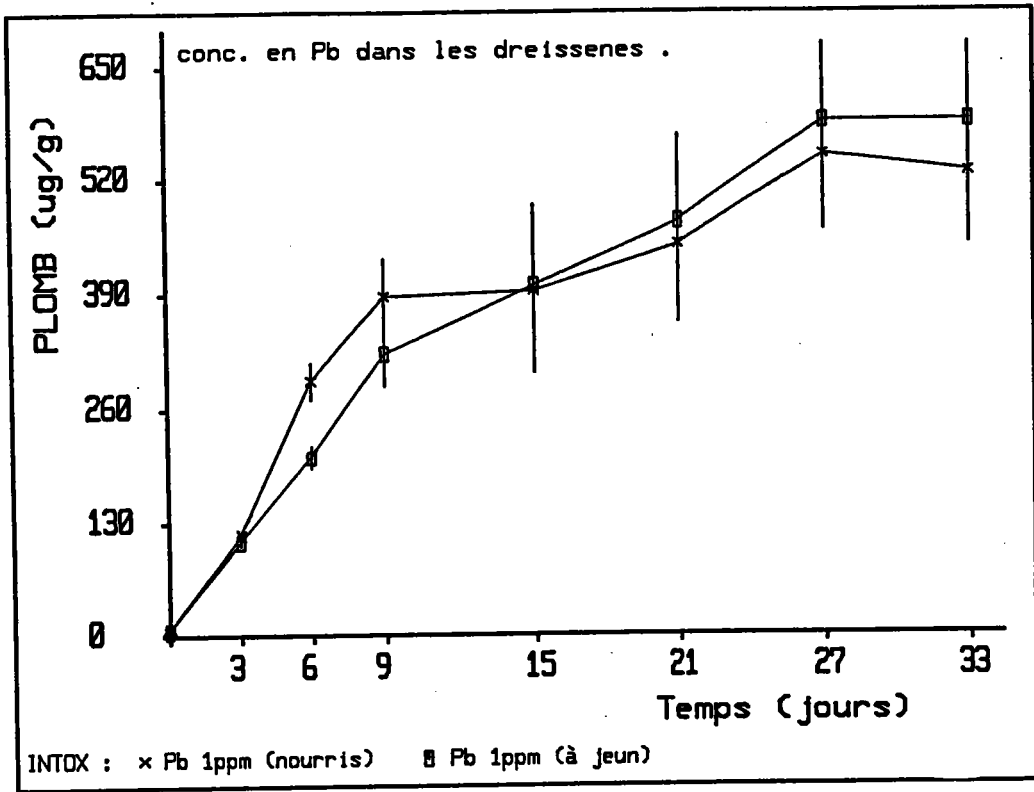


Figure 28: Cinétiques d'accumulation chez les 2 lots nourris et non nourris. (exprimées en concentrations  $\mu\text{gPb/g}$ ).

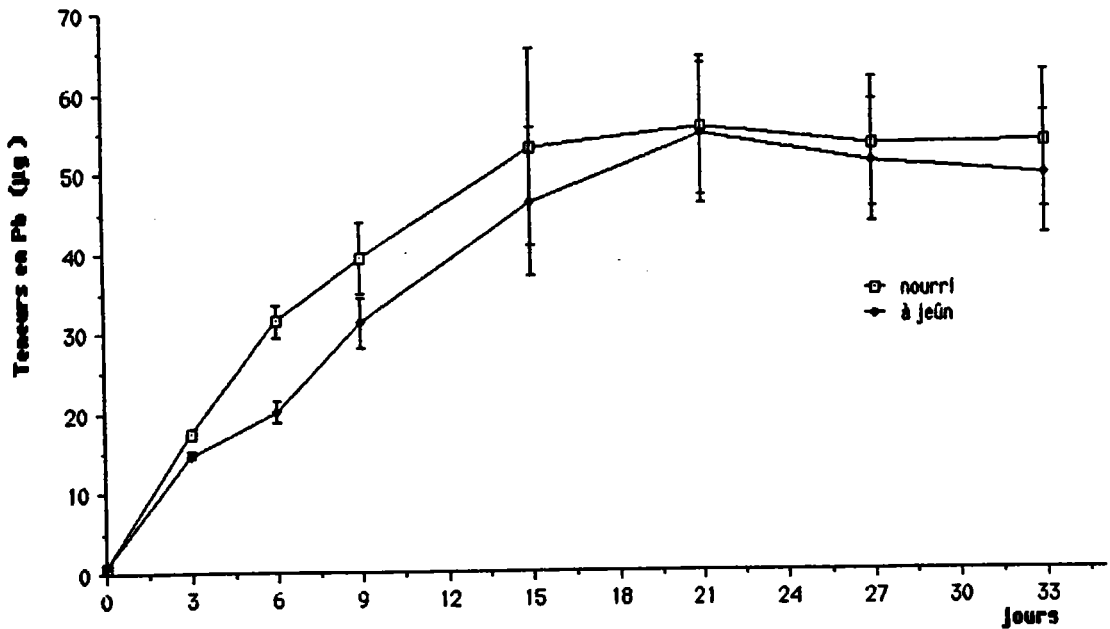


Figure 29: Cinétiques d'accumulation chez les 2 lots nourris et non nourris. (exprimées en contenus, en  $\mu\text{g Pb/échantillon}$ )

déterminant dans la perte de poids des dreissènes est l'absence ou la présence de nourriture.

Quant à l'évolution des concentrations en plomb dans les organismes contaminés, les résultats (figure 28) montrent que vers la fin de l'exposition (21 à 33j) les concentrations dans les dreissènes nourries sont légèrement inférieures à celles des dreissènes ne recevant pas d'apport de nourriture. Les cinétiques de bioaccumulation montrent dans les deux cas une tendance saturante. Le meilleur ajustement donne des régressions de type logarithmique (fig.28).

Le paramètre utilisé pour quantifier la bioaccumulation étant la concentration ( $\mu\text{g/g}$  de poids sec), il est donc dépendant du poids sec des organismes qui, comme on vient de le constater, évolue différemment chez les individus nourris et non nourris. Nous avons alors remplacé ce paramètre par la teneur dans les organismes (contenu en plomb par échantillon en  $\mu\text{g}$ ). L'allure des courbes de cinétiques n'est pas altérée par cette transformation et indique toujours une tendance saturante. Par contre, pour les teneurs en plomb dans les dreissènes, les résultats s'inversent indiquant une accumulation légèrement plus importante chez les individus nourris (fig.29).

Ce résultat montre bien que la bioaccumulation exprimée en concentration a été surestimée chez les lots non nourris à cause de leur perte de poids légèrement plus importante que celle des lots nourris. Ceci soulève la question des limites de l'utilisation du paramètre concentration dans les études de bioaccumulation notamment dans le cas de conditions trophiques différentes.

Les différences constatées entre la bioaccumulation par les dreissènes nourries et celles non nourries ne sont cependant pas significatives à tous les temps d'exposition. On peut donc dire que dans nos conditions expérimentales, le facteur nutritionnel agit sur la bioaccumulation par le biais de son effet sur la variation du poids sec des organismes. Dans le cas étudié, l'influence de ce facteur (apport de nourriture) sur l'évolution des poids secs n'a pas été assez importante pour se traduire par un effet significatif sur la bioaccumulation. Ceci est vraisemblablement dû aux courtes périodes de nourrissage (4 h).

### III-3-2- CONTAMINATION PAR VOIE TROPHIQUE.

La contamination par voie trophique a été réalisée en nourrissant des dreissènes tous les deux jours pendant 4 heures par des suspensions de *Chlorella vulgaris*

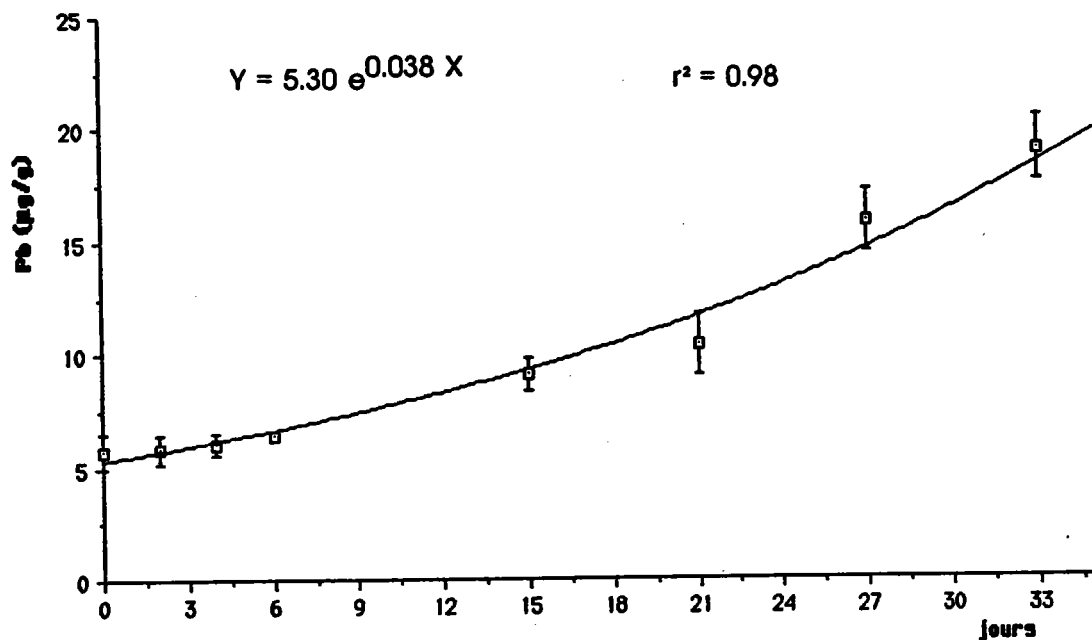


Figure 30: Cinétique d'accumulation du Pb dans les dreissenes contaminées par voie trophique.

Tableau 22: Apport de plomb par la nourriture algale à chaque cycle de 48 heures.

Essais	Apport de biomasse en mg poids sec	Apport de Plomb en µg
1	110	309
2	105	300
3	94	278
4	98	290
5	108	294
6	100	306
7	96	280
8	82	258
9	105	308
10	85	260
11	92	268
12	97	285
13	90	270
14	100	290
15	94	280
	Moy. 97 ± 8	Moy. 285 ± 17

préalablement exposées à 1 ppm de plomb pendant 24 heures. La contamination est alors assurée uniquement par l'ingestion d'algues contaminées.

Les conditions de transfert trophique potentiel sont alors liées à l'apport de plomb par la nourriture algale. Les quantités de plomb accumulées par les algues après 24 heures d'exposition ainsi que les biomasses algales fournies aux dreissènes sont données dans le tableau 22.

Au niveau des dreissènes, la figure 30 montre l'évolution des concentrations en plomb en fonction du temps. Entre 0 et 6 jours nous n'observons pas d'augmentation significative des concentrations dans les dreissènes. Après le 6<sup>e</sup> jour et jusqu'à la fin de l'expérience (33 jours) les concentrations évoluent de manière exponentielle par rapport au temps d'exposition (fig.30). La concentration finale atteinte est de 19  $\mu\text{g/g}$  alors que la concentration initiale était de 5.71  $\mu\text{g/g}$ , ce qui donne un indice de contamination de 3.33. Ce résultat indique bien qu'il y a transfert trophique du plomb entre les chlorelles et les dreissènes.

L'accumulation par voie trophique a été mise en évidence chez *Mytilus edulis* pour le plomb (Schulz-Baldes, 1974) et pour le cadmium (Riisgard et al., 1987). Chez *Crassostrea gigas* le transfert trophique de l'argent a été aussi rapporté (Amiard-Triquet et al., 1987a; Martoja R. et al., 1988).

### III-3-3- COMPARAISON ENTRE LES 2 VOIES DE CONTAMINATION DIRECTE ET TROPHIQUE.

Puisque la contamination des bivalves en milieu naturel se produit selon deux voies de pénétration du métal: par voie directe à partir du milieu et par voie trophique par la consommation de particules alimentaires contaminées, il nous est apparu intéressant de pouvoir apprécier l'importance relative de ces deux modes de prise du métal et leur participation respective à la contamination finale des dreissènes.

Pour que la comparaison entre les deux voies de contamination soit aisée, outre les conditions de contamination qui doivent être identiques, il faut aussi que les quantités de plomb apportées aux organismes par le milieu et par la nourriture soient comparables.

L'expérience d'exposition cyclique au plomb outre l'objectif précédemment décrit, vise aussi à servir à une comparaison avec l'expérience de contamination trophique. En effet les deux protocoles expérimentaux ne diffèrent que par le vecteur de la

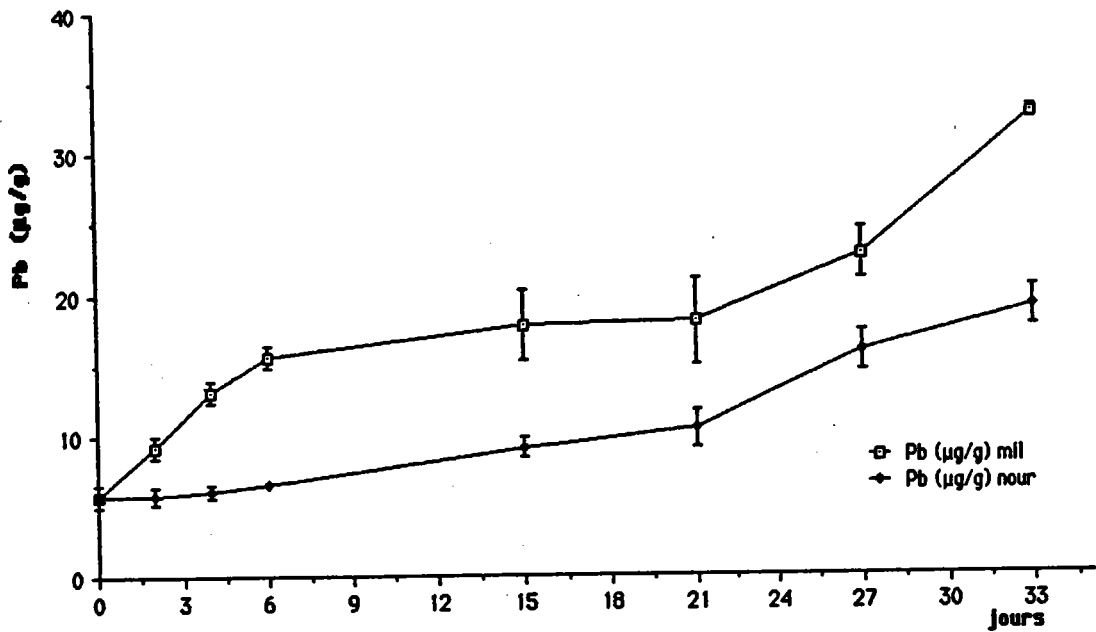


Figure 31: Comparaison des cinétiques d'accumulation du Pb par voie directe et par voie trophique.

Tableau 23: Apport de plomb par le milieu et par la nourriture toutes les 48 heures.

Essais	Apport de Plomb par la nourriture en µg	Apport de plomb par le milieu en µg
1	309	320
2	300	300
3	278	280
4	290	290
5	294	330
6	306	325
7	280	300
8	258	285
9	308	275
10	260	280
11	268	270
12	285	295
13	270	340
14	290	330
15	280	310
	Moy. 285 ± 17	Moy. 302 ± 22

contamination (eau ou nourriture algale). De même les quantités de plomb apportées aux dreissènes et donc potentiellement disponibles (par le milieu ou par la suspension algale) ne présentent pas de différences significatives (tableau 23), ce qui rend les deux expériences directement comparables.

Les résultats présentés à la figure 31 montrent l'évolution des concentrations en plomb dans les dreissènes contaminées par le milieu ou par la nourriture. Dans les deux cas nous observons une augmentation des concentrations dans les parties molles mais de manière plus importante pour l'accumulation directe. Les concentrations maximales atteintes sont de  $32.6 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$  et  $19 \pm 1.4 \mu\text{g/g}$  respectivement pour l'accumulation directe et trophique.

Comme les apports de plomb par le milieu ou par la nourriture sont comparables, on peut alors dire que l'accumulation directe est prépondérante et joue un rôle beaucoup plus important que l'accumulation trophique dans la contamination des dreissènes. En effet le rapport des teneurs en plomb d'origine directe/ trophique est de 1.85.

Toutefois, les différences observées ne sont pas seulement d'ordre quantitatif. Il s'agit aussi de différences notables au niveau des cinétiques d'accumulation: biphasique et de type polynomial pour l'accumulation directe et monophasique et exponentielle pour l'accumulation trophique (fig.31).

Les mécanismes responsables de ces différences sont à rechercher au niveau des interactions entre le métal et les barrières biologiques à savoir les téguments et essentiellement les branchies pour la voie directe, et la barrière intestinale pour la voie trophique.

Les résultats relatifs aux cinétiques d'accumulation et aux teneurs en plomb permettent de penser que le franchissement des barrières branchiales serait plus facile et rapide que celui de la barrière intestinale. Il est possible aussi que la fixation du plomb par les cellules algales modifie son aptitude à pénétrer dans l'organisme.

Une hypothèse explicative peut être émise: Les liaisons établies entre le plomb et les ligands des cellules algales sont labiles, et le métal doit d'abord être libéré dans la lumière intestinale avant de traverser la paroi, ce qui pourrait expliquer la lenteur initiale du processus. Ou bien il existe une fraction du plomb algal qui n'est pas échangeable ou libérée sous des formes chimiques (organiques ou minérales) ne pouvant traverser la barrière intestinale ce qui permettrait d'expliquer la faible accumulation par rapport à la

voie directe vu qu'une fraction du métal serait non biodisponible.

Un résultat comparable a été rapporté chez *Crassostrea gigas* contaminée par l'argent par voie trophique (Martoja R. et al., 1988).

Nos résultats sont en accord avec un certain nombre d'auteurs qui trouvent que l'accumulation directe est beaucoup plus importante que l'accumulation trophique (Harvey et Luoma, 1985; Amiard-Triquet et al., 1987a; Riisgard et al., 1987; Martoja R. et al., 1988). Schulz-Baldes (1974) trouve par contre chez *Mytilus* exposée au Pb que la différence entre les 2 voies d'accumulation n'est pas très grande bien que la prise directe soit légèrement plus importante que la prise trophique en particulier pour les branchies et le rein. Mais il faut signaler que la comparaison de nos résultats avec les études citées est limitée par la différence des protocoles expérimentaux utilisés.

#### III-3-4- CONTAMINATION GLOBALE (DIRECTE + TROPHIQUE)

Nous venons d'établir que la contamination des dreissènes par le plomb peut se produire par les deux voies directe ou trophique mais de manière différente selon la voie empruntée par le contaminant. La double voie (directe + trophique) pourrait être à priori assimilée à la somme des bioaccumulations d'origine directe et trophique, mais il est possible aussi que des interactions synergiques ou antagonistes puissent avoir lieu.

Pour tenter de répondre à cette question, nous avons exposé deux lots de dreissènes à 1 ppm de plomb (concentration nominale) pendant 33 jours, le premier lot est nourri avec des chlorelles contaminées et le second reçoit de la nourriture algale non contaminée. Le premier lot se trouve donc exposé au plomb dans le milieu ainsi qu'à l'apport périodique d'algues contaminées alors que le second n'est contaminé que par le plomb du milieu.

Les résultats présentés à la figure 32 montrent l'évolution des concentrations en plomb chez les deux lots de dreissènes. La bioaccumulation par voie globale est légèrement inférieure à celle par voie directe à tous les temps d'exposition sauf vers la fin de l'expérience (27<sup>e</sup> et 33<sup>e</sup> jours d'exposition). Cependant, les bioaccumulations dans les deux cas ne sont pas significativement différentes et présentent la même cinétique saturante.

Dans le cas de la contamination globale, l'apport de plomb par la voie trophique ne s'accompagne pas d'une augmentation supplémentaire de la bioaccumulation, la



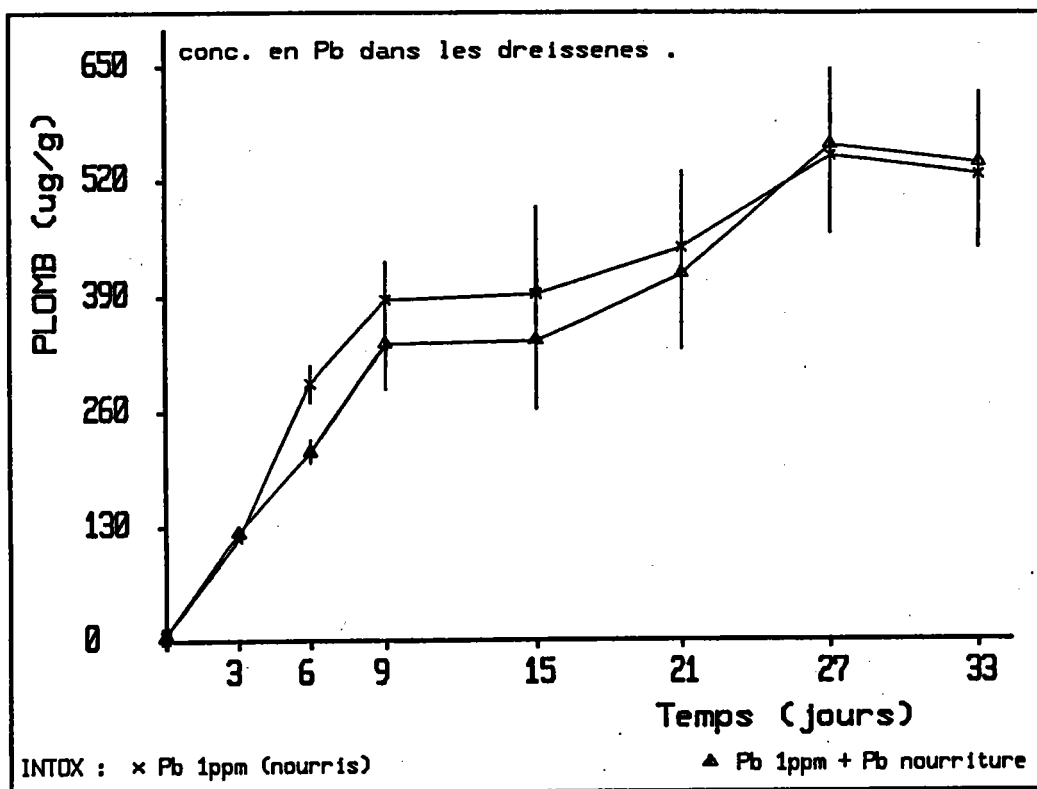


Figure 32: Concentrations en Pb dans les 2 lots de dreissenes. l'un contaminé par voie directe et l'autre par les 2 voies: directe + trophique.

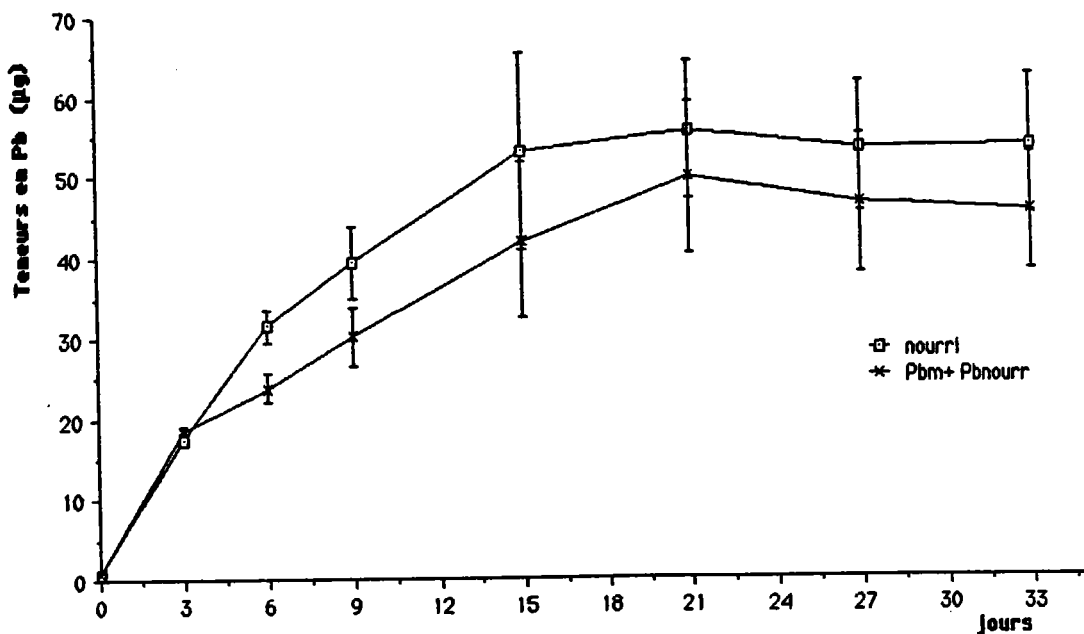


Figure 33: Contents (ou teneurs) en Pb dans les 2 lots de dreissenes. l'un contaminé par voie directe et l'autre par les 2 voies: directe + trophique.

contamination directe étant très importante par rapport à la voie alimentaire.

Quand on exprime les cinétiques de bioaccumulation non plus en concentrations mais en teneurs métalliques en  $\mu\text{g}$  de Pb (fig.33), nous constatons que les différences observées auparavant deviennent significatives aux temps d'exposition 6 et 9 jours, pour les autres temps et notamment à la fin de l'exposition, les différences ne sont plus significatives. Il semble que l'explication de ce résultat se trouve au niveau de la perte de poids sec des organismes nourris d'algues contaminées qui est légèrement supérieure à celle des individus nourris d'algues non contaminées. Cette perte de poids est due à une prise de nourriture moins importante, car nous avons constaté que les moules contaminées par les deux voies filtraient très peu par rapport aux moules exposées au métal par voie directe. En outre la part de la voie trophique dans la contamination est négligeable par rapport à la voie directe.

#### **III-4- INCIDENCE DE QUELQUES PARAMETRES DU MILIEU SUR LA CONTAMINATION DIRECTE.**

La contamination des organismes aquatiques par voie directe peut être influencée par de nombreux paramètres abiotiques. La matrice physico-chimique du milieu peut agir sur la contamination soit directement en modifiant la spéciation chimique du contaminant et par conséquent sa biodisponibilité, soit indirectement en agissant sur l'organisme lui-même et de ce fait aboutissant à une interaction avec le contaminant.

En milieu naturel, les organismes sont souvent exposés à des agressions multiples dans un biotope complexe plutôt qu'à un seul contaminant. En outre la présence de complexants et de chélatants naturels (acides humiques, fulviques...) agissent sur le comportement chimique du polluant et par conséquent sur les processus de contamination.

Il est maintenant admis que ce qui détermine l'importance de la contamination et l'action toxique, c'est la concentration et l'environnement.

Parmi les paramètres pouvant agir sur la contamination des dreissènes par le plomb, nous avons retenu l'action d'un chélatant organique fort (EDTA), d'un complexant inorganique ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), de la température et du Zinc.

### III-4-1- INFLUENCE DE L'EDTA.

Ce chélatant ainsi que le NTA est actuellement introduit comme adjuvant dans les détergents (Gutierrez-Galindo, 1980; Mota et Gonçalves, 1990). Selon Gardiner cité par Gutierrez-Galindo (1980), l'EDTA peut être retrouvé dans des effluents urbains à des concentrations de 1 mg/l.

Nous avons dans un premier temps testé la toxicité létale de l'EDTA vis-à-vis des dreissènes avant de déterminer son action sur la bioaccumulation. Les résultats (tab.24) montrent que ce chélatant, dans la gamme de concentrations utilisées, affiche une très faible toxicité létale. En effet le taux de mortalité le plus élevé après 21 jours d'exposition ne dépasse pas 10%. Néanmoins nous avons constaté une fragilisation de la coquille dont les couches les plus externes sont décapées, les valves prennent alors une couleur blanchâtre. Il s'agirait d'une décalcification par mobilisation ionique provoquée par l'EDTA.

Pour tester l'action de ce chélatant sur la bioaccumulation, nous avons exposé des dreissènes à des ajouts simultanés de plomb et d'EDTA ( $\text{EDTA Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). L'EDTA a été utilisé à deux rapports molaires: légèrement en excès par rapport au plomb ( $\text{EDTA} / \text{Pb} = 1.5$ ) et fortement en excès ( $\text{EDTA} / \text{Pb} = 4$ ).

Les cinétiques d'accumulation présentées dans les figures 34 à 36 montrent l'effet de l'EDTA sur l'évolution des concentrations en plomb dans les dreissènes. Nous observons que la présence d'EDTA dans le milieu de contamination réduit très fortement la bioaccumulation. Les concentrations maximales atteintes en fin d'exposition chez les dreissènes contaminées par du plomb seul sont supérieures à celles obtenues en présence de Pb + EDTA d'un facteur de 3 à 4 quand ce chélatant est légèrement en excès par rapport au plomb et d'un facteur de 30 quand il est fortement en excès. Les indices de contamination (tableau 25) confirment bien l'importance de cet effet antagoniste de l'EDTA sur la capacité de bioaccumulation.

Nous pouvons noter aussi que la présence d'EDTA même à une forte molarité n'annule pas complètement la cinétique d'accumulation. Nous observons en effet une très faible augmentation des concentrations traduisant une accumulation très faible et très lente.

Nous avons par ailleurs montré (partie III-1) que l'utilisation de l'EDTA permet de maintenir le métal en solution et d'éviter les pertes par adsorption et précipitation. Il apparaît alors que malgré les concentrations élevées restant en solution et donc

Tableau 24: Toxicité de l'EDTA sur les dreissenes exprimée en mortalité cumulée sur 15 jours.  
(moyenne de 2 réplicats. 20 individus/essai)

Concentrations testées (µM.)	Mortalité cumulée (%)
0	0
10	5
15	5
25	10
30	10

Tableau 25: Influence de l'EDTA sur l'indice de contamination (I.C.= Pb dans dreissenes contaminées/Pb dans dreissenes témoins.

Concentrations nominales testées	Indice de contamination I.C.
Pb 250 µg/l	28,5
Pb 250 µg/l + EDTA 2 µM	9.3
Pb 1500 µg/l	78,5
Pb 1500 µg/l + EDTA 10 µM	18.3
Pb 1000 µg/l	88.7
Pb 1000 µg/l + EDTA 20 µM	2.9

Tableau 26: Effet protecteur de l'EDTA contre la toxicité létale du plomb.

Concentrations nominales testées	Mortalité cumulée (%)
(Automne)	
Témoin	6
Pb 250 µg/l	9.25
Pb 250 µg/l + EDTA 2 µM	6.25
Pb 1500 µg/l	26,25
Pb 1500 µg/l + EDTA 10 µM	7,5
.....	
(Printemps)	
Témoin	6
Pb 1000 µg/l	10
Pb 1000 µg/l + EDTA 20 µM	5,5

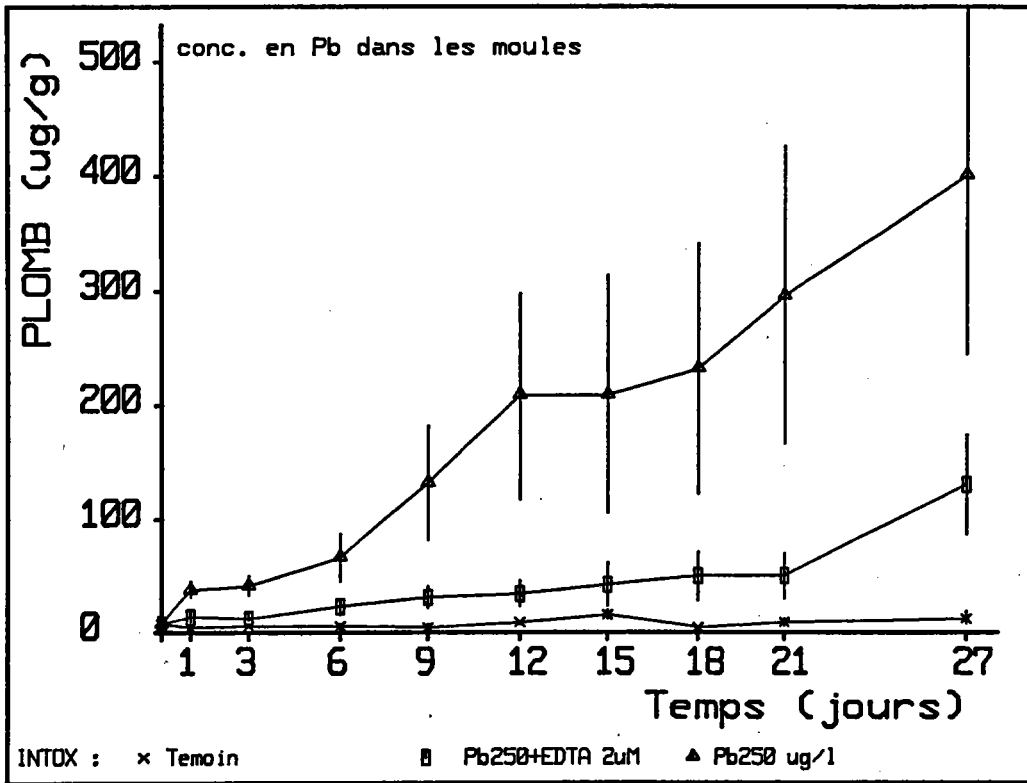


Figure 34: Cinétiques d'accumulation de 250 µgPb/l en présence ou non d'EDTA 2 µM.

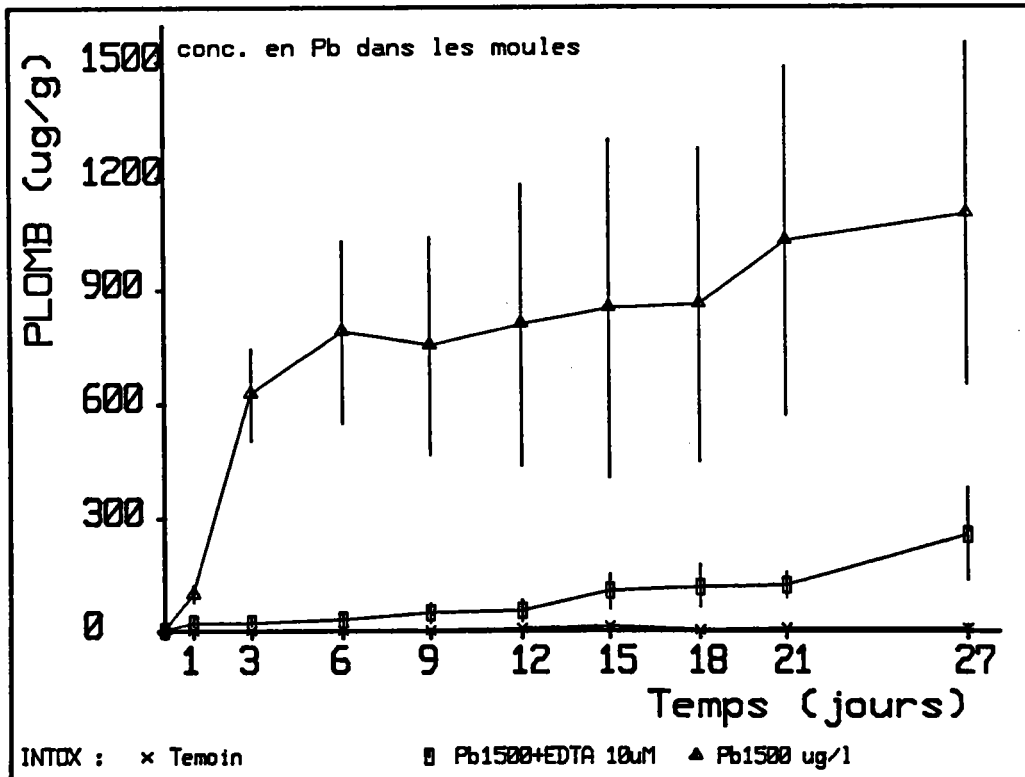


Figure 35: Cinétiques d'accumulation de 1500 µgPb/l en présence ou non d'EDTA 10 µM.

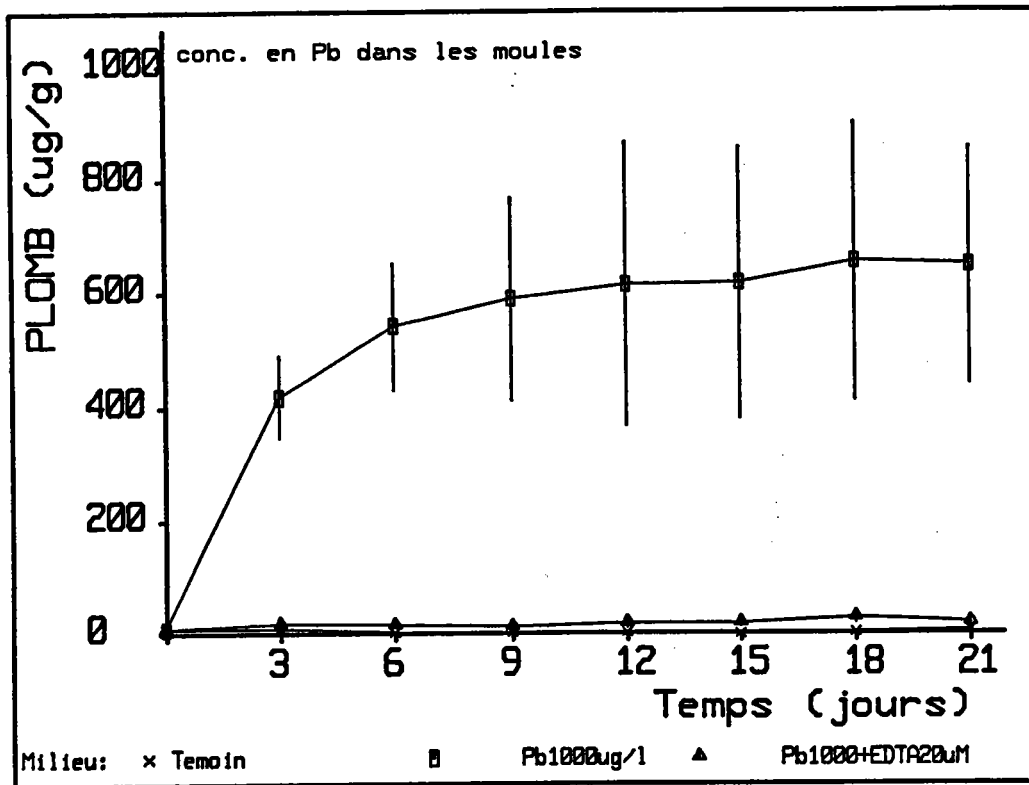


Figure 36: Cinétiques d'accumulation de 1000 µgPb/l en présence ou non d'EDTA 20 µM.

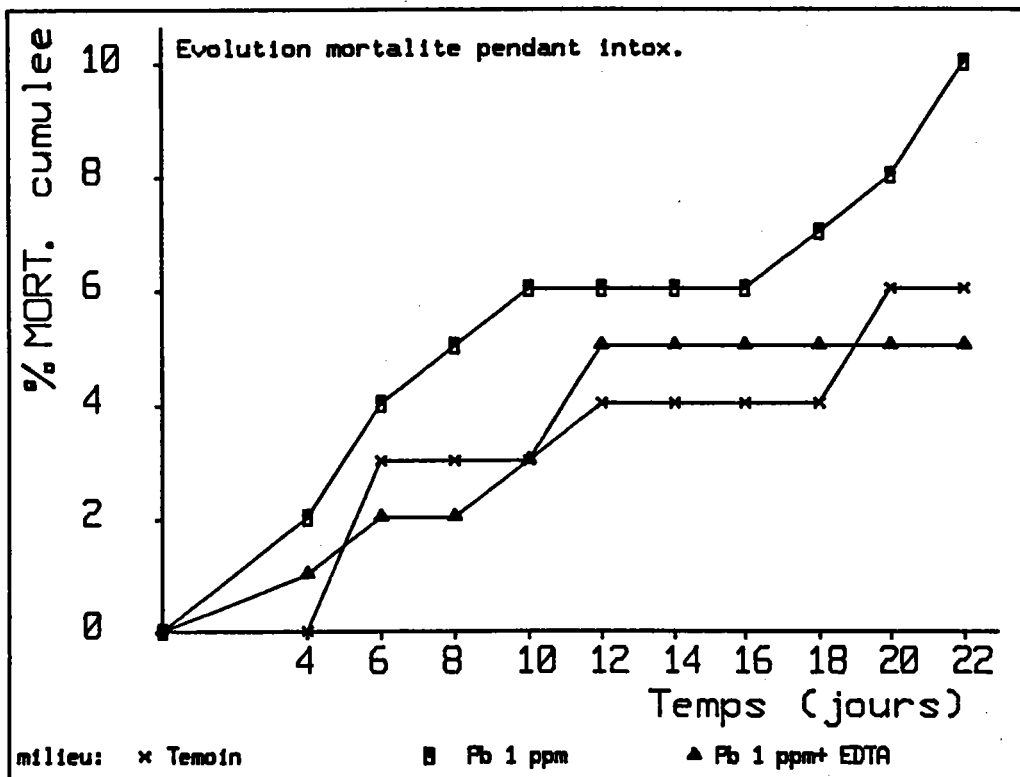


Figure 37: Exemple d'effet de l'EDTA sur l'évolution de la mortalité des dreissenes dans une exposition à 1ppm de Pb.

potentiellement disponibles, l'assimilation est très réduite.

Ces résultats suggèrent que la chélation du plomb par l'EDTA réduit fortement sa disponibilité biologique et par conséquent sa fixation par les organismes. Cette réduction est d'autant plus importante que la molarité de l'EDTA est supérieure à celle du plomb.

Nous avons en outre suivi la mortalité des dreissènes en parallèle aux cinétiques d'accumulation. La présence d'EDTA dans les milieux de contamination se traduit par une réduction importante des % de mortalité cumulée en fin d'exposition (tableau 26). Nous reportons dans la figure 37 un exemple d'évolution de la mortalité sous une exposition à 1 ppm de plomb avec et sans EDTA.

Ces données indiquent de toute évidence une réduction de toxicité létale du métal en présence du chélatant. L'explication de cet effet protecteur de l'EDTA se situe au niveau de son action sur la bioaccumulation. L'analyse des relations existant d'une part entre la mortalité et les concentrations moyennes en plomb dans le milieu (fig.38), et d'autre part entre la mortalité et les concentrations accumulées par les dreissènes (fig.39), montre que la toxicité létale du plomb et sa bioaccumulation sont corrélées positivement.

Nous pouvons donc dire que la présence d'EDTA dans le milieu d'exposition, en réduisant la biodisponibilité du plomb, réduit par conséquent sa bioaccumulation et corrélativement sa toxicité.

Nos résultats sont en accord avec un certain nombre de travaux concernant des mollusques d'eau douce, notamment les observations de Ravera et al. (1973) qui montrent que l'EDTA et le NTA réduisent fortement l'incorporation du zinc et du cobalt chez *Unio mancus*. Des observations comparables ont été rapportées pour le cadmium en présence d'EDTA chez *Anodonta anatina* (Holwerda et al., 1988) et chez *Dreissena polymorpha* pour le zinc (Maarouf, 1988).

De même pour les mollusques marins, les résultats de Mc Leese et Ray (1984) montrent que l'accumulation du cadmium chez *Macoma balthica* est réduite par l'EDTA. Un résultat similaire a été rapporté pour le cuivre chez *Venerupis decussata* (Stephenson et Taylor, 1975); et pour le zinc et le cobalt chez *Mytilus* (George, 1980).

Dans le cas du plomb chez *Mytilus*, les résultats sont différents. En effet l'emploi des alginates, humates et pectates n'affecte pas l'accumulation du plomb (Coombs, 1977). Il semble dans ce cas que c'est la relative labilité de ces complexes, par rapport à

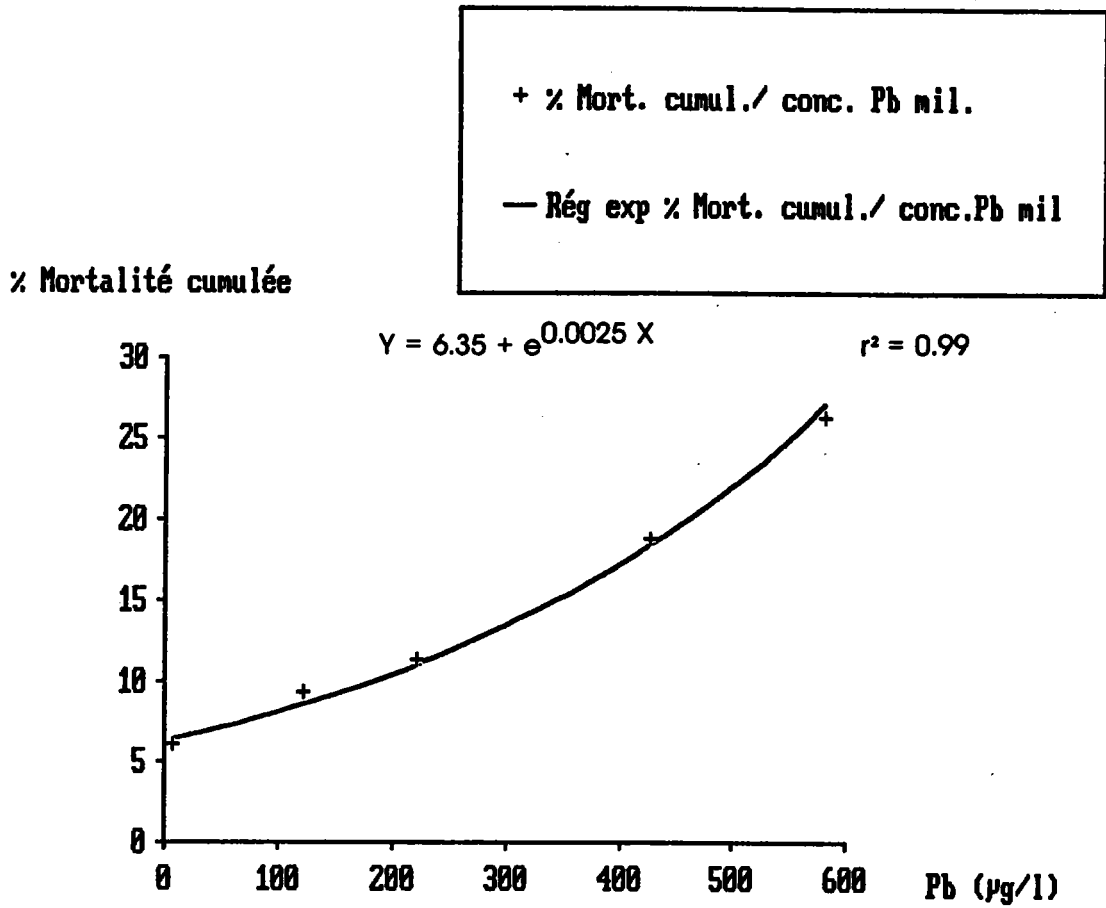


Figure 38: Evolution de la mortalité en fonction des concentrations réelles en Pb dans le milieu.

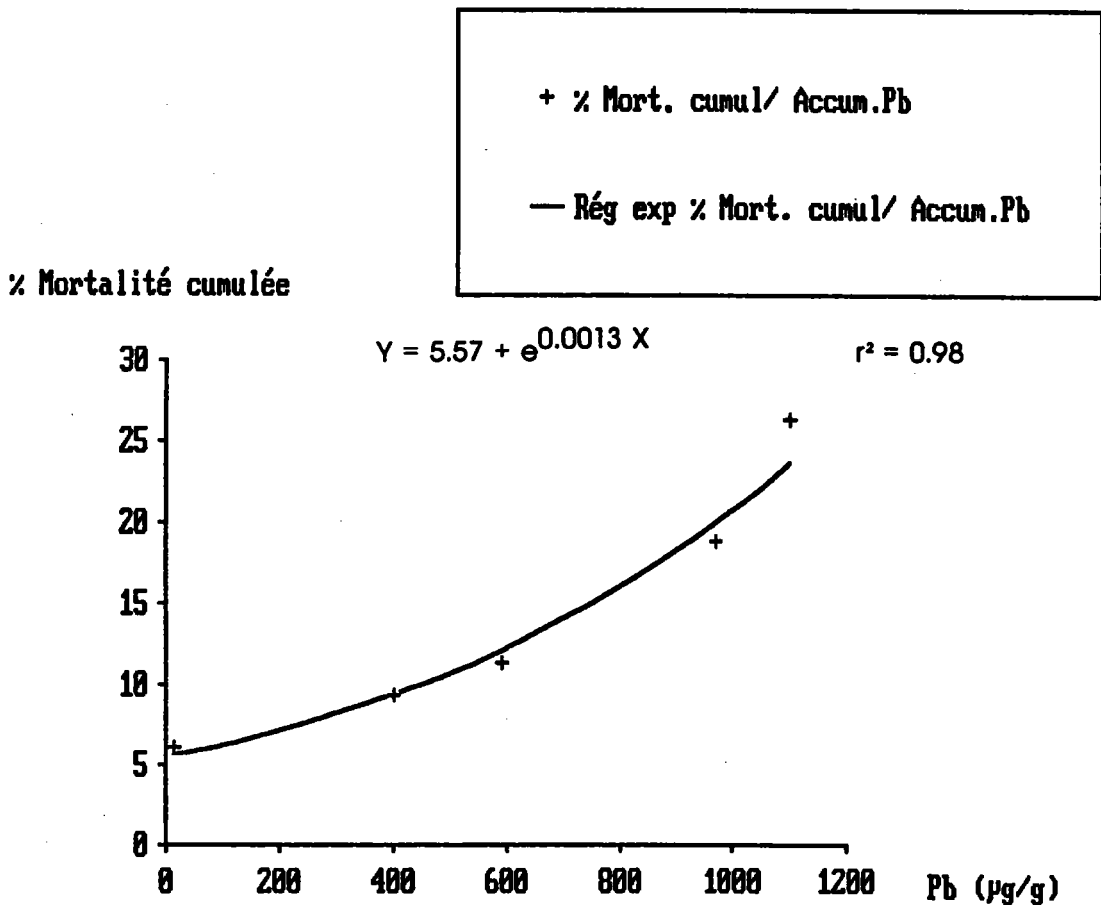


Figure 39: Evolution de la mortalité en fonction des concentrations tissulaire en Pb.



d'autres plus stables que forme l'EDTA (Hung, 1982), qui expliquerait l'absence d'effet observée.

Le mécanisme moléculaire gouvernant l'effet de ce chélatant n'est pas bien connu. Il semble que le chélatant entre en compétition avec un ligand membranaire transporteur (Ahlers et Rösik, 1986). La fixation du métal et son transfert dans la cellule dépend de l'issue de cette compétition. Le résultat de la compétition sera déterminé d'une part, par les constantes de stabilité des complexes métal-chélatant et de la concentration du chélatant dans le milieu (Hung, 1982), et d'autre part par la constante de formation du complexe métal-ligand membranaire, autrement dit l'affinité respective du métal pour le chélatant et le ligand récepteur. Dans la mesure où ce modèle est adopté, nous pouvons dire que pour un chélatant fort tel que l'EDTA en excès par rapport au plomb, la compétition se fait en sa faveur ce qui se traduit par une baisse de la fixation du métal et donc de son incorporation dans les tissus.

#### III-4-2- INFLUENCE DES PHOSPHATES.

Toujours dans l'appréciation de l'influence de la matrice chimique du milieu sur la contamination, nous avons testé l'effet d'un complexant inorganique (ions phosphates), sur la bioaccumulation du Pb. Les phosphates ont été utilisés sous forme de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  à  $20 \mu\text{M}$  d'ions  $\text{PO}_4^{3-}$ . La concentration nominale utilisée en Pb est de 1 mg/l. Le but étant de savoir si la présence des ions phosphates risque de modifier la cinétique de bioaccumulation en agissant sur la spéciation du plomb dans le milieu.

Nous avons retenu les phosphates car des études antérieures (Gutierrez-Galindo, 1980a) ont signalé que la bioaccumulation du Cd n'est pas altérée chez *Mytilus edulis*, même en présence de concentrations élevées en phosphates. Il a été rapporté aussi que les ions phosphates interviendraient au niveau subcellulaire et biochimique dans les processus de détoxification du plomb en participant à la séquestration du métal dans des formes inertes non toxiques notamment dans le système lysosomal (Schulz-Baldes, 1977; George, 1980; 1982; Martoja M. et al., 1988). En outre, dans le milieu naturel, la conjonction d'une pollution métallique et d'une eutrophisation risque d'avoir une incidence particulière sur la contamination des organismes aquatiques.

Les résultats présentés dans la figure 40 montrent l'évolution des concentrations en plomb dans les dreissènes contaminées en absence et en présence de phosphates. La cinétique de bioaccumulation avec du plomb seul montre un ralentissement après le 9<sup>e</sup> jour ce qui indique une tendance saturante. Quand les phosphates sont présents dans le

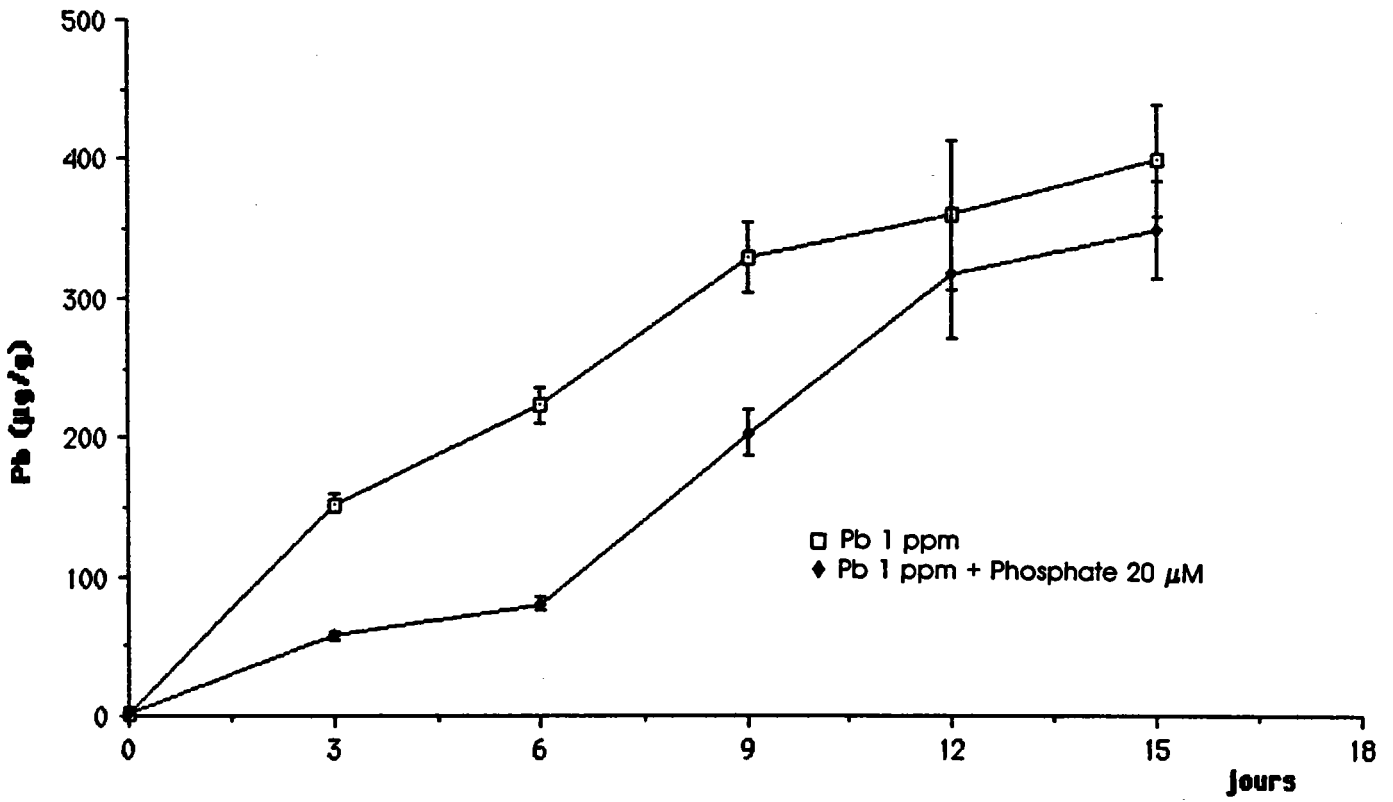


Figure 40: Influence des phosphates ( $20 \mu\text{M}$ ) sur la cinétique d'accumulation de 1ppm Pb.

milieu de contamination, la cinétique montre une allure biphasique. Dans la première phase entre 0 et 6 jours, la bioaccumulation est faible (entre 3 et 6 jours il n'y a pas d'augmentation significative des concentrations). Dans la seconde phase, après le 6<sup>e</sup> jour, il y a reprise de l'accumulation avec une vitesse importante mais selon un mode saturant et l'écart entre les 2 cinétiques avec ou sans phosphates se réduit.

Considérant les accumulations maximales en fin d'exposition, aucune différence significative n'est alors constatée entre les 2 lots de dreissènes contaminés en absence ou en présence de phosphates.

Il apparaît donc que la présence des ions phosphates a une incidence plutôt sur la vitesse initiale d'accumulation que sur la capacité finale de bioaccumulation.

Le suivi des concentrations en Pb dans le milieu montre qu'il y a une réduction de 30 % en moyenne des concentrations en Pb dissous en présence de phosphates. Ceci est dû à la formation de complexes de phosphates de Pb très peu solubles dans le milieu. On peut alors penser que la faible accumulation observée dans la phase initiale de la cinétique est due en partie au moins à la baisse de solubilité du plomb.

Le milieu d'exposition étant constamment agité, du fait de la circulation d'eau dans les bacs expérimentaux, il y a remise en suspension des particules de phosphate de Pb, ce qui se traduit par une exposition des dreissènes au métal présent en partie sous forme particulaire. Ces données permettraient d'expliquer la lenteur de la cinétique dans les premiers jours de l'exposition puisque la forme particulaire est prise plus lentement que la forme soluble du métal. Un résultat comparable a été trouvé par George (1980) chez *Mytilus edulis* dans un cas d'exposition au plomb sous forme de coprécipitat avec le fer. Selon cet auteur la particule de Pb n'est pas prise intacte car le Pb est d'abord désorbé (mobilisé) au niveau membranaire par un chélatant avant son transfert à travers la membrane.

Quant au résultat de Gutierrez-Galindo (1980a) qui ne montre pas d'influence des phosphates sur l'accumulation du Cd par *Mytilus*, il peut être expliqué par la faible affinité du Cd pour les phosphates (Pandard, 1986; Bacle, 1988). En outre comme il s'agit d'eau de mer, la présence de chlorures à des concentrations élevées ajoutée à la réactivité plus importante du Cd pour ces complexants (Pandard, 1986) déplacerait l'équilibre en faveur des chlorures de Cd et rendrait négligeable la formation de complexes de phosphates de Cd.

### III-4-3- EFFET DE LA TEMPERATURE.

La température occupe une place prépondérante parmi les principaux facteurs abiotiques. Fortement dépendante des conditions climatiques, des variations saisonnières et nyctémérales, elle exerce une influence sur de nombreux paramètres du milieu: oxygène dissous, équilibres chimiques...

La majorité des organismes aquatiques étant hétérothermes, toute modification de ce facteur est suivie d'un changement rapide de leur température interne. L'augmentation de température entraîne notamment un accroissement des échanges et de l'activité métabolique (Calms et al., 1975).

Nous avons testé l'effet de ce facteur sur les processus de contamination en exposant des lots de dreissènes à 1 ppm de plomb pendant 15 jours dans deux conditions thermiques: +15 et +20°C.

La figure 41a montre les cinétiques de bioaccumulation pour les deux températures retenues. Pendant les 9 premiers jours, les concentrations en plomb dans les dreissènes pour les deux températures augmentent régulièrement avec le temps d'exposition et ne montrent pas de différences significatives. A partir du 9<sup>e</sup> jour d'exposition, les différences deviennent très significatives et les cinétiques évoluent différemment. Nous observons un ralentissement de la bioaccumulation pour la température de +20°C, les concentrations augmentent très faiblement et indiquent un début de plateau. Elles évoluent de  $329 \pm 26 \mu\text{g/g}$  au 9<sup>e</sup> jour à  $398 \pm 40 \mu\text{g/g}$  en fin d'exposition. Par contre, pour la température de +15°C, les concentrations continuent à augmenter linéairement avec le temps d'exposition pour atteindre une concentration finale de  $675 \pm 66 \mu\text{g/g}$ .

L'analyse des courbes par régression confirme l'évolution linéaire pour la température de +15°C et la tendance saturante pour +20°C (fig.41b).

Concernant la mortalité des individus sur la période d'exposition (tableau 27), nous constatons que c'est pour la température basse (+15°C) que le taux de mortalité cumulée est le plus faible, et cela malgré les teneurs en plomb élevées dans les dreissènes. Il apparaît dans ce cas que l'élévation de température amplifie la toxicité létale du métal. Il s'agit là d'une synergie entre le métal et la température sur la toxicité létale.

L'accumulation métallique chez les bivalves repose sur une fixation du métal par les barrières biologiques (branchies, manteau, paroi intestinale) et sur sa pénétration au

Tableau 27: Taux de mortalité cumulée sur 15 jours d'exposition  
à 1 mg/l de Pb à 15° et 20°c

Témoin 15°c	1mg/l Pb 15°c	Témoin 20°c	1mg/l Pb 20°c
5 %	8 %	6 %	14 %

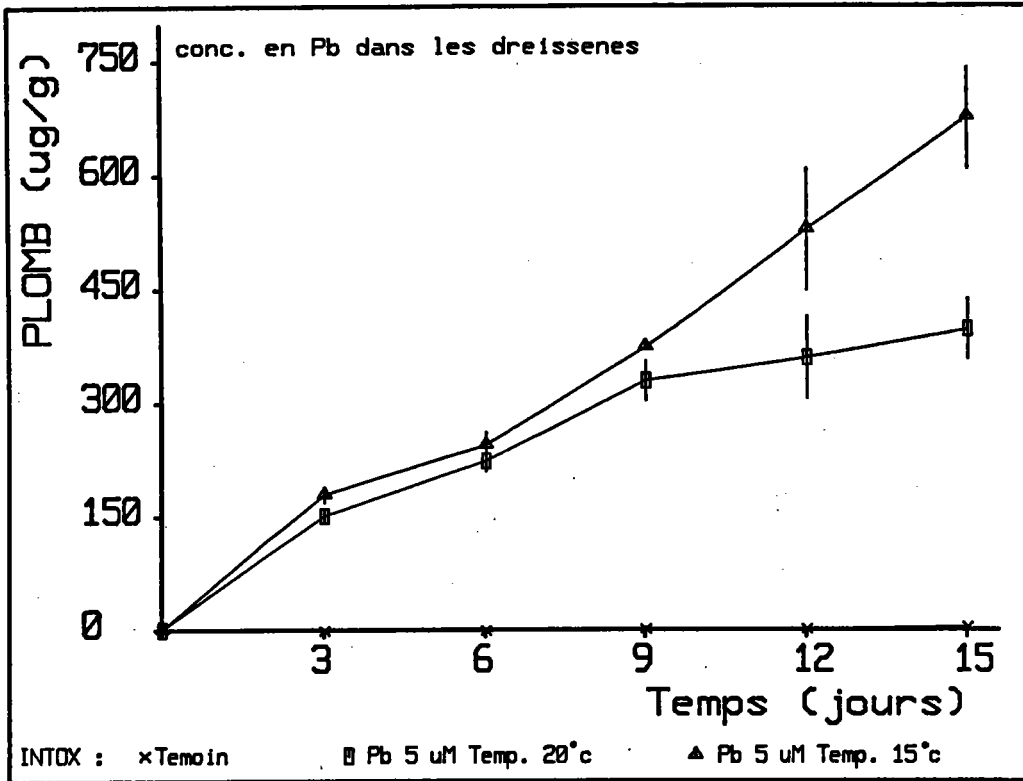


Figure 41a: Cinétiques d'accumulation de 1ppm de Pb à 15° et 20°C.

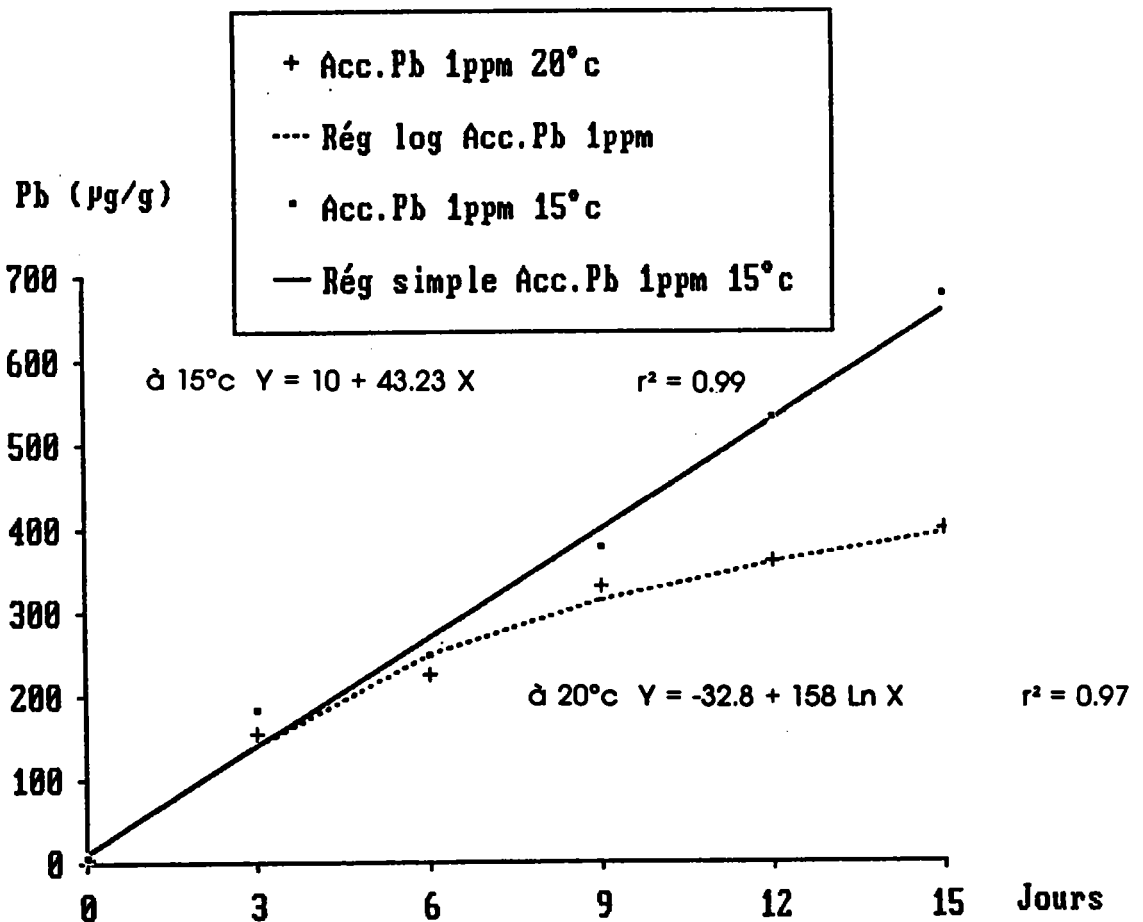


Figure 41b: Régression entre le temps d'exposition et les concentrations en Pb dans les dreissenes pour la température de 15° et 20°C.

travers de ces barrières. Le courant d'eau qui baigne en permanence les branchies et le manteau est dû aux mouvements des cils branchiaux et à l'ouverture du siphon. L'élévation de température augmente la circulation d'eau et accroît l'activité de pompage (Mitchell, 1970; Morton, 1971). On peut alors penser que ce processus faciliterait les transferts du contaminant et par conséquent entraînerait une amplification de la bioaccumulation.

Certains auteurs ont observé chez des bivalves marins une augmentation de l'accumulation du Cd et du Hg avec la température (Zarogian et Cheer, 1976; Phillips, 1976a; 1977; Jackim et al., 1977; Fowler et al., 1978; Denton et Burdon-Jones, 1981). Concernant le plomb, les travaux de Phillips (1976a; 1977; 1978) sur *Mytilus edulis* et Denton et Burdon-Jones (1981) sur *Saccostrea echinata* montrent que la bioaccumulation n'est pas affectée par la température. Par contre des résultats obtenus "in situ" chez *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis* et *Mytilus edulis* montrent une corrélation négative entre les concentrations en Pb dans les organismes et la température de l'eau (Bryan, 1973; Orren et al., 1980; Popham et D'Auria, 1982). Pour le cuivre, chez *Mytilus galloprovincialis*, l'élévation de température (de +13 à +23°C) réduit l'accumulation (Varengo et al., 1988).

Puisque l'effet de la température sur la bioaccumulation diffère selon le métal et l'organisme testé, il ressort de ces travaux que la relation entre l'augmentation de la température et l'accumulation, ne peut s'expliquer simplement par l'augmentation du flux d'eau dans la cavité palléale provoquée par l'amplification des processus adaptatifs (taux de filtration, consommation d'oxygène). Ceci suggère alors que les mécanismes intervenant dans l'accumulation du Pb sont différemment affectés par le changement de température que ceux intervenant pour les autres métaux tels que Cd et Hg.

Dans le cas de la dreissène, nos résultats montrent que nous pouvons distinguer 2 phases dans l'action de la température sur l'accumulation du Pb:

- Une première phase (0 à 9 jours) pendant laquelle la température ne semble pas avoir d'effet sur l'accumulation. Ce qui rejoint les observations de certains auteurs sur les bivalves marins (Phillips, 1976a; 1978; Denton et Burdon-Jones, 1981).

- Une seconde phase (9 à 15 j) où l'effet de l'augmentation de la température apparaît et entraîne une réduction de l'accumulation et l'apparition d'un plateau dans la cinétique.

Si l'effet de la température chez les bivalves s'accompagne généralement d'une augmentation de certains processus physiologiques comme le taux de filtration (Mitchell,

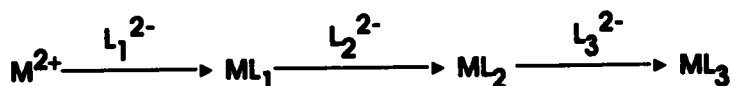
1970; Morton, 1971), les battements cardiaques (Widdows, 1973) et la consommation d'oxygène (Bass, 1977; Mouabad, 1986), il y a aussi avec l'élévation de la température interne un accroissement de toute l'activité métabolique et notamment des processus d'excrétion (Bryan, 1973; Cairns et al., 1975).

On peut donc interpréter l'action de la température chez la dreissène comme une stimulation du transport interne du Pb et de l'activité excrétrice. Ceci expliquerait la réduction de l'accumulation, et surtout le plateau observé dans la cinétique. Celui-ci n'indique nullement une saturation des sites potentiels de fixation du métal mais plutôt une élimination plus importante qui contrebalance sa fixation.

Concernant l'absence d'effet de la température dans les travaux cités sur le plomb, nous pensons qu'elle serait due aux très faibles concentrations utilisées par les auteurs (10 µgPb/l par Denton et Burdon-Jones, 1981 et 20 µgPb/l par Phillips, 1976 a).

Nous avons signalé précédemment que la contamination à la température élevée s'accompagne d'une mortalité plus importante des dreissènes (Tableau 27). Un résultat similaire a été obtenu avec le zinc (Maarouf, 1988). Cette amplification de la toxicité est généralement observée pour différents animaux aquatiques; en général, plus la température est élevée plus le métal est toxique (Cairns et al., 1975; Del Ramo et al., 1987). Cependant les charges en plomb trouvées dans les dreissènes contaminées à +20°C sont faibles par rapport à celles exposées à +15°C. Ceci semble indiquer que la toxicité létale ne varie pas toujours parallèlement aux teneurs en métal surtout quand un autre facteur telle que la température intervient.

Si on adopte le modèle selon lequel généralement les métaux traces pénètrent et sont contrôlés dans la cellule par une série de ligands de forces croissantes (Williams, 1981):



Dans la mesure où on accepte ce schéma, il est alors possible de suggérer comment la température influence les concentrations métalliques intracellulaires. Une diminution de la température s'accompagnera d'une augmentation de la formation des complexes métal-ligand (augmentation de la constante de formation). Une hausse de la température aura un effet opposé (dissociation des complexes métal-ligand) (Simkiss et Watkins, 1988; Watkins et Simkiss, 1988).



Tableau 28: Plan expérimental suivi pour l'étude de l'interaction Pb - Zn  
(Ajouts des métaux en  $\mu\text{M}$ .)

N° essais	PLOMB	ZINC
1	0	0
2	0	5
3	0	15
4	2.5	0
5	2.5	5
6	2.5	15
7	5	0
8	5	5
9	5	15

La dissociation des complexes métal-ligand aura pour conséquence l'augmentation de l'activité des ions métalliques, ce qui expliquerait la mortalité élevée. En outre ce processus stimulerait la détoxification (Watkins et Simkiss, 1988) et l'élimination du métal au niveau du rein et permettrait de comprendre le plateau de la cinétique observée à +20°C.

#### III-4-4- INFLUENCE DU ZINC.

La pollution des milieux aquatiques est souvent un facteur à composantes multiples, incluant divers polluants et différents paramètres physico-chimiques du milieu récepteur de ces polluants. Ces paramètres agissent de concert et déterminent les réponses biologiques.

Dans cet environnement aquatique, les organismes se trouvent exposés simultanément à plusieurs polluants dont l'action globale n'est pas obligatoirement la somme des actions singulières. De ce fait, l'étude des interactions s'est imposée et occupe de plus en plus une place grandissante en écotoxicologie. Par définition l'interaction entre 2 facteurs correspond au fait que l'effet de l'un dépend des valeurs que prend l'autre.

Parmi les méthodes de détermination des interactions, la plus puissante et la plus récente est la modélisation par régression multiple. Elle a été appliquée dans le cadre de plans factoriels pour des études d'écotoxicologie (Bois, 1984; Bois et al., 1986; Heuillet, 1986; Kaitala, 1988). L'analyse par régression multiple de plans factoriels permet de modéliser la réponse biologique de façon à rendre compte des interactions se produisant entre les facteurs agissant sur cette réponse. (Cf. II-4)

Pour tenter de tester l'incidence d'autres métaux sur la bioaccumulation du plomb, nous avons retenu le zinc car contrairement au plomb, c'est un élément trace essentiel dont la bioaccumulation par la dreissène a été déjà étudiée (Maarouf, 1988). En outre, il se trouve souvent associé au plomb dans les eaux naturelles soumises à une pollution métallique.

Pour étudier l'influence du zinc sur la bioaccumulation du plomb, nous avons exposé des lots de dreissènes pendant 15 jours au plomb seul et au plomb associé au zinc selon le plan expérimental donné dans le tableau 28.

Les 2 variables de base Pb et Zn sont chacune à 3 modalités:

Pb: 0, 2.5 et 5  $\mu\text{M}$ . - Zn: 0, 5 et 15  $\mu\text{M}$ .

Nous avons dans un premier temps intégré au plan factoriel la variable: Temps d'exposition à 6 modalités: 0, 3, 6, 9, 12 et 15 jours pour rendre compte de la cinétique. Le plan est donc à 3 variables de base avec 54 essais (6.3.3).

Les résultats obtenus à partir de ce plan factoriel à 3 variables de base: Temps ( $X_1$ ), Pb ( $X_2$ ), Zn ( $X_3$ ) ont permis de calculer l'équation suivante, tous les termes retenus étant significatifs au niveau de probabilité de 95 % :

$$Y = 7.93 + 1.79 X_2 + 0.27 X_1 + 0.17 X_1 X_2 - 0.14 X_3 - 0.08 X_2 X_3 + 0.006 (X_1^2 - 11.6) X_3 + 0.005 (X_1^2 - 11.6) X_2 X_3.$$

Y étant les concentrations en Pb dans les dreissènes exprimées en  $\text{Log}_e$  (100 (Pb)  $\mu\text{g/g}$ ). Nous avons opéré cette transformation logarithmique pour homogénéiser les variances des essais car nous avons constaté une variation des écarts-types avec les moyennes. Cette transformation a été satisfaisante après vérification par le test de Cochran d'homogénéité des variances.

Les termes linéaires qui traduisent les effets principaux montrent que la bioaccumulation du plomb dépend d'abord de sa concentration dans le milieu et du temps d'exposition. Le facteur Zn apparaît avec un signe négatif ce qui signifie que sa présence réduit la bioaccumulation du plomb. Le terme produit  $X_2 X_3$  avec un coefficient négatif traduit une interaction négative entre le Pb et le Zn.

Les 2 derniers termes du polynôme, malgré la faible importance de leurs contributions, montrent respectivement une interaction double entre le temps et le Zn et une interaction triple entre Temps, Zn et Pb qui sont toutes les deux de signe positif. L'interprétation de ces termes signifie que la prolongation du temps d'exposition atténue l'effet négatif du zinc.

Ce résultat nous a incités à refaire les calculs en éliminant la variable Temps du plan factoriel complet, et en modélisant la bioaccumulation pour chaque temps d'exposition. Ce qui donne 5 plans factoriels pour les 5 temps d'exposition: 3, 6, 9, 12 et 15 j.

Ces plans sont à 2 variables: Pb ( $X_1$ ) et Zn ( $X_2$ ) ayant 3 modalités chacune comme précédemment. Les 5 équations de régression sont les suivantes, nous ne représentons

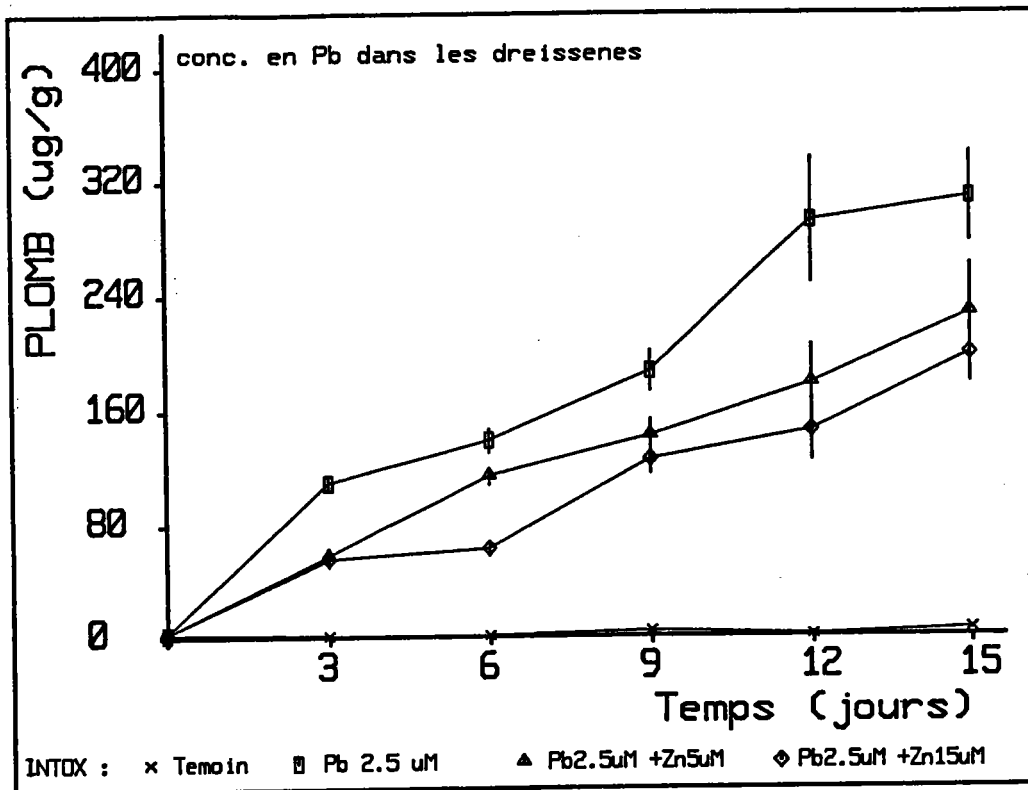


Fig. 42a:

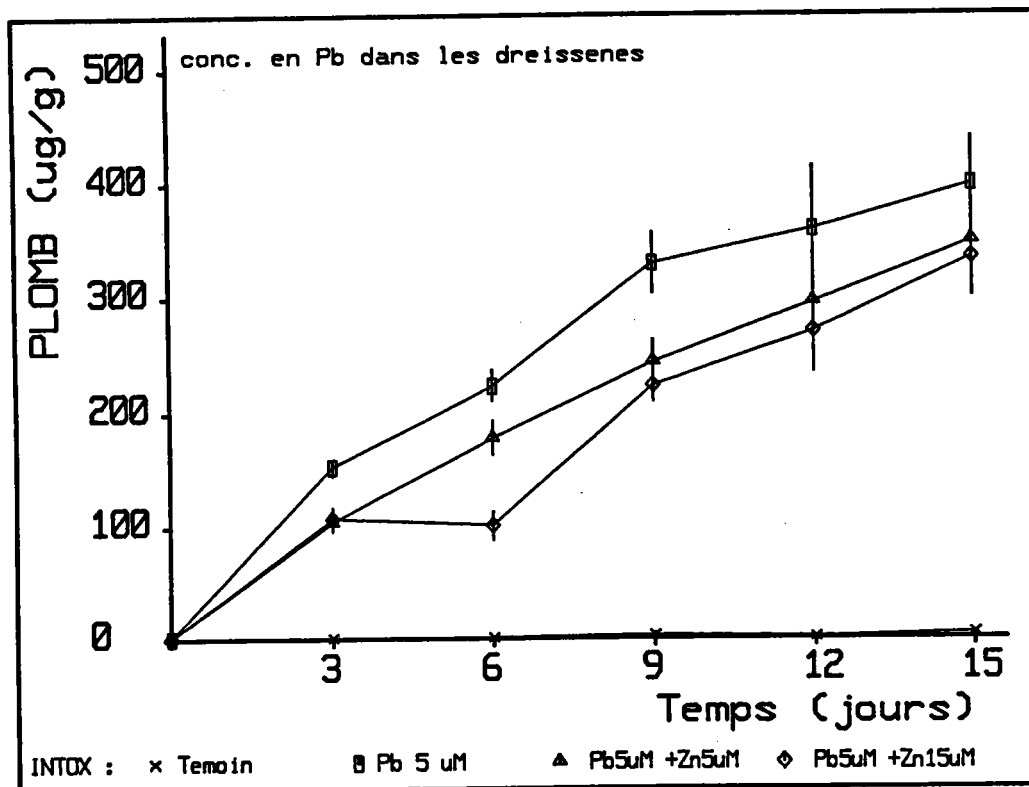


Fig. 42b:

Figures 42a-b: Influence du Zn sur les cinétiques d'accumulation du Pb pour les concentrations indiquées.

que les effets linéaires et significatifs ( $\alpha = 0.05$ ):

$$\text{A 3 jours: } Y = 7.89 + 1.97 X_1 - 0.17 X_2 - 0.09 X_1 X_2$$

$$\text{A 6 j. : } Y = 8.05 + 2.18 X_1 - 0.26 X_2 - 0.2 X_1 X_2$$

$$\text{A 9 j. : } Y = 8.61 + 2.05 X_1 - 0.13 X_2$$

$$\text{A 12 j. : } Y = 8.54 + 2.43 X_1 - 0.16 X_2$$

$$\text{A 15 j. : } Y = 8.92 + 2.13 X_1$$

Il apparait de l'étude de ces équations que pour les temps 3 et 6 jours le Zn ( $X_2$ ) agit négativement sur l'accumulation du Pb. En plus le terme  $X_1 X_2$  traduit une interaction entre Pb et Zn qui va dans le même sens que l'effet du Zn. En fait par cette interaction négative, le Zn diminue davantage l'accumulation du Pb. Le coefficient de cette interaction ainsi que celui du Zn augmente entre 3 et 6 jours, ce qui indique une amplification de l'effet négatif du Zn.

Pour les temps d'exposition 9 et 12 jours l'effet du facteur Zn apparait toujours avec un signe négatif, mais le terme de l'interaction étant devenu non significatif disparaît de l'équation, ce qui signifie que l'effet réducteur du Zn persiste mais n'est plus amplifié par son interaction négative avec le Pb.

Enfin pour la dernière équation correspondant à la fin de l'exposition, l'accumulation ne dépend plus que de la concentration en Pb dans le milieu. L'effet du facteur Zn n'est plus significatif.

En définitive, si l'on considère l'ensemble des équations, nous pouvons dire que la bioaccumulation du Pb dépend principalement du facteur Pb et que l'effet négatif du Zn seul ou en interaction avec le Pb se manifeste dans les premiers temps de l'exposition puis s'atténue au fur et à mesure que le temps d'exposition se prolonge.

Cette variation, au cours de l'exposition, de l'effet du Zn sur la bioaccumulation du Pb se trouve illustrée par les cinétiques de bioaccumulation données dans les figures 42 a et b.

En étudiant les courbes d'évolution des concentrations en Pb dans les dreissènes, nous observons un ralentissement de l'accumulation en présence de Zn pour toutes les combinaisons. L'augmentation du rapport molaire Zn/Pb accentue cet effet en particulier au 6<sup>e</sup> jour. Pour les autres temps, la cinétique en présence de Zn est toujours réduite mais l'écart tend à diminuer jusqu'à devenir non significatif vers la fin de l'exposition (12 et 15 jours) en particulier pour la forte molarité en Pb. Ceci signifie que c'est plutôt la

vitesse initiale d'accumulation qui est le plus affectée par la présence de Zn dans le milieu que l'accumulation maximale. Quant à l'influence du Pb sur l'accumulation du Zn chez *Dreissena* les résultats sont variables et ne permettent pas de conclure à un effet significatif (Maarouf, 1988).

Concernant l'effet de l'interaction sur la toxicité létale, nous avons observé là aussi un antagonisme entre les deux métaux. En effet à la fin de l'exposition, la mortalité cumulée des dreissènes exposées au Pb seul est de 14 %, celle des individus exposés au Zn seul est de 11 %, du même ordre de grandeur que celle des individus exposés au 2 métaux (10 %).

Il peut être proposé à la lumière des résultats sur la bioaccumulation les interprétations suivantes de l'antagonisme observé entre le Pb et le Zn:

La réduction de l'accumulation du Pb serait due à une diminution de l'activité de filtration des dreissènes provoquée par la présence de Zn dans le milieu. En effet l'action du Zn sur la filtration de la dreissène est plus importante et se produit plus rapidement que celle du Pb. Le seuil de toxicité comportementale du Zn (<200 ppb) est plus faible que celui du Pb (<400 ppb) (Mouabad, 1991). Par conséquent, dans les premiers jours de l'exposition, la réponse valvaire des dreissènes sera caractérisée par des périodes de fermetures très fréquentes et longues. On peut alors penser que cette diminution de la filtration se traduit par une faible contamination des organismes.

L'antagonisme observé peut aussi s'exercer au niveau des organes de prise des deux métaux. Il pourrait s'agir d'une compétition pour les sites de pénétration et de fixation au niveau des branchies. Un résultat similaire a été trouvé par Hemelraad et al. (1987) chez *Anodonta cygnea*. Il montre que la présence de Zn à forte concentration réduit très fortement l'accumulation du Cd au niveau des organes de prise (branchies, palpes et dans un moindre degré le manteau) alors que pour la glande digestive et le rein l'effet du Zn n'est pas significatif. En outre ces auteurs rapportent que la présence de Zn accélère le transport du Cd des branchies vers les organes internes.

L'atténuation de l'antagonisme, entre le Pb et le Zn, avec le temps d'exposition peut s'expliquer par l'adaptation des dreissènes au stress du métal. Elles adoptent alors un comportement de filtration discontinue (Mouabad, 1991). Cette réaction comportementale permet à l'animal de faire un compromis entre ses exigences de filtration et l'environnement défavorable. Alors, la prise du métal reprendrait vers la fin de la période d'exposition et l'action du Zn sur l'accumulation du Pb tendrait à diminuer. De plus la différence des voies métaboliques de détoxication des deux métaux chez les

bivalves (George et Viarengo, 1985), participerait à l'atténuation de cet antagonisme.

Il est vraisemblable que les deux phénomènes, physiologique et biochimique, interviennent dans l'interaction entre le Pb et le Zn dans la phase initiale d'accumulation.

Il y a peu de données publiées concernant les effets des interactions métalliques sur la bioaccumulation en particulier pour le plomb. En outre les différences de protocole et les rapports molaires des métaux utilisés font que parfois les résultats sont contradictoires et ne permettent pas des comparaisons rigoureuses. Signalons cependant que la plupart des travaux consultés concernant l'interaction entre métal essentiel et métal non essentiel sont en accord avec nos résultats. Ainsi Hemelraad et al. (1987) ont trouvé que la bioaccumulation du Cd est réduite en présence de Zn chez le bivalve d'eau douce *Anodonta cygnea*. Une interaction similaire pour le Cd en présence de Zn ou de Cu a été rapportée chez des bivalves marins comme *Mytilus edulis* (Elliott et al., 1986), *Mytilus galloprovincialis* et *Mulinia lateralis* (Jackim et al., 1977). Par contre Phillips (1976a) a trouvé que l'accumulation du Pb par *Mytilus edulis* n'est pas affectée par la présence de Zn, Cu et Cd. Mais il faut signaler qu'outre les molarités différentes utilisées, il s'agit là d'une interaction quadruple puisque les 4 métaux ont été testés ensemble.

### **III-5- ETUDE DE LA VARIABILITE ET INFLUENCE DE LA SAISON.**

Nous avons constaté, en répétant nos expérimentations à différentes saisons, que les réponses des dreissènes n'étaient pas similaires notamment la capacité de bioaccumulation. Ceci nous a incité à comparer les cinétiques de bioaccumulation pour 3 saisons: automne, hiver et printemps.

Avant de chercher l'incidence de la saison de prélèvement sur les capacités de bioaccumulation des dreissènes, nous avons au préalable testé la reproductibilité de la réponse à une contamination par le plomb de populations de dreissènes prélevées au même moment. Il s'agit donc d'estimer la variabilité intrasaisonnière.

#### **III-5-1- VARIABILITE DES RESULTATS DE BIOACCUMULATION.**

Pour réaliser les expérimentations portant sur la variabilité intrasaisonnière, nous avons récolté les dreissènes à la même station, dans la même population et dans le même microhabitat afin d'éliminer au maximum les facteurs incontrôlés liés au biotope qui pourraient agir sur la variabilité. Trois lots équivalents de dreissènes de la même

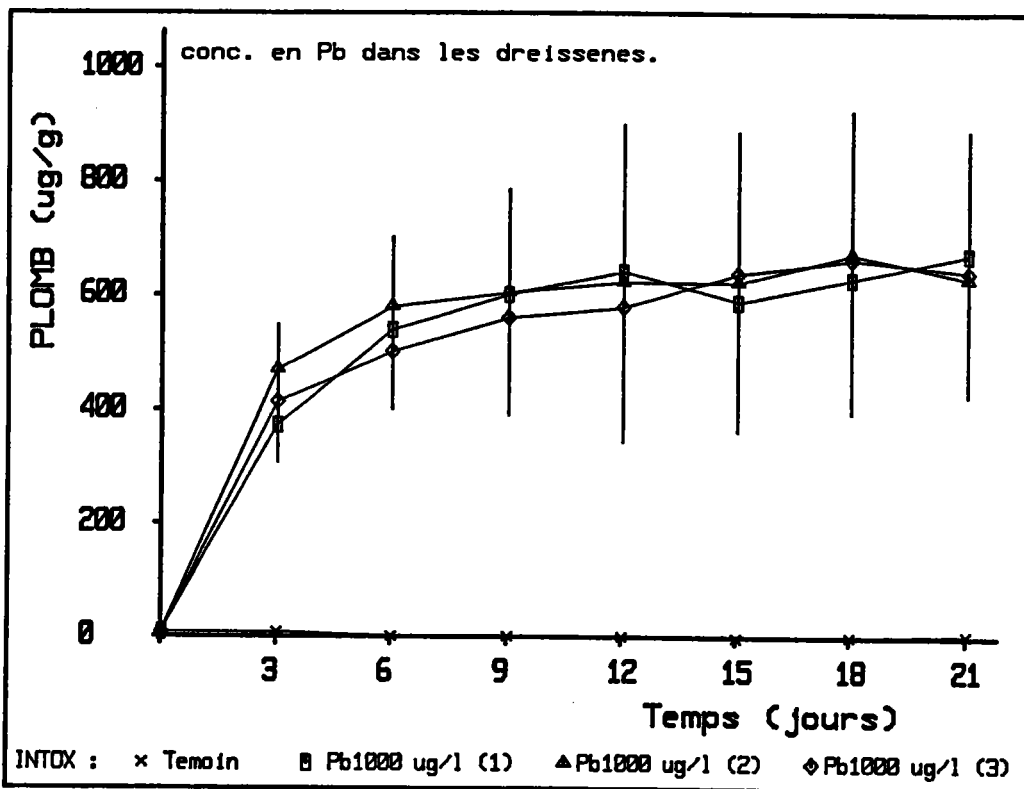


Fig. 43a:

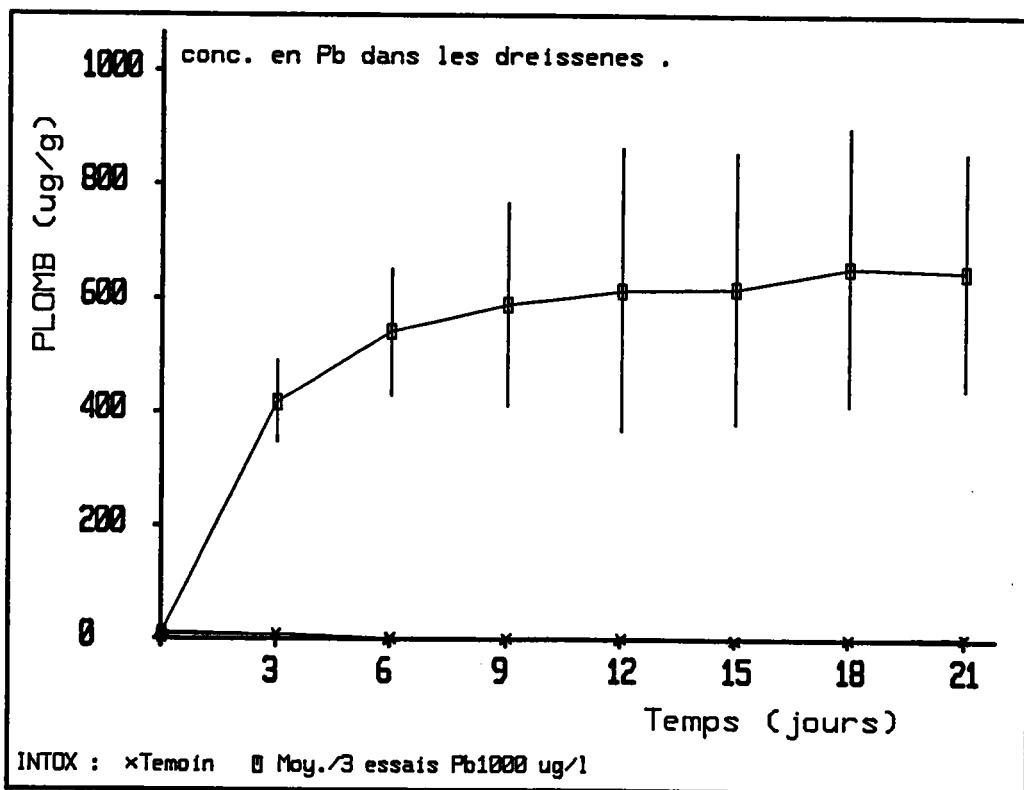


Fig. 43b:

Figures 43a-b: Cinétiques d'accumulation de 1ppm Pb réalisée en Avril.  
a: Expérience effectuée en 3 réplicats.  
b: Résultante des 3 courbes de cinétique.



classe de taille  $20 \pm 2$  mm ont été prélevés au printemps (avril) et répartis dans 3 unités expérimentales. Le rapport biomasse/volume d'eau est identique dans chaque unité. Chaque lot est exposé à 1 ppm de Pb (en concentration nominale) pendant 21 jours et à une température de  $19^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ . Le milieu est renouvelé quotidiennement sans apport de nourriture.

Les concentrations en Pb accumulées par les 3 lots de dreissènes ne montrent aucune différence significative et ceci à tous les temps de prélèvement. Les cinétiques de bioaccumulation obtenues (fig.43a) se superposent et présentent la même allure saturante à partir du 9<sup>e</sup> jour. L'analyse de variance ( $\alpha=0.05$ ) montre que l'on peut considérer que les réponses des 3 lots sont homogènes. A cet égard, Léglize et Crochard (1987) rapportent que les réponses des dreissènes "in situ" vis-à-vis du Pb et du Zn sont particulièrement répétitives. Dès lors que l'échantillon de population réagit avec une bonne répétabilité aux conditions de contamination, nous pouvons calculer la résultante de ces 3 courbes qui sera la cinétique de bioaccumulation pour le printemps (fig.43b)

Nous observons aussi que les écarts-types sur les moyennes augmentent avec le temps d'exposition, ce qui signifie que les variances sont proportionnelles aux moyennes. Quand on représente la variabilité de la bioaccumulation en coefficients de variation (CV en %) nous constatons qu'ils évoluent aussi avec le temps d'exposition. Ce résultat se vérifie aussi pour toutes les cinétiques de bioaccumulation présentées auparavant.

Nous représentons en figure 44 un exemple d'évolution des C.V en fonction du temps d'exposition pour la cinétique de bioaccumulation en avril. Au début de la contamination la variabilité exprimée en CV est de 15 % et augmente jusqu'à 40 % au 15<sup>e</sup> jour. Au delà, nous observons une stabilisation suivie d'une baisse à 32 % de variation à la fin de l'exposition (21 jours).

L'évolution des C.V (fig.44) présente une allure comparable à celle de la cinétique de bioaccumulation, cela signifie que le degré de variabilité tend à augmenter avec le degré de contamination autrement dit avec la charge métallique des organismes.

Les facteurs possibles de la variabilité peuvent être les suivants: taille des organismes, sexe, site de prélèvement et les conditions de contamination (Popham et D'Auria, 1983; Amiard et al., 1986; Lobel, 1987a). Dans notre cas, avec les précautions prises lors du prélèvement des dreissènes et les conditions homogènes de contamination au laboratoire, nous pouvons considérer que les facteurs de variabilité liés à l'habitat et aux conditions de laboratoire peuvent être éliminés. De plus dans le but de réduire au

C.V. %

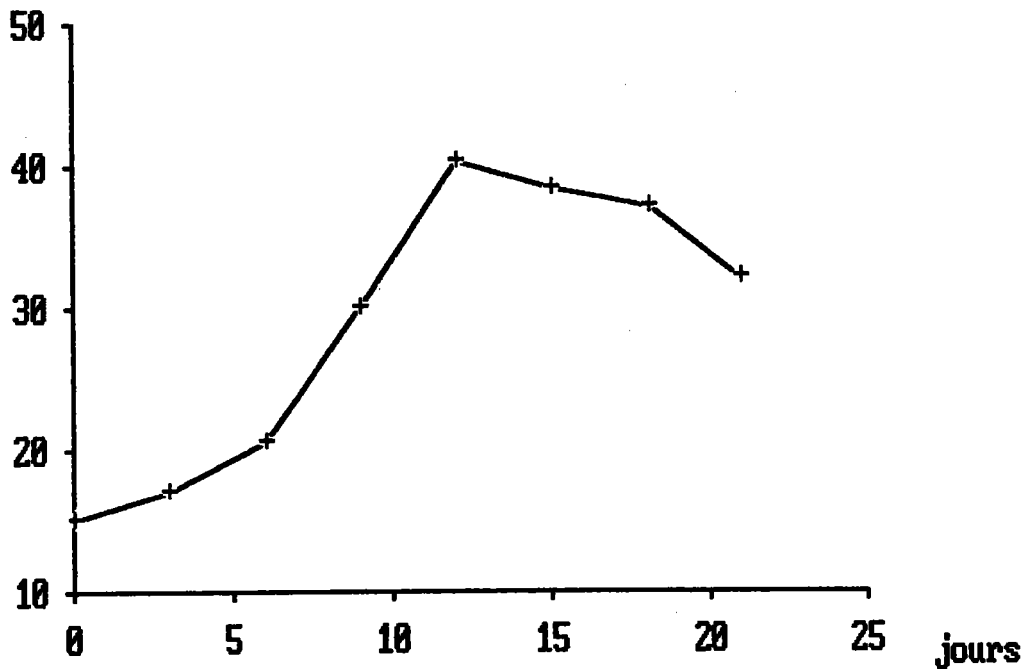


Figure 44: Evolution des Coefficients de Variation (C.V. %) en fonction du temps d'exposition. (expérience d'avril).

Tableau 29: Evolution des Coefficients de Variation (C.V en %) de la bioaccumulation avec le temps d'exposition. (Données recalculées à partir des références cités)

Métal	Temps d'exposition	C.V %	Références et commentaires
Pb	2 jours	10	Schulz-Baldes (1974) exposition de <i>Mytilus edulis</i> à 1ppm en labo.
	4 j	14	
	8 j	19	
	12 j	22	
	18 j	25	
	26 j	21.5	
	32 j	19	
39 j	19.5		
Pb	12.5 heures	14	Schulz-Baldes (1977) exposition de <i>Mytilus ed.</i> à 0.2 ppm en labo.
	25 h	16	
	75 h	21	
	125 h	24.5	
	175 h	21	
Pb	0 jours	24	Phillips (1976) exposition de <i>Mytilus ed.</i> en labo. au Pb,Cd,Zn et Cu (Pb= 20 µg/l, Cd= 40 µg/l, Zn= 400 µg/l, Cu= 20 µg/l)
	6 j	27	
	14 j	42	
Cd	0 j	14	
	6 j	18	
	14 j	31	
Zn	0 j	20	
	6 j	40	
	14 j	47	
Pb	0 jours	10	Leglize et Crochard (1987) Lab.Ecol.Metz (1985) exposition de <i>Dreissena polymorpha</i> in situ
	28 j	15.6	
	56 j	20.5	
	76 j	38.6	

maximum l'effet possible de la taille, la classe de taille  $20 \pm 2$  mm a été sélectionnée. Seul le facteur sexe n'a pu être pris en compte. Cependant la part de variabilité due à ce paramètre pour des métaux non essentiels tels que le plomb est très réduite (Orren et al., 1980). En outre la participation des gonades à la charge métallique chez les bivalves est négligeable (Bryan, 1973; Schulz-Baldes, 1974; Amiard et al., 1986).

Il apparaît alors que, même en minimisant les facteurs connus de variation, la variabilité résiduelle observée reste élevée et augmente avec la teneur métallique. Cette variabilité résiduelle définie comme la variabilité ne pouvant être expliquée ou associée à un paramètre physiologique ou écologique connu a été signalée et rapportée dans nombre de travaux "in situ" (N.A.S., 1980; Boyden et Phillips, 1981; Lobel, 1987a; 1989).

Le résultat que nous venons d'exposer n'est pas un cas isolé. Nous rapportons dans le tableau 29 quelques données, reprises de la littérature et recalculées, illustrant l'évolution de la variabilité de la bioaccumulation. Nous pouvons constater que ce phénomène est assez généralement observé. Cependant peu de travaux se sont intéressés à l'explication de ce phénomène. Lobel (1987 b; 1988; 1989) dans une exposition de *Mytilus edulis* au Zn rapporte que ce sont les différences biochimiques entre individus, en particulier au niveau du rein, qui expliquent cette grande variabilité résiduelle. Simkiss et Mason (1984) dans leur étude sur les réponses cellulaires des tissus de mollusques aux métaux, expriment la même idée et expliquent cette augmentation de la variabilité des résultats par les différences d'activités cellulaires et de turn-over des ligands impliqués dans la séquestration du métal. Ils ajoutent que cette variabilité peut être aussi importante que l'accumulation dans l'interprétation des réponses des organismes aux polluants métalliques.

Concernant nos résultats, nous pouvons dire qu'effectivement la variabilité des résultats d'accumulation du plomb par la dreissène augmente avec le degré de contamination. Les mécanismes sous-jacents de cette variabilité sont encore inconnus et leur compréhension nécessite des études complémentaires des mécanismes biochimiques impliqués dans le métabolisme des polluants métalliques, voire des différences génétiques entre individus comme l'a suggéré Lobel (1989) pour *Mytilus edulis*. La seule étude génétique sur *Dreissena polymorpha* à notre connaissance est celle de Hebert et al. (1989) qui montre que l'espèce présente un niveau de variabilité génétique exceptionnellement élevé.

### III-5-2- INFLUENCE DE LA SAISON SUR LA BIOACCUMULATION.

Après avoir vérifié la bonne répétabilité de la réponse des dreissènes aux conditions de contamination, nous pouvons passer à l'étude de la variabilité saisonnière. Nous envisagerons l'étude des différences au niveau des cinétiques de bioaccumulation et du degré de variabilité des résultats pour des dreissènes prélevées à 3 saisons différentes: automne (septembre), hiver (février) et printemps (avril).

Les conditions de prélèvement et de contamination des 3 lots de dreissènes récoltés en automne, hiver et printemps sont identiques (voir ci-dessus III-5-1).

Nous nous intéresserons dans un premier temps au poids des dreissènes, à leurs concentrations (en  $\mu\text{gPb/g}$  poids sec) et teneurs (contenu en Pb en  $\mu\text{g}$  par échantillon) initiales en Pb et à leurs évolutions chez les lots non exposés.

Dans le tableau 30 nous donnons les poids secs moyens initiaux et en fin d'expérience pour les échantillons témoins lors des 3 saisons. Les dreissènes d'avril présentent les poids secs initiaux les plus élevés suivies des dreissènes de février puis de celles de septembre qui montrent les poids les plus faibles.

Des résultats d'études biométriques, biochimiques et histologiques réalisées sur les mêmes populations naturelles de dreissènes (Léglize et Crochard, 1987; Tourari, 1988) confirment cette variation saisonnière. En effet, ces travaux permettent de distinguer trois phases caractéristiques dans l'évolution pondérale des organismes, évolution corrélée avec le cycle sexuel. Une phase de novembre à mars marquée par une évolution lente des paramètres pondéraux et correspond à la phase de préparation des animaux au cycle génital. La phase d'avril à juin pendant laquelle se produit une augmentation importante des poids secs (+100 %) correspond à la période de synthèse des réserves et de maturation sexuelle. La dernière phase qui est celle de l'émission des gamètes se produisant en juillet et août et se poursuivant jusqu'en septembre se traduit par une perte importante de poids sec (Tourari, 1988). Quant à l'évolution pondérale des témoins durant les expériences (tableau 30), on note dans tous les cas une diminution des poids secs due au jeûne des animaux. Les pourcentages de perte de poids sont comparables pour les 3 saisons.

Les figures 45a et b montrent respectivement l'évolution des concentrations et des teneurs en Pb chez les témoins lors des 3 saisons. Nous constatons que lorsque les charges métalliques sont exprimées en concentrations ( $\mu\text{g Pb/g}$  poids sec) (fig.45a), les valeurs initiales dans les organismes se présentent dans l'ordre suivant: avril, septembre et

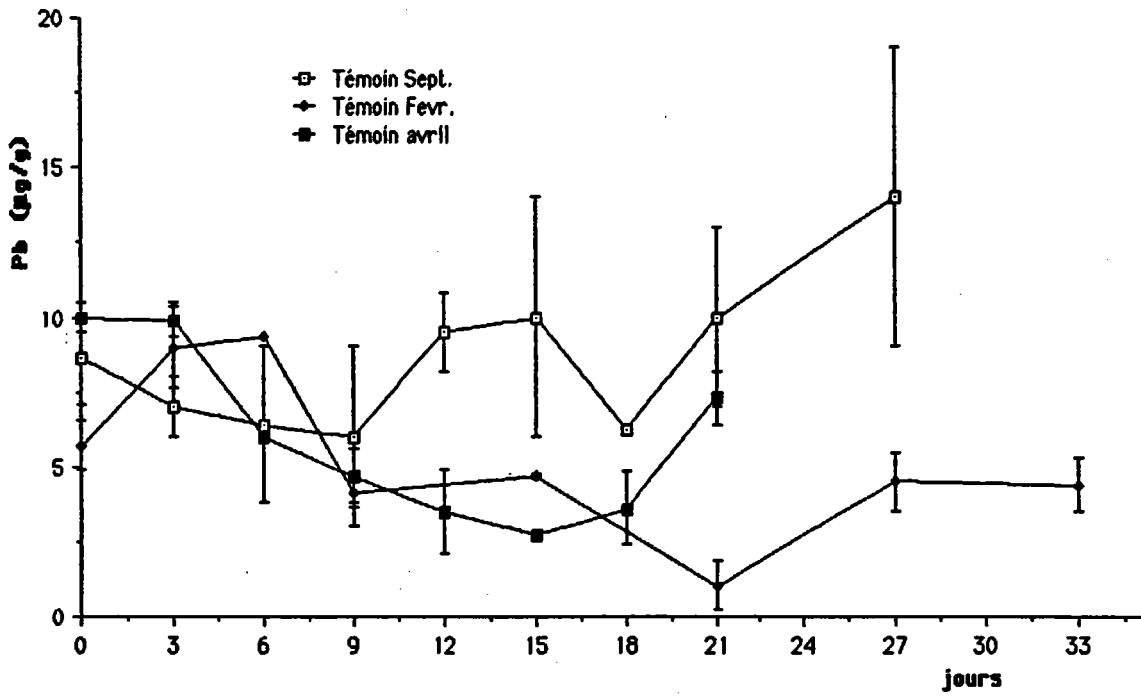


Fig. 45a:

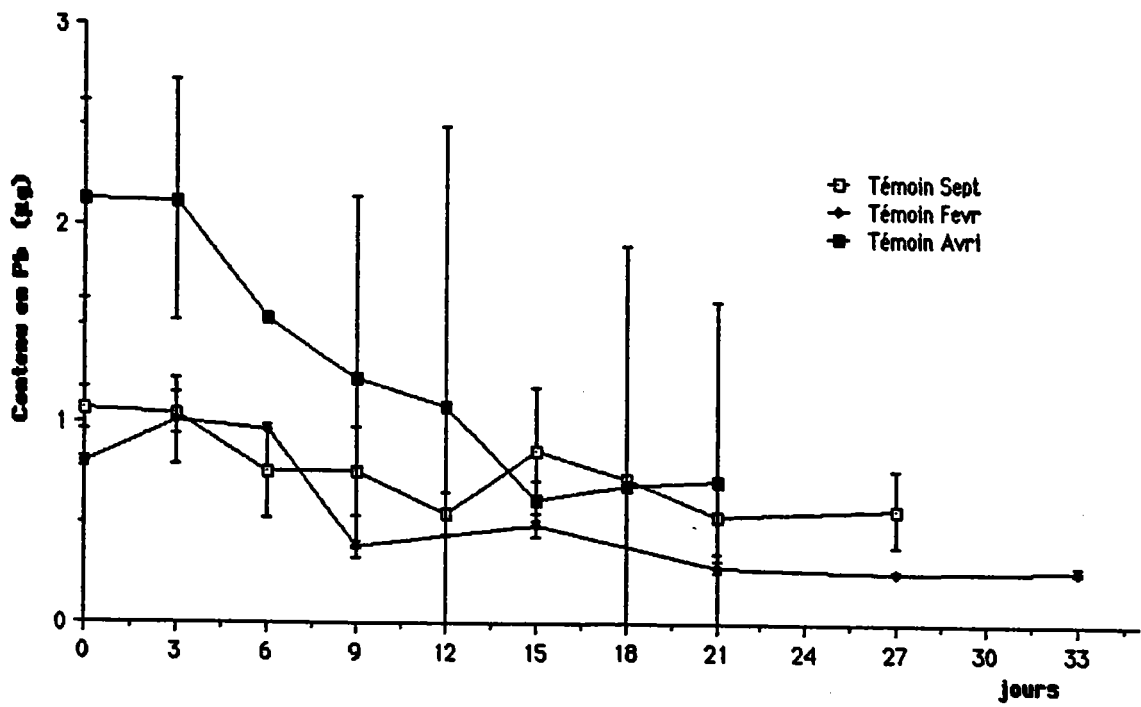


Fig. 45b:

Figures 45a-b: Evolution des concentrations (a) et des contenus (b) en Pb dans les dreissenes témoins de Septembre, de Février et d'Avril.

Tableau 30: Poids secs des dreissenes témoins aux 3 saisons  
(moyennes de 20 dreissenes mélangées par lots de 5)

	Automne (septembre)	Hiver (février)	Printemps (avril)
Poids initial (en mg)	96.5 ± 11.4	143 ± 16	212 ± 23
Poids final ,,	77 ± 13	105 ± 17	165 ± 33
Durée expérience	27 jours	33 jours	21 jours

Tableau 31: Contenus en Pb et poids secs moyens des dreissenes  
exposées à 1ppm de Pb pour les 3 saisons.  
Comparaison entre rapports des poids secs et rapports  
des contenus. (échantillons de 5 individus mélangés)

	Poids secs moyens (en mg)	Contenus en Pb (en µg)
Avril	183 ± 39	99.9 ± 31.7
Septembre	86 ± 13	43.6 ± 17.5
Février	120 ± 13	51.8 ± 8.2
Rapport Avril/Septembre	2.13	2.29
,, Avril/Février	1.53	1.93
,, Février/septembre	1.39	1.20

février. Les différences cependant entre les concentrations initiales d'avril et de septembre (respectivement  $8.9 \pm 1.5 \mu\text{g/g}$  et  $10.0 \pm 0.5 \mu\text{g/g}$ ) ne présentent pas de différences très significatives mais sont nettement élevées par rapport à février ( $5.7 \pm 0.8 \mu\text{g/g}$ ). En outre les concentrations chez les témoins de septembre montrent une tendance à l'augmentation et présentent à la fin de l'expérience des valeurs supérieures à la concentration initiale.

L'expression des résultats en teneurs (ou contenus en  $\mu\text{g Pb}$ ) (fig.45b) ne modifie pas l'ordre d'importance relative des charges métalliques initiales mais les différences entre avril et septembre deviennent plus importantes. Les teneurs initiales en avril sont 2 fois plus élevées qu'en septembre. Il est à souligner aussi que l'évolution des teneurs est différente de celle des concentrations en particulier après le 9<sup>e</sup> jour. Alors que le suivi des concentrations laissait croire à une augmentation principalement pour le témoin de septembre, l'évolution des contenus en Pb montre au contraire une baisse plus importante en avril et février qu'en septembre. L'augmentation de concentrations enregistrée à la fin de l'expérience de septembre s'explique par cette très faible diminution des contenus alors que la perte de poids est importante. Il apparaît alors qu'il y a un risque de surestimation des charges métalliques des échantillons lorsque seul le critère de concentration est utilisé.

Les variations saisonnières des charges métalliques chez les bivalves ont fait l'objet d'études "in situ" par de nombreux auteurs (Simpson, 1979; Cossa et al., 1980; Boalch et al., 1981; Popham et D'Auria, 1982; 1983; Amlard et al., 1986). Tous ces travaux montrent que ce sont les fluctuations des poids secs des animaux qui expliquent en grande partie ces variations saisonnières des niveaux métalliques.

Nous allons nous intéresser à présent aux différences de bioaccumulation chez les dreissènes exposées à 1ppm de Pb (concentration nominale) en septembre, février et avril. Nous examinerons l'incidence des différences saisonnières de poids secs sur la bioaccumulation.

La figure 46a présente les cinétiques de bioaccumulation exprimées en concentrations. La comparaison de ces cinétiques permet de faire quelques constatations qualitatives et quantitatives sur la variation saisonnière de la bioaccumulation.

En février, la bioaccumulation est très lente et linéaire dans sa phase initiale. En fin d'expérience nous observons une diminution de la vitesse d'accumulation et une tendance à la stabilisation des concentrations indiquant ainsi un début de plateau. La

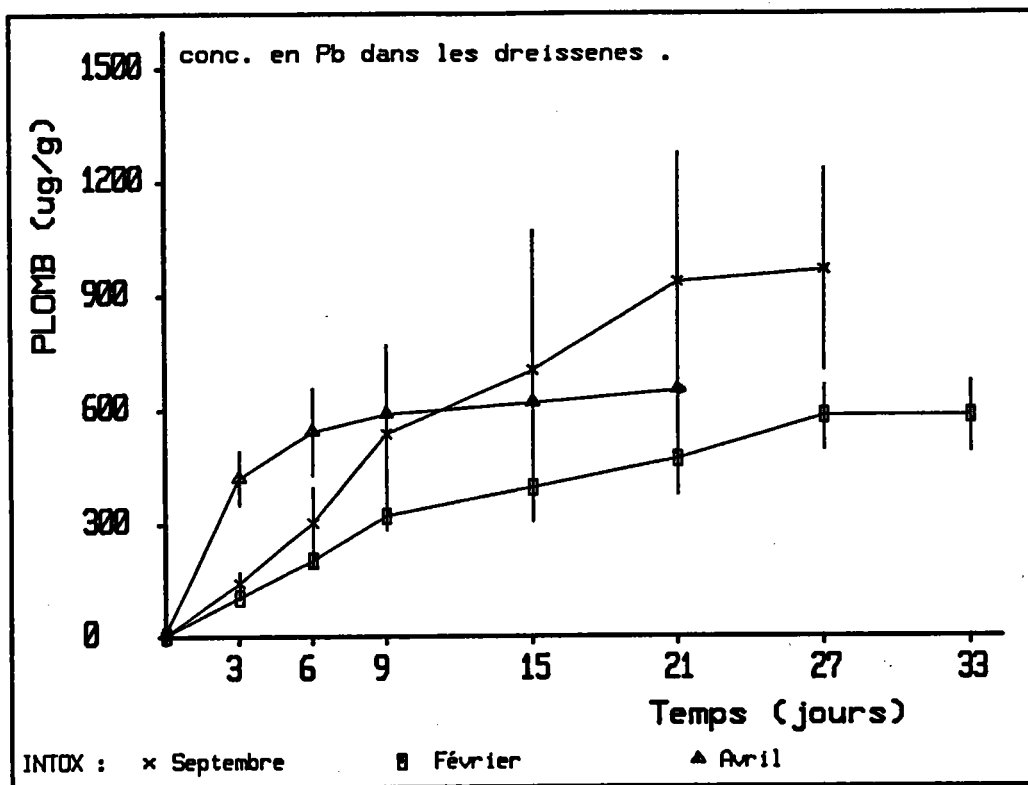


Fig. 46a:

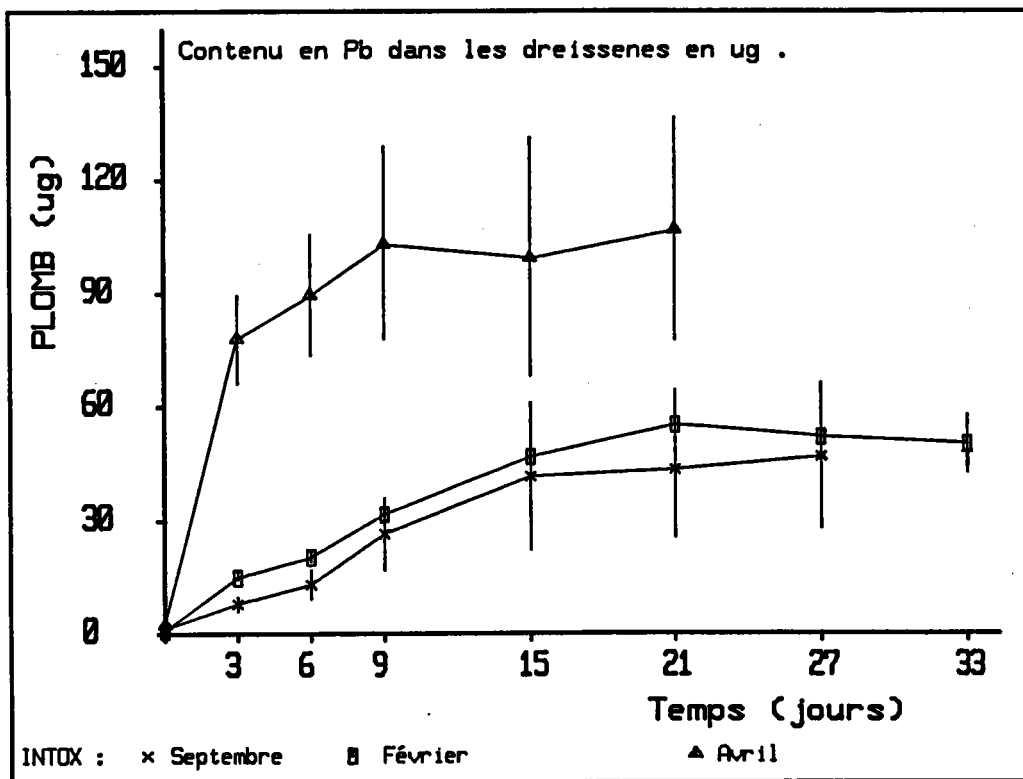


Fig. 46b:

Figures 46a-b: Evolution des concentrations (a) et des contenus (b) en Pb dans les dreissenes des 3 saisons exposées à 1ppm Pb.



concentration maximale atteinte est de 583  $\mu\text{g/g}$ .

La cinétique en septembre est comparable à celle de février, avec cependant des concentrations plus élevées qui atteignent en fin d'expérience 970  $\mu\text{g/g}$  soit 1.66 fois supérieures à celles de février.

Par contre la bioaccumulation en avril présente une cinétique différente des précédentes. En effet nous observons dans la phase initiale une augmentation rapide des concentrations indiquant une vitesse d'accumulation élevée qui dépasse largement celles de septembre et février. En outre, cette cinétique présente une nette allure saturante à partir du 9<sup>e</sup> jour. Les concentrations maximales atteintes sont de 648  $\mu\text{g/g}$  et se situent alors dans une valeur intermédiaire entre les concentrations élevées de septembre et celles plus faibles de février.

La comparaison de ces cinétiques (fig.46a) montre que ce sont les dreissènes de septembre qui présentent la capacité d'accumulation la plus élevée. La prise du métal se produit lentement mais atteint des niveaux supérieurs à ceux de février et d'avril.

Le paramètre utilisé ici pour quantifier la bioaccumulation est la concentration. Or nous avons signalé auparavant les limites d'utilisation de ce paramètre seul, notamment dans le cas d'organismes présentant des poids secs différents. Il a donc été nécessaire d'introduire le second paramètre de bioaccumulation qui est le contenu en Pb par échantillon (teneur) afin de procéder à une analyse globale des différences entre les 3 lots d'animaux.

La figure 46b montre l'évolution des contenus chez les 3 lots de dreissènes. Nous observons que par rapport aux cinétiques précédentes (fig.46a) nous enregistrons des modifications qualitatives et quantitatives importantes. Concernant la capacité d'accumulation exprimée cette fois en contenus, les résultats s'inversent par rapport aux données en concentrations puisque ce sont les dreissènes d'avril qui affichent les valeurs les plus élevées (99.9  $\mu\text{g Pb}$ ), suivies des dreissènes de février (51.8  $\mu\text{g}$ ) et de septembre (43.6  $\mu\text{g}$ ). Quant à l'allure des cinétiques, la tendance à la saturation est plus nette pour les 3 courbes. Il est à noter aussi que le début du plateau survient dès le 9<sup>e</sup> jour en avril alors qu'en février et septembre il se produit plus tardivement vers le 15<sup>e</sup> jour d'exposition. Les contenus des dreissènes de février et septembre évoluent de manière similaire et les différences enregistrées ne sont significatives que dans la première semaine d'exposition.

L'explication de cette contradiction apparente entre les résultats en concentrations et en contenus réside dans le type de relation liant le poids sec des organismes à leur teneur ou à leur concentration métallique.

Plusieurs auteurs se sont intéressés à l'étude des relations entre le contenu métallique ou la concentration et le poids sec chez quelques bivalves. Parmi les publications consultées, nous citerons les travaux de Boyden (1974; 1978); Cossa et al. (1980); Popham et D'Auria (1983); Amlard et al. (1986).

Ces auteurs ont établi pour quelques métaux dont le Pb des relations log-log entre contenu métallique et poids sec. En général la corrélation est positive, ce qui signifie que le contenu métallique s'accroît avec le poids sec des parties molles.

La relation utilisée est analogue à celle liant des fonctions métaboliques au poids de l'organisme (Boyden, 1974). Il s'agit d'une fonction puissance de la forme:

$$Y = a X^b$$

Y: contenu métallique.

X: poids sec.

La transformation logarithmique donne la régression linéaire suivante:

$$\log Y = b \log X + \log a$$

La relation entre concentration et poids découle de la précédente:

$$Y' = \frac{Y}{X} = \frac{a X^b}{X} = a X^{(b-1)}$$

$$\log Y' = (b-1) \log X + \log a$$

Il ressort de ces équations que c'est la valeur de b qui détermine le type de relation entre concentration et poids:

Quand  $b = 1$  la concentration est indépendante du poids

Quand  $b > 1$  .. .. augmente avec le poids

Quand  $b < 1$  .. .. diminue lorsque le poids augmente

Dans le cas du Pb, chez de nombreux bivalves marins la pente b est inférieure à 1. Cela signifie que la concentration est liée négativement au poids sec (Boyden, 1974; 1977; Simpson, 1979; Amlard et al., 1986). Dans le cas de la dreissène, la relation liant le poids sec à la charge métallique n'est encore pas établie, mais les données que nous avons exposées permettent de penser que la relation généralement obtenue chez les

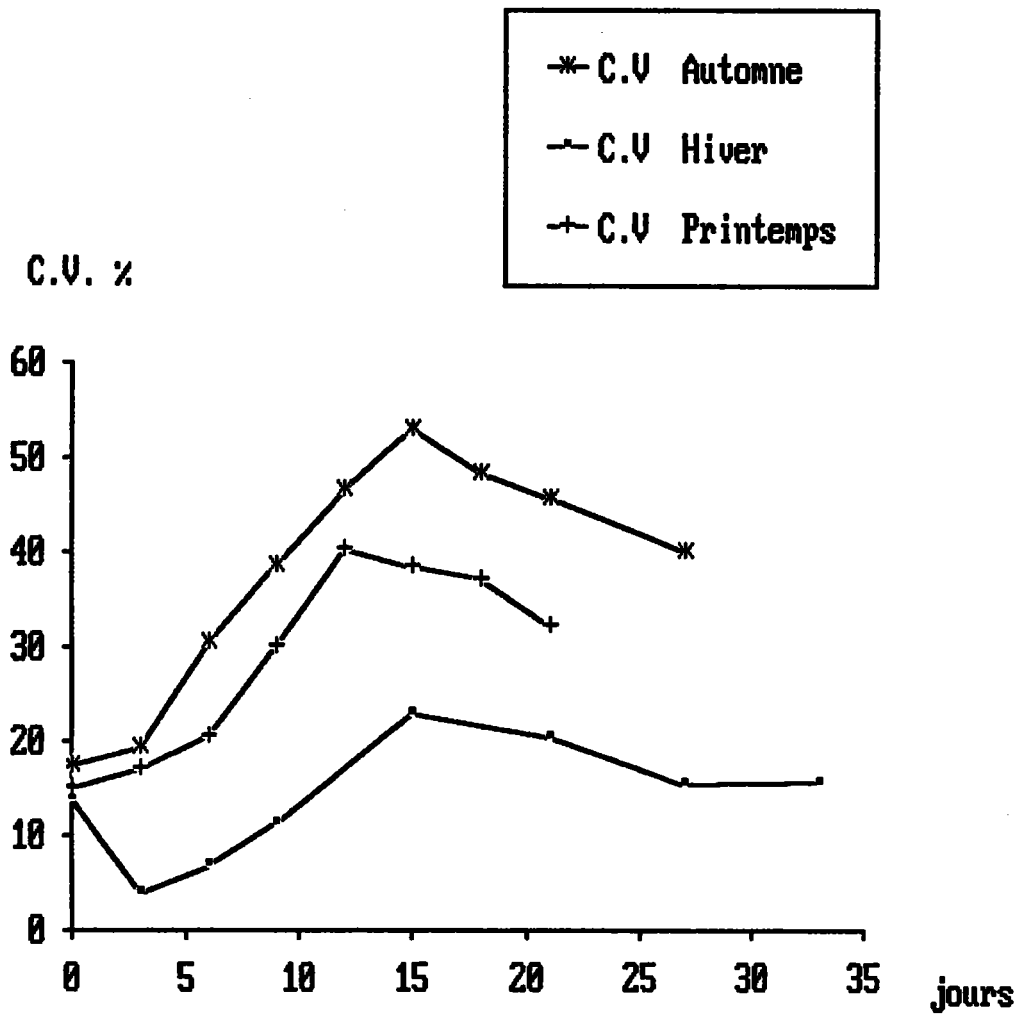


Figure 47: Evolution des Coefficients de Variation (C.V.) en fonction du temps d'exposition pour les dreissenés des 3 saisons.

bivalves marins se vérifie aussi. Les échantillons de septembre affichent des concentrations élevées alors que les contenus sont les plus faibles. Ceci est dû en fait aux faibles poids secs des organismes de cette saison, ce qui conduit par conséquent à une surestimation des concentrations. En effet, une baisse de poids ne s'accompagne pas systématiquement d'une baisse correspondante du contenu métallique.

Il a déjà été signalé (Simpson, 1979; Hemelraad et al., 1986; Holwerda et al., 1988) que le paramètre "concentration" peut conduire à des erreurs dans le cas de variabilité du terme poids, ce qui se produit quand les expériences sont menées à des saisons différentes ou sur une très longue période sans apport suffisant de nourriture. Le critère qui semble donc plus fiable pour la comparaison intersaisonnière des données d'accumulation est le contenu métallique des organismes.

La classification de l'accumulation exprimée en contenus donne l'ordre suivant:

Contenu avril >> C. février > C. septembre

Pour l'ordre d'importance des poids secs moyens calculés sur toute la durée de l'expérience pour les 3 lots, nous avons:

Poids sec avril >> p.s. février > p.s. septembre

Les rapports entre maximum et minimum saisonnier des poids secs des parties molles sont du même ordre de grandeur que les rapports entre maximum et minimum des contenus en Pb (tableau 31). Par conséquent les fluctuations pondérales apparaissent comme la cause principale de la variation saisonnière des teneurs métalliques. Ainsi, les différences de capacité d'accumulation observées semblent liées à l'importance du poids sec des organismes et donc à la disponibilité des sites de fixation du métal (turn-over des ligands intervenant dans la séquestration du métal). Concomitants à la prise de poids, les changements métaboliques associés à la maturation sexuelle et à la saison modifient l'importance relative des compartiments de circulation et de stockage et peuvent être responsables des variations de la bioaccumulation (Cossa et al., 1980).

En ce qui concerne les différences saisonnières de variabilité des résultats d'accumulation, exprimées en coefficient de variation (CV) (fig.47), nous observons pour les 3 saisons une augmentation du degré de variabilité avec le temps d'exposition et par conséquent avec les charges métalliques. Les CV calculés en septembre sont les plus élevés comparés à ceux de février et d'avril, alors que les charges métalliques accumulées pendant ce mois sont les plus faibles. Il apparaît par conséquent que les dreissènes de septembre accumulent le plomb avec une grande variabilité.

L'observation histologique des dreissènes de septembre montre que certains individus ont complètement émis leurs produits génitaux alors que d'autres, moins avancés, sont en fin de ponte et présentent encore des gamètes dans leurs gonades. L'hétérogénéité biologique, due à l'absence de synchronisme physiologique des individus de septembre et surtout leur poids sec faible seraient vraisemblablement à l'origine de la grande variabilité constatée.

### **III-6- BIOACCUMULATION DANS LES ORGANES ET LOCALISATION TISSULAIRE DU PLOMB.**

La distribution du Pb dans les organes de la dreissène constitue une donnée intéressante permettant de comprendre la dynamique interne du métal, de déterminer les tissus de stockage et de dresser un éventuel organotropisme du métal. Deux approches complémentaires ont été utilisées: la première analytique et quantitative consiste à doser le métal dans certains organes, la seconde est histochimique et microanalytique et vise la localisation tissulaire du métal.

#### **III-6-1- BIOACCUMULATION DU PLOMB DANS LES ORGANES.**

Dans cette expérience réalisée en novembre, nous avons utilisé des dreissènes de taille plus grande (25-30 mm). Les animaux ont été exposés à 1 ppm de Pb pendant 15 jours. La quantification de la bioaccumulation a été suivie d'une part dans les organes directement en contact avec le milieu: coquille, byssus, manteau et branchies, et d'autre part dans la partie "reste" qui regroupe le complexe gonado-digestif, réno-péricardique et les muscles. La limite imposée par la taille des animaux n'a pas permis une séparation plus complète. Chaque groupe d'organes provient de la dissection de 10 dreissènes.

Le tableau 32 donne les concentrations en Pb atteintes en fin d'expérience ainsi que les indices de contamination pour les différents organes. La bioaccumulation se produit dans tous les organes analysés mais à des niveaux différents. L'indice de contamination (I.C.) qui est le rapport entre la concentration chez les animaux exposés / concentration chez les témoins, permet d'apprécier le taux de contamination de chaque organe; ce qui donne la séquence suivante: Byssus >> Branchies > Manteau > Coquille > Reste.

Concernant les tissus mous, ce sont les organes en contact avec le milieu

Tableau 32: Concentrations en  $\mu\text{gPb/g}$  dans les organes de dreissenes exposées pendant 15 jours à 1ppm Pb.  
I.C.: indice de contamination

Organes	Témoins	9 j. d'exposition	15 j. d'exposition	I.C.
Manteau	5.86	184	280	47.8
Branchies	3.26	206	234	71.8
Reste	4.51	150	190	42.1
Byssus	65	6200	7050	108.4
Coquille	3.85	166	180	46.7

Tableau 33: Accumulation du Pb dans les coquilles en  $\mu\text{g/g}$ . Contamination par 1 ppm de Pb.

\* : concentrations dans le périostracum calculées sur la base de 2% du poids sec de la coquille.

Temps (jours)	Coq témoins	Coq vivantes	Coq isolées	Coq sans périostracum	Périostracum*
0	3.85 ± 0.70	3.85 ± 0.70	3.85 ± 0.70	1.35 ± 0.45	125
3	2.66 ± 0.03	84.3 ± 3.1	80.9 ± 6.1	28.5 ± 2.4	2620
6	1.98 ± 0.10	130 ± 10	141.5 ± 14	42.3 ± 4.2	4960
9	1.88 ± 0.20	166 ± 13	150 ± 10	45.6 ± 3.5	5250
12	1.79 ± 0.13	170 ± 7	168 ± 5	55.5 ± 5.7	5880
15	1.96 ± 0.20	180 ± 20	190 ± 14	60 ± 5	6500

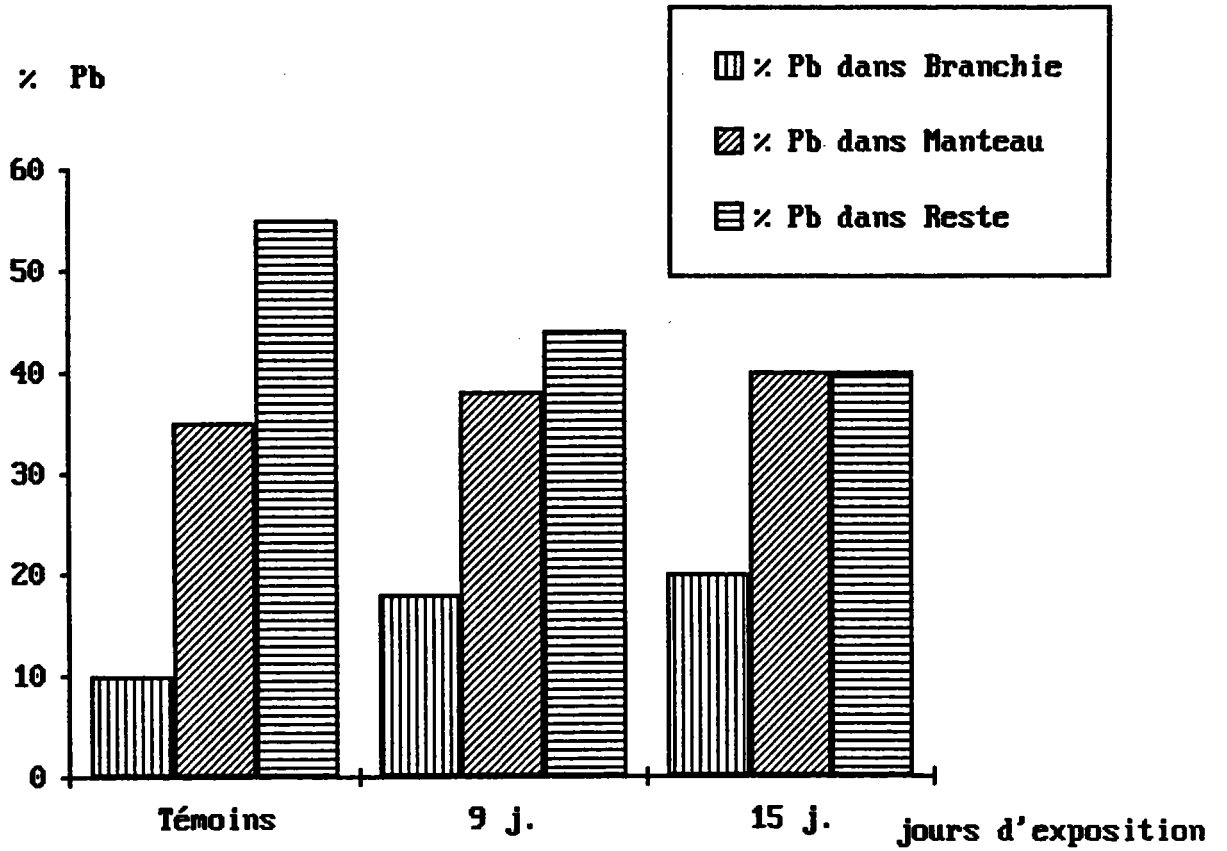


Figure 48: Distribution du Pb, en % par rapport au total, dans les 3 fractions de la partie molle chez les dreissenés témoins et contaminés.

(branchies et manteau) qui montrent des accumulations importantes par rapport à la partie "reste". En outre, c'est au niveau des branchies que la vitesse d'accumulation est la plus élevée. En effet, dès le 9<sup>e</sup> jour la concentration atteinte est de 206  $\mu\text{g/g}$  puis évolue peu jusqu'au 15<sup>e</sup> jour (234  $\mu\text{g/g}$ ). Ceci semble indiquer une tendance saturante de la bioaccumulation dans la branchie.

L'expression des résultats en teneur en Pb dans chaque organe rapportée à la teneur totale de la partie molle, permet d'apprécier la distribution du métal dans l'organisme et la participation de chaque organe à la charge métallique totale (fig.48).

Chez les témoins, 55% du contenu total en Pb se trouve dans la partie "reste", 35% dans le manteau et seulement 10% dans les branchies (fig.48). Ainsi dans les organismes non contaminés, c'est la partie reste regroupant le complexe gonado-digestif, rénopéricardique et les muscles qui montre les charges métalliques les plus élevées. Cette répartition évolue peu chez les témoins pendant la durée de l'expérience.

Chez les animaux exposés, la distribution du métal se trouve modifiée par rapport aux témoins. Les changements observés concernent surtout les branchies qui contiennent à la fin de l'expérience 20% du contenu total en Pb, ce qui représente une augmentation d'un facteur 2 par rapport aux témoins (fig.48). L'ensemble manteau et branchies contient 60% du Pb total à la fin de l'exposition alors qu'il ne représente que 40% du poids sec de l'animal. Ce changement dans la distribution relative du Pb entre les organes analysés se produit principalement dans les 9 premiers jours d'exposition et évolue très peu par la suite. Ceci laisse supposer que les processus de transport interne se trouveraient à partir du 9<sup>e</sup> jour en équilibre avec la vitesse de pénétration du métal.

Parallèlement à cette bioaccumulation du Pb dans les tissus mous, il y a aussi augmentation des concentrations dans la coquille et le byssus (tab.32). Ce dernier est de loin l'organe qui montre les plus fortes concentrations (7050  $\mu\text{g/g}$ ) ainsi qu'un indice de contamination extrêmement élevé (108.4).

Concernant la coquille, l'accumulation atteint  $180 \pm 20 \mu\text{g/g}$  ce qui représente une augmentation de 46.7 par rapport aux témoins. Dans le but de comprendre comment se produit cette accumulation (processus d'adsorption passif ou bien processus biochimique actif consistant en une déposition dans la coquille comme voie de détoxification et d'élimination du métal) et dans quelle couche de la coquille elle a lieu (périostracum ou couche cristalline calcaire), nous avons comparé l'accumulation du Pb dans des coquilles isolées, des coquilles vivantes et des coquilles isolées dépourvues de



péριοstracum (par grattage de la couche organique externe).

L'évolution des concentrations en Pb dans les coquilles isolées et vivantes (tab.33) ne montre pas de différences significatives. Les deux cinétiques de fixation du métal sont similaires et présentent une tendance saturante après le 9<sup>e</sup> jour d'exposition. Cette similitude des cinétiques d'accumulation dans les coquilles isolées et celles de dreissènes vivantes montre que la fixation du métal procéderait d'un processus d'adsorption passif sur la surface de la coquille.

La comparaison entre l'accumulation des coquilles isolées entières et celle de coquilles sans péριοstracum (tab.33) montre l'importance de cette membrane externe dans la fixation du métal. Le rôle principal de cette membrane organique mince sécrétée par le repli du bord palléal du manteau est d'une part d'agir comme support et substrat pour la nucléation initiale et la croissance des cristaux calcaires, et d'autre part de protéger la couche calcaire supérieure. Il arrive souvent que le péριοstracum soit érodé partiellement et on voit affleurer la couche de calcite qui se trouve ainsi exposée au milieu extérieur.

Les résultats du tableau 33 montrent qu'environ 70% du Pb dans les coquilles se trouvent adsorbés sur le péριοstracum. Ceci semble montrer que les sites de fixation dans le péριοstracum organique sont plus importants que dans les parties essentiellement minérales de la coquille. Bias et Karbe (1985) trouvent chez la dreissène que plus de 60% du Cd fixé par la coquille est associé au péριοstracum. De même Sturesson (1976) rapporte qu'environ 75% du Pb dans les coquilles de *Mytilus edulis* est adsorbé sur le péριοstracum. Ces travaux sont en accord avec nos résultats et démontrent l'importance de cette couche externe organique dans la fixation du métal par un phénomène d'adsorption passif.

La comparaison entre coquille et byssus (tab.32) montre que ce dernier accumule considérablement le plomb et à un niveau 39 fois supérieur à celui des coquilles. Des résultats similaires ont été trouvés chez la dreissène aussi bien pour le cadmium (Bias et Karbe, 1985; Herwig et al., 1989) que pour le zinc (Maarouf, 1988). L'explication de cette différence d'accumulation pourrait être liée à la nature du support d'adsorption, organique dans le cas des filaments du byssus et largement inorganique dans le cas de la coquille. Il s'agirait là en fait de différence dans le nombre de sites de fixation du

métal par unité de poids sec et qui serait nettement supérieur pour les filaments du byssus par rapport à la coquille.

La comparaison sera pertinente si elle est faite entre périostracum et byssus. Il s'est avéré très difficile d'évaluer le % du poids du périostracum par rapport au poids de la coquille par la méthode que nous avons utilisée et qui consiste à gratter la couche externe des coquilles. Ceci a entraîné une grande variabilité dans l'estimation du poids sec du périostracum. Bias et Karbe (1985) ayant utilisé des méthodes plus fines (dissolution graduelle de la coquille et vérification par des mesures micrométriques) sont arrivés à estimer à environ 2 % le poids sec du périostracum par rapport au poids total de la coquille de *Dreissena polymorpha*. Si cette valeur (2 %) trouvée par Bias et Karbe est utilisée comme base de calcul des concentrations en Pb dans le périostracum (en  $\mu\text{g/g}$  de poids sec de périostacum) (tab.33), les valeurs calculées deviennent très proches de celles trouvées dans le byssus à la fin de l'exposition (respectivement 6500  $\mu\text{g/g}$  et 7050  $\mu\text{g/g}$ ).

Il est possible, sur une longue période d'exposition, que le Pb soit activement incorporé dans la structure de la coquille durant sa croissance. Cette déposition peut être une voie d'élimination du métal des tissus mous. Ceci a été démontré chez *Mytilus edulis* par Bourgoin (1990). En effet cet auteur s'est intéressé à l'accumulation du Pb dans la couche intérieure de nacre qui se trouve donc séparée du milieu extérieur par le liquide extrapalléal et le manteau. Ses résultats montrent une corrélation positive entre les concentrations en Pb dans la partie molle et celles dans la couche de nacre. L'auteur propose l'utilisation de cette fraction de la coquille comme un nouvel outil bioindicateur de la pollution par le Pb. De même l'élimination du Pb dans les filaments du byssus n'est pas exclue mais selon George (1980) elle représenterait une part négligeable dans le contenu métallique du byssus.

Les résultats que nous venons d'exposer ne nous permettent pas de vérifier si effectivement le byssus représente une voie d'élimination du Pb, nous verrons ci-après à la lumière des résultats histochimiques si ceci peut être confirmé.

### III-6-2- LOCALISATION TISSULAIRE DU PLOMB

La dreissène limite, du fait de ses dimensions, la dissection de la partie molle et l'isolement des différents organes en vue de l'analyse quantitative du métal. Mais cet

Inconvénient devient un avantage pour l'étude histologique puisque la partie molle entière peut être examinée.

La mise en évidence du Pb a été réalisée par la méthode au chromate de potassium qui consiste en une conversion des sels de Pb en grains jaunes de chromate de Pb (Ganter et Jolles, 1970).

La localisation du métal dans l'organisme a pu être faite à différents niveaux.

Les granulocytes (cellules circulantes) présentent dans leurs cytoplasmes des granules de Pb de couleur jaune. Ces granulocytes sont très abondants dans les branchies (fig.49). On les trouve aussi dans la glande péricardiale (fig.50a), dans le tissu conjonctivo-musculaire du manteau (fig.50b); dans le tissu interstitiel au contact des épithéliums gonadique et digestif (fig.51); et dans la glande du byssus où on peut voir également des grains de Pb dans les filaments byssaux en formation (fig.52).

Certaines zones de l'épithélium digestif (fig.51) montrent une coloration jaune pâle signifiant une présence de Pb en faible quantité et révélant là plutôt une voie de transit du métal.

C'est l'organe excréteur qui affiche la plus forte concentration en chromate de Pb. On retrouve ces grains de Pb dans la partie apicale des cellules épithéliales des tubules distaux internes de chaque rein (fig.53). On peut constater dans la lumière du tubule distal externe des amas de granules de Pb avant extrusion (fig.53).

C'est uniquement dans le rein que l'on peut retrouver trace du métal lorsque l'EDTA est introduit dans le milieu de contamination.

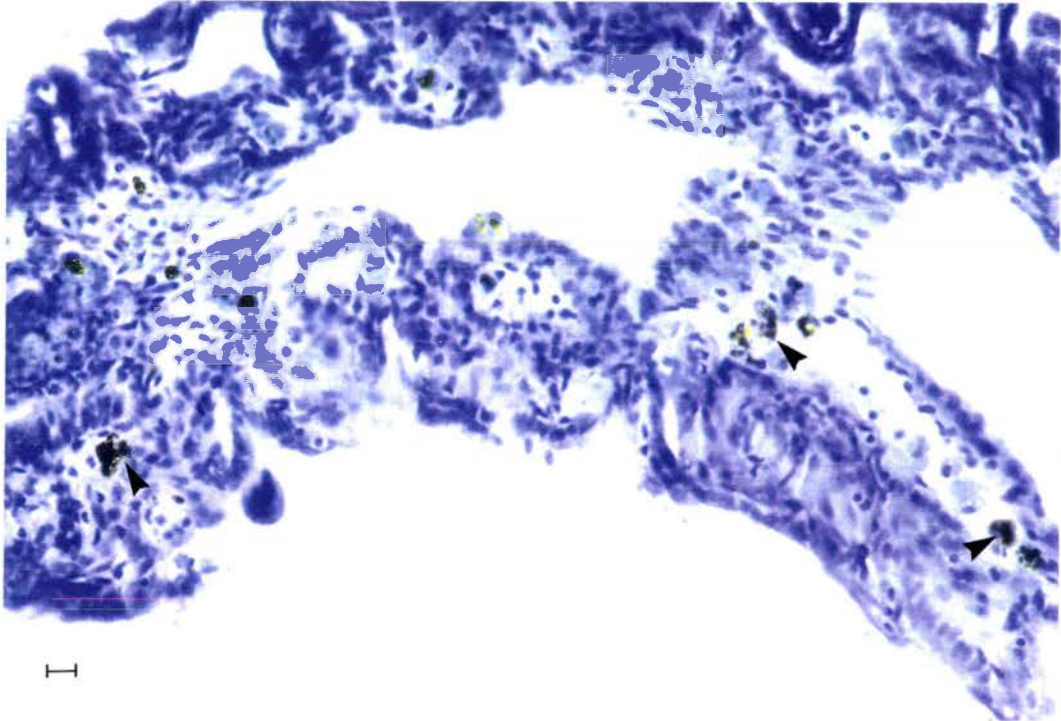
Les produits de réaction histochimique reposent sur la conversion du Pb en grains de chromate de Pb. On peut penser que seuls certaines formes d'accumulation du Pb réagissent dans ce sens. Autrement dit le Pb fortement lié à des ligands protéiques ou inorganiques peut échapper à la réaction et donc ne serait pas visualisé histochimiquement. En outre, il est possible que le traitement des échantillons par les différents bains de fixation et de déshydratation puisse mobiliser une partie du métal accumulé ce qui constituerait une perte métallique qui échappe à la détection. Dans le but donc de déterminer s'il y a ou non perte, nous avons dosé le Pb dans les liquides utilisés pour la fixation et la déshydratation ainsi que dans des échantillons de dreissènes traités et non traités. Les résultats résumés dans le tableau 34 montrent que les pertes en

Tableau 34: Quantités de Pb perdues lors du traitement histochimique, en % du contenu total en Pb.

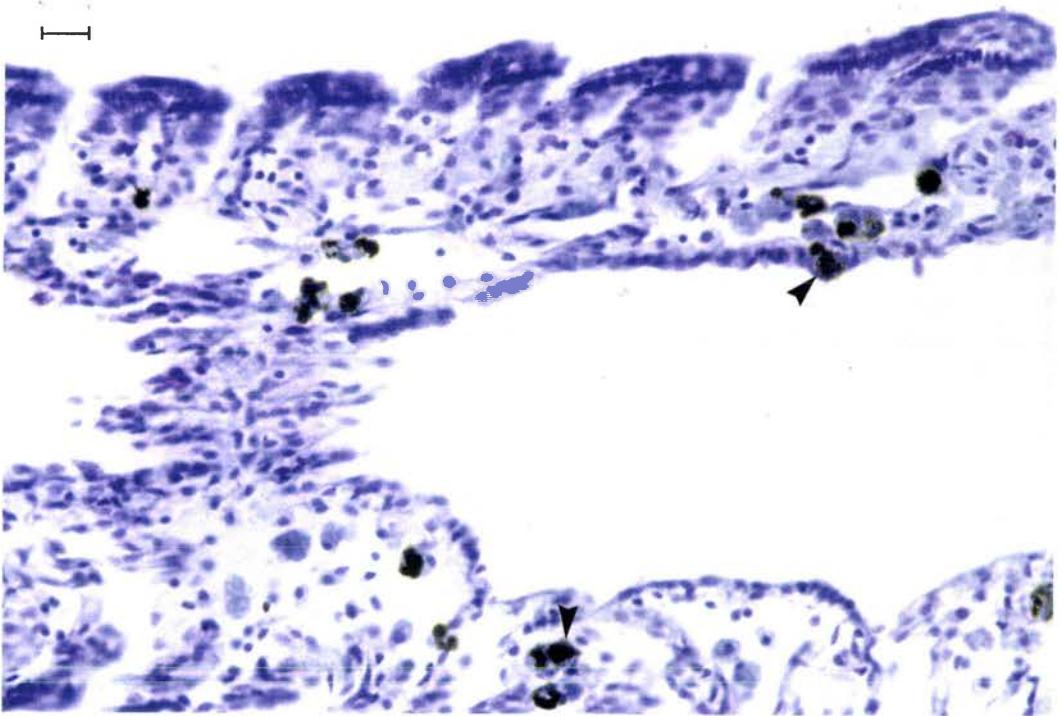
Traitements	Perte en Pb
Möller + Alcool + Toluène	0.5 %
Carnoy + Alcool + Toluène	7.5 %

Figures 49a-c: Localisation histochimique du Pb dans des granulocytes au sein de la branchie. Les flèches indiquent les granulocytes dont le cytoplasme montre des inclusions de chromates de Pb. c: Exemple montrant un granulocyte chargé de Pb s'infiltrant dans l'épithélium branchial.

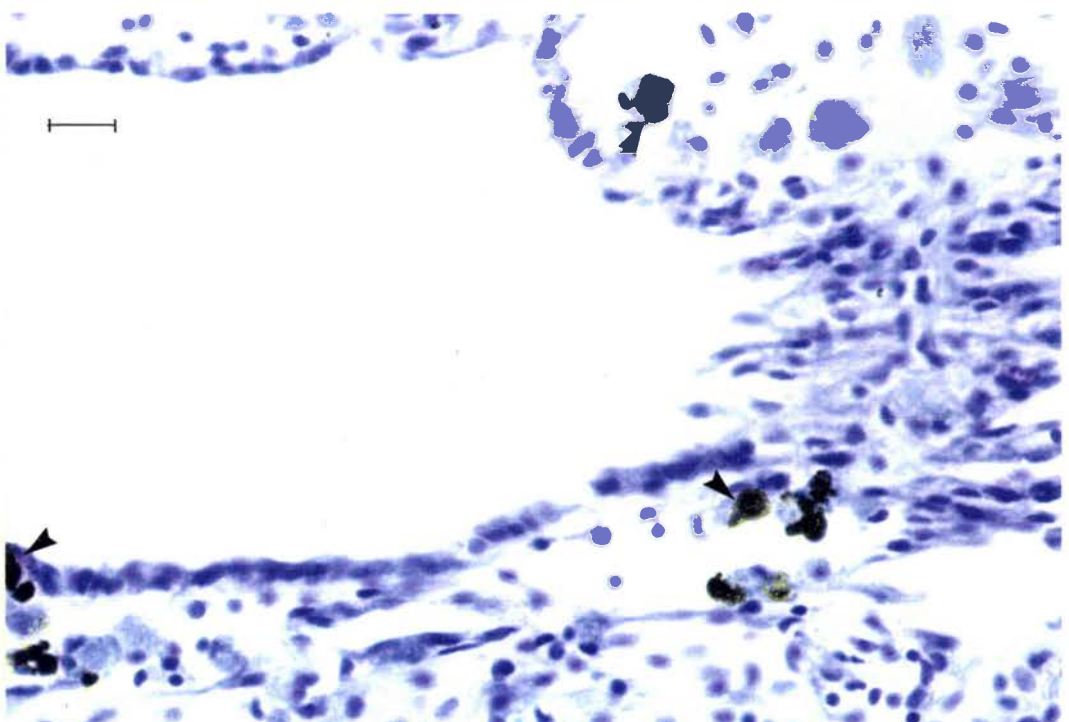
La barre d'échelle représente 10  $\mu$ m.



49a



49b



49c



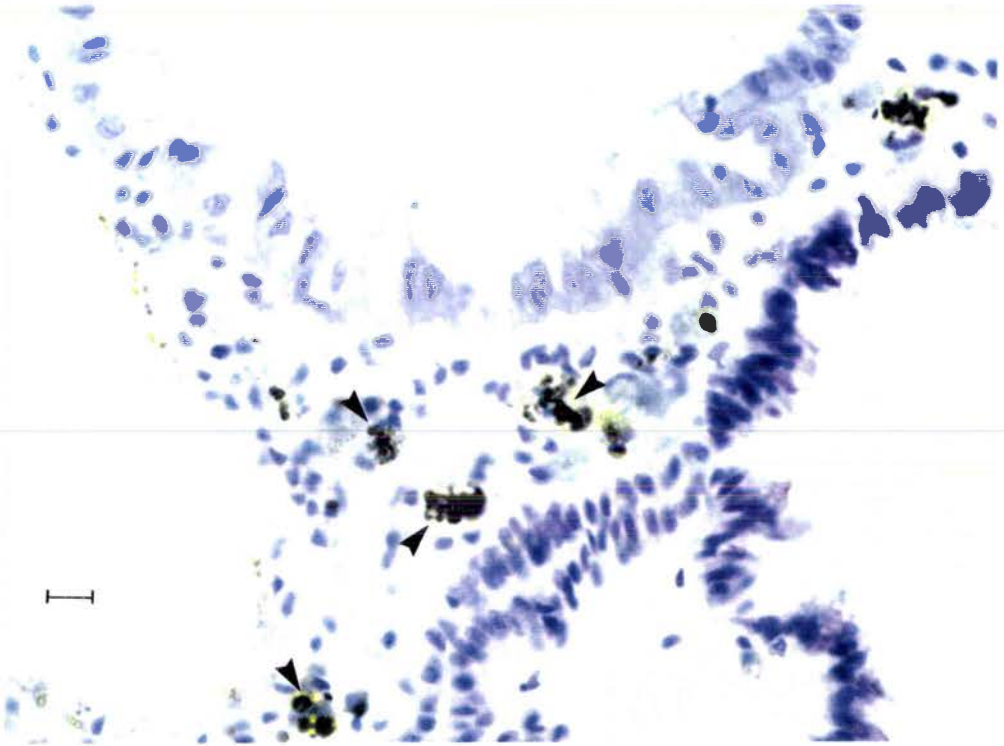


Figure 50a: Inclusions de Pb dans des granulocytes infiltrés au sein de la glande péricardiale.

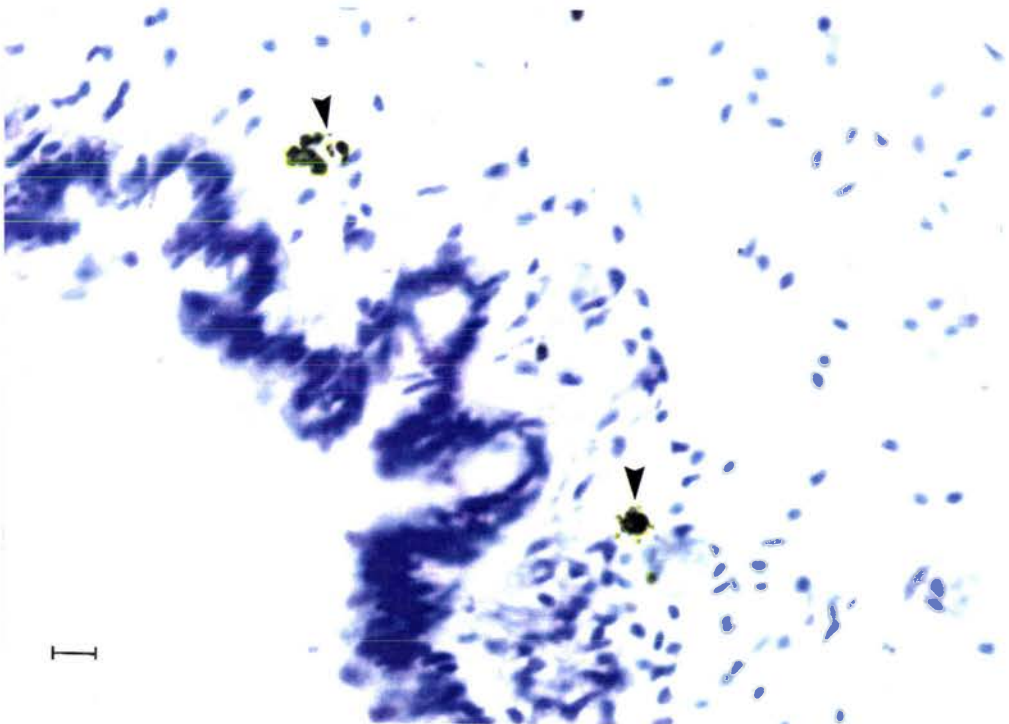


Figure 50b: Granulocytes chargés de Pb dans le tissu du manteau, près de l'épithélium palléal.

La barre d'échelle représente 10  $\mu\text{m}$ .



Figure 51a: Pb dans des granulocytes au sein du tissu interstitiel, au contact de l'épithélium digestif.

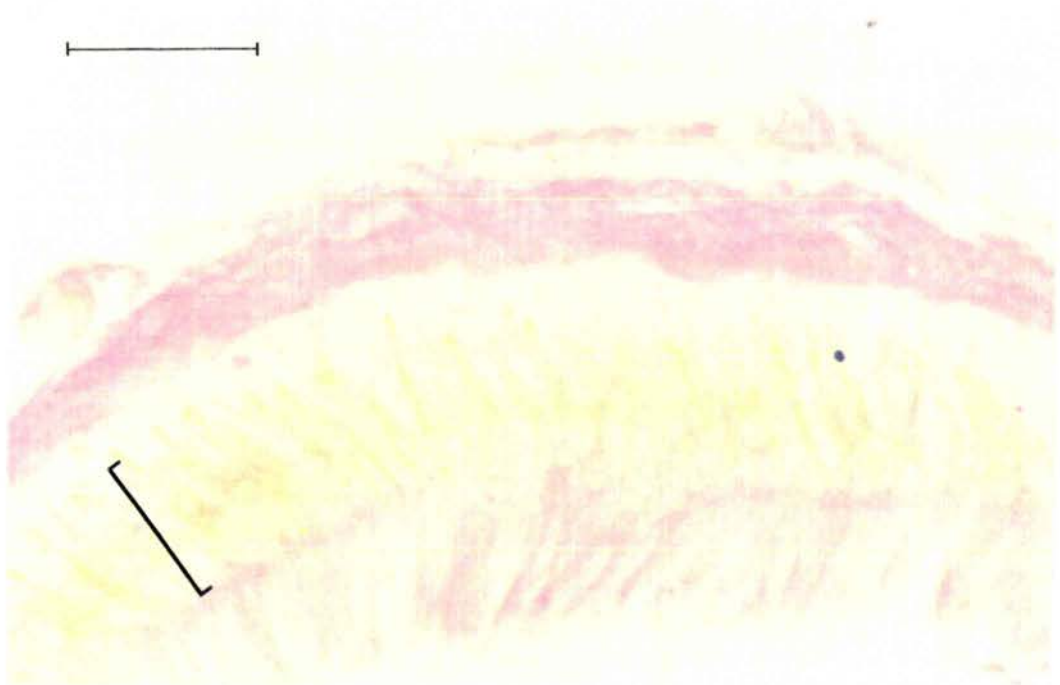
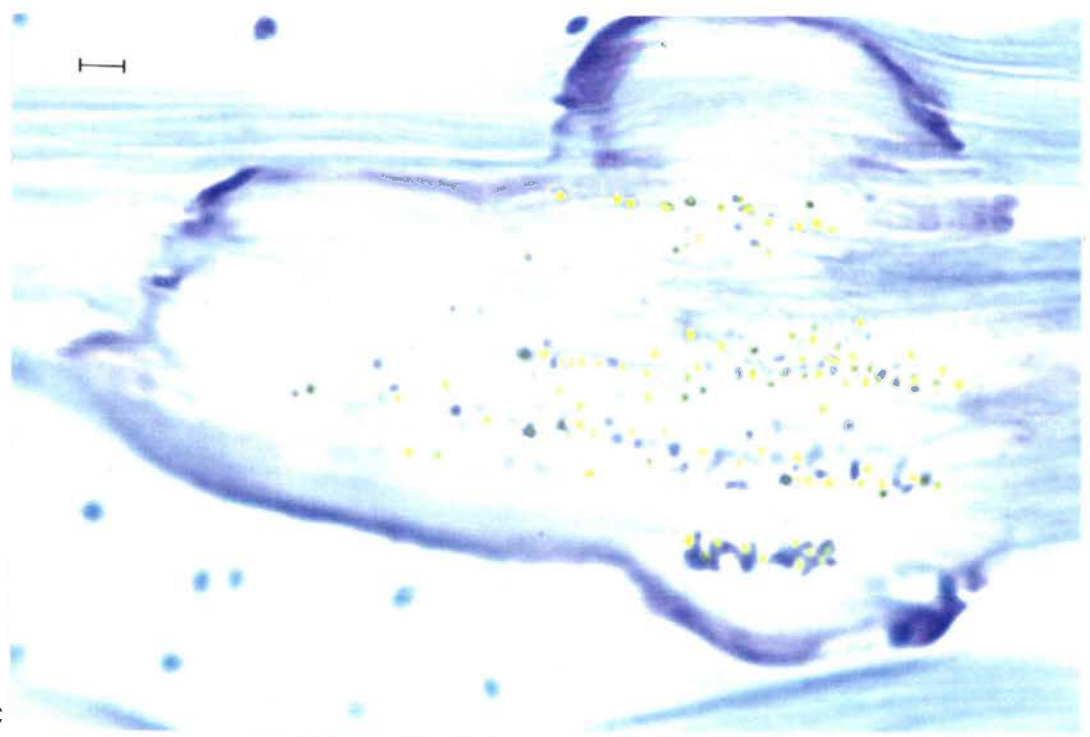
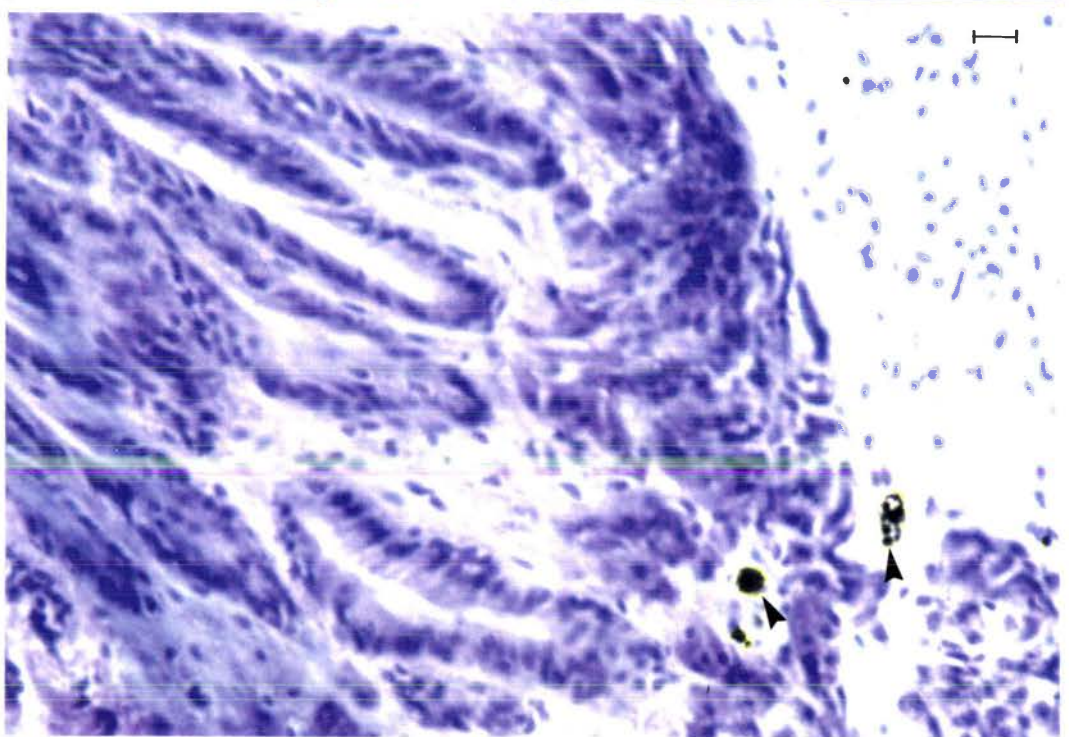
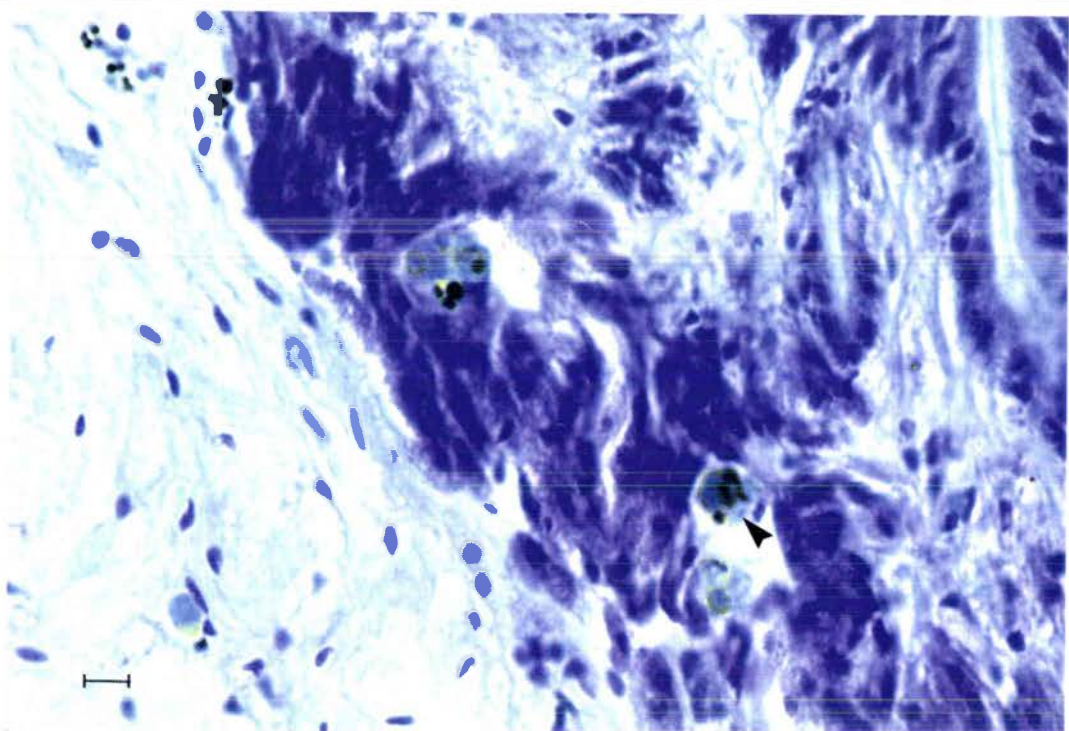


Figure 51b: Pb diffus dans l'épithélium digestif. L'accolade désigne la zone de cytoplasme colorée en jaune par du bichromate de Pb au sein de l'épithélium digestif.

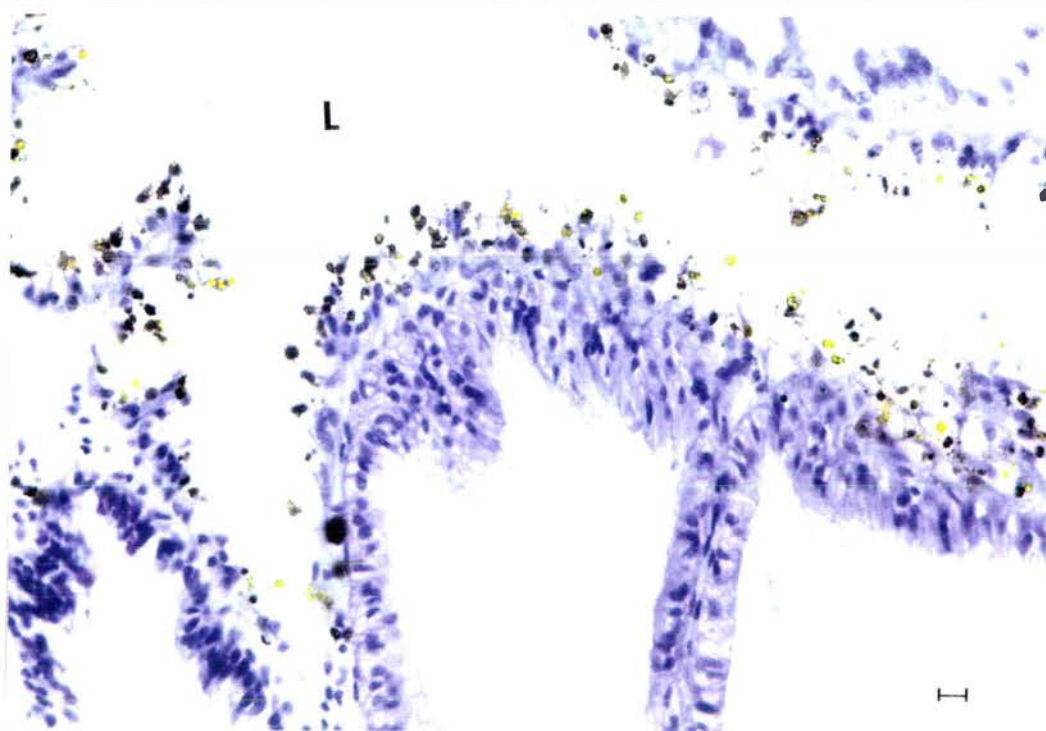
La barre représente 10  $\mu$ m.



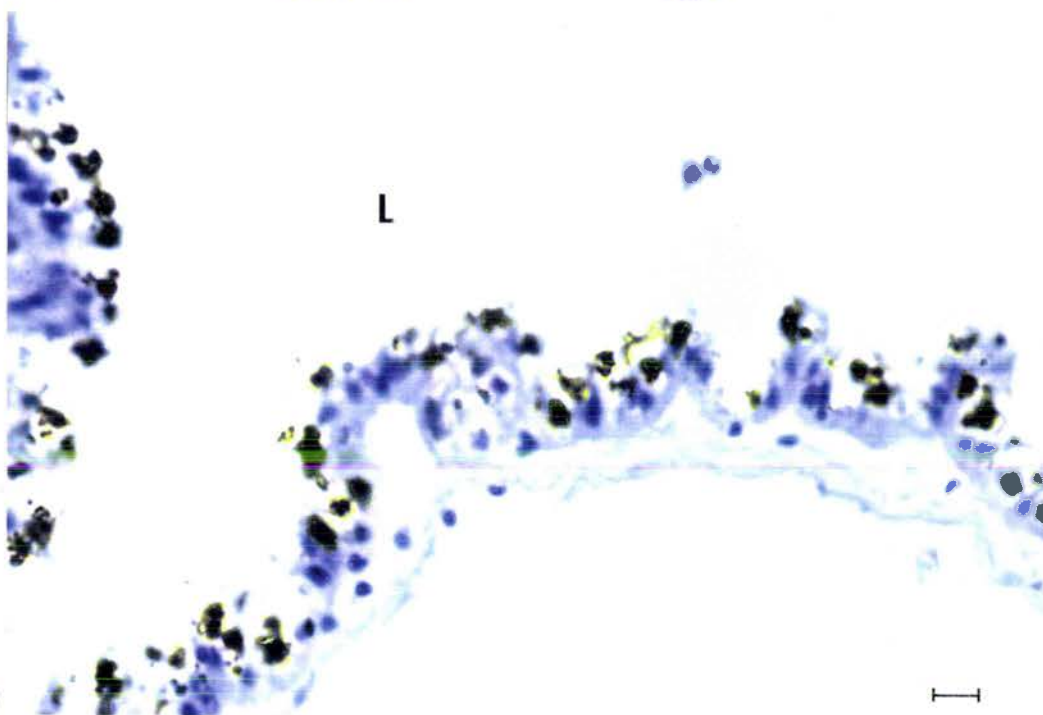




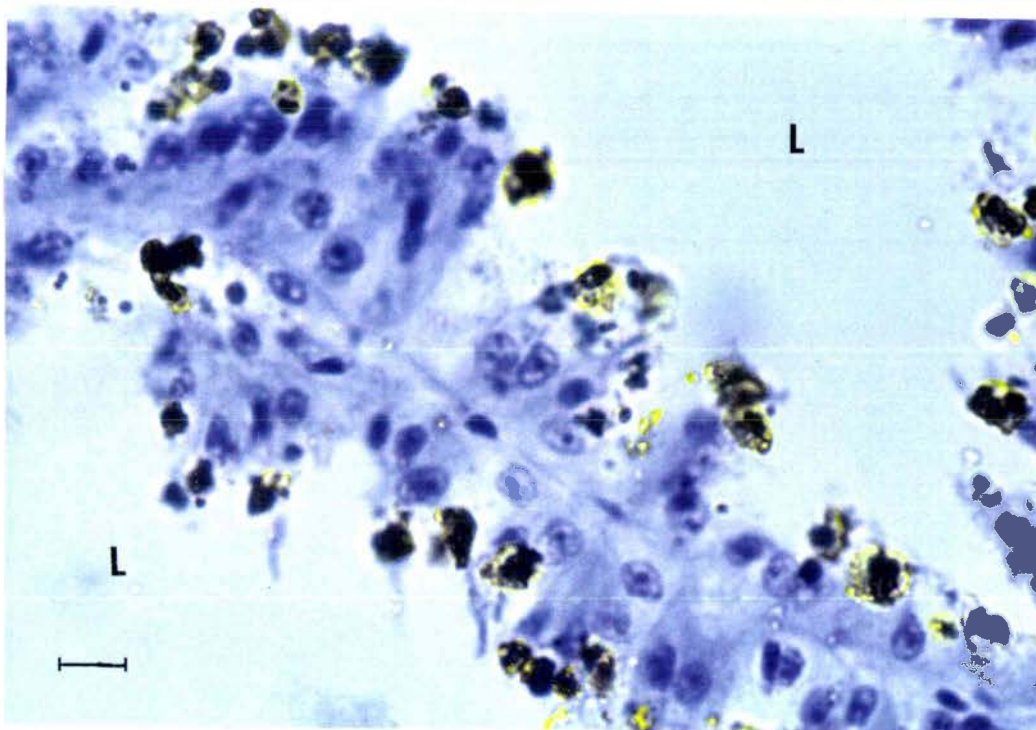
53a

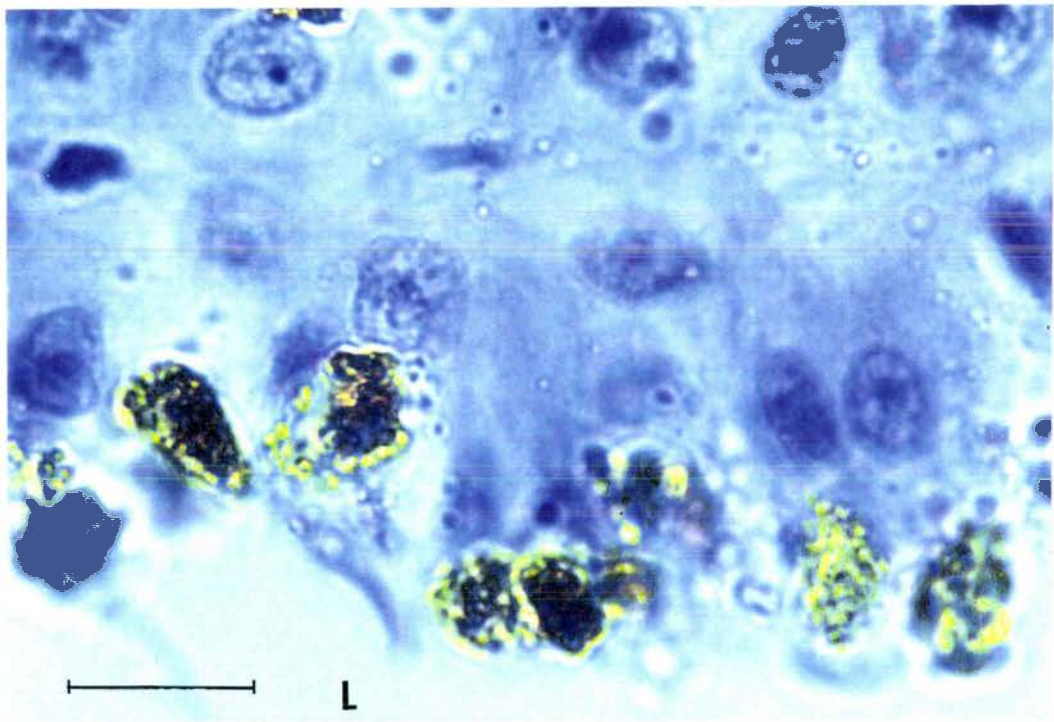


b

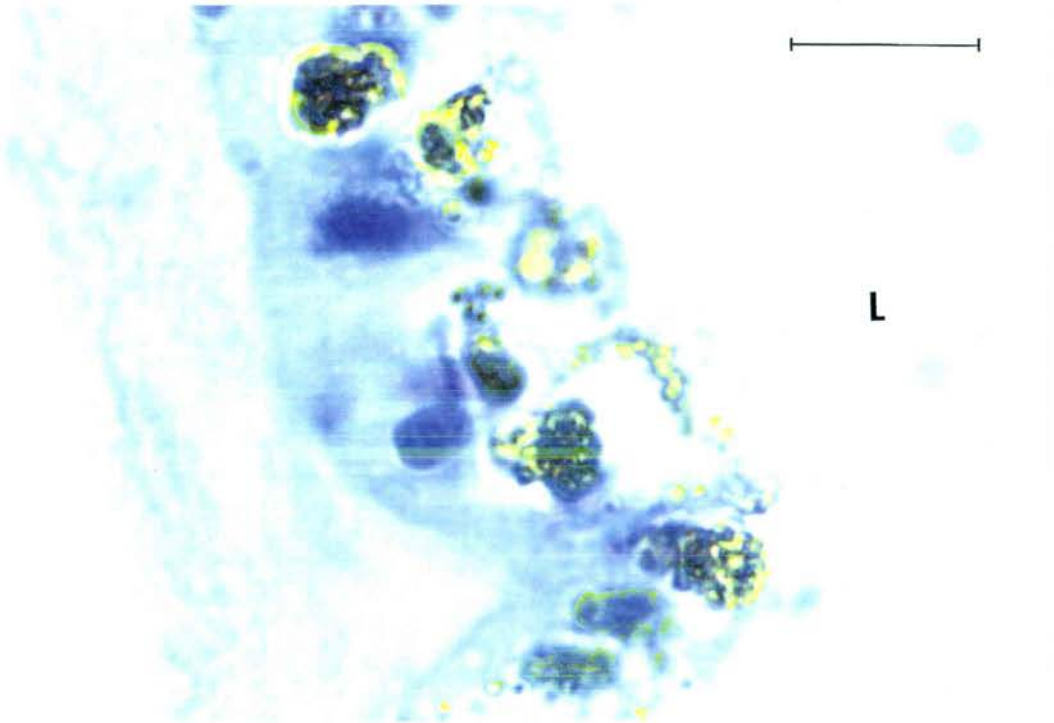


c

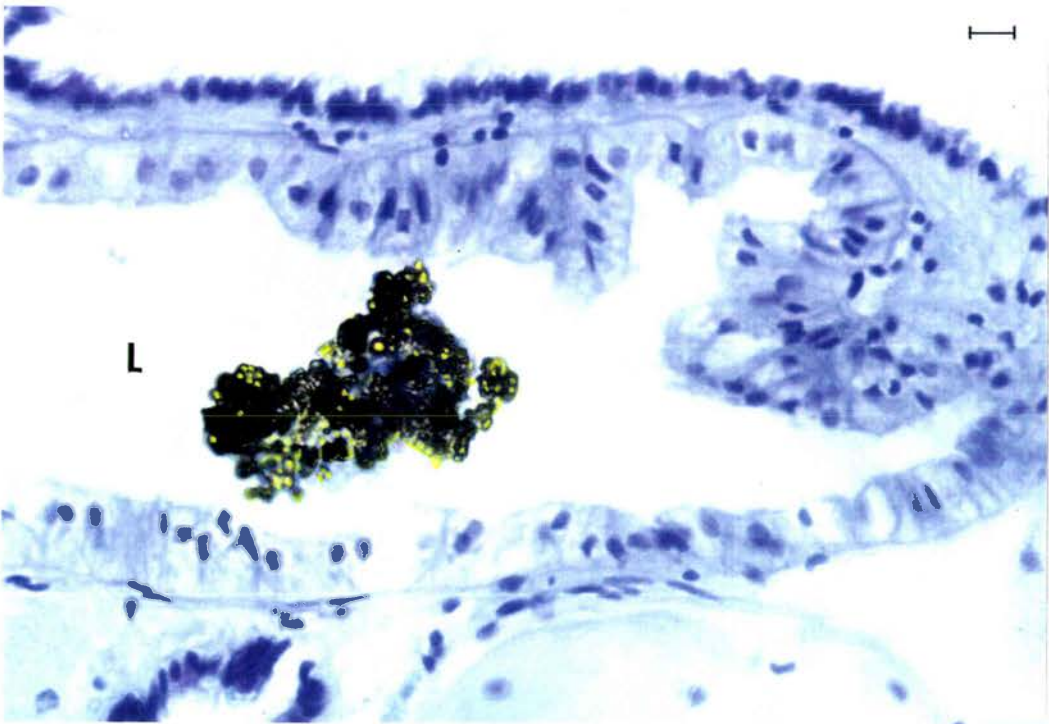




53d



e



f



Pb sont très faibles avec cependant une perte plus sensible quand le fixateur de Carnoy est utilisé (tableau 34).

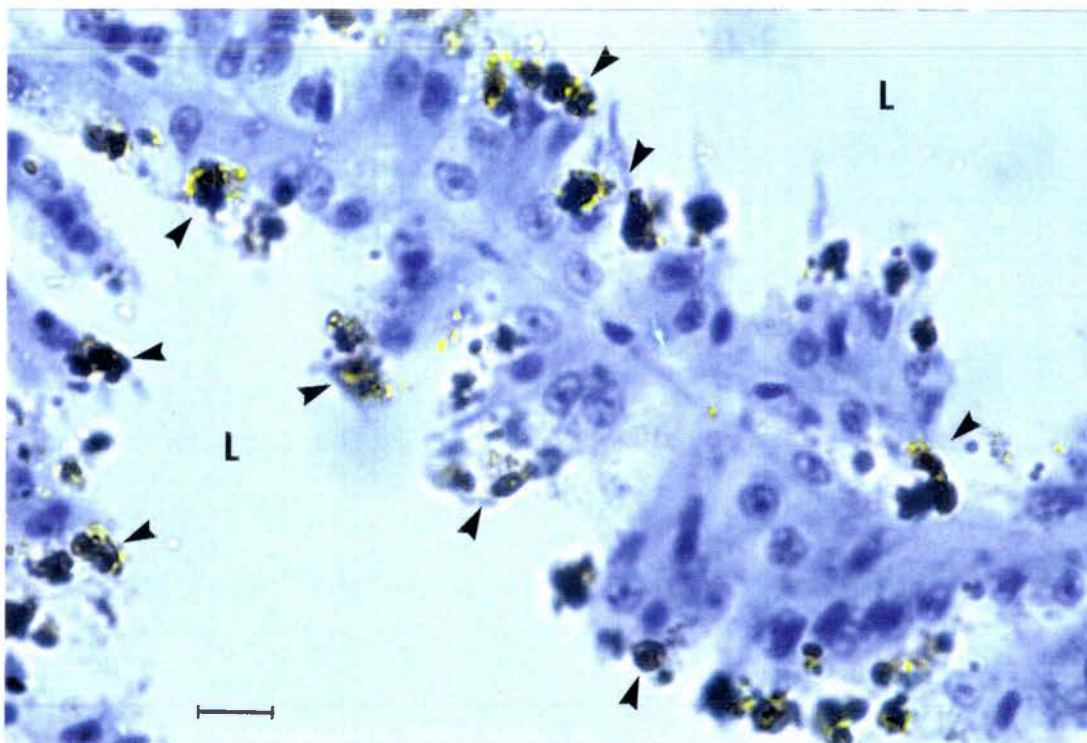
La spécificité de la méthode employée peut aussi être discutable, par conséquent dans le but de vérifier les réactions histochimiques observées, nous avons utilisé la microanalyse LAMMA. Cette technique s'est révélée très performante dans la confirmation des résultats histochimiques. En effet le spectre de masse de la figure 54 confirme que le précipité obtenu après réaction du bichromate de potassium sur des coupes de tubules rénaux est effectivement du chromate de Pb. Dans ce cas la coupe utilisée est une coupe de 5  $\mu\text{m}$  préparée comme pour l'histologie classique, montée sur grille double et déparaffinée.

Pour les coupes semi-fines préconisées pour le LAMMA, l'utilisation de l'illumination UV a permis de visualiser les structures et de choisir le point d'impact du faisceau (fig.55). L'analyse montre que les indices de présence de Pb fournis par l'étude histochimique étaient fondés puisque les granulocytes montrent régulièrement des pics de Pb pouvant quelquefois atteindre la saturation (fig.55).

Concernant les formes chimiques d'accumulation du Pb ainsi que les éléments associés, les résultats ne sont pas encore probants, les investigations dans ce sens continuent pour optimiser la méthode. Pour le Zn par exemple, détecté au niveau des cellules du tubule rénal distal, il est généralement trouvé associé aux phosphates et au Calcium (Pihan et al., 1988). Des études antérieures ont montré les mêmes associations pour le Pb dans les cellules rénales de *Mytilus edulis* (Schulz-Baldes, 1977; Coombs, 1977; George, 1980; 1982).

Les résultats de l'analyse quantitative et ceux de la détection histochimique ne sont pas aisément comparables. Il est à signaler que les 2 méthodes fournissent des informations sur des catégories différentes de Pb. En effet, le dosage renseigne sur le métal total accumulé alors que la méthode histochimique révèle la fraction du Pb qui réagit et donc convertible en chromate de Pb. Cependant à partir de ces résultats qui se complètent, nous pouvons tenter une analyse du processus de contamination et du transport interne du Pb.

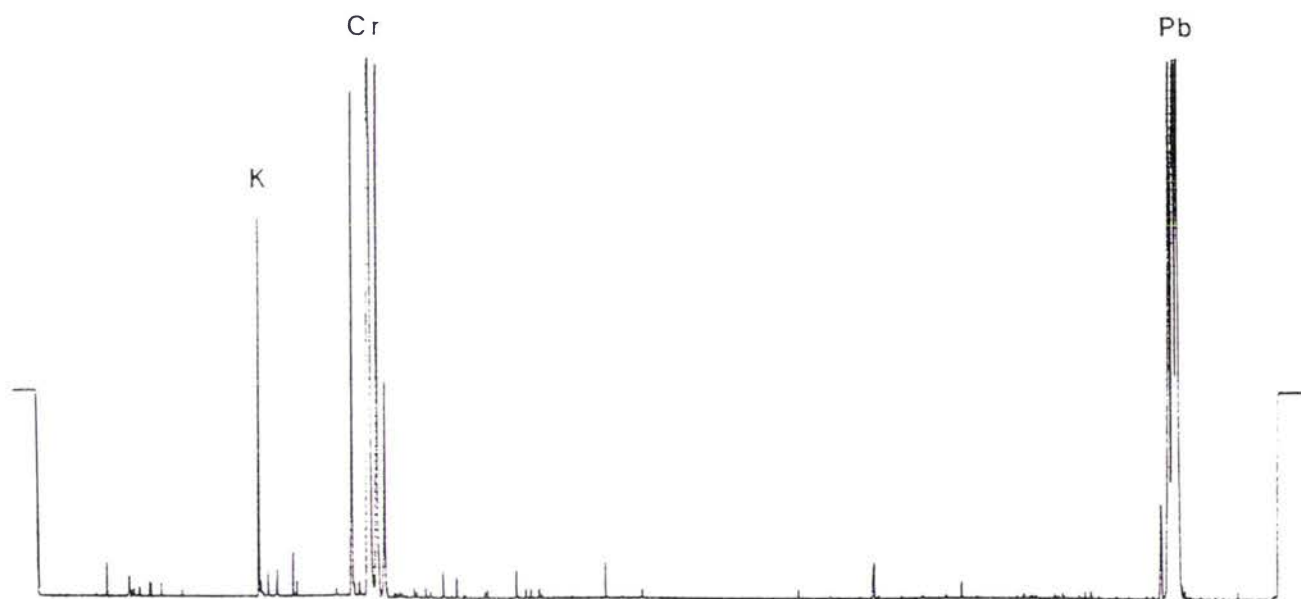
Les épithéliums branchiaux et digestifs sont en contact avec le métal dissous libre ou sous forme de complexes inorganiques ou encore secondairement complexé par le mucus. La contamination de ces cellules épithéliales a lieu et la réaction histochimique est positive. Puis les granulocytes interviennent très nombreux surtout dans le tissu



54a

L: Lumière du tubule.

La Barre représente 10  $\mu\text{m}$ .



54b

Figures 54: a: Concrétions de Pb dans les cellules de l'épithélium du tubule rénal.  
b: Spectre LAMMA vérifiant la détection cytochimique de chromate de Pb.



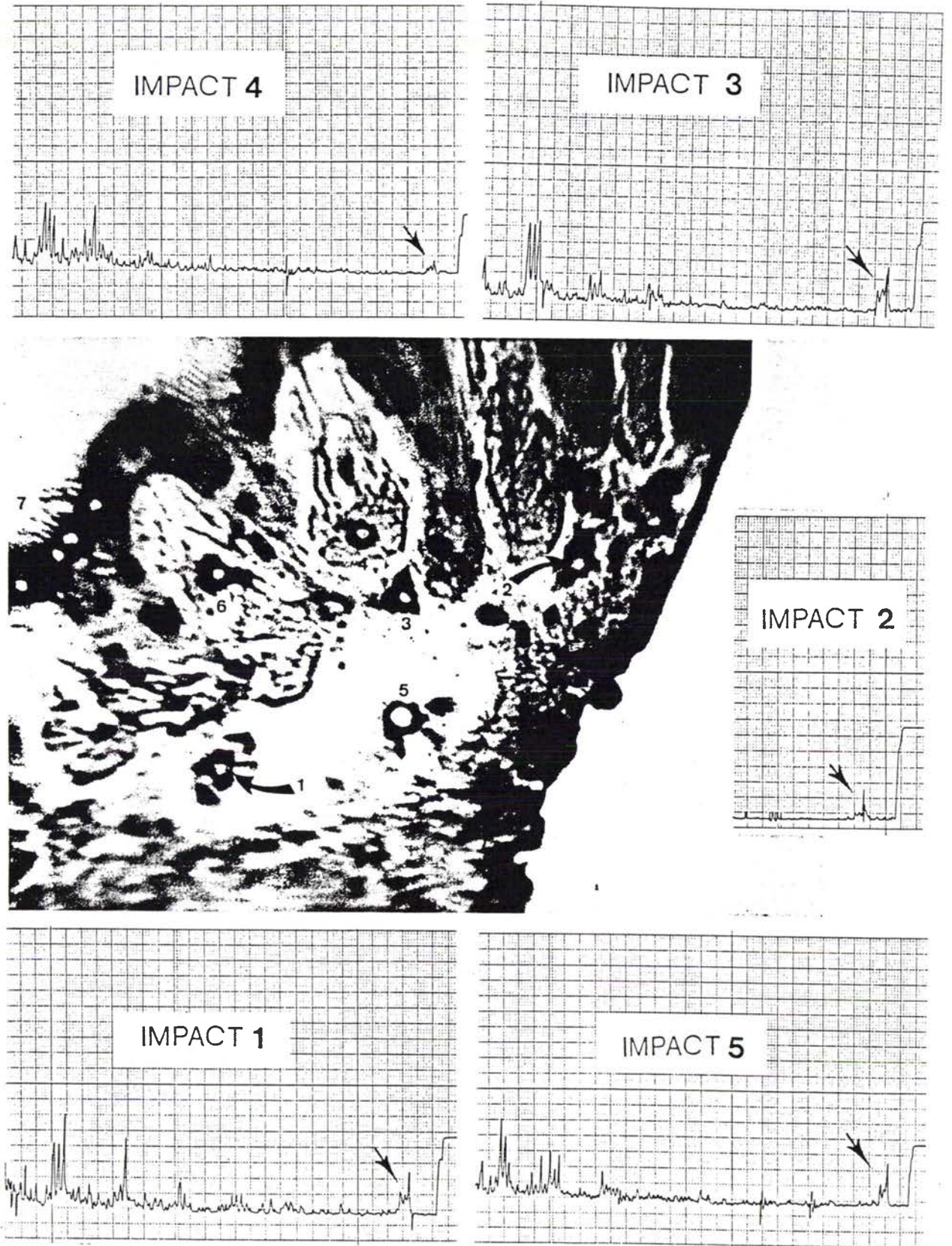


Figure 55: Détection du Pb par microanalyse LAMMA au niveau de la branchie. Cliché central en visualisation UV. Les impacts 1,2,3 et 5 concernent des granulocytes.

branchial, se chargent et concentrent progressivement le métal. A ce stade la microanalyse devient positive car les teneurs en Pb augmentent. Le devenir de ces granulocytes est multiple. Les observations histochimiques et microanalytiques concordent. Certains granulocytes gagnent le milieu extérieur au niveau de l'épithélium branchial, du manteau et de la glande du byssus avec des cas d'incorporation du Pb aux filaments. D'autres pénètrent dans l'épithélium de la glande péricardiale et se retrouvent détruit dans la cavité péricardiale avec libération des granules métalliques. Une autre catégorie encore gagne le sinus rénal, s'infiltré dans l'épithélium du tubule rénal distal interne libérant ses granules soit directement dans la lumière du rein soit par l'intermédiaire des cellules du tubule rénal distal qui présentent au pôle apical des concrétions de Pb intravésiculaires.

La prise en charge et le transport du métal par les granulocytes, malgré son importance, ne constitue pas l'unique voie de transport interne. Une partie du Pb traversant l'épithélium branchial se retrouve dans l'hémolymphe. A ce stade le Pb serait complexé par des protéines plasmatiques. La présence de métaux lourds sous forme de complexes solubles dans l'hémolymphe a été démontrée chez des bivalves (Schulz-Baldes, 1977; George, 1980; Robinson et al., 1985; Hemelraad et Herwig, 1988). Via l'hémolymphe ces complexes de Pb peuvent atteindre la glande péricardiale qui est l'organe d'ultrafiltration chez les mollusques bivalves. Le mécanisme d'ultrafiltration est taille et charge-dépendant; il se produit à la base des podocytes (Morse, 1987). Ainsi les complexes de Pb relativement petits peuvent traverser la barrière d'ultrafiltration et passer dans l'urine primaire. Ensuite à travers le canal rénopéicardial ces complexes se retrouvent dans le tubule rénal où ils sont accumulés par les cellules de l'épithélium rénal. Ainsi le métal présent dans l'hémolymphe peut suivre une voie directe de détoxication en gagnant les reins via le liquide péicardial.

### **III-7- ETUDE DE LA DECONTAMINATION.**

Pendant l'étude de la contamination expérimentale, nous avons fait apparaître lors de discussions la notion de décontamination. La décontamination est envisagée ici comme l'ensemble des processus, qui concourent au niveau de l'organisme, à éliminer le plomb bioaccumulé, après la période d'exposition au métal. Pour les métaux lourds en général, les mécanismes mis en jeu correspondent essentiellement aux fonctions d'excrétion contrairement aux toxiques organiques dont la dégradation et la métabolisation participent à leur élimination.

Des expériences ont été menées en vue de l'analyse de la dynamique de décontamination aux niveaux de la partie molle entière et de quelques organes de la dreissène, en relation avec des paramètres du milieu (EDTA, T°) et de la saison. Ces expériences ont été conduites sans apport de nourriture et avec un taux de renouvellement du milieu plus élevé dans les premiers jours de la phase de dépuraton, ceci afin d'éviter une éventuelle réabsorption du métal éliminé par les organismes.

Nous présenterons dans un premier temps tous les résultats de décontamination, puis nous passerons à leur discussion globale.

### III-7-1- DECONTAMINATION AU NIVEAU DE LA PARTIE MOLLE TOTALE.

#### III-7-1-1- Influences des conditions de contamination.

##### \* Influence du niveau de contamination initiale:

La dynamique d'élimination du plomb a été suivie chez des dreissènes contaminées par 250, 500, 1000 et 1500  $\mu\text{gPb/l}$  (conc. nominales) pendant 27 jours (expérience réalisée en automne). La période de décontamination a duré 40 jours.

Les résultats relatifs à l'évolution des concentrations présentés dans la figure 56 mettent en évidence la décontamination des organismes. Les concentrations atteintes en fin de d'expérience sont proportionnelles aux niveaux de contamination initiale et restent encore très élevées par rapport à celles des témoins. Ces cinétiques (fig.56) montrent aussi que l'élimination du métal est un processus lent par rapport à l'accumulation. En outre les taux de décontamination atteints à la fin de la phase de dépuraton ne dépassent pas 40 %.

Le tableau 35 donne l'évolution des taux de décontamination (calculés sur la base des concentrations) pendant la période de dépuraton avec les contaminations initiales correspondantes. Les résultats ne montrent pas de relation entre le taux de décontamination et le niveau de contamination initiale. Cependant au regard des cinétiques, la vitesse de décontamination semble être plus élevée quand le niveau de contamination initiale est relativement faible.

Il apparaît anormal de rencontrer un taux de décontamination négatif (par exemple à 8 jours, tab.35), alors que toute source exogène de Pb a été supprimée

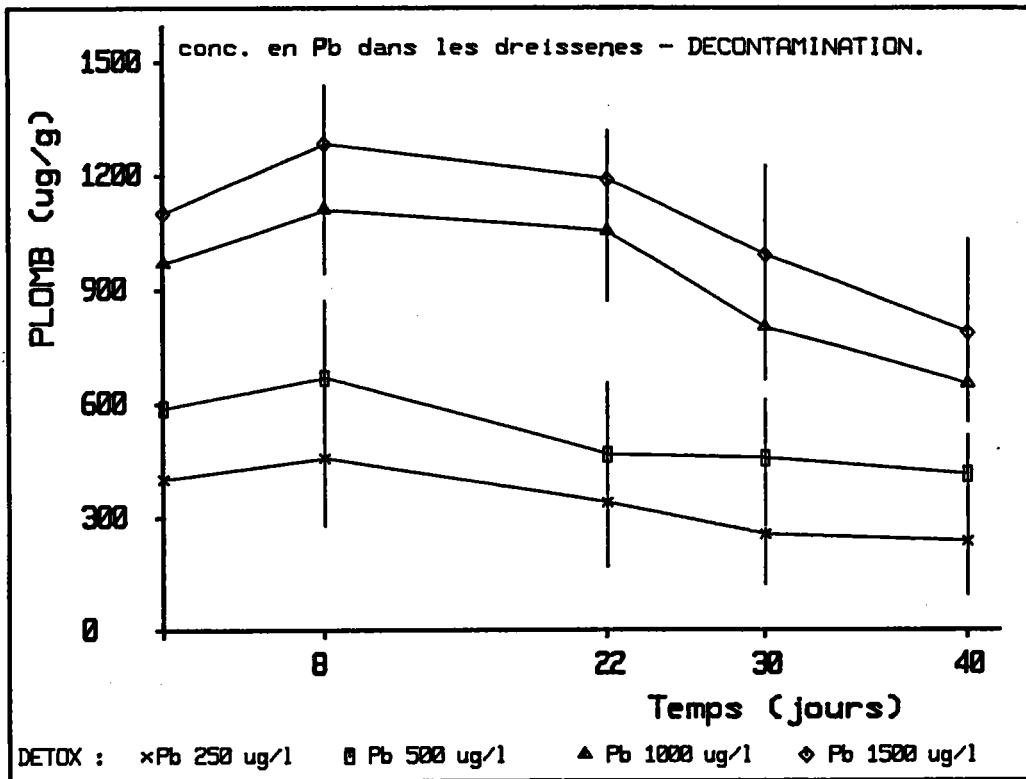


Figure 56: Cinétiques de décontamination du Pb. Exposition préalable pendant 27 jours aux concentrations indiquées.

Tableau 35: Evolution des taux de décontamination avec la contamination initiale.  
(\*: calculé sur la base des contenus en Pb.)

Période de Décontamination	Niveaux de contamination initiale			
	Pb 250 ppb	Pb 500 ppb	Pb 1000 ppb	Pb 1500 ppb
0 jours	0 %	0 %	0 %	0 %
8 ..	-14.5 %	-13 %	-14.2 %	-16.5 %
22 ..	15.2 %	21.2 %	-8.4 %	-8 %
30 ..	36.5 %	22.4 %	17.7 %	10 %
40 ..	40.5 %	29.3 %	33 %	28.4 %
Taux de décontam. globale *	45 %	34 %	37.5 %	34 %



pendant la phase de dépuraton. Ceci laisserait croire à un enrichissement en Pb des dreissènes. En fait les différences observées entre les concentrations aux temps 0 et 8 jours ne sont pas significatives ( $\alpha=0.05$ ). Cette variabilité importante des résultats rappelle celle signalée lors de l'étude de la contamination. Elle est imputable dans ce cas en grande partie à la diminution du poids sec des organismes. L'interprétation des résultats de décontamination doit prendre en compte ce paramètre. En effet la baisse de poids peut engendrer une surévaluation des concentrations à la fin de la période de dépuraton, par conséquent l'analyse de l'évolution des concentrations ne rend pas compte entièrement du processus réel de décontamination.

La comparaison des taux de décontamination calculés à partir des concentrations avec ceux à partir des contenus (tab.35), montre que l'élimination du Pb est légèrement plus importante quand on tient compte des contenus. Le taux maximum obtenu dans ce cas atteint 45 %. Ce résultat peut s'expliquer largement par le fait qu'une baisse de poids des dreissènes ne s'accompagne pas systématiquement d'une élimination correspondante des teneurs en Pb. De même pour les organismes à croissance rapide, l'effet de dilution provoqué par cette croissance pondérale contribuera à diminuer les concentrations du métal et augmentera donc virtuellement le taux de décontamination alors que la décontamination réelle peut ne pas se produire. Ceci pose les problèmes liés à la détermination de la demi-vie biologique d'un polluant.

L'estimation graphique de la demi-vie biologique du Pb est possible mais serait entachée d'erreurs compte tenu de la variabilité des résultats et donc de l'intervalle d'incertitude associé à la courbe. La détermination de ce critère ne peut être effectuée qu'à partir du calcul des taux de décontamination. Les valeurs obtenues après 40 jours de décontamination (tab.35) sont inférieures à 50 % et ne permettent donc pas d'évaluer la demi-vie biologique du Pb. Nous pouvons cependant dire que, dans les conditions de cette expérience, elle est supérieure à 40 jours.

#### \* Influence des teneurs tissulaires en Zn:

Il s'agit ici de l'étude de la dynamique de décontamination chez des dreissènes contaminées par du Pb en combinaison ou non avec le Zn (partie III-4-4). Le but de l'expérience est de rechercher si les teneurs tissulaires en Zn ont une incidence sur la décontamination du Pb.

Les résultats présentés dans la figure 57 ne permettent pas de mettre en évidence une relation entre le Zn et les taux de décontamination du Pb. Par conséquent, les

Taux de décontamination  
du Pb ( % )

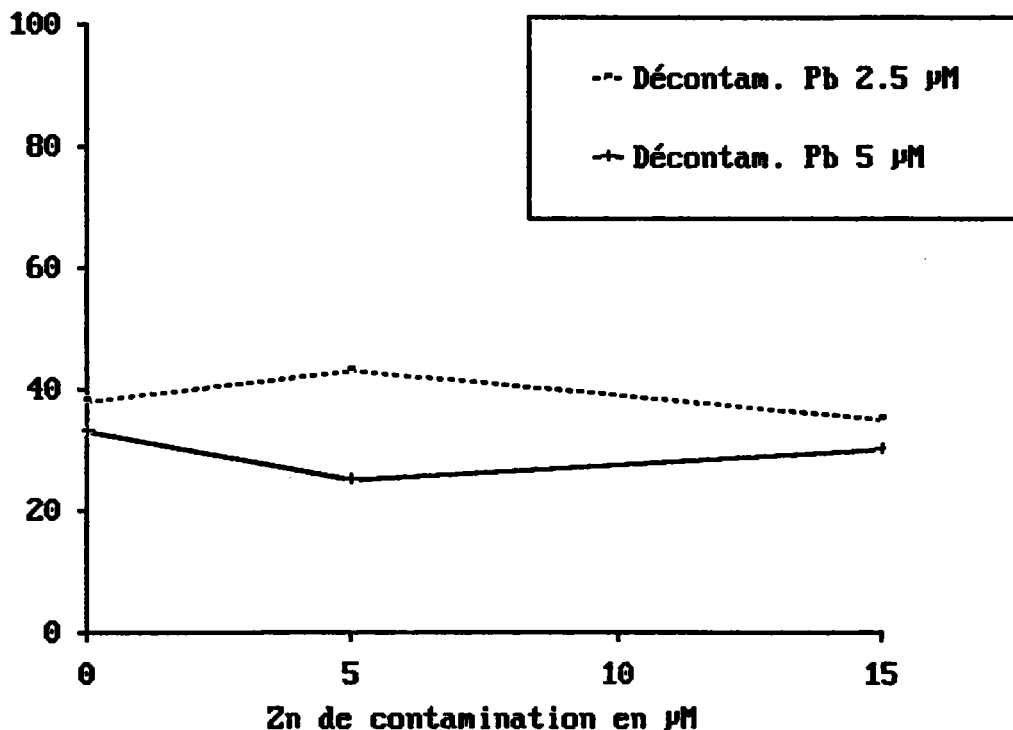


Figure 57: Taux de décontamination du Pb en fonction des concentrations en Zn dans le milieu de contamination, pour les diverses concentrations testées.

Taux de décontamination ( % )

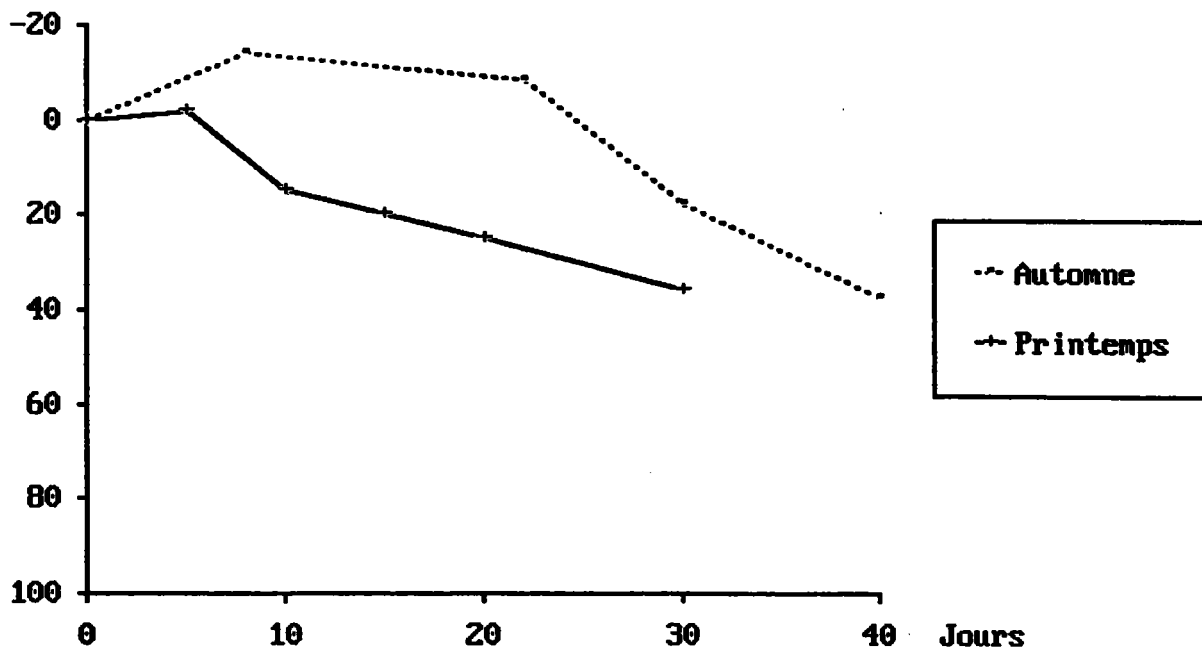


Figure 58: Evolution des taux de décontamination en fonction du temps, pour les dreissenés d'Automne et de Printemps.

cinétiques de décontamination ne dépendent que de la durée de la phase de dépuración et des teneurs en Pb dans les dreissènes.

### **III-7-1-2- Influence de la saison**

Nous avons démontré dans l'étude des processus de contamination que la saison et donc l'état biologique des dreissènes a une influence sur la bioaccumulation du plomb. L'influence de ce paramètre a également été recherché au niveau de la décontamination.

Nous nous proposons donc de comparer les dynamiques de décontamination chez 2 lots de dreissènes préalablement contaminés par 1 ppm de Pb en automne et au printemps. Les durées de décontamination sont respectivement de 40 et 30 jours.

Les résultats illustrés par la figure 58 permettent de comparer l'évolution des taux de décontamination pour les 2 saisons. Ces cinétiques montrent que la décontamination ne présente pas la même tendance pour les 2 lots de dreissènes. La décontamination est plus rapide pour le lot du printemps et débute dès la première semaine de la phase de dépuración. Par contre pour le lot d'automne, on observe un temps de latence de plus de 2 semaines avant qu'une décontamination réelle et significative ne se produise. Ceci se traduit par une vitesse de décontamination plus lente dans la phase initiale puis elle tend à augmenter progressivement.

Au terme des 2 périodes de dépuración, les taux de décontamination globale sont respectivement de 37.5 % et 36 % pour le lot d'automne et de printemps. Les teneurs en fin de dépuración sont respectivement 28 et 32 fois supérieures à celles des témoins d'automne et de printemps. Ces valeurs, en relation avec les durées de dépuración et les tendances des cinétiques révèlent une capacité de décontamination plus importante pour les dreissènes de printemps.

Le niveau de contamination initiale ne peut intervenir pour expliquer cette différence dans la capacité de décontamination des 2 lots de dreissènes. En effet les dreissènes d'automne en fin de contamination présentaient des charges métalliques plus faibles que celles des dreissènes de printemps (partie III-5-2) et en outre nous venons d'observer que la vitesse de décontamination a tendance à être plus élevée quand la contamination initiale est faible. Par conséquent les différences entre les 2 lots concernant la capacité de décontamination sont à relier avec l'état physiologique des individus. Ainsi, même chez les témoins, l'élimination du métal est plus importante au

Tableau 36: Taux de décontamination et mortalité pendant la dépuraction chez les dreissenes de printemps et d'automne

	Témoins		Traités	
	Automne	Printemps	Automne (40j.)	Printemps (30j.)
Taux de décontam.	50 %	70 %	37.5 %	36 %
Mortalité	14 %	6 %	62 %	20 %

Tableau 37: Effet de la température sur le taux de décontamination final

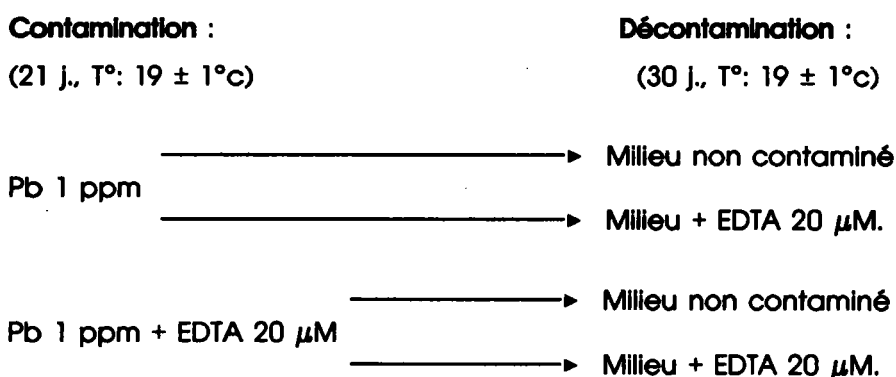
	Contamination à 20°c		Contamination à 15°c	
	Décontam. 20°	Décontam. 15°	Décontam. 20°	Décontam. 15°
Taux de décontamination	35 %	19.5 %	25 %	19 %

printemps qu'en automne; de plus c'est en automne que les taux de mortalité sont les plus élevés (tab.36).

### III-7-1-3- Influences des paramètres du milieu: EDTA et Température

#### \* EDTA:

L'EDTA réduit fortement la bioaccumulation du Pb et sa toxicité létale chez les dreissènes (partie III-4-1). L'incidence de ce chélatant sur la décontamination a été aussi analysée selon le plan expérimental suivant:



Les cinétiques d'élimination du Pb sont visualisées par les figures 59 a,b. Après 30 jours de dépuración pratiquée sans EDTA, les dreissènes ont éliminé 36 % du métal accumulé. Pour les dreissènes décontaminées en présence d'EDTA, la vitesse d'élimination du métal est plus rapide. Le taux de décontamination est plus important et atteint à la fin de l'expérience 55%. Ces résultats montrent que la présence de ce chélatant dans le milieu de dépuración favorise la décontamination du Pb. Toutefois, même en présence d'EDTA, la décontamination totale n'est pas atteinte. La demi-vie biologique dans ces conditions peut être estimée à environ 30 jours.

#### \* Température:

Des dreissènes contaminées par 1 ppm de Pb pendant 15 jours aux températures de 15° et 20°C, ont servi à suivre la décontamination par transplantation croisée, dans des milieux de dépuración à des températures de 15° et 20°C pendant 16 jours.

Le tableau 37 résume les taux de décontamination, obtenus à la fin de l'expérience pour chaque condition thermique. Les lots décontaminés à 20°C présentent des taux de décontamination plus élevés que ceux des lots décontaminés à 15°C, et

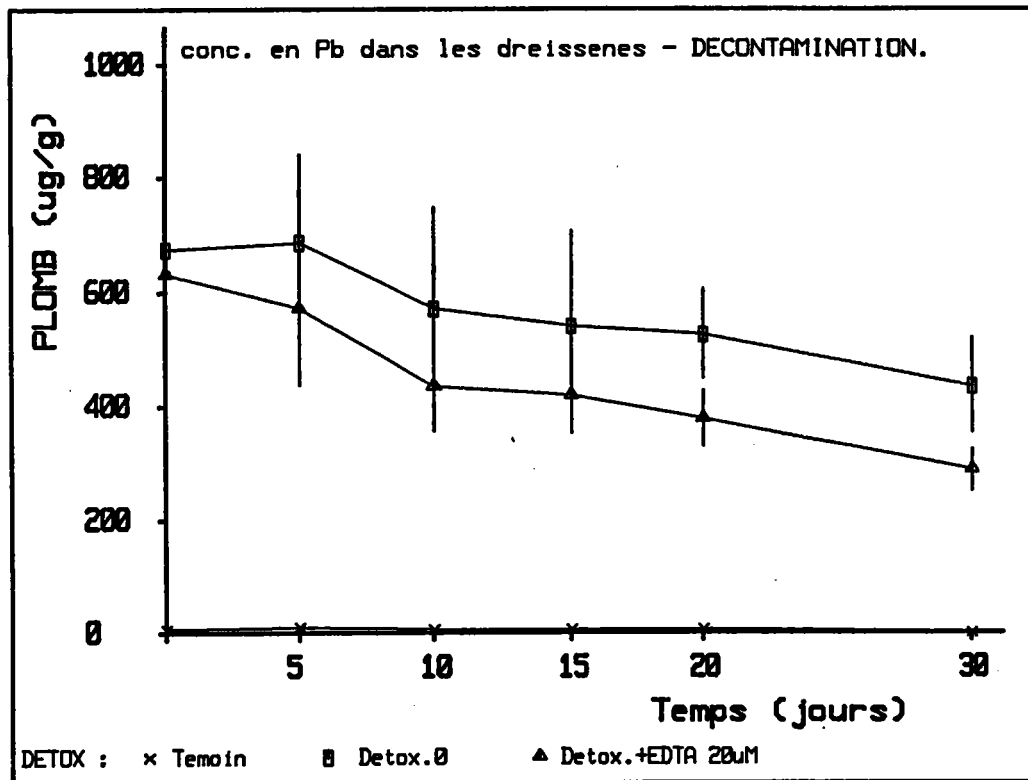


Figure 59a: Cinétiques de décontamination avec et sans EDTA 20 µM. Contamination initiale par 1ppm Pb durant 21 jours.

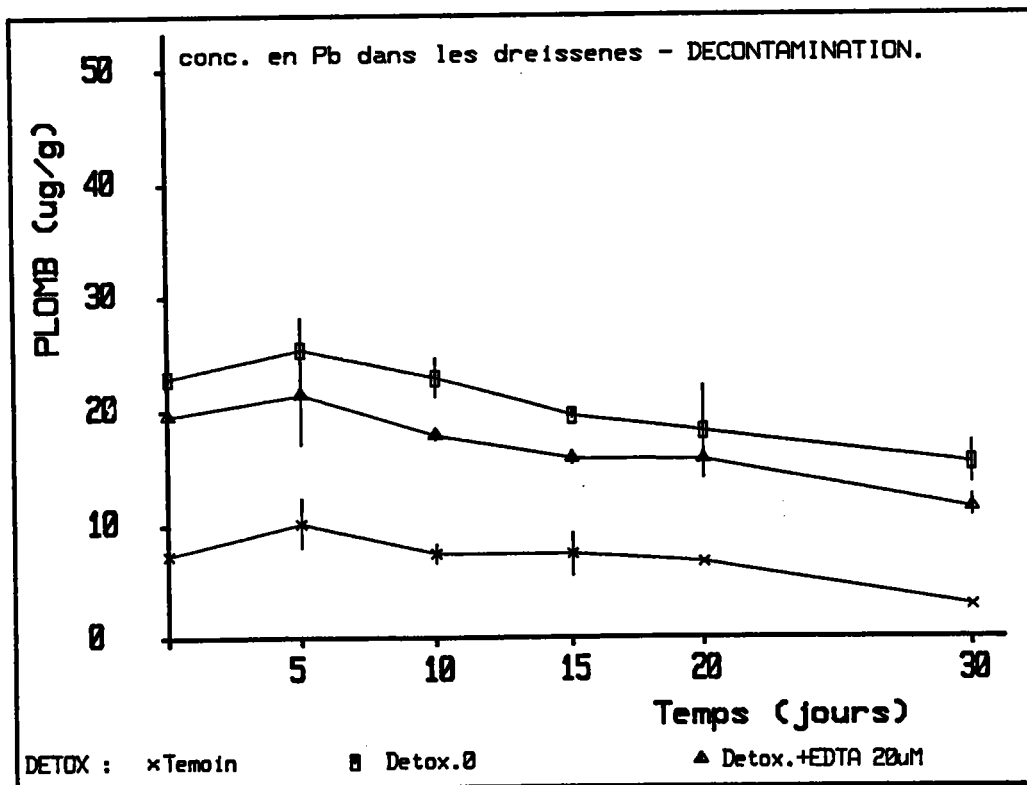


Figure 59b: Cinétiques de décontamination avec et sans EDTA 20 µM. Contamination initiale par 1ppm Pb en présence de 20 µM EDTA durant 21 jours.

ceci quelle que soit la température de contamination. Ainsi, l'augmentation de la température pendant la phase de dépuración semble stimuler la décontamination du Pb. Il est à noter cependant, que le lot de dreissènes contaminé à 15°C et dépuré à 20°C, présente un taux de décontamination moins important que celui du lot contaminé et dépuré à 20°C (tableau 37). Le sens de variation de la température entre les phases de contamination et de dépuración semble avoir une incidence sur le taux de décontamination.

### III-7-2- DECONTAMINATION AU NIVEAU DES ORGANES.

Chez un lot de dreissènes préalablement exposé à 1 ppm de Pb pendant 15 jours, la décontamination a été étudiée au niveau des 5 organes (manteau, branchies, reste de la partie molle, byssus et coquille) après une période de dépuración de 12 jours.

La décontamination au niveau des 3 fractions de la partie molle (manteau, branchies et "reste") est marquée dans tous les cas par une décroissance des concentrations en Pb (tableau 38). Le taux de décontamination le plus élevé (33%) a été obtenu au niveau des branchies, suivi de celui du manteau avec 20% de décontamination. Le taux le plus faible a été obtenu au niveau du "reste"(13%).

En ce qui concerne le byssus et la coquille, nous observons des comportements différents. La coquille relargue 25% du Pb accumulé après 12 jours de dépuración, alors qu'au niveau du byssus, le taux de décontamination est négatif (-15%) signifiant un enrichissement en Pb (tableau 38).

La contribution de chacun des organes de la partie molle à la charge métallique totale, au début et la fin de la dépuración (fig.60), permet d'apprécier l'évolution de la distribution du Pb dans les tissus mous, et l'importance des organes dans les processus de transfert et de stockage.

Les branchies sont décontaminées assez rapidement, et leur contribution au contenu total en Pb passe de 20% à 13%. Le pourcentage de Pb dans le manteau décroît de 40% à 34%. Par contre pour la partie "reste", nous observons une augmentation de sa contribution passant de 40% à 53% (fig.60). Ceci signifie qu'il se produit une redistribution du Pb entre les organes pendant la décontamination. Le faible taux de décontamination obtenu au niveau du "reste" ainsi que l'augmentation de sa contribution à la charge métallique totale, permettent de déduire qu'il y a transfert du

Tableau 38: Concentrations dans les organes pendant la dépuraton et les taux de décontamination.

Décontamination	Branchie	Manteau	Reste	Byssus	Coquille
0 jour	234 µg/g	280 µg/g	190 µg/g	7050 µg/g	180 µg/g
12 j.	156 ,,	224 ,,	165 ,,	8120 ,,	135 ,,
Taux de décontamination	33 %	20 %	13 %	-15 %	25 %

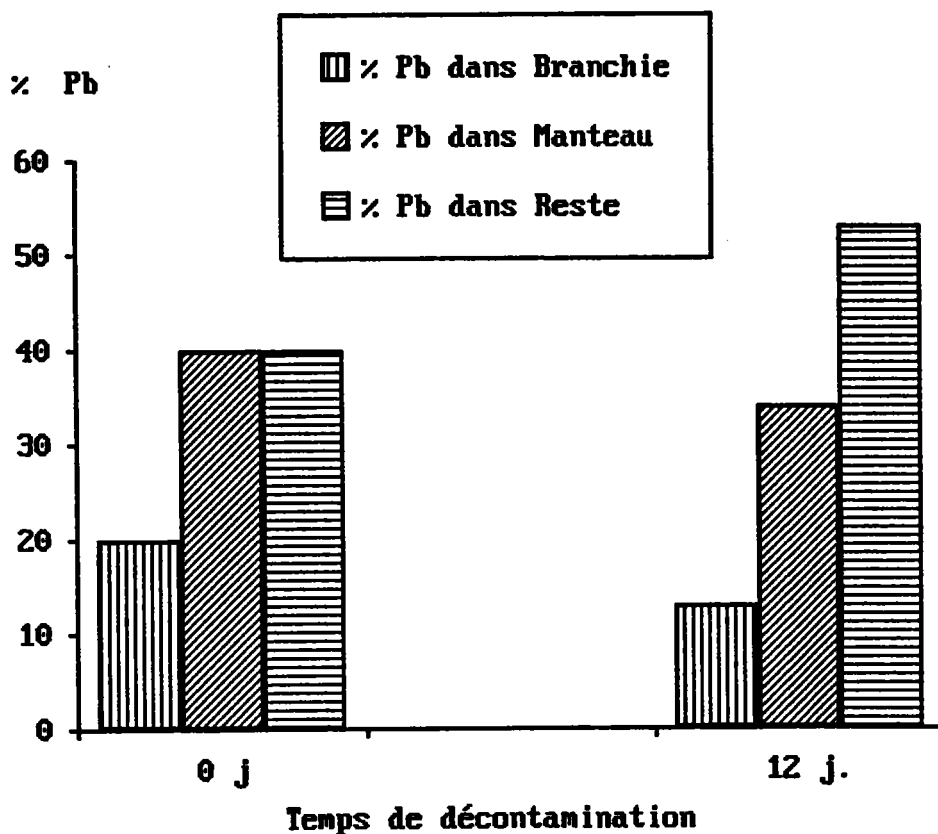


Figure 60: Evolution de la distribution du Pb dans les 3 fractions de la partie molle pendant la phase de dépuraton.



Pb des organes externes (branchies et manteau) vers le "reste". Ceci peut s'expliquer par la présence, dans la partie "reste", des reins, organes à grand pouvoir de stockage du Pb avant excrétion.

Quel que soit le protocole de décontamination, c'est au niveau des branches distales interne et externe du rein que l'on retrouve trace du Pb, toujours sous forme de granules, intracellulaires ou bien présents dans la lumière des tubes.

### III-7-3- DISCUSSION.

L'étude de la décontamination, en relation avec les paramètres biotique et abiotiques pris en compte, permet de donner des indications importantes sur le temps de résidence d'un métal dans les organismes contaminés et par conséquent sur les risques écotoxicologiques. D'autre part, la dynamique de décontamination doit permettre une meilleure compréhension du phénomène global de bioaccumulation. En effet, la bioaccumulation est la résultante de processus complexes correspondant à la prise du métal, sa distribution tissulaire, et parallèlement, à l'élimination d'une part plus ou moins importante des charges accumulées. La capacité de bioaccumulation est par conséquent fonction de la vitesse et de l'importance des entrées du métal dans l'organisme, mais également de celles de l'élimination vers le milieu extérieur.

L'élimination du métal est un processus lent par rapport à l'accumulation. Les résultats montrent que même après une période de dépuration au moins 1.5 fois plus longue que la contamination, la décontamination totale n'est jamais atteinte. Les teneurs dans les dreissènes décontaminées restent très élevées par rapport à celles des témoins.

Des résultats similaires ont été obtenus pour le Pb chez des bivalves marins (Schulz-Baldes, 1974; Zarogian et al., 1979; Denton et Burdon-Jones, 1981), ainsi que chez des bivalves d'eau douce (Salanki et V-Balogh, 1989). Par rapport au Cd (Bias et Karbe, 1985), le Pb semble plus rapidement éliminé par la dreissène. Par contre pour le Zn chez la même espèce (Maarouf, 1988), les résultats montrent des taux de relargage comparables aux nôtres et se situant entre 37 et 54%.

Nos résultats n'ont pas permis d'établir s'il y a une relation nette entre le taux global de décontamination et la concentration du métal dans les organismes, contrairement aux résultats de Schulz-Baldes (1974) chez *Mytilus* qui montrent que la vitesse d'élimination du Pb est proportionnelle à la contamination initiale. La reprise des

données de l'auteur et le calcul des taux de décontamination ne permettent pas de confirmer ses conclusions, puisque pour la plupart des concentrations utilisées (0.2, 0.5, 1 et 5 mg Pb/l) la décontamination n'a pas excédé 25%.

La comparaison de nos résultats avec ceux de l'étude "in situ" réalisée par Légize et Crochard (1987), montre que les dreissènes en situation de décontamination dans le milieu naturel éliminent le métal plus rapidement. Les taux de décontamination rapportés par ces auteurs sont supérieurs à 50% dans les 20 premiers jours de la phase de dépuración. Les conditions trophiques du milieu, ainsi que la dilution du métal relargué dans des volumes d'eau importants et la présence de complexants naturels pourraient être des éléments d'explication de ces différences.

Les facteurs du milieu influencent aussi la capacité de décontamination des dreissènes. L'étude de l'effet de la température par des transplantations croisées indique que les dreissènes éliminent plus le Pb à 20°C qu'à 15°C. Ainsi, l'augmentation de la température semble amplifier les processus de décontamination. Un résultat similaire a été trouvé pour le Cd chez *Crassostrea* (Van Dolah et al., 1987). Ceci est à relier vraisemblablement à une augmentation de l'activité métabolique des organismes notamment l'activité d'excrétion. Le sens de variation de la température entre les phases de contamination et de dépuración semble aussi avoir une incidence sur le taux de décontamination. Il est probable qu'un choc thermique provoqué par le passage de 15°C à 20°C engendre des modifications métaboliques qui limitent la capacité de décontamination.

La présence d'EDTA dans le milieu de dépuración augmente significativement l'élimination du Pb. Cette action de l'EDTA sur la décontamination peut être attribuée à sa forte capacité de chélation du métal relargué par les dreissènes. Mais cet effet serait très limité car, dans les premiers jours de dépuración, le taux de renouvellement du milieu a été augmenté d'un facteur de 2 dans le but de minimiser les chances de réabsorption du métal éliminé. Par conséquent, l'effet de l'EDTA serait à rechercher au niveau de l'organisme lui-même. Il est établi que les bivalves assimilent la matière organique dissoute par pinocytose à travers les branchies et le manteau (Pequignat, 1973; Sorokin et Wyshkwarzev, 1973 cités par Van Dolah et al., 1987); il est possible que l'EDTA soit assimilé de la même manière. En effet, Van Dolah et al., 1987 rapportent que l'EDTA marqué au C<sup>14</sup> est rapidement assimilé par l'huître *Crassostrea*. Les concentrations les plus élevées en EDTA ont été trouvées au niveau du coeur et du péricarde.

On peut alors penser que l'EDTA pénétrant dans les organes externes (branchies et manteau) mobilise le métal en le chélatant et le transporte jusqu'au péricarde. Les complexes Pb-EDTA étant relativement petits, le passage de la barrière d'ultrafiltration au niveau de la glande péricardiale est donc possible. Ces complexes se retrouvent alors, via le canal réno-péricardial, au niveau des reins où ils sont pris en charge par les cellules rénales et éliminés vers le milieu extérieur. Cette voie de détoxification directe empruntée par ces complexes et leur excrétion par les reins expliquerait alors l'élimination rapide du métal.

Des indices histochimiques qui concordent avec l'interprétation précédente ont été obtenus. En effet, dans tous les cas où l'EDTA est employé, le Pb a été visualisé histochimiquement uniquement dans les reins.

Une diffusion inverse directement vers le milieu extérieur des complexes Pb-EDTA à partir des organes de prise (branchies, manteau) est aussi possible. L'absence d'indice histochimique de présence du Pb dans les branchies et manteau quand l'EDTA est employé serait due au masquage chimique du Pb par l'EDTA qui empêche la conversion en chromate de Pb.

La décontamination au niveau des fractions de la partie molle indique une redistribution du Pb pendant la phase de dépuration. Certes les concentrations en Pb baissent dans toutes les fractions analysées sauf dans le byssus, mais la participation de chaque fraction à la charge métallique totale évolue différemment. Les proportions de Pb dans le manteau et les branchies baissent alors qu'au niveau de la partie "reste" elles augmentent. Cette redistribution du Pb ne se produit pas seulement pendant la phase de dépuration, mais semble commencer déjà vers la fin de la période de contamination.

**SYNTHESE ET PERSPECTIVES.**

## **SYNTHESE ET PERSPECTIVES.**

L'étude expérimentale des processus de contamination et de décontamination chez *Dreissena polymorpha* nous a permis de mettre en évidence quelques caractéristiques de la réponse de ce bivalve au plomb (fig. 61).

La bioaccumulation du Pb au niveau de la dreissène, comme au niveau des organes, repose sur la participation simultanée ou décalée dans le temps de tous les mécanismes de prise, d'accumulation et d'élimination du métal. La résultante de ces divers processus constitue la charge métallique de la dreissène.

L'étude de la contamination directe met en évidence une capacité de bioaccumulation et de résistance importante de la dreissène vis-à-vis du plomb. La proportionnalité entre les concentrations du métal dans les organismes et celles dans le milieu n'est vérifiée que pour les faibles concentrations; situation généralement rencontrée dans l'environnement. Pour des concentrations élevées, la dynamique de bioaccumulation devient saturante.

L'élimination du Pb est un processus lent par rapport à l'accumulation. La décontamination totale n'est jamais atteinte même après des périodes de dépuración plus longues que celles de la contamination. Les taux de décontamination obtenus en fin de dépuración semblent indépendants du niveau de contamination initiale.

L'exposition cyclique des dreissènes à une faible concentration en Pb montre que la proportionnalité simple généralement observée entre le temps d'exposition et les concentrations dans les organismes trouve sa limite dans ces conditions. Néanmoins, les résultats montrent que même dans une situation aussi extrême (contaminations très brèves et très espacées), la dreissène réagit comme un intégrateur de la pollution par le Pb.

La cinétique de bioaccumulation obtenue dans les conditions de contamination cyclique semble indiquer que la dreissène se comporte comme un système à compartiments multiples d'accumulation. Il apparaît aussi que l'étape limitante de la bioaccumulation est la capacité de fixation du Pb par les organes en contact avec le milieu (branchies, manteau) et la vitesse de son transfert interne vers les autres compartiments de stockage.

La contamination par voie trophique, au moyen de chlorelles préalablement

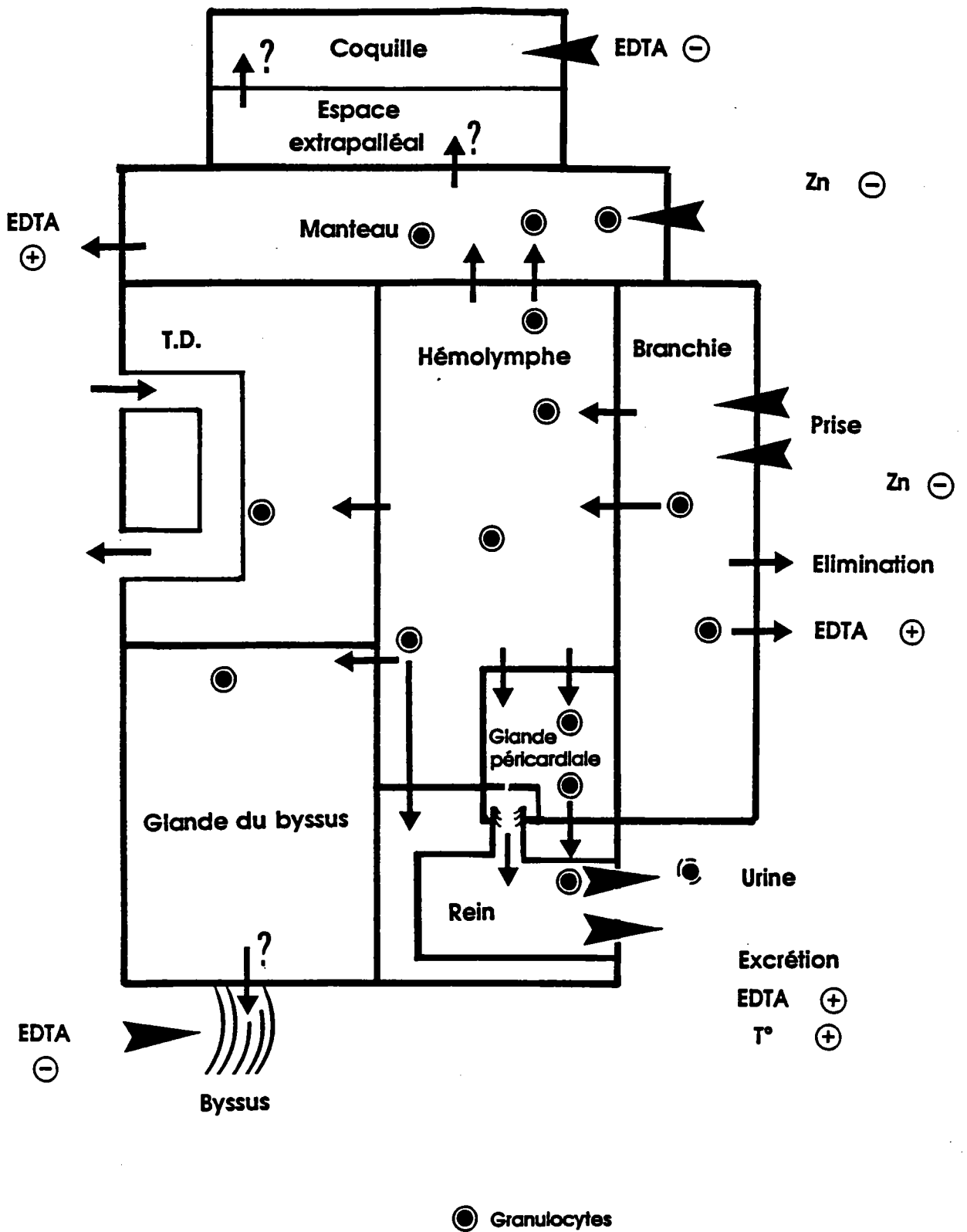


Figure 61: Schéma synthétique illustrant la dynamique du Pb dans *Dreissena polymorpha*, et l'action de certains paramètres du milieu.  
 + : Stimulation ; - : Inhibition

contaminées montre qu'il y a bien transfert trophique du Pb. La bioaccumulation par voie trophique se produit très lentement dans la phase initiale, et reste très faible par rapport à la bioaccumulation par voie directe.

La matrice physico-chimique du milieu influence la bioaccumulation du Pb. L'élévation de la température du milieu (15°-->20°C) diminue la bioaccumulation et augmente l'élimination du Pb. Il semble que l'augmentation de température stimule les processus d'excrétion favorisant ainsi la décontamination.

L'utilisation de chélatants forts tels que l'EDTA modifie les phénomènes de bioaccumulation. Il semble que ce chélatant exerce un effet protecteur en réduisant la bioaccumulation et corrélativement la toxicité létale. Cet agent arrive d'autre part à mobiliser le métal préalablement accumulé et contribue ainsi à favoriser son élimination. Cette particularité peut être exploitée pour l'utilisation de l'EDTA dans le développement d'un processus de dépollution métallique pour certains bivalves d'intérêt économique. Il est en outre employé comme additif alimentaire agréé par la U.S Food and Drug Administration par exemple pour prévenir l'oxydation et la décoloration des huîtres (Van Dolah et al., 1987).

L'étude de l'interaction entre le Pb et le Zn montre que ce dernier réduit la bioaccumulation du Pb dans la première phase de l'exposition. Cet antagonisme tend à disparaître avec le temps. En effet, à la fin de la contamination, l'action du Zn sur l'accumulation du plomb n'est plus significative. Les charges tissulaires en Zn ne montrent aucun effet significatif sur la décontamination du Pb.

Les résultats ont permis de montrer que les processus de bioaccumulation diffèrent en fonction de la saison. En effet, ce sont les dreissènes contaminées au printemps, période de reproduction, qui affichent la capacité de bioaccumulation la plus importante et la cinétique la plus rapide.

La détection histochimique et microanalytique du Pb a pu être faite essentiellement dans des concrétions au sein des cellules rénales, dans le cytoplasme des cellules circulantes ainsi que dans l'épithélium intestinal. Quand l'EDTA est employé c'est uniquement dans le rein que l'on retrouve trace du métal. A la fin des périodes de dépuración et quel que soit le protocole de décontamination utilisé, c'est également au niveau du rein que le Pb est retrouvé, toujours sous forme de granules intracellulaires ou bien présents dans la lumière des tubules rénaux distaux.

## REFLEXIONS GENERALES ET PERSPECTIVES.

Les bivalves du fait de leur capacité de bioaccumulation des métaux ont été largement utilisés en biomonitoring de la pollution métallique. La quantification de la pollution présente 2 aspects: 1) La comparaison des niveaux métalliques dans les tissus de bivalves de différents sites pour évaluer les degrés de pollution relative; 2) l'utilisation des taux d'accumulation pour estimer les niveaux métalliques moyens dans le milieu. L'ensemble de ces aspects nécessite que les bivalves soient intégrateurs de la pollution, ce qui requiert une relation simple et constante entre les concentrations dans les tissus des organismes et celles dans le milieu.

L'étude expérimentale que nous avons entreprise sur la dreissène constitue une contribution à la compréhension des processus de bioaccumulation et d'élimination du Pb chez cette espèce. Nos travaux confrontés pour certains aspects à une étude réalisée "in situ" (Léglize et Crochard, 1987), montrent que ce bivalve d'eau douce peut être considéré comme un bon intégrateur de la contamination métallique.

Nos résultats soulèvent aussi le problème de l'expression des résultats d'accumulation dans les tissus mous. L'utilisation (très répandue) du seul paramètre concentration peut conduire à des erreurs dans le cas de variabilité du poids sec. C'est ce qui se produit quand les expériences sont prolongées sur une longue période sans apport suffisant de nourriture, ou à des saisons différentes. Un autre critère qui est le contenu métallique ou teneur par échantillon semble plus fiable et doit être introduit dans l'analyse des cinétiques d'accumulation. En outre ces deux critères n'ont pas la même signification écotoxicologique. La concentration est un indicateur de risque toxicologique. Plus la concentration est élevée, plus le nombre de sites de fixation occupés par le métal au niveau cellulaire est grand. La probabilité d'apparition d'atteintes structurales ou biochimiques est par conséquent dépendante de la concentration en métal dans la cellule ou l'organe considérés. La teneur ou contenu métallique renseigne sur la quantité totale accumulée par l'individu et donc potentiellement transférable dans la chaîne trophique.

Il convient donc de poursuivre les recherches dans cette voie afin d'établir les relations entre les concentrations tissulaires en métal et le poids ou la taille des dreissènes, voire d'introduire un autre paramètre indépendant de la taille et du poids des organismes à l'instar de l'indice de Cadmium de Fischer (1988) pour *Mytilus* ou de Marigomez et Ireland (1990) pour *Littorina*. Cet indice consiste à rapporter le contenu de l'organisme en Cd au poids sec de la coquille.



Nos résultats ont montré que la variabilité des résultats d'accumulation augmente avec le degré de contamination, ce qui peut engendrer des difficultés d'interprétation. Des investigations complémentaires sont alors nécessaires pour comprendre l'origine de cette variabilité liée au degré de contamination. Il est également indispensable d'approfondir l'étude microanalytique couplée à la microscopie électronique pour identifier les formes chimiques sous lesquelles le métal est accumulé ainsi que les structures cellulaires intervenant dans le piègeage et la détoxification. En parallèle aux techniques de quantification de la bioaccumulation, l'apport de l'histochemie s'avère d'une grande importance car il donne des indications sur la signification écotoxicologique des concentrations métalliques accumulées.

La preuve de l'intérêt grandissant pour *Dreissena polymorpha* dans le biomonitoring et la gestion des eaux douces est l'abondance des travaux récents qui sont réalisés sur cette espèce (Kramer et al., 1989; Reeders et Bij de Vaate, 1990; The Zebra Mussel *Dreissena*, Symposium on Ecology and Biomonitoring, 1991, Cologne, R.F.A., Neumann & Jenner (eds.) in presse). En outre son apparition récente dans les grands lacs américains (Hebert et al., 1989) ainsi que les problèmes que peut poser cette espèce invasive laissent supposer un développement prochain des études sur l'espèce. *Dreissena* est donc toute qualifiée pour devenir l'équivalent de *Mytilus* pour le "Mussel Watch" en eau douce.

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.**

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABAYCHI J.K. & Y.Z. MUSTAFA, 1988. The asiatic clam, *Corbicula fluminea*: An indicator of trace metal pollution in the Shatt-al-Arab river, Iraq. Environ. Pollut., **54**: 109-122.
- ABDULLAH M. & L. ROYLE, 1972. The occurrence of Lead in natural waters. In International Symposium "Environmental Health Aspects of Lead", Amsterdam.
- ABEL P.D., 1976. Effects of some pollutants on the filtration rate of *Mytilus edulis*. Mar. Pollut. Bull., **7**: 228-231.
- A.F.E.E. (Association Française pour l'Etude des Eaux), 1976. Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales. Rapport n°3 : Le Plomb-l'étain. AFEE, Paris : 132 p.
- AHLERS J. & E. RÖSICK, 1986. Cadmium-uptake and influence on plasma membrane functions of yeast. Toxicol. Environ. Chemistry, **11**: 291-300.
- AHLERS J. & E. RÖSICK, 1986. Influence of Nitroloacetic acid on  $\text{Cd}^{2+}$  uptake by yeast. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **37**: 96-105.
- AMIARD J.C., C. AMIARD-TRIQUET, B. BERTHET & C. METAYER, 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. I: field study. Mar. Biol., **90**: 425-431.
- AMIARD J.C., C. AMIARD-TRIQUET, B. BERTHET, C. METAYER, 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu - Zn) and non-essential (Cd - Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., **106**: 73-89.
- AMIARD-TRIQUET C., B. BERTHET, C. METAYER & J.C. AMIARD, 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. II: Experimental study. Mar. Biol., **92**: 7-13.
- AMIARD-TRIQUET C., J.C. AMIARD, C. BALLAN-DUFRANCAIS, B. BERTHET, P. GOUZERH, A.Y. JEANTET, R. MARTOJA & M. TRUCHET, 1987 a. Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism level of silver transferred to the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg directly from water or via food. In 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburgh .
- AMIARD-TRIQUET C., C. METAYER & J.C. AMIARD, 1987 b. Etudes in situ et expérimentales de l'écotoxicologie de quatre métaux lourds (Cd,Pb,Cu,Zn) chez des algues et des Mollusques Gastéropodes brouteurs. Water. Air. Soil. Pollut., **34**: 11-30.
- AOKI Y. & K.T. SUZUKI, 1986. Control mechanism of metallothionein gene expression and its relationship to metabolism of heavy metals. Eisei Kagaku, **32**, 2: 70-84.
- BACLE I., 1988. Accumulation et relargage du cuivre et du cadmium par deux espèces de mousses aquatiques. Influence du pH, de l'EDTA et des phosphates. Mémoire DEA, Univ. Metz, 142 p.

- BAER K.N. & W.H. BENSON, 1987. Induction of metallothionein in response to heavy metals and environmental stress: Implications in mechanisms of metal tolerance. In 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultants, Edinburgh .
- BARGHIGIANI C., R. FERRARA, O. RAVERA & A. SERITTI, 1983. Biological effects under laboratory conditions. In: Trace element speciation in surface waters and its ecological implications: 123-136, LEPPARD G.G. (ed.), Plenum Publishing Corporation.
- BASS L.E., 1977. cité par DENTON & BURDON-JONES, 1981.
- BENOIT D.A., V.R. MATTSON & D.L. OLSON, 1982. A continuous-flow mini-diluter system for toxicity testing. Water. Res., 16: 457-464.
- BENYAHIA M., 1985. Cinétiques d'accumulation et de relargage de métaux lourds (Plomb, Zinc) par des bryophytes aquatiques en laboratoire. Mémoire DEA, Univ. Metz, 45p + Annexes.
- BENYAHIA M., C. CROCHARD & J.C. PIHAN, 1988. Toxicité, bioaccumulation et relargage du plomb chez *Dreissena polymorpha*. Effet de l'EDTA et des phosphates. Haliotis, 18: 239-249.
- BIAS R. & L. KARBE, 1985. Bioaccumulation and partitioning of cadmium within the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas. Int. Revue. Ges. Hydrobiol., 70: 113-125.
- BOALCH R., S. CHAN & D. TAYLOR, 1981. Seasonal variation in the trace metal content of *Mytilus edulis*. Mar. Pollut. Bull., 12, 8: 276-280.
- BOGUSZ D., 1987. Industrial water pollution treatment in Penarroya factory (in North France). In 6th International Conference "Heavy metals in the environment" New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultants, Edinburgh.
- BOIS F., 1984. Influence de paramètres physico-chimiques du milieu sur la toxicité des produits chimiques: Cas du zinc et du pentachlorophénol, Mémoire de DEA, Univ. Metz, 75 p.
- BOIS F., M. VAILLANT & P. VASSEUR, 1986. Multiple regression analysis of toxic interactions: Application to the Microtox test and general comments. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36: 707-714.
- BOLOGNANI FANTIN A.M., L. BENEDETTI, L. BOLOGNANI & E. OTTAVIANI, 1982. The effect of lead pollution on the freshwater gastropod *Viviparus viviparus* L.: Biochemical and Histochemical features. Malacologia, 22: 19-21.
- BONNEFOY D. & A. BOURG, 1984. Estimation du fond géochimique naturel dans les sols et évaluation du niveau de pollutions dues aux activités humaines: Cas du bassin versant de l'Orne, affluent de la Moselle. Rapport BRGM 84 SGN 169 GMX, 49p + Annexes et planches.
- BOUDOU A., 1982. Recherches en écotoxicologie expérimentale sur les processus de bioaccumulation et de transfert des dérivés du mercure dans les systèmes aquatiques continentaux. Thèse d'état, Bordeaux I, 297 p.
- BOURGOIN B.P., 1990. *Mytilus edulis* shell as bioindicator of lead pollution: considerations on bioavailability and variability. Mar. Ecol. Prog. Ser., 61: 253-262.

- BOUSTRON C., 1987. Changes of lead, cadmium, zinc and copper concentrations in antarctic ice during the last 30000 years. In 6th International Conference "Heavy metals in the environment" New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburgh .
- BOUSTRON C., 1988. Le plomb dans l'atmosphère. La recherche, 19, 198: 446-455.
- BOYDEN C.R., 1974. Trace element content and body size in molluscs. Nature, 251: 311-314.
- BOYDEN C.R., 1977. Effect of size upon metal content of shellfish. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 57: 675-714.
- BOYDEN C.R. & D.J.H. PHILLIPS, 1981. Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oysters and their implications for indicator studies. Mar. Ecol. Prog. Ser., 5: 29-40.
- BOYLE E.A., 1987. Evolution of anthropogenic lead in the ocean. In 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburg.
- BREDER R., H.W. NÜRNBERG, J. GOLIMOWSKY & M. STOEPLER, 1985. Toxic metal levels in the river rhine. In: Pollutants and their ecotoxicological significance: 205-225, NÜRNBERG H.W. (ed.), WILEY & Sons Ltd.
- BROWN B.E., 1978. Lead detoxification by a copper-tolerant isopod, Nature, 276 : 388-390.
- BROWN B.E., 1982. The form and function of metal-containing granules in invertebrate tissues. Biol. Rev., 57: 621-667.
- BRÜGMAN L., 1988. Some peculiarities of the trace metal distribution in baltic waters and sediments. Mar. Chem., 23: 425-440.
- BRYAN G.W., 1971. The effects of heavy metals (other than mercury) on marine and estuarine organisms. Proc. Roy. Soc. Lond., 177: 389-410.
- BRYAN G.W., 1973. The occurrence and seasonal variation of trace metals in the scallops *Pecten maximus* (L.) and *Chlamys opercularis* (L.). J. Mar. Biol. Ass. U. K., 53: 145-166.
- BRYAN G.W., 1976. Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms, In: Effects of pollutants on aquatic organisms: 7-35, A.P.M. Lockwood (ed.). University Press, Cambridge.
- BUFFLE J., A. TESSIER & W. HAERDI, 1984. Interpretation of trace metal complexation by aquatic organic matter. In: Complexation of trace metals in natural waters, Part V: Interaction with organics: 301-314, KRAMER C.J.M. & J.C. DUINKER (eds.), NIJHOFF & JUNK, The Hague.
- BUSS J.S. & J.E. GIBSON, 1979 Cités par VIARENGO, 1985.
- CAIRNS J., A.G. HEATH & B.C. PARKER, 1975. Temperature influence on toxicity of chemicals to aquatic organisms. J. Wat. Pollut. Control Fed., 47: 267-280.
- CAMPBELL J.H. & R.D. EVANS, 1987. Inorganic and organic ligand binding of lead and cadmium and resultant implications for bioavailability. Sci. Total. Environ., 62: 219-227.

- CAMPBELL P.G.C. & A. TESSIER, 1984. Determination of the complexation capacity of natural waters using metal solubilization technics, in: Complexation of trace metals in natural waters: 67-81, KRAMER C.J.M. & J.C. DUINKER (eds.), NIJHOFF & JUNK, the Hague.
- C.E.E., 1975. Directives du conseil concernant la qualité requise des eaux superficielles destinées à la production d'eau alimentaire dans les états membres (75/440/C.E.E.). J. O. Comm. Eur., L194: 26-31.
- C.E.E., 1976. Directives du conseil concernant la pollution causée par certaines substances dangereuses déversées dans le milieu aquatique de la communauté (76/464/C.E.E.). J. O. Comm. Eur., L129: 23-29.
- C.E.E., 1980. Directives du conseil relatives à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (80/778/C.E.E.). J. O. Comm. Eur., L229: 11-29.
- C.E.E., 1986. Directives du conseil relatives à la protection de l'environnement et notamment des sols lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture (86/278/C.E.E.). J. O. Comm. Eur., L181: 6-12.
- CHABERT D. & N. VICENTE, 1980. Corrélation entre la concentration en plomb chez un mollusque gastéropode *Monadonta turbinata* (Born) et la température de l'eau de mer. C. R. Acad. Sc. Paris, Sér. D, 290: 363-366.
- CHAN H.M., 1988. Accumulation and tolerance to cadmium, copper, lead and zinc by the green mussel *Perna viridis*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 48: 295-303.
- CHENG T.C. & J.T. SULLIVAN, 1984. Effects of heavy metals on phagocytosis by Molluscan Hemocytes. Mar. Environ. Res., 14: 305-315.
- CHOIE D.D. & G.W. RICHTER, 1974. Cell proliferation in mouse kidney induced by lead, I: Synthesis of desoxyribonucleic acid. Lab. Invest., 30: 352- .
- COOMBS T.L., 1977. Uptake and storage mechanisms of heavy metals in marine organisms. Proc. Analyt. Div. Chem. Soc., 14: 219-222.
- COSSA D., E. BOURGET, D. POULIOT, J. PIUZE & J.P. CHANUT, 1980. Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal content and body weight in *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 58: 7-14.
- COSSON R.P., 1987. Influence des pratiques agricoles sur la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds: Approche écotoxicologique. Thèse d'état, Paris-Sud (Orsay), 275 p. + Annexes.
- DEL RAMO J., J. DIAZ-MAYANS, A. TORREBLANCA & A. NUNEZ, 1987. Effects of temperature on acute toxicity of heavy metals (Cr, Cd and Hg) to the freshwater crayfish, *Procambrus clarkii* (Girard). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38: 736-741.
- DENTON G.R.W. & C. BURDON-JONES, 1981. Influence of temperature and salinity on the uptake, distribution and depuration of mercury, cadmium and lead by the Black-lip oyster *Saccostrea echinata*. Mar. Biol., 64: 317-326.
- DOHERTY F.G., D.S. CHERRY & J. CAIRNS, 1987. Valve closure responses of the asiatic clam *Corbicula fluminea* exposed to cadmium and zinc. Hydrobiol., 153: 159-167.
- EBERSVEILLER N., 1988. Etude quantitative du taux de filtration de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Influence des métaux (zinc et cuivre). Mémoire DEA, Univ. Metz, 74 p.

- EICHHORM G.L., 1973. Complexes of polynucleotides and nucleic acids, In: Inorganic biochemistry, vol.2: 1210-1245, EICHHORM G.L. (eds.), Elsevier, Amsterdam.
- EISLER R., 1977. Acute toxicities of selected heavy metals to the softshell clam *Mya arenaria*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 17: 137-145.
- ELDON J., M. PEKKARINEN & R. KRISTOFFERSON, 1980. Effect of low concentrations of heavy metals on the bivalve *Macoma balthica*. Ann. Zool. Fennici, 17: 233-242.
- ELLIOTT N.G., R. SWAIN & D.A. RITZ, 1985. The influence of cyclic exposure on the accumulation of heavy metals by *Mytilus edulis planatus* (Lamarck). Mar. Environ. Res., 15: 17-30.
- ELLIOTT N.G., R. SWAIN & D.A. RITZ, 1986. Metal interaction during accumulation by the mussel *Mytilus edulis planatus*. Mar. Biol., 93: 395-399.
- EVERARD M. & P. DENNY, 1984. The transfer of lead by freshwater snails in Ullswater, Cumbria. Environ. Pollut. ser. A., 35: 299-314.
- FARKAS W.R., 1968 ; FARKAS W.R. & al., 1971, cités par VALLEE B.L. & D.D. ULMER, 1972.
- FARRINGTON J.W., E.D. GOLDBERG, R.W. RISEBROUGH, J.H. MATIN & V.T. BOWEN, 1983. U.S. "Mussel watch" 1976-1978 : An overview of the trace metal, DDE, PCB, Hydrocarbon and artificial radionuclide data. Environ. Sci. Technol., 17, 8: 490-496.
- FAUCHERRE J., A.M. PINART, J. PINART & A. DUTOT, 1985. A regional case study of the pollution of natural waters, soils and plants by lead, cadmium and zinc. In: Pollutants and their ecotoxicological significance: 189-205, NÜRNBERG H.W. (ed.), WILEY & Sons Ltd.
- FERARD J.F., 1987. Aspects de la toxicité et de la biosorption du cadmium chez l'algue *Chlorella vulgaris*. Thèse d'état, Metz, 222 p.
- FISCHER H., 1988. *Mytilus edulis* as quantitative indicator of dissolved cadmium. Final study and synthesis. Mar. Ecol. Prog. Ser., 48: 163-174.
- FORESTER A.J., 1980. Monitoring the bioavailability of toxic metals in acid stressed shield lakes using pelecypod molluscs (Clams, Mussels), In: Trace substances in environmental health XIV: 142-147, HEMPHILL D.D. (ed.), University of Missouri, Columbia.
- FORESTER A.J., 1981. Unionacean clams as indicators of persistent substances in freshwater, In: Ecotoxicology and the aquatic environment: 37-42, STOCKES P.M.(eds.), Pergamon Press, Oxford.
- FÖRSTNER U. & G.T.W. WITTMAN, 1981. Metal pollution in the aquatic environment. 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin: 485 p.
- FOSTER R.B. & J.M. BATES, 1978. Use of freshwater mussels to monitor point source industrial discharges, Environ. Sci. Technol., 12: 958-962.
- FOWLER B.A., 1978. General subcellular effects of lead, mercury, cadmium and arsenic. Environ. Health. Perspect., 22: 37-41.
- FOWLER S.W., M. HEYRAUD & J. La ROSA, 1978. Factors affecting methyl and inorganic mercury dynamics in mussels and shrimp. Mar. Biol., 46: 267-276.
- FRANCE ENVIRONNEMENT (Ministère), 1974. La pollution par le plomb et ses dérivés. Documentation française, Paris: 138 p.

- FRIDOVICH I., 1978. The biology of oxygen radicals, Science, **201**: 875-879.
- GANTER P. & G. JOLLES, 1970. Histochimie normale et pathologique. Tome 2, Gauthier-Villars, Paris: 999-1001.
- GARRELS R.M., F.T. Mc KENZIE & C. HUNT, 1975, cités par MOORE J.W. & S. RAMAMOORTHY, 1984.
- GEORGE S.G., 1980. Correlation of metal accumulation in mussels with the mechanisms of uptake, metabolism and detoxification: A review. Thalassia Jugoslavica, **16**: 347-365.
- GEORGE S.G., 1981. Pathways of heavy metal metabolism in marine shellfish. In: Proc. Internat. Conf. "Heavy metals in the environment". Amsterdam.
- GEORGE S.G., 1982. Subcellular accumulation and detoxication of metals in aquatic animals. In: Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity: 3-52, VERNBERG W.B., A. CALABRESE, F.P. THURBERG & F.J. VERNBERG (eds.), Academic Press, N.Y.
- GEORGE S.G., 1983. Heavy metal detoxication in the mussel *Mytilus edulis*. Composition of Cd Containing kidney granules (tertiary lysosomes). Comp. Biochem. Physiol., **76**: 53-57.
- GEORGE S.G., E. CARPERE, T.L. COOMBS, J. OVERNELL & A. YOUNGSON, 1979. Characterisation of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L.), exposed to cadmium. Biochim. Biophys. Acta, **580**: 225-233.
- GEORGE S.G. & T.L. COOMBS, 1977. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. Mar. Biol., **39**: 261-268.
- GEORGE S.G. & B.J.S. PIRIE, 1979. The occurrence of cadmium in subcellular particles in the kidney of the marine mussels *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. Biochim. Biophys. Acta, **580**: 234-244.
- GEORGE S.G. & B.J.S. PIRIE, 1980. Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus edulis* (L.): A combined ultrastructural and biochemical study. J. Mar. Biol. Ass. U. K., **60**: 575-590.
- GEORGE S.G., B.J.S. PIRIE, A.R. CHEYNE, T.L. COOMBS & P.T. GRANT, 1978. Detoxication of metals by marine bivalves: An ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*. Mar. Biol., **45**: 147-156.
- GEORGE S.G., B.J.S. PIRIE & T.L. COOMBS, 1976. The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxide in *Mytilus edulis* (L.) and its distribution in the tissues. J. exp. mar. Biol. Ecol., **23**: 71-84.
- GEORGE S.G., B.J.S. PIRIE & T.L. COOMBS, 1977. Metabolic characteristics of endocytosis of ferritin by gills of a marine bivalve mollusc. Biochem. Soc. Trans., **5**: 136-137.
- GEORGE S.G. & A. VIARENGO, 1985. A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussels, In: Marine pollution and physiology: Recent advances: 125-143, VERNBERG F.J., F.P. THURBERG, A. CALABRESE & W. VERNBERG (eds.), Univ. South Carolina Press, Columbia.
- GIAMBERINI L., 1987. Bioaccumulation de microparticules métalliques par la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Mémoire de DEA, Metz, 53 p + Annexes.



- GILFILLAN E.S., D.S. PAGE, D. VALLAS, L. GONZALES, E. PENDERGAST, J.C. FOSTER & S.A. HANSON, 1985. Relationship between glucose-6-phosphate dehydrogenase and aspartate amino transferase activities, scope for growth and body burden of Ag,Cd,Cu,Cr, Pb and Zn in populations of *Mytilus edulis* from a polluted estuary, In: Marine pollution and physiology: Recent advances :107-124, VERNBERG F.J., F.P. THURBERG, A. CALABRESE & W. VERNBERG (eds.), Univ. South Carolina Press, Columbia.
- GIRAUD A.S., L.K. WEBSTER, J.G. FABRIS, L.C. COLLETT & N.D. YEOMANS, 1986. Absence of histopathological response to cadmium in gill and digestive diverticula of the mussel *Mytilus edulis*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **36**: 146-149.
- GOLDBERG E.D., 1975. The mussel watch. A first step in global marine monitoring. Mar. Pollut. Bull., **6**: 111- .
- GOLDBERG E.D., V.T. BOWEN, J.W. FARRINGTON, G. HARVEY, J.H. MARTIN, P.L. PARKER, R.W. RISEBROUGH, W. ROBERTSON, E. SCHNEIDER & E. GAMBLE, 1978. The mussel watch. Environ. Conserv. **5**, 2: 101-126.
- GOYER R.A., 1971, cité par FOWLER B.A., 1978.
- GRANEY R.L., D.S. CHERRY & J. CAIRNS, 1983. Heavy metal indicator potential of the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) artificial stream system. Hydrobiol., **102**: 81-88.
- GUTIERREZ-GALINDO E.A., 1980 a. Etude de l'accumulation du cadmium par la moule *Mytilus edulis* en présence d'EDTANa2 et de phosphate. Rev. Int. Océanogr. Med., **LIX**: 41-45.
- GUTIERREZ-GALINDO E.A., 1980 b. Etude de l'élimination du cadmium par *Mytilus edulis* en présence d'EDTA et de phosphate. Chemosphère, **9**: 495-500.
- GUTNECHT J., 1981. Inorganic mercury ( $Hg^{2+}$ ) transport through lipid bilayer membranes. J. Membrane Biol., **6**: 61-66.
- HARVEY R.W. & S.N. LUOMA, 1985. Separation of solute and particulate vectors of heavy metal uptake in controlled suspension-feeding experiments with *Macoma balthica*. Hydrobiol., **121**: 97-102.
- HEBERT P.D.N., B.W. MUNCASTER & G.L. MACKIE, 1989. Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the Great Lakes. Can. J. Fish. Aquat. Sci., **46**, 9: 1587-1591.
- HEMELRAAD J., D.A. HOLWERDA & D.I. ZANDEE, 1986 a. Cadmium kinetics in freshwater clams.I: The pattern of cadmium accumulation in *Anodonta cygnea*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **15**: 1-7.
- HEMELRAAD J., D.A. HOLWERDA, K.J. TEERDS, H.J. HERWIG & D.I. ZANDEE, 1986 b. Cadmium kinetics in freshwater clams. II: A comparative study of cadmium uptake and cellular distribution in the unionidae *Anodonta cygnea*, *Anodonta anatina* and *Unio pictorum*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **15**: 9-21.
- HEMELRAAD J., H.A. KLEINVELD, A.M. de ROOS, D.A. HOLWERDA & D.I. ZANDEE, 1987. Cadmium kinetics in freshwater clams. III: Effects of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., **16**: 95-101.

- HEMELRAAD J. & H.J. HERWIG, 1988. Cadmium kinetics in freshwater clams. IV: Histochemical localization of cadmium in *Anodonta cygnea* and *Anodonta anatina* exposed to cadmium chloride. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 17: 333-343.
- HERWIG H.J., F. BRANDS, E. KRUITWAGEN & D.I. ZANDEE, 1989. Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. Aquat. Toxicol., 15: 269-286.
- HEUILLET E., 1986. Etude des mécanismes d'accumulation et de détoxification du cadmium par *Dunaliella bioculata*, algue euryhaline prise comme modèle cellulaire. Thèse d'Université, Paris VII, 222 p.
- HOBDEN J., 1967. Iron metabolism in *Mytilus edulis*. I: Variations in total content and distribution. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 47: 597-606.
- HOLWERDA D.A., J.A. DE KNECHT, J. HEMELRAAD & P.R. VEENHOF, 1989. Cadmium kinetics in freshwater clams. Uptake of cadmium by the excised gill of *Anodonta anatina*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 42: 382-388.
- HOLWERDA D.A., J. HEMELRAAD, P.R. VEENHOF & D.I. ZANDEE, 1988. Cadmium accumulation and depuration in *Anodonta anatina* exposed to cadmium chloride or cadmium-EDTA complex. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 40: 373-380.
- HUBER F., U. SCHMIDT & H. KIRCHMANN, 1978, cités par MOORE J.W. & S. RAMAMOORTHY, 1984.
- HUNG Y.W., 1982. Effects of temperature and chelating agents on cadmium uptake in the american oyster. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 28: 546-551.
- IMBER B.E., J.A.J. THOMPSON & S. WARD, 1987. Metal binding protein in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* : Assessment of the protein as a biochemical environmental indicator. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 38: 707-714.
- JACKIM E., 1974. Enzyme responses to metals in fish. In: Pollution and physiology of marine organisms: 59-65, VERNBERG F.G & W.B. VERNBERG (eds.), Academic Press, N.Y.
- JACKIM E., G. MORRISON & R. STEELE, 1977. Effects of environmental factors on radiocadmium uptake by four species of marine bivalves. Mar. Biol., 40: 303-308.
- JARVIE A.W.P., R.N. MARKALL & H.R. POTTER, 1975. Chemical alkylation of lead. Nature, 255: 217-218.
- KAGI J.H.R. & M. NORDBERG, 1979, cités par ROESJADI G., 1980.
- KAITALA S., 1988. Multiple toxicity and accumulation of heavy metals in two bivalves mollusc species. Water, Sci. Technol., 20, 6/7: 23-32.
- KARBE L., N. ANTONACOPOULOS & C. SCHNIER, 1975. The influence of water quality on accumulation of heavy metals in aquatic organisms. Verh. Internat. Verein. Limnol., 19: 2094-2101.
- KLERKS P.L. & J.S. WEIS, 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: A review. Environ. Pollut., 45: 173-205.
- KRAMER K.J.M., H.A. JENNER & D. De ZWART, 1989. The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. Hydrobiol., 188/189: 433-443.

- LABORATOIRE d'ÉCOLOGIE Univ. METZ, 1981. Effets des polluants sur les écosystèmes aquatiques d'eau douce. Rapport Contrat Ministère Environnement France, Convention n° 78 139, 90 p. + Annexes.
- LABORATOIRE D'ÉCOLOGIE Univ. METZ, 1985. Répartition et passage de polluants métalliques dans divers compartiments inertes et vivants d'un cours d'eau. Rapport Contrat Ministère Environnement France, Convention n° 81 370, 511 p.
- LEGLIZE L. & C. CROCHARD, 1987. Vérification expérimentale du choix de *Dreissena polymorpha* (Lamellibranche) comme bioindicateur de contamination métallique. Naturaliste Can. (Rev. Ecol. Syst.), 114: 315-323.
- LELAND H.V., S.N. LUOMA & J.M. FIELDEN, 1979. Bioaccumulation and toxicity of heavy metals and related trace elements. J. Wat. Pollut. Contr. Fed., 51, 6: 1592-1616.
- LEVIN R., 1987. Lead in U.S. public drinking water : The benefits of reducing that exposure, In: 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburgh .
- LOBEL P.B., 1987 a. Intersite, intrasite and inherent variability of the whole soft tissue zinc concentrations of individual mussels *Mytilus edulis* : Importance of the kidney. Mar. Environ. Res., 21: 59-71.
- LOBEL P.B., 1987 b. Short-term and long-term uptake of zinc by the mussel, *Mytilus edulis* : A study in individual variability. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 16: 723-732.
- LOBEL P.B., 1988. A unique low molecular weight zinc-binding ligand in the kidney cytosol of the mussel *Mytilus edulis*, and its relationship to the inherent variability of zinc accumulation in this organism. Mar. Biol., 99: 101-105.
- LOBEL P.B., S.P. BELKHODE, S.E. JACKSON & H.P. LONGERICH, 1989. A universal method for quantifying and comparing the residual variability of element concentrations in biological tissues using 25 elements in the mussel *Mytilus edulis* as a model. Mar. Biol., 102: 513-518.
- LORING D.H. & F. PROSI, 1986. Cadmium and lead cycling between water, sediment and biota in an artificially contaminated mud flat on Borkum (F.R.G.). Wat. Sci. Technol., 18: 131-139.
- LUOMA S.N. & G.W. BRYAN, 1978. Factors controlling the availability of sediment-bound lead to the estuarine bivalve *Scrobicularia plana*. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 58: 793-802.
- MAAROUF A., 1988. Etude expérimentale de la bioaccumulation et du relargage du zinc chez *Dreissena polymorpha* (Bivalve d'eau douce). Cinétique et mécanismes de contamination et de décontamination. Thèse Doctorat Université Metz, 298 p.
- MARIGOMEZ J.A., E. ANGULO & V. SAEZ, 1986. Feeding and growth responses to copper, zinc, mercury and lead in the terrestrial Gastropod *Arion ater* (Linne). J. Moll. Stud., 52 : 68-78.
- MARIGOMEZ J.A. & M.P. IRELAND, 1990. A laboratory study of cadmium exposure in *Littorina littorea* in relation to environmental cadmium and exposure time. Sci. Total Environ., 90: 75-87.
- MARSHALL A.T. & V. TALBOT, 1979. Accumulation of cadmium and lead in the gills of *Mytilus edulis* : X Ray micro-analysis and chemical analysis. Chem.-Biol. Interact., 27: 111-123.

- MARTOJA M., C. BALLAN-DUFRANCAIS, A.Y. JEANTET, M. TRUCHET & J. COULON, 1988. Influence de la composition chimique de l'environnement sur le bivalve *Abra alba*. Etude comparative d'animaux récoltés dans des milieux naturels et d'animaux contaminés expérimentalement par un effluent industriel. Ann. Inst. Océanogr., **64**, 1: 1-24.
- MARTOJA R., C. BALLAN-DUFRANCAIS, A.Y. JEANTET, P.GOUZERH, J.C. AMIARD, C. AMIARD-TRIQUET, B. BERTHET & J.P. BAUD, 1988. Effets chimiques et cytologiques de la contamination expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg par l'argent administré sous forme dissoute et par voie alimentaire. Can. J. Fish. Aquat. Sci., **45**: 1827-1841.
- MASON A.Z. & K. SIMKISS, 1982. Cités par SIMKISS et al., 1982.
- MATSUSHITA S. & F. IBUKI, 1960, cité par VALLEE B.L. & D.D. ULMER, 1972.
- Mc CLURG T.P., 1984. A peristaltic dosing apparatus for the chronic exposure of aquatic organisms to pollutants. Water S.A., **10**, 1: 46-49.
- Mc DUFFIE B., I. EL-BARBARY, G.J. HOLLOD & R.D. TIBERIO, 1976. Trace metals in rivers. Speciation, transport and role of sediments. Trace subst. Environ. Health, **10**: 85-95.
- Mc LEESE D.W. & S. RAY, 1984. Uptake and excretion of Cd, Cd EDTA and zinc by *Macoma balthica*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **32**: 85-92.
- MESZAROS A., A.J. FRIEDLAND, L. HASZPRA, E. MESZAROS, A. LASZTITY & Zs. HORVATH, 1987. Lead and Cadmium deposition rates and temporal patterns in central Hungary. In: 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburgh.
- MEYER W., G. HARISCH & A.N. SAGREDOS, 1986. Biochemical and histochemical aspects of lead exposure in dragonfly larvae (Odonata: Anisoptera). Ecotoxicol. Environ. Safety, **11**: 308-319.
- MITCHELL S.I., 1970. cité par DENTON & BURDON-JONES, 1981.
- MIZRAHI L. & Y. ACHITUV, 1989. Effect of heavy metals ions on enzyme activity in the mediterranean mussel, *Donax trunculus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol., **42**: 854-859.
- MOORE J.F., R.A. GOYER & M. WILSON, 1973. Lead-induced inclusion bodies. Solubility, amino acid content and relationship to residual acidic nuclear proteins. Lab. Invest., **29**: 488-494.
- MOORE J.W. & S. RAMAMOORTHY, 1984. Heavy metals in natural waters. Applied monitoring and impact assessment: 100-123, DESANTO R.S. (ed.), Springer-Verlag, N.Y.
- MORRISON G.M.P., 1987. Assessment of metals species bioavailability and geochemical mobility in polluted waters. Environ. Technol. Lett., **8**: 361-372.
- MORRISON G.M.P. & D.M. REVITT, 1987. Bioavailable metal uptake rate determination in polluted waters by dialysis with receiving resins. Environ. Technol. Lett., **8**: 393-402.
- MORSE M.P., 1987. Comparative functional morphology of the bivalve excretory system. Amer. Zool., **27**: 737-746.
- MORTON B., 1969 a. Studies of the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. I. General anatomy and morphology. Proc. Malac. Soc. Lond., **38**: 301-319.

- MORTON B., 1969 b. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. II. Correlation of the rhythms of adductor activity, feeding, digestion and excretion. Proc. Malac. Soc. Lond., 38: 401-413.
- MORTON B., 1971. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. V. Some aspects of filter-feeding and the effect of micro-organisms upon the rate of filtration. Proc. Malac. Soc. Lond., 39: 289-301.
- MOTA A.M. & M.L. GONCALVES, 1990. NTA and lead speciation in natural water conditions. Water. Res., 24, 5: 587-590.
- MOUABAD A., 1986. Etude de l'activité respiratoire et filtrante de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* en présence de zinc. Mémoire DEA, Univ. Metz, 61 p.
- MOUABAD A., 1991. Toxicité comportementale et physiologique (filtration, respiration) des métaux lourds (Cu, Zn, Hg et Pb) chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* PALLAS. Extension à d'autres micropolluants. Proposition de la réponse comportementale comme critère d'évaluation de la toxicité. Thèse Doctorat Univ. Metz, 253 p.
- MOUVET C., 1984. Métaux lourds et mousses aquatiques, spéciation physico-chimique, bioaccumulation et toxicité. Thèse doctorat Sc. botaniques, Liège, 157 p.
- MOUVET C., P. CORDEBAR, B. GALLISSOT, T. PENSEL, E. LECLERCQ & M. BENYAHIA, 1986. Utilisation des mousses aquatiques pour la surveillance de micropolluants minéraux et organiques dans les eaux courantes. In: 1ère Conférence Internationale des Limnologues d'Expression Française (CILEF), Laval, Quebec, Canada.
- MUGEL M. & J.F. FERARD, 1978. Elaboration d'un modèle de chaîne trophique dulçaquicole et application à une étude ecotoxicologique du cadmium. Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, Metz, 344 p.
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (N.A.S.), 1980. The International Mussel Watch, cité par Lobel, 1989.
- NEWMAN M.C. & A.W. Mc INTOSH, 1982. The influence of lead in components of a freshwater ecosystem on Molluscan tissue lead concentrations. Aquat. Toxicol., 2: 1-19.
- NEWMAN M.C. & A.W. Mc INTOSH, 1983. Lead elimination and size effects on accumulation by two freshwater gastropods. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 12: 25-29.
- NIEBOER E. & D.H.S. RICHARDSON, 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ. Pollut. Ser.B., 1: 3-26.
- NOEL-LAMBOT F., J.M. BOUQUEGNEAU, F. FRANKENNE & A. DISTECHE, 1978. Le rôle des métallothionéines dans le stockage des métaux lourds chez les animaux marins. Rev. Int. Océanogr. Méd., XLIX: 13-20.
- NOEL-LAMBOT F., J.M. BOUQUEGNEAU, F. FRANKENNE & A. DISTECHE, 1980. Cadmium, zinc and copper accumulation in limpets (*Patella vulgata*) from the bristol channel with special reference to metallothioneins. Mar. Ecol. Prog. Ser., 2: 81-89.
- NRIAGU J.O., 1979. Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. Nature, 279: 409-411.

- NRIAGU J.O. & R.D. COKER, 1980. Trace metals in humic and fulvic acids from lake ontario sediments. Environ. Sci. Technol., 14: 443-446.
- NRIAGU J.O., H.K.T. WONG & R.D. COKER, 1981. Particulate and dissolved trace metals in lake ontario. Wat. Res., 15: 91-96.
- ORREN M.J., G.A. EAGLE, H.F-K.O. HENNIG & A. GREEN, 1980. Variations in trace metals content of the mussel *Chromomytilus meridionalis* (Kr.) with season and sex. Mar. Pollut. Bull., 11: 253-257.
- PACYNA J.M. & J. MÜNCH, 1987. Atmospheric emissions of As, Cd, Pb and Zn from industrial sources in Europe. In: 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINDBERG S.E. et T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburgh.
- PANDARD P., 1986. Importance des phénomènes de complexation sur la toxicité du cadmium, du cuivre et du zinc. Mémoire DEA, Univ. Metz, 86 p. + Annexes.
- PATTERSON C.C., D.M. SETTLE & B. GLOVER, 1976. Analysis of lead in polluted coastal seawater. Mar. Chem., 4: 305-319.
- PATTERSON C.C. & D.M. SETTLE, 1987. Geographic relationships between sources of industrial lead emissions and eolian deposition fluxes around the globe. In: 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburgh.
- PENNING W. & P. SCOPPA, 1977, cités par VIARENGO A., 1985.
- PERTOLDI MARLETTA G., L. FAVRETTO GABRIELLI & L. FAVRETTO, 1979. Pollution of mussels by particulate lead from seawater. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 168: 181-184.
- PFEIFFER W.C., M. FISZMAN, O. MALM & J. MAURICIO, 1986. Heavy metals pollution in the Paraíba do sul river, Brazil. Sci. Tot. Environ., 58: 73-79.
- PHILLIPS D.J.H., 1976 a. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I: Effects of environmental variables on uptake of metals. Mar. Biol., 38: 59-69.
- PHILLIPS D.J.H., 1976 b. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. II: Relationship of metals in the mussels to those discharged by industry. Mar. Biol., 38: 71-80.
- PHILLIPS D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. A review. Environ. Pollut., 13: 281-317.
- PHILLIPS D.J.H., 1978. The common mussel *Mytilus edulis* as an indicator of trace metals in Scandinavian waters. II. Lead, Iron and manganese. Mar. Biol., 46: 147-156.
- PHILLIPS D.J.H. & P.S. RAINBOW, 1988. Barnacles and mussels as biomonitors of trace elements: a comparative study. Mar. Ecol. Prog. Ser., 49: 88-93.
- PIHAN J.C., A. GUCKERT & J.L. MOREL, 1987. Intérêt de l'étude de la contamination par les métaux lourds de la production agricole irriguée par les eaux résiduaires. Sci. Eau., 6, 3: 367-373.

- PIHAN J.C., C. CROCHARD, M. BENYAHIA, L. GIAMBERINI, A. MAAROUF, A. MOUABAD & J.L. TOURMANN, 1988. Etude écotoxicologique in vitro du zinc et du plomb chez le mollusque d'eau douce *Dreissena polymorpha* Pallas (Cinétiques d'accumulation et de relargage. Voies de pénétration, excrétion. Incidence sur l'activité respiratoire et filtrante, microanalyse). In: 2ème Conférence Internationale des Limnologues d'Expression Française (CILEF). Aussois, France.
- POPHAM J.D. & J.M. D'AURIA, 1981. Statistical models for estimating seawater metal concentrations from metal concentrations in mussels (*Mytilus edulis*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 27: 660-670.
- POPHAM J.D. & J.M. D'AURIA, 1982. Effects of season and seawater concentration on trace metal concentrations in organs of *Mytilus edulis*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 11: 273-282.
- POPHAM J.D. & J.M. D'AURIA, 1983. Statistical approach for deciding if mussels (*Mytilus edulis*) have been collected from a water body polluted with trace metals. Environ. Sci. Technol., 17: 576-582.
- POPHAM J.D. & J.M. D'AURIA, 1983. Combined effect of body size, season and location on trace element levels in mussels (*Mytilus edulis*). Arch. Environ. Contam. Toxicol., 12: 1-14.
- RASPOR B., H.W. NÜRNBERG, P. VALENTA & M. BRANICA, 1984. Significance of dissolved humic substances for heavy metal speciation in natural waters. In: Complexation of trace metals in natural waters: 317-327, KRAMER C.J.M. & J.C. DUINKER (eds.). NIJHOFF & JUNK, The Hague.
- RAVERA O., A. CARTISANO, R. DE BERNARDI & L. GUZZI, 1973. Effects of chelating agents (EDTA and SNTA) on the incorporation of radionuclides by freshwater filter-feeding organisms (copepod and lamellibranch). In: Atti. 5° Coll. int. oceanogr. med. Messina: 437-448.
- RAVERA O., 1974. Lead pollution in air and water. Bull. FEPE, 21: 46-54.
- REEDERS H.H. & A. BIJ de VAATE, 1990. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): A new perspective for water quality management. Hydrobiol., 200/201: 437-450.
- REID N.W. & M.A. LUSIS, 1987. The deposition of heavy metals and acidity in ontario. In: 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburgh .
- RHYNE B.C. & R.A. GOYER, 1971, cités par FOWLER B.A., 1978.
- RIISGARD H.U., E. BJORNSTAD & F. MOHLENBERG, 1987. Accumulation of Cd in the mussel *Mytilus edulis*: Kinetics and importance of uptake via food and seawater. Mar. Biol., 96: 349-353.
- ROBBE D., 1981. Pollutions métalliques du milieu naturel. Guide méthodologique de leur étude à partir des sédiments. Rapport bibliographique. Rapport de recherche LPC n°104, Lab. Cent. Ponts et Chaussées: 88 p.
- ROBINSON W.E., M.P. MORSE, B.A. PENNEY, J.P. KAKAREKA & E.U. MEYHÖFER, 1985. The eulamellibranch *Mercenaria mercenaria*(L): A review and current data on metals accumulation and the internal transport of cadmium. In: Marine pollution and physiology: Recent advances: 83-106, VERNBERG F.J., F.P. THURBERG , A. CALABRESE & W. VERNBERG (eds.), Univesity of South Carolina Press.

- ROESIJADI G., 1980. The significance of low molecular weight metallothionein-like proteins in marine invertebrates: current status. Mar. Environ. Res., 4: 167-179.
- ROESIJADI G., 1982. Uptake and incorporation of mercury into mercury binding proteins of gills of *Mytilus edulis* as a function of time. Mar. Biol., 66: 151-157.
- ROESIJADI G. & P.L. KLERKS, 1989. Kinetic analysis of cadmium binding to metallothionein and other intracellular ligands in oyster gills. J. Exp. Zool., 251: 1-12
- SALANKI J. & K. V.-BALOGH, 1989. Physiological background for using freshwater mussel in monitoring copper and lead pollution. Hydrobiol., 188/189: 445-454.
- SCHMIDT U. & F. HUBER, 1976. Methylation of organolead and lead (II) compounds to  $(CH_3)_4 Pb$  by microorganisms. Nature, 259: 157-158.
- SCHROEDER W.H., 1987. The roles of the atmosphere in influencing the pathways and fate of heavy metals in the environment. An overview, In: 6th International Conference "Heavy metals in the environment", New Orleans, LINGDBERG S.E. & T.C. HUTCHINSON (eds.), C.E.P. Consultant, Edinburgh.
- SCHULZ-BALDES M., 1974. Lead uptake from seawater and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 25: 177-193.
- SCHULZ-BALDES M., 1977. Lead transport in the common mussel *Mytilus edulis*. In: Physiology and behaviour of marine organisms: 211-218, Mc LUSKY D.S. & A.J. BERRY (eds.), Pergamon Press, Oxford.
- SIMKISS K., 1979. Metal ions in cells. Endeavour, 3: 2-6.
- SIMKISS K., 1981. Cellular discrimination processes in metal accumulating cells. J. Exp. Biol., 94: 317-327.
- SIMKISS K., 1983. Lipid solubility of heavy metals in saline solutions. J. Mar. Biol. Ass. U.K., 63: 1-7.
- SIMKISS K., 1984. Effects of metal ions on respiratory structures. In: Toxins, drugs and pollutants in marine animals: 137-148, BOLIS L., J. ZADUNAISKY & R. GILLES (eds.), Springer-Verlag, Berlin.
- SIMKISS K. & A.Z. MASON, 1984. Cellular responses of molluscan tissues to environmental metals. Mar. Environ. Res., 14: 103-118.
- SIMKISS K., M. TAYLOR & A.Z. MASON, 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. Mar. Biol. Lett., 3: 187-201.
- SIMKISS K. & B. WATKINS, 1988, Metal ion activities in oscillating temperatures. Mar. Environ. Res., 24: 125-128.
- SIMPSON R.D., 1979. Uptake and loss of zinc and lead by mussels (*Mytilus edulis*) and relationships with body weight and reproductive cycle. Mar. Pollut. Bull., 10: 74-78.
- SLOOFF W., D. DE ZWART & J.M. MARQUENIE, 1983. Detection limits of a biological monitoring system for chemical water pollution based on mussel activity. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30: 400-405.
- SPEHAR R.L., R.L. ANDERSON & J.T. FIANDT, 1978. Toxicity and bioaccumulation of cadmium and lead in aquatic invertebrates. Environ. Pollut., 15: 195-206.



- SPRUNG M. & U. ROSE, 1988, Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. Oecologia, 77: 526-532.
- S.-ROZSA K. & J. SALANKI, 1990. Heavy metals regulate physiological and behavioral events by modulating ion channels in neuronal membranes of molluscs. Environ. Monitor. Assess., 14: 363-375.
- STANCZYKOWSKA A., 1964. On the relationship between abundance, aggregation and condition of *Dreissena polymorpha* (Pallas) in 36 Mazurian lakes, Ekol. Pol., 12, 34: 653-690.
- STANCZYKOWSKA A., 1968. The filtration capacity of *Dreissena polymorpha* (Pallas) in different lakes as a factor affecting circulation of matter in the lake. Ekol. Pol., B, 14: 265-270.
- STANCZYKOWSKA A., 1977. Ecology of *Dreissena polymorpha* (Pallas) in lakes. Pol. Arch. Hydrobiol., 24, 4: 461-530.
- STEPHENSON R.R. & D. TAYLOR, 1975. The influence of EDTA on the mortality and burrowing activity of the clam (*Venerupis decussata*) exposed to sublethal concentrations of copper. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 14: 304-308
- STURESSON U., 1976. Lead enrichment in shells of *Mytilus edulis*. Ambio, 5: 253-256.
- TALBOT V., 1987. Relationship between lead concentrations in seawater and in the mussel *Mytilus edulis*: a water quality criterion. Mar. Biol., 94: 557-560.
- TAN W.H. & L.H. LIM, 1984. The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis*. Aquaculture, 42: 317-332.
- TEN WINKEL E.H. & C. DAVIDS, 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca: Bivalvia). Freshwat. Biol., 12: 553-558.
- TESTARD P., 1991. Eléments d'écologie du lamellibranche invasif *Dreissena polymorpha* Pallas. Etude de la dispersion des larves en région parisienne et de leur fixation. Réponses à la désoxygénation de l'eau. Thèse d'Etat, Paris VI, 358 p.
- TESSIER A. & P.G.C. CAMPBELL, 1987. Partitioning of trace metals in sediment: Relationship with bioavailability. Hydrobiol., 149: 43-52.
- THOMPSON J.A.J. & J.A. CRERAR, 1980. Methylation of lead in marine sediment. Mar. Pollut. Bull., 11: 251-253.
- TOURARI A., 1988. Effets de l'échauffement des eaux sur le cycle de reproduction de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (Bivalve: Dreissenidae). Etude in situ et en laboratoire: Aspects histologiques, histochimiques et biologiques. Thèse Doctorat Univ. Metz, 230p.
- VALLEE B.L. & D.D. ULMER, 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium and lead. Ann. Rev. Biochem., 41: 91-128.
- VAN DOLAH F.M., T.C. SIEWICKI, G.W. COLLINS & J.S. LOGAN, 1987. Effects of environmental parameters on the elimination of cadmium by eastern oysters, *Crassostrea virginica*. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 16: 733-743.
- VIARENGO A., 1985. Biochemical effects of trace metals. Mar. Pollut. Bull., 16: 153-158.

- VIARENGO A., G. MANCINELLI, M. ORUNESU, G. MARTINO, F. FARANDA & A. MAZZUCOTELLI, 1988. Effects of sublethal copper concentration, temperature, salinity and oxygen levels on calcium content and cellular distribution of copper in the gills of *Mytilus galloprovincialis* Lam.: A multifactorial experiment. Mar. Environ. Res., **24**: 227-231.
- VIARENGO A., M.N. MOORE, G. MANCINELLI, A. MAZZUCOTELLI, R.K. PIPE & S.V. FARRAR, 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: The effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. Mar. Biol., **94**: 251-257.
- VIARENGO A., S. PALMERO, G. ZANICCHI, R. CAPELLI, R. VAISSIERE & M. ORUNESU, 1985. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* (L.). Mar. Environ. Res., **16**, 4: 23-26.
- VIARENGO A., M. PERTICA, G. MANCINELLI, R. CAPELLI & M. ORUNESU, 1980. Rapid induction of copper-binding protein in the gills of metal exposed mussels. Comp. Bioch. Physiol., **67**: 215-218.
- VIARENGO A., M. PERTICA, G. MANCINELLI, S. PALMERO, G. ZANICCHI, M. ORUNESU, 1982. Evaluation of general and specific stress indices in mussels collected from populations subjected to different levels of heavy metal pollution. Mar. Environ. Res., **6**: 235-243.
- WALTON J.R., 1973. Granules containing lead in isolated mitochondria. Nature, **243**: 100-101.
- WALZ N., 1978. The energy balance of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* PALLAS in laboratory experiments and in lake constance. I. Pattern of activity, feeding and assimilation efficiency. Arch. Hydrobiol., **1**: 83-105.
- WARREN C.E. & G.E. DAVIS, 1971. Laboratory stream research: Objectives, possibilities and constraints. Ann. Rev. Ecol. Syst., **2**: 111-144.
- WATKINS B. & K. SIMKISS, 1988. The effect of oscillating temperatures on the metal ion metabolism of *Mytilus edulis*, J. Mar. Biol. Ass. U.K., **68**: 93-100.
- WATLING H., 1981. The effects of metals on mollusc filtering rates. Trans. Roy. Soc. S. Afr., **44**: 441-451.
- WEINBERG E.D., 1978. Iron and infection. Microbiol. Rev., **42**: 45-66.
- WHITE C. & G.M. GADD, 1987. Inhibition of H<sup>+</sup> efflux and K<sup>+</sup> uptake, and induction of K<sup>+</sup> efflux in yeast by heavy metals. Toxic. Assess., **2**: 437-447.
- WIDDOWS J., 1973. Effect of temperature and food on the heart beat, ventilation rate and oxygen uptake of *Mytilus edulis*. Mar. Biol., **20**: 269-276.
- WILLIAMS R.J.P., 1981. Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. Phil. Trans. R. Soc. Lond., **294**: 57-74.
- ZAROOGIAN G.E. & S. CHEER, 1976. Accumulation of cadmium by the american oyster, *Crassostrea virginica*. Nature, **261**: 408-409.
- ZAROOGIAN G.E., G. MORRISON & J.F. HELTSHE, 1979. *Crassostrea virginica* as an indicator of lead pollution. Mar. Biol., **52**: 189-196.

**ANNEXES.**

**ANNEXE I: Concentrations en Pb dans les dreissenes pour les diverses conditions de contamination.**

**Pb en ug/g dans dreissenes pdt INTOX.**

**Pb 250-500-1000-1500 ug/l**

Temps jours	Pb 250		Pb 500		Pb 1000		Pb 1500	
	Moy	s	Moy	s	Moy	s	Moy	s
0	8.6	1.5	8.6	1.5	8.6	1.5	8.6	1.5
1	39	6.8	50	10	83	16	103	21
3	42	8.1	121	23	145	28	624	118
6	66	20	157	47	302	92	790	237
9	132	50	208	79	536	207	732	285
12	208	90	263	120	602	280	809	370
15	209	104	360	190	699	370	852	446
18	232	110	466	223	821	397	860	412
21	296	130	563	253	937	427	1029	460
27	400	156	590	235	970	388	1100	450

**Pb en ug/g dans dreissenes pdt INTOX.**

**Pb 250-(Pb250+EDTA2uM)-Pb1500-(Pb1500+EDTA10uM.)**

Temps Jours	Pb 250		Pb250 + EDTA2uM		Pb 1500		Pb1500 +EDTA10uM	
	Moy.	s.	Moy	s.	Moy.	s.	Moy.	s.
0	8.6	1.5	8.6	1.5	8.6	1.5	8.6	1.5
1	39	6.8	15	5	103	21	26	10
3	42	8.1	13	2	824	118	25	8
6	66	20	24	7	790	237	35	13
9	132	50	32	10	732	285	52	25
12	208	90	35	11	809	370	60	29
15	209	104	43	19	852	446	108	44
18	232	110	50	21	860	412	121	53
21	296	130	50	20	1029	460	124	52
27	400	156	131	44	1100	450	257	119

**Pb en ug/g dans dreissenes pdt INTOX.**

**Temoin-(Pb250ug/l+EDTA2uM)-(Pb1500ug/l+EDTA10uM.)**

Temps jours	TEMOIN		Pb250 +EDTA 2uM		Pb1500 +EDTA 10uM	
	Moy.	s	Moy.	s.	Moy.	s.
0	8.6	1.5	8.6	1.5	8.6	1.5
1	5.7	1.3	15	5	26	10
3	7.0	1.0	13	2	25	8
6	6.4	2.6	24	7	35	13
9	6.0	3.0	32	10	52	25
12	9.5	1.3	35	11	60	29
15	10.0	4.0	43	19	108	44
18	6.2	0.0	50	21	121	53
21	10.0	3.0	50	20	124	52
27	14.0	5.0	131	44	257	119

**Pb en ug/g dans dreissenes pdt INTOX.**

**Pb 1000 ug/l dans les 3 unites exp.**

Temps jours	TEMOIN		Pb 1 unite 1		Pb 1 unite 2		Pb 1 unite 3	
	Moy	s	Moy	s	Moy	s	Moy	s
0	10.0	1.5	10.0	1.5	10.0	1.5	10.0	1.5
3	9.9	0.6	372	63	469	80	414	70
6	6.0	0.0	539	110	581	120	503	103
9	4.7	0.9	603	180	604	182	560	168
12	3.5	1.4	642	258	623	251	580	234
15	2.7	0.1	589	226	624	240	640	245
18	3.6	1.2	629	233	673	250	643	246
21	7.3	0.9	672	216	630	202	643	207

Pb en ug/g dans dresseines pdt INTOX.  
 Pb1000+EDTA20uM dans les 2 unites exp.

Temps jours	TEMOIN		Pb+EDTA unite 1		Pb+EDTA unite 2	
	Moy	s	Moy	s	Moy	s
0	10.0	1.5	10.0	1.5	10.0	1.5
3	9.9	0.6	22.6	4.6	18.0	3.7
6	6.0	0.0	16.0	3.2	18.3	3.8
9	4.7	0.9	18.0	5.4	18.2	3.4
12	3.5	1.4	18.4	6.1	19.3	6.8
15	2.7	0.1	18.2	5.3	20.3	6.1
18	3.6	1.2	25.2	8.4	33.9	11.2
21	7.3	0.9	22.7	6.3	19.5	5.8

Pb en ug/g dans dresseines pdt INTOX.  
 Moy. des 3 essais Pb 1000ug/l  
 & 2 essais Pb1000+EDTA20uM.

Temps jours	TEMOIN		Pb1000 moy/3 essais		Pb+EDTA moy/2essais	
	Moy.	s	Moy.	s	Moy.	s
0	10.0	1.5	10.0	1.5	10.0	1.5
3	9.9	0.6	418	71	20.3	4.2
6	6.0	0.0	341	111	17.1	3.5
9	4.7	0.9	389	177	15.6	4.7
12	3.5	1.4	613	248	18.9	6.3
15	2.7	0.1	617	237	19.2	5.8
18	3.6	1.2	655	243	29.3	10.0
21	7.3	0.9	648	208	21.1	6.0

Accumulation du Pb (1mg/l) par 3 lots de dresseines: a jeun, nourries, et nourries avec algues contaminees en Pb  
 Pb en ug/g poids sec.

Temps jours	Pb milieu (Nourri)		Pb milieu (a jeun)		Pb milieu +Pb Nourr.	
	moy	s	moy	s	moy	s
0	5.71	0.79	5.71	0.79	5.71	0.79
3	113	4.50	106	4.20	120	9.0
6	289	20	205	14	212	14.6
9	384	43	320	36	335	37
15	390	89	397	91	339	77
21	444	91	471	96	413	84
27	546	85	584	90	558	86
33	526	82	583	91	537	83

Accumulation du Pb par le milieu et par la nourriture.  
 Pb en ug/g poids sec.

Temps jours	TEMOIN Nourri		TEMOIN a jeun		INTOX:Pbmilieu		INTOX:PbNourrit	
	moy	s	moy	s	moy	s	moy	s
0	5.71	0.79	5.71	0.79	5.71	0.79	5.71	0.79
3	5.46	0.82	5.68	1.35	2.17	0.33	5.80	0.65
6	5.24	0.0	5.34	0.0	13.18	0.78	6.00	0.47
9	3.70	0.27	4.13	0.46	15.56	0.81	6.46	0.00
15	3.42	0.17	4.45	0.06	17.74	2.56	9.10	0.71
21	1.92	0.07	4.02	0.81	18.00	3.00	10.40	1.33
27	1.80	0.18	4.48	1.00	22.79	1.79	15.86	1.40
33	1.62	0.27	4.39	0.87	32.65	0.50	19.00	1.40

Accumulation du Pb par le milieu  
 et par la nourriture.  
 Contenu en Pb en ug.

Temps jours	TEMOIN Nourri		TEMOIN a jeun		INTOX:Pbmilieu		INTOX:PbNourrit	
	mo	si	mo	si	mo	si	mo	si
0	0.806	0.020	0.806	0.020	0.806	0.020	0.806	0.020
3	0.779	0.149	1.012	0.219	4.820	0.098	0.805	0.080
6	0.553	0.039	0.971	0.00	4.296	0.078	0.806	0.065
9	0.451	0.001	0.390	0.014	1.545	0.063	0.804	0.126
15	0.295	0.126	0.488	0.059	1.629	0.140	0.907	0.024
21	0.237	0.035	0.282	0.031	1.657	0.084	1.059	0.084
27	0.178	0.048	0.262	0.001	1.682	0.502	1.658	0.028
33	0.168	0.009	0.273	0.016	3.429	0.085	1.850	0.163

Accumulation du Pb(1 mg/l) par 3 lots  
 de dreissenes: a jeun, nourries, et  
 nourries avec algues contaminees en Pb  
 Contenu en Pb en ug.

Temps jours	Pb milieu (Nourri)		Pb milieu (a jeun)		Pb milieu +Pb Nourr.	
	mo	si	mo	si	mo	si
0	0.806	0.02	0.806	0.02	0.806	0.02
3	17.51	0.45	14.73	0.39	18.62	0.50
6	31.46	2.17	20.13	1.31	23.78	1.70
9	39.41	4.42	31.31	3.13	30.14	3.77
15	53.22	12.24	46.35	9.27	42.06	9.70
21	55.59	8.57	54.67	8.75	49.79	9.40
27	53.50	8.02	51.24	7.68	46.51	8.60
33	53.70	8.60	49.50	7.57	45.46	7.21

Concentrations en Pb en ug/g dans  
dreissenes temoins.

Exp: Septembre-Fevrier-Avril.

Temps jours	SEPTEMBRE		FEVRIER		AVRIL	
	roy	s	roy	s	roy	s
0	8.60	1.3	5.71	0.79	10.00	0.50
3	7.00	1.0	8.98	1.35	9.90	0.60
6	6.40	2.6	9.34	0.0	6.00	0.0
9	6.00	3.0	4.13	0.46	4.70	0.90
12	9.50	1.3	---	---	3.50	1.40
15	10.00	4.0	4.65	0.06	2.70	0.10
18	6.20	0.0	---	---	3.60	1.20
21	10.00	3.0	4.02	0.81	7.30	0.90
27	14.00	5.0	4.48	1.00	---	---
33	---	---	4.39	0.87	---	---

Contenus en Pb en ug dans  
dreissenes temoins.

Exp: Septembre-Fevrier-Avril.

Temps jours	SEPTEMBRE		FEVRIER		AVRIL	
	roy	s	roy	s	roy	s
0	1.073	0.107	0.806	0.020	2.119	0.181
3	1.054	0.103	1.012	0.219	2.118	0.180
6	0.764	0.233	0.971	0.00	1.334	0.118
9	0.760	0.221	0.390	0.014	1.231	0.114
12	0.551	0.103	---	---	1.083	0.161
15	0.864	0.316	0.488	0.059	0.617	0.081
18	0.722	0.0	---	---	0.688	0.064
21	0.541	0.191	0.282	0.031	0.712	0.034
27	0.577	0.195	0.262	0.001	---	---
33	---	---	0.273	0.016	---	---

Concentrations en Pb en ug/g dans  
dreissenes exposees au Pb 1ppm.

Exp: Septembre-Fevrier-Avril.

Temps jours	SEPTEMBRE		FEVRIER		AVRIL	
	roy	s	roy	s	roy	s
0	8.60	1.50	5.71	0.79	10.0	1.50
3	145	28	106	4.2	418	71
6	302	92	205	14	541	111
9	536	207	320	36	589	177
12	602	280	---	---	615	248
15	699	370	397	91	617	237
18	821	397	---	---	655	243
21	937	427	471	96	648	208
27	970	388	584	90	---	---
33	---	---	583	91	---	---

Contenus en Pb en ug dans  
dreissenes exposees au Pb 1ppm.

Exp: Septembre-Fevrier-Avril.

Temps jours	SEPTEMBRE		FEVRIER		AVRIL	
	roy	s	roy	s	roy	s
0	1.073	0.107	0.806	0.02	2.119	0.181
3	7.76	1.86	14.73	0.39	77.2	11.58
6	12.88	3.90	20.13	1.31	89.0	16.02
9	26.04	9.37	31.31	3.13	102.6	25.65
12	35.22	13.19	---	---	98.2	34.74
15	40.95	19.12	46.35	9.27	98.9	31.60
18	44.18	20.19	---	---	96.3	30.81
21	42.85	17.82	54.67	8.75	106.2	29.73
27	46.40	18.88	51.24	7.68	---	---
33	----	----	49.50	7.57	----	----

ANNEXE II: Evolution des Coefficients de Variation avec le  
le temps chez les témoins et les animaux exposés.

Evolution des C.V. en % en fonction  
du temps chez les témoins.

Exp: Sept.-Nov.-Fevr.-Avril.

Temps jours	SEPT.	NOV.	FEVRIER		AVR.
			a jeun	nourris	
0	17.4	14.0	13.8	13.8	15.0
3	14.3	1.7	15.0	11.0	6.0
6	40.6	2.5	--	--	--
9	50.0	10.8	11.1	7.3	19.1
12	13.7	14.8	--	--	40.0
15	23.5	12.2	1.3	5.0	3.7
18	--	--	--	--	33.3
21	30.0	--	20.1	3.6	12.3
27	35.7	--	22.3	10.0	--
33	--	--	19.8	16.6	--

Evolution des C.V. en % en fonction  
du temps chez les exposes au Pbipm.

Exp: Sept.-Nov.-Fevr.-Avril.

Temps jours	SEPT.	NOV.	FEV.	AVR.
0	17.4	14.0	13.8	15.0
3	19.3	4.6	3.9	17.0
6	30.4	5.8	6.8	20.5
9	38.6	7.9	11.2	30.0
12	46.5	15.0	--	40.3
15	53.0	10.0	22.9	38.4
18	48.3	--	--	37.1
21	45.6	--	20.4	32.1
27	40.0	--	15.4	--
33	--	--	15.6	--



**ANNEXE III: Concentrations en Pb dans les dreissenes pour les diverses conditions de décontamination.**

**Pb en ug/g dans dreissenes pdt DETOX.  
Intox.prealable: Pb250-Pb500-  
Pb1000-Pb1500 ug/l**

Temps jours	Pb 250		Pb 500		Pb 1000		Pb 1500	
	Moy.	s	Moy.	s	Moy.	s	Moy.	s
0	400	156	590	235	970	398	1100	450
8	458	180	666	266	1108	448	1282	512
22	339	169	465	232	1052	547	1187	417
30	254	128	458	230	798	436	993	491
40	238	140	417	250	651	390	787	470

**Fb en ug/g dans dreissenes pdt DETOX.  
Intox.prealable: Pb250-(Pb250+EDTA2uM)  
Pb1500-(Pb1500+EDTA10uM)**

Temps jours	Pb 250		Pb250 +EDTA2uM		Pb 1500		Pb1500 +EDTA10uM	
	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.
0	400	156	131	44	1100	450	257	119
8	458	180	135	66	1282	512	256	91
22	339	169	126	55	1187	617	244	66
30	254	128	109	45	893	491	228	54
40	238	140	70	28	787	470	115	51

**Pb en ug/g dans dreissenes pdt DETOX.  
Temoin-Intox.prealable: (Pb250+EDTA2uM)  
- (Pb1500+EDTA10uM)**

Temps jours	TEMOIN		Intox:Pb250 +EDTA2		Intox:Pb1500+EDTA10	
	Moy	s	Moy.	s	Moy.	s
0	14	5	131	44	257	119
8	9	5	135	66	256	91
22	11	7	126	55	244	66
30	10	4	109	45	228	54
40	12	6	70	28	115	51

**Pb en ug/g dans dreissenes pdt DETOX.  
(Intox. prealable: Pb 1000ug/l)**

Temps jours	TEMOIN		DETOX. 0		DETOX.+EDTA		DETOX.+P04	
	Moy	s	Moy	s	Moy	s	Moy	s
0	7.3	0.9	672	216	630	202	643	207
5	10.1	2.1	685	154	570	130	763	328
10	7.4	0.8	571	175	434	80	640	224
15	7.4	1.8	539	188	417	45	782	238
20	6.7	0.0	524	190	377	100	608	229
30	2.9	0.0	434	173	287	50	874	314

**Pb en ug/g dans dreissenes pdt DETOX.  
(Intox. prealable: Pb 1000+EDTA20uM)**

Temps jours	TEMOIN		DETOX. 0		DETOX.+ EDTA	
	Moy	s	Moy	s	Moy	s
0	7.3	0.9	22.7	6.3	19.5	5.8
5	10.1	2.1	25.3	2.7	21.3	4.2
10	7.4	0.8	22.8	1.6	17.7	0.2
15	7.4	1.8	19.5	0.2	15.7	0.5
20	6.7	0.0	18.0	4.0	15.5	0.0
30	2.9	0.0	15.2	3.8	11.4	0.7

ANNEXE IV: Interaction Pb-Zn sur la bioaccumulation.

Tableaux des concentrations en Pb.

Interaction Pb-Zn pdt Intox.

conc. Pb en ug/g poids sec.

Temps jours	Pb 2.5uM.		Pb 2.5uM. Zn 5 uM.		Pb 2.5uM. Zn 15 uM.		Pb 5uM.		Pb 5uM. Zn 5uM.		Pb 5uM. Zn 15uM.	
	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.
0	2.64	0.37	2.64	0.37	2.64	0.37	2.64	0.37	2.64	0.37	2.64	0.37
3	109	5	58	3	55	3	152	7	104	8	107	9
6	139	8	114	6	63	4	223	13	178	15	101	12
9	187	14	142	11	125	10	329	26	243	18	223	15
12	272	44	178	27	146	22	359	54	294	44	270	36
15	308	31	227	34	198	20	398	40	348	48	334	34

Interaction Pb-Zn - Detox.

intox. préalable: Pb2.5-Pb2.5+Zn5-  
Pb2.5+Zn15-Pb5-Pb5+Zn5-Pb5+Zn15uM

Temps jours	Pb 2.5uM.		Pb 2.5uM. Zn 5 uM.		Pb 2.5uM. Zn 15 uM.		Pb 5uM.		Pb 5uM. Zn 5uM.		Pb 5uM. Zn 15uM.	
	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.	Moy.	s.
0	308	31	227	34	198	20	398	40	348	48	334	34
4	293	31	176	15	157	13	380	40	396	50	302	30
8	254	71	155	25	129	22	325	92	337	54	250	37
12	200	60	110	23	101	20	259	79	299	72	253	51
16	123	40	---	--	---	--	---	--	264	55	192	40

Action Temperature et PO4 sur  
accumulation Pb. conc. en ug/g p.S

Temps jours	TEMOIN		Pb 5uM Temp.20		Pb 5uM Temp.15		Pb5uM+PO4 20uM	
	moy.	s.	moy.	s.	moy.	s.	moy.	s.
0	2.64	0.37	2.64	0.37	2.64	0.37	2.64	0.37
3	2.30	0.04	152	7	179	9	58	3
6	2.00	0.05	223	13	246	16	80	5
9	4.34	0.69	329	26	374	00	203	17
12	2.35	0.35	359	54	529	80	317	47
15	5.08	0.62	398	40	675	66	348	35

Plan factoriel complet pour l'étude de l'interaction  
Pb - Zn - Temps d'exposition.

X<sub>1</sub>: Temps X<sub>2</sub>: Pb X<sub>3</sub>: Zn

Seules les variables significatives sont retenues.

File planSortie, lue par Plan Complet

( 3 6 3 3 2 )

No	X1	X2	X3	Y1	Y2	Y moyen
1 :	-5	-1	-1	5.420	5.710	5.565
2 :	-5	-1	0	5.420	5.710	5.565
3 :	-5	-1	1	5.420	5.710	5.565
4 :	-5	0	-1	5.420	5.710	5.565
5 :	-5	0	0	5.420	5.710	5.565
6 :	-5	0	1	5.420	5.710	5.565
7 :	-5	1	-1	5.420	5.710	5.565
8 :	-5	1	0	5.420	5.710	5.565
9 :	-5	1	1	5.420	5.710	5.565
10 :	-3	-1	-1	5.420	5.450	5.435
11 :	-3	-1	0	5.420	5.450	5.435
12 :	-3	-1	1	5.420	5.450	5.435
13 :	-3	0	-1	9.250	9.340	9.295
14 :	-3	0	0	8.610	8.710	8.660
15 :	-3	0	1	8.550	8.660	8.605
16 :	-3	1	-1	9.580	9.670	9.625
17 :	-3	1	0	9.170	9.320	9.245
18 :	-3	1	1	9.190	9.360	9.275
19 :	-1	-1	-1	5.270	5.320	5.295
20 :	-1	-1	0	5.270	5.320	5.295
21 :	-1	-1	1	5.270	5.320	5.295
22 :	-1	0	-1	9.480	9.590	9.535
23 :	-1	0	0	9.290	9.390	9.340
24 :	-1	0	1	8.680	8.810	8.745
25 :	-1	1	-1	9.950	10.070	10.010
26 :	-1	1	0	9.700	9.870	9.785
27 :	-1	1	1	9.090	9.330	9.210
28 :	1	-1	-1	5.900	6.220	6.060
29 :	1	-1	0	5.900	6.220	6.060
30 :	1	-1	1	5.900	6.220	6.060
31 :	1	0	-1	9.760	9.910	9.835
32 :	1	0	0	9.480	9.630	9.555
33 :	1	0	1	9.350	9.510	9.430
34 :	1	1	-1	10.320	10.480	10.400
35 :	1	1	0	10.020	10.170	10.095
36 :	1	1	1	9.940	10.080	10.010
37 :	3	-1	-1	5.300	5.600	5.450
38 :	3	-1	0	5.300	5.600	5.450
39 :	3	-1	1	5.300	5.600	5.450
40 :	3	0	-1	10.120	10.420	10.270
41 :	3	0	0	9.620	9.930	9.775
42 :	3	0	1	9.420	9.730	9.575
43 :	3	1	-1	10.320	10.630	10.475
44 :	3	1	0	10.120	10.430	10.275
45 :	3	1	1	10.060	10.330	10.195
46 :	5	-1	-1	6.100	6.340	6.220
47 :	5	-1	0	6.100	6.340	6.220
48 :	5	-1	1	6.100	6.340	6.220
49 :	5	0	-1	10.230	10.430	10.330
50 :	5	0	0	9.870	10.170	10.020
51 :	5	0	1	9.780	9.990	9.885
52 :	5	1	-1	10.480	10.690	10.585
53 :	5	1	0	10.310	10.580	10.445
54 :	5	1	1	10.310	10.510	10.410

Variance moy. des essais = 0.0256  
Test d'egalite des variances:  
Statistique G de Cochran = 2.0010

variable : 1 \*

coefficient : 7.9325925924E+00  
contribution : 3.3980053628E+03  
residuelle du modele a ce stade : 4.4758405109E+00

test no 1 : F calcule = 759.188  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante

test no 3 : F calcule = 265603.661  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 2

variable : X2 \*

coefficient : 1.7961111111E+00  
contribution : 1.1613654444E+02  
residuelle du modele a ce stade : 2.3285192815E+00

test no 1 : F calcule = 49.876  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante

test no 3 : F calcule = 9077.764  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 3

variable : X1 \*

coefficient : 2.7612698412E-01  
contribution : 4.8035050158E+01  
residuelle du modele a ce stade : 1.4323127937E+00

test no 1 : F calcule = 33.537  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante

test no 3 : F calcule = 3754.640  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 4

variable : (X2^2 - 2/3)

coefficient : -1.3969444444E+00  
contribution : 2.3417445370E+01  
residuelle du modele a ce stade : 9.9261014217E-01

test no 1 : F calcule = 23.592  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante

test no 3 : F calcule = 1830.415  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 5

variable : (X1^2 - 70/6)

coefficient : -4.7562003967E-02  
contribution : 1.2161287334E+01  
residuelle du modele a ce stade : 7.6467795459E-01

test no 1 : F calcule = 15.904  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante

test no 3 : F calcule = 950.582  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 6 \*

variable : X1 X2

coefficient : 1.6992857143E-01  
contribution : 1.2127802143E+01  
residuelle du modele a ce stade : 5.2794620066E-01

test no 1 : F calcule = 22.972  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante

test no 3 : F calcule = 947.965  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 7 \*  
 variable :  $(X1^2 - 70/6) X2$   
 coefficient :  $-4.7853422619E-02$   
 contribution :  $8.2071810019E+00$   
 residuelle du modele a ce stade :  $3.6455822617E-01$   
 test no 1 : F calcule = 22.513  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08  
 critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
 test no 3 : F calcule = 641.511  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 8 \*  
 variable :  $(X1^3 - 20.2X1)$   
 coefficient :  $1.1565715021E-02$   
 contribution :  $4.9927803858E+00$   
 residuelle du modele a ce stade :  $2.6394470096E-01$   
 test no 1 : F calcule = 18.916  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08  
 critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
 test no 3 : F calcule = 390.259  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 9 \*  
 variable :  $X1 (X2^2 - 2/3)$   
 coefficient :  $-1.4352380953E-01$   
 contribution :  $2.8838717461E+00$   
 residuelle du modele a ce stade :  $2.0572409996E-01$   
 test no 1 : F calcule = 14.018  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08  
 critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
 test no 3 : F calcule = 225.417  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 10 \*  
 variable :  $(X1^3 - 20.2X1) X2$   
 coefficient :  $9.2197145062E-03$   
 contribution :  $2.1151500231E+00$   
 residuelle du modele a ce stade :  $1.6232805625E-01$   
 test no 1 : F calcule = 13.030  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08  
 critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
 test no 3 : F calcule = 165.330  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 11 \*  
 variable :  $(X1^4 - (16213/597)(X1^2 - 70/6) - 707/3) X2$   
 coefficient :  $-3.3731845854E-03$   
 contribution :  $1.4381311628E+00$   
 residuelle du modele a ce stade :  $1.3265821656E-01$   
 test no 1 : F calcule = 10.841  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08  
 critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
 test no 3 : F calcule = 112.411  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 12 \*  
 variable :  $(X1^2 - 70/6) (X2^2 - 2/3)$   
 coefficient :  $3.4215029763E-02$   
 contribution :  $1.3985583499E+00$   
 residuelle du modele a ce stade :  $1.0251773719E-01$   
 test no 1 : F calcule = 13.642  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08  
 critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
 test no 3 : F calcule = 109.318  
           F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 13 \*  
variable :  $*(X1^5 - (133632/4147)(X1^3 - 20.2X1) - (3271/7)X1)$   
coefficient : 1.4650164124E-03  
contribution : 1.1302889240E+00  
residuelle du modele a ce stade : 7.7450147272E-02  
test no 1 : F calcule = 14.594  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
test no 3 : F calcule = 88.349  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 14 \*  
variable : X3  
coefficient : -1.3944444444E-01  
contribution : 7.0001111112E-01  
residuelle du modele a ce stade : 6.1886123176E-02  
test no 1 : F calcule = 11.311  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
test no 3 : F calcule = 54.716  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 15 \*  
variable :  $(X1^4 - (16213/597)(X1^2 - 70/6) - 707/3)$   
coefficient : -1.9081086199E-03  
contribution : 6.9026480295E-01  
residuelle du modele a ce stade : 4.5773849336E-02  
test no 1 : F calcule = 15.080  
F de Fischer (1, 39, 95%) = 4.09  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
test no 3 : F calcule = 53.954  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 16 \*  
variable :  $(X1^3 - 20.2X1)(X2^2 - 2/3)$   
coefficient : -6.6560570989E-03  
contribution : 3.6746760031E-01  
residuelle du modele a ce stade : 3.7308224310E-02  
test no 1 : F calcule = 9.850  
F de Fischer (1, 38, 95%) = 4.10  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
test no 3 : F calcule = 28.723  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 17 \*  
variable :  $(X1^4 - (16213/597)(X1^2 - 70/6) - 707/3)(X2^2 - 2/3)$   
coefficient : 2.7777048286E-03  
contribution : 3.2506425499E-01  
residuelle du modele a ce stade : 2.9531034291E-02  
test no 1 : F calcule = 11.008  
F de Fischer (1, 37, 95%) = 4.10  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais --> variable importante  
test no 3 : F calcule = 25.409  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 18  
variable :  $(X2^2 - 2/3) X3$   
coefficient : 1.6895833333E-01  
contribution : 2.2837534722E-01  
residuelle du modele a ce stade : 2.4007581155E-02  
test no 1 : F calcule = 9.513  
F de Fischer (1, 36, 95%) = 4.11  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais --> variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 17.851  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 19  
variable : X2 X3  
coefficient : -8.312500001E-02  
contribution : 1.658343750E-01  
residuelle du modele a ce stade : 1.9955387045E-02  
test no 1 : F calcule = 8.310  
F de Fischer (1, 35, 95%) = 4.12  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais --> variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 12.962  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 20  
variable : (X1^2 - 70/6) X3  
coefficient : 6.2909226191E-03  
contribution : 1.4183933532E-01  
residuelle du modele a ce stade : 1.6370565037E-02  
test no 1 : F calcule = 8.664  
F de Fischer (1, 34, 95%) = 4.13  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais --> variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 11.087  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 21  
variable : (X1^5 - (133632/4147)(X1^3 - 20.2X1) - (3271/7)X1) (X2^2 - 2/3)  
coefficient : 8.6683537933E-04  
contribution : 8.7935701981E-02  
residuelle du modele a ce stade : 1.4201924523E-02  
test no 1 : F calcule = 6.192  
F de Fischer (1, 33, 95%) = 4.14  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais --> variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 6.873  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 22  
variable : (X1^2 - 70/6) X2 X3  
coefficient : 5.0390624999E-03  
contribution : 6.0670312498E-02  
residuelle du modele a ce stade : 1.2749787399E-02  
test no 1 : F calcule = 4.759  
F de Fischer (1, 32, 95%) = 4.15  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais --> variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 4.742  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 23  
variable : (X1^5 - (133632/4147)(X1^3 - 20.2X1) - (3271/7)X1) X2  
coefficient : -3.8925323858E-04  
contribution : 5.3195843763E-02  
residuelle du modele a ce stade : 1.1445075903E-02  
test no 1 : F calcule = 4.648  
F de Fischer (1, 31, 95%) = 4.16  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais --> variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 4.158  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

----- 24  
variable : (X1^5 - (133632/4147)(X1^3 - 20.2X1) - (3271/7)X1) (X3^2 - 2/  
coefficient : 6.2519725420E-04  
contribution : 4.5743153568E-02  
residuelle du modele a ce stade : 1.0301806648E-02  
test no 1 : F calcule = 4.440  
F de Fischer (1, 30, 95%) = 4.17  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais --> variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 3.575  
F de Fischer (1, 40, 95%) = 4.08

Plan expérimental pour l'étude de l'interaction  
Pb - Zn. Le facteur Temps n'étant plus une  
variable.

X<sub>1</sub>: Pb      X<sub>2</sub>: Zn

File planSortie, lue par Plan Complet

A 3 jours.

plan1 Pb(5nd) Zn(3nd) a 3j intex.  
( 2 3 3 2 )

No	X1	X2	Y1	Y2	Y moyen
1 :	-1	-1	5.420	5.450	5.435
2 :	-1	0	5.420	5.450	5.435
3 :	-1	1	5.420	5.450	5.435
4 :	0	-1	9.250	9.340	9.295
5 :	0	0	8.610	8.710	8.660
6 :	0	1	8.550	8.660	8.605
7 :	1	-1	9.580	9.670	9.625
8 :	1	0	9.170	9.320	9.245
9 :	1	1	9.190	9.360	9.275

Variance moy. des essais = 0.0051  
Test d'égalité des variances:  
Statistique G de Cochran = 2.8149

----- 1  
variable : 1  
coefficient : 7.890000000E+00  
contribution : 5.602688999E+02  
résiduelle du modèle a ce stade : 3.490462500E+00  
test no 1 : F calculé = 160.514  
F de Fischer (1, 8, 95%) = 5.32  
critère no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calculé = 21826.581  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 2  
variable : X1  
coefficient : 1.973333333E+00  
contribution : 2.336426666E+01  
résiduelle du modèle a ce stade : 6.5134761903E-01  
test no 1 : F calculé = 35.871  
F de Fischer (1, 7, 95%) = 5.59  
critère no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calculé = 9102.961  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 3  
variable : (X1<sup>2</sup> - 2/3)  
coefficient : -1.445000000E+00  
contribution : 4.176049999E+00  
résiduelle du modèle a ce stade : 6.389722227E-02  
test no 1 : F calculé = 65.356  
F de Fischer (1, 6, 95%) = 5.99  
critère no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calculé = 1627.032  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 4  
variable : X2  
coefficient : -1.733333334E-01  
contribution : 1.802666667E-01  
résiduelle du modèle a ce stade : 4.062333337E-02  
test no 1 : F calculé = 4.438  
F de Fischer (1, 5, 95%) = 6.61  
critère no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calculé = 70.234  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 5  
variable : (X1<sup>2</sup> - 2/3) X2  
coefficient : 2.575000001E-01  
contribution : 8.840833339E-02  
résiduelle du modèle a ce stade : 2.867708337E-02  
test no 1 : F calculé = 3.083  
F de Fischer (1, 4, 95%) = 7.71  
critère no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calculé = 34.445  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 6  
variable : (X2<sup>2</sup> - 2/3)  
coefficient : 1.650000001E-01  
contribution : 5.445000009E-02  
résiduelle du modèle a ce stade : 2.008611113E-02  
test no 1 : F calculé = 2.711  
F de Fischer (1, 3, 95%) = 10.13  
critère no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calculé = 21.214  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 7  
variable : X1 X2  
coefficient : -8.750000001E-02  
contribution : 3.062500001E-02  
résiduelle du modèle a ce stade : 1.881666668E-02  
test no 1 : F calculé = 2.067  
F de Fischer (1, 2, 95%) = 18.51  
critère no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calculé = 11.932  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 8  
variable : (X1<sup>2</sup> - 2/3) (X2<sup>2</sup> - 2/3)  
coefficient : -1.875000003E-01  
contribution : 1.562500004E-02  
résiduelle du modèle a ce stade : 1.400833332E-02  
test no 1 : F calculé = 1.115  
F de Fischer (1, 1, 95%) = 161.40  
critère no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calculé = 6.088  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 9  
variable : X1 (X2<sup>2</sup> - 2/3)  
coefficient : 1.025000000E-01  
contribution : 1.400833332E-02  
résiduelle du modèle a ce stade : 0.000000000E+00  
test no 1 : zero ddl, test non faisable  
critère no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calculé = 5.458  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

Fin.



File planSortie, lue par Plan Complet

A 6 jours.

plan1 Pb(3rd) Zn(3rd) a 6j intex.  
( 2 3 3 2 )

No	X1	X2	Y1	Y2	Y moyen
1 :	-1	-1	5.270	5.320	5.295
2 :	-1	0	5.270	5.320	5.295
3 :	-1	1	5.270	5.320	5.295
4 :	0	-1	9.480	9.590	9.535
5 :	0	0	9.290	9.390	9.340
6 :	0	1	8.680	8.810	8.745
7 :	1	-1	9.950	10.070	10.010
8 :	1	0	9.700	9.870	9.785
9 :	1	1	9.090	9.330	9.210

Variance moy. des essais = 0.0082  
Test d'egalite des variances:  
Statistique G de Cochran = 3.5170

----- 1  
variable : 1  
coefficient : 8.056666666E+00  
contribution : 5.841889000E+02  
residuelle du modele a ce stade : 4.414931250E+00  
test no 1 : F calcule = 132.321  
F de Fischer (1, 8, 95%) = 5.32  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 142678.429  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 2  
variable : X1  
coefficient : 2.186666667E+00  
contribution : 2.868906666E+01  
residuelle du modele a ce stade : 9.471976190E-01  
test no 1 : F calcule = 30.288  
F de Fischer (1, 7, 95%) = 5.59  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 7006.828  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 3  
variable : (X1^2 - 2/3)  
coefficient : -1.725000000E+00  
contribution : 5.951249999E+00  
residuelle du modele a ce stade : 1.131888889E-01  
test no 1 : F calcule = 52.578  
F de Fischer (1, 6, 95%) = 5.99  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 1453.494  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 4  
variable : X2  
coefficient : -2.650000000E-01  
contribution : 4.213500000E-01  
residuelle du modele a ce stade : 5.155666666E-02  
test no 1 : F calcule = 8.173  
F de Fischer (1, 5, 95%) = 6.61  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 102.908  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 5  
variable : X1 X2  
coefficient : -2.000000000E-01  
contribution : 1.600000000E-01  
residuelle du modele a ce stade : 2.444583333E-02  
test no 1 : F calcule = 6.545  
F de Fischer (1, 4, 95%) = 7.71  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 39.077  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 6  
variable : (X1^2 - 2/3) X2  
coefficient : 1.950000000E-01  
contribution : 5.069999998E-02  
residuelle du modele a ce stade : 1.569444444E-02  
test no 1 : F calcule = 3.230  
F de Fischer (1, 3, 95%) = 10.13  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 12.383  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 7  
variable : (X2^2 - 2/3)  
coefficient : -1.249999998E-01  
contribution : 3.124999991E-02  
residuelle du modele a ce stade : 7.916666664E-03  
test no 1 : F calcule = 3.947  
F de Fischer (1, 2, 95%) = 18.51  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 7.632  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 8  
variable : X1 (X2^2 - 2/3)  
coefficient : -8.749999991E-02  
contribution : 1.020833331E-02  
residuelle du modele a ce stade : 5.624999982E-03  
test no 1 : F calcule = 1.815  
F de Fischer (1, 1, 95%) = 161.40  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 2.493  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 9  
variable : (X1^2 - 2/3) (X2^2 - 2/3)  
coefficient : 1.124999998E-01  
contribution : 5.624999982E-03  
residuelle du modele a ce stade : 0.000000000E+00  
test no 1 : zero dil, test non faisable  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 1.374  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

Fin.

File planSortie, lue par Plan Complet

A 9 jours.

plan1 Pb(3rd) Zn(3) a 9j intex:  
( 2 3 3 2 )

No	X1	X2	Y1	Y2	Y moyen
1 :	-1	-1	5.900	6.220	6.060
2 :	-1	0	5.900	6.220	6.060
3 :	-1	1	5.900	6.220	6.060
4 :	0	-1	9.760	9.910	9.835
5 :	0	0	9.480	9.630	9.555
6 :	0	1	9.350	9.510	9.430
7 :	1	-1	10.320	10.480	10.400
8 :	1	0	10.020	10.170	10.095
9 :	1	1	9.940	10.080	10.010

Variance moy. des essais = 0.0248  
Test d'egalite des variances:  
Statistique G de Cochran = 2.0687

----- 1  
variable : 1  
coefficient : 8.611666666E+00  
contribution : 6.6744722499E+02  
residuelle du modele a ce stade : 3.7428562500E+00  
test no 1 : F calcule = 178.326  
F de Fischer (1, 8, 95%) = 5.32  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 53935.129  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 2  
variable : X1  
coefficient : 2.0541666667E+00  
contribution : 2.5317604167E+01  
residuelle du modele a ce stade : 6.6074940475E-01  
test no 1 : F calcule = 38.316  
F de Fischer (1, 7, 95%) = 5.59  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 2045.867  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 3  
variable : (X1^2 - 2/3)  
coefficient : -1.4925000000E+00  
contribution : 4.4551124999E+00  
residuelle du modele a ce stade : 2.835555557E-02  
test no 1 : F calcule = 157.116  
F de Fischer (1, 6, 95%) = 5.99  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 360.009  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 4  
variable : X2  
coefficient : -1.3250000000E-01  
contribution : 1.0533750000E-01  
residuelle du modele a ce stade : 1.2959166668E-02  
test no 1 : F calcule = 8.128  
F de Fischer (1, 5, 95%) = 6.61  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 8.512  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 5  
variable : X1 X2  
coefficient : -9.750000003E-02  
contribution : 3.802500003E-02  
residuelle du modele a ce stade : 6.6927083345E-03  
test no 1 : F calcule = 5.682  
F de Fischer (1, 4, 95%) = 7.71  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 3.073  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 6  
variable : (X1^2 - 2/3) X2  
coefficient : 1.0499999999E-01  
contribution : 1.4699999998E-02  
residuelle du modele a ce stade : 4.0236111132E-03  
test no 1 : F calcule = 3.653  
F de Fischer (1, 3, 95%) = 10.13  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 1.188  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 7  
variable : (X2^2 - 2/3)  
coefficient : 6.2500000020E-02  
contribution : 7.8125000050E-03  
residuelle du modele a ce stade : 2.1291666673E-03  
test no 1 : F calcule = 3.669  
F de Fischer (1, 2, 95%) = 18.51  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.631  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 8  
variable : X1 (X2^2 - 2/3)  
coefficient : 5.5000000008E-02  
contribution : 4.0333333346E-03  
residuelle du modele a ce stade : 2.2500000009E-04  
test no 1 : F calcule = 17.926  
F de Fischer (1, 1, 95%) = 161.40  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.326  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 9  
variable : (X1^2 - 2/3) (X2^2 - 2/3)  
coefficient : -2.2500000005E-02  
contribution : 2.2500000009E-04  
residuelle du modele a ce stade : 0.000000000E+00  
test no 1 : zero ddf, test non faisable  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.018  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

Fin.

File planSortie, lue par Plan Complet

interac Pb-2a a 12j intox.  
( 2 3 3 2 )

A 12 jours.

No	X1	X2	Y1	Y2	Y moyen
1 :	-1	-1	5.300	5.600	5.450
2 :	-1	0	5.300	5.600	5.450
3 :	-1	1	5.300	5.600	5.450
4 :	0	-1	10.120	10.420	10.270
5 :	0	0	9.620	9.930	9.775
6 :	0	1	9.420	9.730	9.575
7 :	1	-1	10.320	10.630	10.475
8 :	1	0	10.120	10.430	10.275
9 :	1	1	10.060	10.330	10.195

Variance moy. des essais = 0.0454  
Test d'egalite des variances:  
Statistique G de Cochran = 1.0582

----- 1  
variable : 1  
coefficient : 8.546111111E+00  
contribution : 6.573241361E+02  
residuelle du modele a ce stade : 5.465848611E+00  
test no 1 : F calcule = 120.260  
F de Fischer (1, 8, 95%) = 5.32  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 28953.467  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 2  
variable : X1  
coefficient : 2.432500000E+00  
contribution : 3.550233750E+01  
residuelle du modele a ce stade : 1.174921627E+00  
test no 1 : F calcule = 30.217  
F de Fischer (1, 7, 95%) = 5.59  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 1563.788  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 3  
variable : (X1^2 - 2/3)  
coefficient : -1.990833333E+00  
contribution : 7.926834722E+00  
residuelle du modele a ce stade : 4.960277777E-02  
test no 1 : F calcule = 159.806  
F de Fischer (1, 6, 95%) = 5.99  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 349.157  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 4  
variable : X2  
coefficient : -1.625000000E-01  
contribution : 1.584375000E-01  
residuelle du modele a ce stade : 2.783583333E-02  
test no 1 : F calcule = 5.692  
F de Fischer (1, 5, 95%) = 6.61  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 6.979  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 5  
variable : (X1^2 - 2/3) X2  
coefficient : 2.774999999E-01  
contribution : 1.026750000E-01  
residuelle du modele a ce stade : 9.1260416687E-03  
test no 1 : F calcule = 11.251  
F de Fischer (1, 4, 95%) = 7.71  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 4.523  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 6  
variable : X1 X2  
coefficient : -7.000000000E-02  
contribution : 1.960000000E-02  
residuelle du modele a ce stade : 5.634722225E-03  
test no 1 : F calcule = 3.478  
F de Fischer (1, 3, 95%) = 10.13  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.863  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 7  
variable : (X2^2 - 2/3)  
coefficient : 6.916666668E-02  
contribution : 9.568055560E-03  
residuelle du modele a ce stade : 3.668055557E-03  
test no 1 : F calcule = 2.608  
F de Fischer (1, 2, 95%) = 18.51  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.421  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 8  
variable : (X1^2 - 2/3) (X2^2 - 2/3)  
coefficient : -1.175000000E-01  
contribution : 6.136111113E-03  
residuelle du modele a ce stade : 1.200000000E-03  
test no 1 : F calcule = 5.113  
F de Fischer (1, 1, 95%) = 161.40  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.270  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 9  
variable : X1 (X2^2 - 2/3)  
coefficient : 3.000000000E-02  
contribution : 1.200000000E-03  
residuelle du modele a ce stade : 0.000000000E+00  
test no 1 : zero ddl, test non faisable  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.053  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

Fin.

File planSortie, lue par Plan Complet

A 15 jours.

plan1 Pb(3md) Zn(3md)  
( 2 3 3 2 )

No	X1	X2	Y1	Y2	Y moyen
1 :	-1	-1	6.100	6.340	6.220
2 :	-1	0	6.100	6.340	6.220
3 :	-1	1	6.100	6.340	6.220
4 :	0	-1	10.230	10.430	10.330
5 :	0	0	9.870	10.170	10.020
6 :	0	1	9.780	9.990	9.885
7 :	1	-1	10.480	10.690	10.585
8 :	1	0	10.310	10.580	10.445
9 :	1	1	10.310	10.510	10.410

Variance moy. des essais = 0.0280  
Test d'egalite des variances:  
Statistique G de Cochran = 1.6075

----- 1  
variable : 1  
coefficient : 8.9261111111E+00  
contribution : 7.1707913610E+02  
residuelle du modele a ce stade : 4.1646173611E+00  
test no 1 : F calcule = 172.184  
F de Fischer (1, 8, 95%) = 5.32  
critere no 2 : resid. > var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 51230.103  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 2  
variable : X1  
coefficient : 2.1300000000E+00  
contribution : 2.7221400000E+01  
residuelle du modele a ce stade : 8.7079126962E-01  
test no 1 : F calcule = 31.261  
F de Fischer (1, 7, 95%) = 5.59  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable importante  
test no 3 : F calcule = 1944.772  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 3  
variable : (X1<sup>2</sup> - 2/3)  
coefficient : -1.7283333333E+00  
contribution : 5.9742722221E+00  
residuelle du modele a ce stade : 2.0211111111E-02  
test no 1 : F calcule = 295.593  
F de Fischer (1, 6, 95%) = 5.99  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 426.818  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 4  
variable : X2  
coefficient : -1.0333333333E-01  
contribution : 6.4066666666E-02  
residuelle du modele a ce stade : 1.1440000001E-02  
test no 1 : F calcule = 5.600  
F de Fischer (1, 5, 95%) = 6.61  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 4.577  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 5  
variable : (X1<sup>2</sup> - 2/3) X2  
coefficient : 1.7875000000E-01  
contribution : 4.2602083331E-02  
residuelle du modele a ce stade : 3.6494791680E-03  
test no 1 : F calcule = 11.673  
F de Fischer (1, 4, 95%) = 7.71  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 3.044  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 6  
variable : X1 X2  
coefficient : -4.3750000001E-02  
contribution : 7.6562500002E-03  
residuelle du modele a ce stade : 2.3138888906E-03  
test no 1 : F calcule = 3.309  
F de Fischer (1, 3, 95%) = 10.13  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.547  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 7  
variable : (X2<sup>2</sup> - 2/3)  
coefficient : 4.6666666667E-02  
contribution : 4.3555555594E-03  
residuelle du modele a ce stade : 1.2930555562E-03  
test no 1 : F calcule = 3.368  
F de Fischer (1, 2, 95%) = 18.51  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.311  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 8  
variable : (X1<sup>2</sup> - 2/3) (X2<sup>2</sup> - 2/3)  
coefficient : -6.1250000022E-02  
contribution : 1.6673611123E-03  
residuelle du modele a ce stade : 9.1875000018E-04  
test no 1 : F calcule = 1.815  
F de Fischer (1, 1, 95%) = 161.40  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.119  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

----- 9  
variable : X1 (X2<sup>2</sup> - 2/3)  
coefficient : 2.6250000003E-02  
contribution : 9.1875000018E-04  
residuelle du modele a ce stade : 0.0000000000E+00  
test no 1 : zero d'ill, test non faisable  
critere no 2 : resid. < var. moy. des essais → variable peu importante  
test no 3 : F calcule = 0.066  
F de Fischer (1, 9, 95%) = 5.12

Fin.

**ANNEXE V: Méthode Histochimique de détection du Pb.**

( Ganter & Jolles, 1970)

**— PLOMB**

**I. — MÉTHODES AU CHROMATE DE POTASSIUM**

**A. Principe.**

Conversion des sels de plomb en cristaux jaunâtres de chromate de plomb par action d'une solution de chromate ou de bichromate de potassium.

**B. Procédés opératoires.**

La réaction peut être effectuée sur tissus frais ou fixés.

**α PROCÉDÉ APPLICABLE AUX TISSUS FRAIS.**

1. Fixer de minces fragments dans le *liquide d'ORTH ou de MÖLLER* (formules page 1396) pendant 24 à 48 heures.
2. Laver à l'eau courante pendant 6 heures.
3. Déshydrater, clarifier et inclure à la paraffine - Couper à 5  $\mu$ .
4. La coupe, déparaffinée, est amenée à l'eau.
5. Colorer le fond par une solution aqueuse à 0,5 % de bleu de toluidine, pendant 1 minute.
6. Alcools successifs. Xylènes I et II. Monter au DPX.

**β PROCÉDÉ APPLICABLE AUX TISSUS FIXÉS.**

Tissus *fixés* dans le formaldéhyde à 10 % neutre, ou dans l'éthanol, inclus et coupés à la paraffine.

La coupe, déparaffinée, est amenée à l'eau distillée.

1. Traiter dans une solution de *chromate de potassium acidifié* \* pendant plusieurs jours (temps optimum à déterminer par tâtonnements).
2. Laver à l'eau courante pendant 6 heures.
3. Colorer le fond par une solution aqueuse à 0,5 % de bleu de toluidine, pendant 1 minute.
4. Alcools successifs. Xylènes I et II. Monter au DPX.

**C. Résultats.**

Les sels de plomb apparaissent sous forme de cristaux jaunâtres, sur un fond bleu pâle.

**D. Préparation du réactif.**

\* *Chromate de potassium.*

Chromate de potassium .....	2 g
Solution aqueuse à 1 % d'acide acétique .....	100 ml

### LAMMA 500

Provides unique capabilities for the chemical analysis of all types of samples

- extremely high sensitivity ppm to sub-ppm for most elements in almost any sample including biological and inorganic samples
- high lateral resolution submicron resolution with outstanding sensitivity
- high mass range allows quasimolecular and molecular fragment ions to be detected above 1000 amu
- laser desorption (LD) or plasma mode of ionization by variable laser power density microprobe analysis of both trace elements and molecules including non-volatile inorganic and organic compounds
- molecular weight and structural information high relative intensities of quasimolecular ions in LD mode, characteristic fragments
- positive - negative ion operation by push button selection approx. equal abundance of positive or negative ions
- direct analysis of electrically conducting and non-conducting materials
- fast and simple sample introduction
- rapid analysis
- sample observation through light microscope during analysis
- spectra free from instrumental background

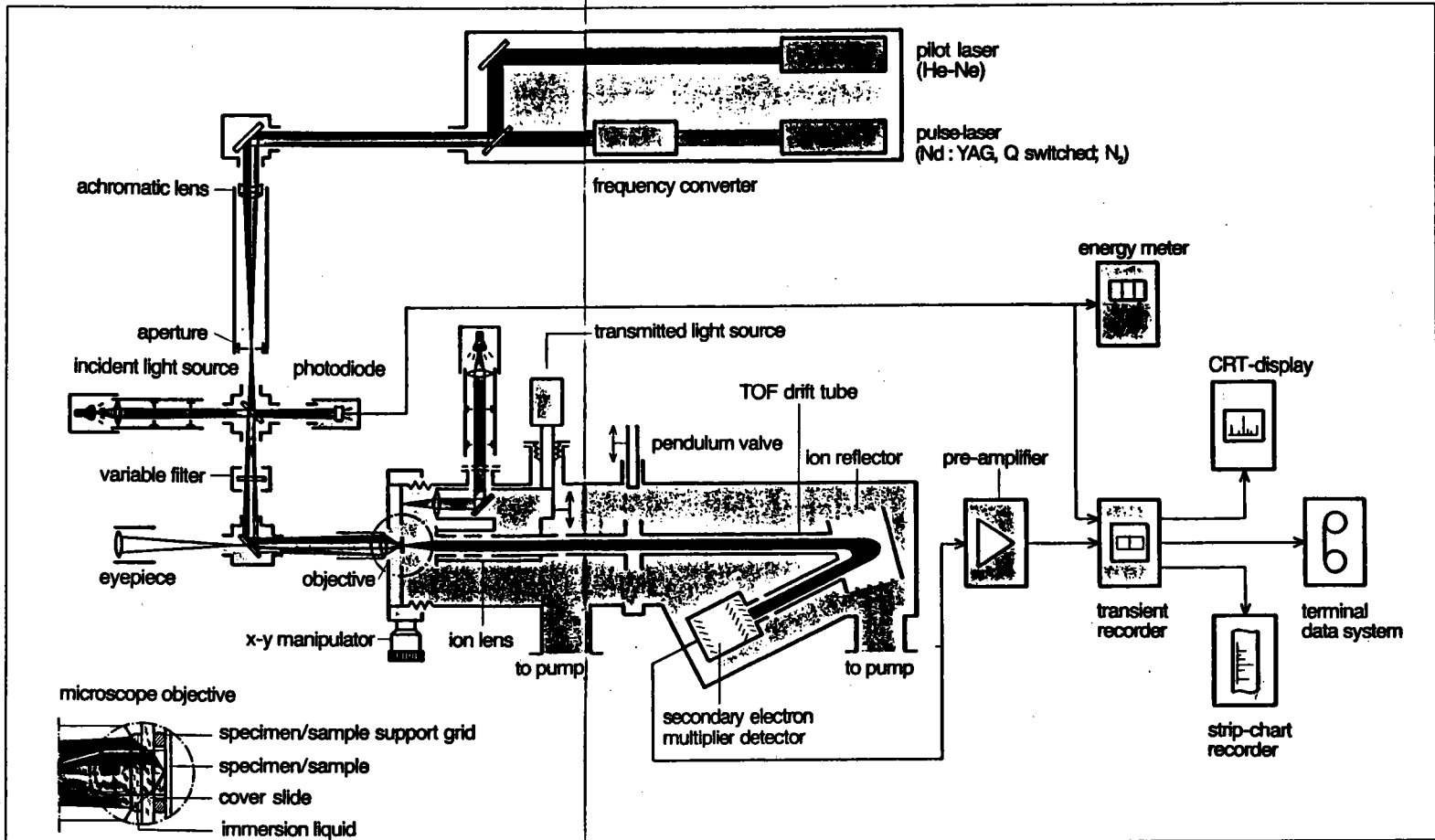
### LAMMA 500 Fields of Application

- chemistry, inorganic and organic
- biology
- medicine
- environmental research
- mineralogy
- geology
- criminology

### LAMMA 500 Has been applied to

- trace element analysis in microsamples
- microprobe analysis of biologically active ions
- analysis of particulate materials (dust, aerosols), chemical histograms
- isotope ratio analysis in microvolumes
- non-volatile compound analysis
- drug analysis, cellular and subcellular pharmacokinetics
- macromolecular fingerprinting in microvolumes
- fingerprinting of bacteria and polymers by laser pyrolysis/ionization
- compound tracing in tissues
- layer by layer analysis

Schematic diagram of LAMMA 500



STUDY OF THE CONTAMINATION OF THE FRESHWATER BIVALVE *DREISSENA*  
*POLYMORPHA* BY LEAD.  
BIOACCUMULATION, DISTRIBUTION AND ELIMINATION OF THE METAL.  
EFFECTS OF BIOTIC AND ABIOTIC PARAMETERS.

Abstract:

Freshwater mussels (*Dreissena polymorpha*) were exposed to lead under laboratory conditions. Patterns of accumulation in whole animals were linear at low concentrations and the tissue lead concentrations were proportional to lead in the medium. At high concentrations of lead in the medium, the accumulation proceeded at a high rate in a saturating mode. Under cyclic conditions of exposure, kinetic of lead accumulation showed a pronounced biphasic mode. It is argued that the biphasic course of accumulation seemed to indicate that the animal acts as a multi-compartments accumulation system.

The chelation of lead by EDTA decreased strongly its toxicity and bioaccumulation. In the presence of zinc, uptake of lead in whole *Dreissena* was reduced in the initial phase of accumulation. Thereafter, the antagonistic effect of Zn decreased and became not significant at the end of exposure period. A rise in temperature decreased lead accumulation by mussels. The results also indicate that accumulation were greatly affected by seasonal conditions. In spring, the rate of uptake was the faster and lead body burden was the most important.

By means of histochemical staining method and microanalytical technique (LAMMA), lead has been localized mainly in granules of renal cells and in cytoplasm of granulocytes in gills, pericardial gland, byssal gland and digestive epithelium.

The depuration process were low and occurred slowly compared to accumulation. The original lead concentrations in the soft parts did not influence significantly the rate of elimination. The presence of EDTA or a rise in temperature enhanced the rate of lead elimination. In all conditions, the total depuration were not attained and the tissue lead concentrations remained at high levels in comparison to controls.

Key words: Bioaccumulation, Depuration, Pb, Interaction Pb/Zn, Histochemistry of Pb,  
*Dreissena polymorpha*, Bioindicator.

Nom : BENYAHIA  
Prénom : Mohamed

Date de soutenance  
25 Juin 1991

---

**TITRE : ETUDE DE LA CONTAMINATION DU BIVALVE D'EAU DOUCE *DREISSENA POLYMORPHA* PAR LE PLOMB. BIOACCUMULATION, DISTRIBUTION TISSULAIRE ET ELIMINATION DU METAL. INCIDENCE DE PARAMETRES BIOTIQUES ET ABIOTIQUES.**

---

**RESUME :**

Les dreissènes exposées au plomb accumulent le métal à des niveaux différents en fonction de la concentration métallique dans le milieu. Les cinétiques de bioaccumulation sont linéaires pour les faibles concentrations de Pb dans le milieu et saturantes pour les concentrations élevées. Les paramètres du milieu agissent sur la bioaccumulation. L'EDTA réduit fortement la bioaccumulation et la toxicité létale du plomb. Le Zn montre une interaction négative avec le plomb dans la phase initiale de la cinétique de bioaccumulation. La température diminue la bioaccumulation en stimulant les processus d'excrétion. Dans une exposition cyclique au plomb, la cinétique de bioaccumulation présente une allure sigmoïde et semble montrer que les dreissènes se comportent comme un système à compartiments d'accumulation. Il existe une variation saisonnière de la bioaccumulation. C'est au printemps que la vitesse de bioaccumulation ainsi que les contenus métalliques des organismes sont les plus importants. Le plomb a pu être localisé histochimiquement et par microanalyse LAMMA essentiellement dans les granules au sein des cellules rénales, dans le cytoplasme des granulocytes des branchies, de l'épithélium digestif, de la glande péricardiale et dans le byssus.

La décontamination est faible et se produit lentement par rapport à l'accumulation. Elle est significativement augmentée en présence d'EDTA. La température favorise l'élimination du métal. Le niveau de contamination initiale ne montre pas d'influence significative sur les taux de décontamination. Quel que soit le protocole utilisé, la décontamination totale n'est pas atteinte.

---

**MOTS-CLES :** Bioaccumulation; Dépuration; Plomb; Interaction Plomb-Zinc; Histochimie du plomb; *Dreissena polymorpha*; Bioindicateur.

---

**LABORATOIRE DE RECHERCHE :** Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Metz.

---

**DIRECTEUR DE RECHERCHE :** Pr. Jean-Claude Pihan

---

**RAPPORTEURS :** Pr. N. Dhainaut - Pr. J.-L. Morel

**EXAMINATEURS :** Pr. B. Elkaim - M. Khalanski

---