



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

VB 69090

UNIVERSITE DE METZ
Laboratoire d'Ecologie

U. F. R. Sci F.A.

THESE

présentée à l'Université de METZ
pour obtenir le grade de :

DOCTEUR de l'UNIVERSITE de METZ

Mention : Sciences de la Vie
Spécialité : Ecotoxicologie

par

Abdelfattah MOUABAD

Titre :

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	1991 0165
Cote	S/M3 91/8
Loc	Magasin

**TOXICITE COMPORTEMENTALE ET PHYSIOLOGIQUE
(FILTRATION, RESPIRATION) DES METAUX LOURDS
(Cu, Zn, Hg, Cd et Pb) CHEZ LA MOULE D'EAU DOUCE
*DREISSENA POLYMORPHA PALLAS***

**Proposition d'un protocole d'essai pour l'évaluation de la toxicité
par la réponse comportementale de *Dreissena***

Soutenue le 5 Juin 1991 devant la commission d'examen :

Président de jury	:	J.C. PIHAN	Professeur à l'Université de Metz (Directeur de Thèse)
Rapporteurs	:	K.J.M. KRAMER	Senior Scientist, TNO Applied Marine Research laboratory à Den Helder, NL
		J.C. MORETEAU	Professeur à l'Université de Metz
		P. TESTARD	Maître de Conférence à l'Université de Paris VI
Examineur	:	P. LAMBERT	Ingénieur, Chef de la Division Qualité des Eaux au S.R.A.E. Lorraine

Avant-propos

Les recherches présentées dans ce mémoire ont été réalisées au Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Metz. Elles s'intègrent dans les travaux du groupe "Ecotoxicologie de Dreissena" dirigé par le Professeur J.C. PIHAN, Directeur du Laboratoire.

Monsieur J.C. PIHAN m'a initié à la recherche, a assuré le suivi et la direction scientifique de mon travail. Il m'a fait bénéficier de ses compétences scientifiques et de ses qualités humaines, a mis à ma disposition toutes les facilités matérielles pour la conduite du travail. Qu'il trouve dans l'aboutissement de ces six années au sein de son équipe l'expression de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont à Monsieur M. NOURISSON, ancien Directeur du Laboratoire et aujourd'hui Professeur Emérite à l'Université de Metz, pour l'accueil bienveillant qu'il m'a réservé à mon arrivée au Laboratoire.

Monsieur Kees J.M. KRAMER, Senior Scientist au TNO Applied Marine Research Laboratory à Den Helder a accepté la lourde tâche de rapporteur et me fait l'honneur de se déplacer "de si loin" pour juger mon travail. Je lui exprime mes sincères remerciements.

Monsieur P. TESTARD, Maître de Conférence à l'Université de Paris VI, a manifesté son intérêt pour mon sujet et a accepté avec bienveillance le travail de rapporteur. Ses remarques et critiques judicieuses m'ont aidé à améliorer le mémoire. Je suis sensible à l'honneur qu'il me fait en présidant ce jury.

Monsieur J.C. MORETEAU, Professeur à l'Université de Metz, a également assuré le travail de rapporteur. Ses compétences en biostatistiques et ses critiques constructives m'ont aidé à améliorer mon mémoire. Qu'il trouve ici le témoignage de ma plus sincère reconnaissance.

Je remercie vivement Monsieur P. LAMBERT, Ingénieur des Travaux Ruraux et Chef de la Division Qualité des Eaux au Service Régional d'Aménagement des Eaux en Lorraine (SRAEL), pour avoir accepté de participer à mon jury.

J'ai le grand plaisir d'exprimer ici ma reconnaissance aux personnes qui ont contribué de diverses façons à la réalisation des travaux présentés dans ce mémoire. Mes remerciements s'adressent spécialement à :

Monsieur A. LAMBERT, qui m'a accueilli en stage en 1986 au Laboratoire de Parasitologie Comparée de Montpellier et a mis à ma disposition son matériel anémométrique durant cinq ans.

Les techniciens de la Société DANTEC ELECTRONIK à Montpellier et à Paris, qui ont toujours bien assuré la maintenance du matériel anémométrique.

Madame M. OLLIVIER, pour son aide efficace dans la documentation.

Messieurs Ph. WAGNER et J.F. POINSAINT, pour leur dévouement "en tout temps" dans les campagnes de prélèvement des moules.

Monsieur M. RIBETTE, pour son apport précieux en graphisme.

Madame D. BEAUFILS, pour son aide quotidienne.

Je voudrais également remercier mes amis A. BENHRA, M. BENYAHIA, A. MAAROUF, J. MERSCH et A. TOURARI, pour leur aide dans certaines expériences. Nos longues discussions m'ont été d'une grande utilité.

Aux autres membres du Laboratoire d'Ecologie, j'adresse ma profonde sympathie pour leur aide quotidienne et pour l'excellente ambiance de travail qu'ils ont su créer durant ces six années passées parmi eux.

Mademoiselle L. LALLEMAND a assuré avec beaucoup d'efficacité la saisie en traitement de texte du mémoire. Qu'elle en soit chaleureusement remerciée.

Enfin, je dois reconnaissance à ma famille à Marrakech, pour son soutien et sa patience.

Ce travail a été réalisé grâce à une bourse du M.E.N. du Maroc et au soutien financier reçu dans le cadre des contrats CNRS-PIREN (ATP Ecotoxicologie, 86-88) et EDF-CPN-Cattenom (1986-1991).

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE ET SITUATION DU TRAVAIL	1
I.1. Importance des études de toxicité sublétales en écotoxicologie	1
I.2. Situation du travail	2
I.3. Critères d'évaluation de la toxicité physiologique	2
1ère PARTIE : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE	5
<u>CHAPITRE I</u> : Ecophysiologie des bivalves	7
I.1. L'activité de filtration	7
I.1.1. Principe	7
I.1.2. Mécanisme	7
I.1.3. L'efficacité de rétention	10
I.1.4. Quantification de la filtration : taux de pompage et taux de filtration	10
I.1.5. Les rythmes de filtration	15
I.1.6. Facteurs de variation et mécanismes de contrôle	15
I.2. L'activité respiratoire	17
I.2.1. Mécanisme d'extraction de l'oxygène	17
I.2.2. Facteurs de variation de la consommation d'oxygène	17
I.2.3. Relation entre le taux de filtration et le taux de consommation d'oxygène	21
<u>CHAPITRE II</u> : Aspects de la contamination des hydrosystèmes par les métaux lourds	23
II.1. Généralités	23
II.1.1. Sources de contamination	23
II.1.2. Spéciation	25
II.1.3. Le passage transmembranaire	26
II.2. Les effets des métaux lourds sur la faune aquatique	26
II.2.1. Statut des métaux dans les systèmes biologiques	26
II.2.2. Effets des métaux lourds sur les invertébrés	29
II.2.2.1. Toxicité aiguë	29
II.2.2.2. Toxicité sublétales	30

II.3. Effets des métaux chez les mollusques bivalves	30
II.3.1. Voies de prise et mécanismes de détoxification	30
II.3.2. Toxicité létale	37
II.3.3. Effets sublétaux	42
II.3.3.1. Le bivalve face au métal, la réponse comportementale	45
II.3.3.2. Effets sur le taux de filtration	48
II.3.3.3. Mécanisme d'inhibition de la filtration	50
II.3.3.4. Effets des métaux sur l'activité respiratoire	53
II.3.3.5. Effets biochimiques et cellulaires	55
II.3.3.6. Effets histopathologiques	56
II.3.3.7. Effets sur la croissance et la reproduction	57
2ème PARTIE : MATERIEL ET METHODES	59
<u>CHAPITRE I</u> : Matériels biologiques	61
I.1. <i>Dreissena polymorpha</i>	61
I.1.1. Systématique et répartition géographique	61
I.1.2. Aspects anatomiques et biologiques	63
I.1.3. <i>Dreissena</i> dans la recherche écotoxicologique	64
I.2. <i>Chlorella vulgaris</i>	65
I.3. <i>Chlamydomonas variabilis</i>	65
<u>CHAPITRE II</u> : Approche méthodologique	67
II.1. Prélèvement et maintenance des moules	67
II.2. L'exposition aux toxiques	70
II.2.1. Les systèmes d'essai en laboratoire	70
II.2.2. Les dispositifs expérimentaux	72
II.2.3. Modalités de contamination	74
II.2.4. Les solutions métalliques	75
II.3. Les techniques d'étude des fonctions physiologiques	75
II.3.1. Méthode d'étude des comportements de filtration : l'anémométrie à film chaud	75
II.3.1.1. Principe de l'approche	75
II.3.1.2. Principe de la technique	77
II.3.1.3. Dispositif expérimental	77

II.3.1.4. Milieu d'essai et mode opératoire	77
II.3.1.5. Lecture des enregistrements	79
II.3.2. La mesure du taux de filtration	79
II.3.2.1. Dispositif de mesure	79
II.3.2.2. Les suspensions	81
II.3.2.3. Comptage des particules	82
II.3.2.4. Expression des résultats	83
II.3.3. La mesure respirométrique	83
II.3.3.1. Le dispositif de mesure	83
II.3.3.2. Précaution d'utilisation et entretien	85
II.3.3.3. Mode opératoire	85
II.3.3.4. Expression des résultats	86
II.3.4. Evaluation du potentiel énergétique de croissance	86
II.3.4.1. Principe de méthode	86
II.3.4.2. Les calculs énergétiques	87
II.3.4.3. La mesure du taux d'excrétion	88
II.4. Traitement des données	89
3ème PARTIE : ETUDE EXPERIMENTALE.	
RESULTATS ET DISCUSSION	91
<u>CHAPITRE I</u> : Toxicité létale des métaux chez <i>Dreissena</i>	93
I.1. Introduction	93
I.2. Conditions d'essai et protocole expérimental	93
I.3. Expression des résultats	94
I.4. Toxicité létale du zinc	94
I.5. Toxicité létale du cuivre	95
I.5.1. Essai en automne	97
I.5.2. Essai du printemps	99
I.6. Toxicité létale du mercure	101
I.6.1. Essai d'automne	101
I.6.2. Essai du printemps	103
I.7. Toxicité létale du cadmium	104
I.8. Toxicité létale du plomb	105
I.9. Discussion générale de la toxicité létale à court terme des métaux lourds chez <i>Dreissena</i>	106

<u>CHAPITRE II</u> : Effets de l'exposition aux métaux sur le comportement de filtration de <i>Dreissena polymorpha</i>	109
II.1. Analyse des enregistrements	109
II.1.1. Définitions	109
II.1.2. Analyse du cycle de 24 heures	109
II.2. Description de l'activité de filtration témoin	112
II.3. Effets du zinc sur le comportement de filtration de <i>Dreissena</i>	117
II.3.1. Exposition de court terme (24 heures)	117
II.3.2. Effets à moyen terme du Zn sur le comportement de filtration de <i>Dreissena</i>	123
II.4. Effets du cuivre sur le comportement de filtration de <i>Dreissena</i>	125
II.5. Effets du mercure sur le comportement de filtration de <i>Dreissena</i>	129
II.6. Effets du cadmium sur le comportement de filtration de <i>Dreissena</i>	130
II.7. Effets du plomb sur le comportement de filtration de <i>Dreissena</i>	133
II.8. Discussion générale de la toxicité des métaux vis-à-vis de l'activité de filtration	135
<u>CHAPITRE III</u> : Effets de l'exposition aux métaux sur le taux de filtration de <i>Dreissena</i>	137
III.1. Conditions expérimentales et mode opératoire	137
III.2. Taux de filtration (TF) chez les témoins	138
III.3. Effets du zinc sur le TF de <i>Dreissena</i>	143
III.4. Effets du cuivre sur le TF de <i>Dreissena</i>	147
III.5. Effets du mercure sur le TF de <i>Dreissena</i>	149
III.6. Effets du cadmium sur le TF de <i>Dreissena</i>	152
III.7. Effets du plomb sur le TF de <i>Dreissena</i>	155
III.8. Discussion générale de la toxicité des métaux vis-à-vis du taux de filtration de <i>Dreissena</i>	158
<u>CHAPITRE IV</u> : Effets de l'exposition sublétales aux métaux sur la consommation d'oxygène chez <i>Dreissena</i>	161
IV.1. Etude préliminaire : facteur de variation et variabilité de la consommation d'oxygène chez <i>Dreissena</i>	161
IV.1.1. But de l'étude	161
IV.1.2. Influence de la température sur la VO ₂ de <i>Dreissena</i>	161
IV.1.3. Influence du poids sur la VO ₂	165
IV.1.4. Influence de la diminution de la pression partielle d'O ₂ (pO ₂) sur la VO ₂	165

IV.1.5. Influence de la saison	166
IV.1.6. Influence du jeûne	168
IV.2. Effets du zinc sur la VO ₂ de <i>Dreissena</i>	168
IV.2.1. Expositions de 6 h et 24 h	168
IV.2.2. Exposition de 3 semaines	171
IV.2.3. Effet du Zn en présence d'un chélatant (l'EDTA)	172
IV.2.4. Discussion	173
IV.3. Effets du cuivre sur la VO ₂ de <i>Dreissena</i>	177
IV.3.1. Expositions de 6 h et 24 h	177
IV.3.2. Exposition d'une semaine	179
IV.3.3. Discussion	179
IV.4. Effets du mercure sur la VO ₂ de <i>Dreissena</i>	181
IV.4.1. Expositions de 6 h et 24 h	181
IV.4.2. Exposition d'une semaine	181
IV.4.3. Discussion	183
IV.5. Effets du cadmium sur la VO ₂ de <i>Dreissena</i>	185
IV.6. Effets du plomb sur la VO ₂ de <i>Dreissena</i>	185
IV.6.1. Expositions de 6 h et 24 h	185
IV.6.2. Exposition de 96 h	187
IV.6.3. Exposition de deux semaines	187
IV.6.4. Discussion	188
IV.7. Discussion générale des effets des métaux sur la consommation d'oxygène de <i>Dreissena</i>	188
CHAPITRE V : Intégration des effets physiologiques du cadmium et du cuivre chez <i>Dreissena</i> : effets sur le potentiel énergétique de croissance (PEC)	191
V.1. Introduction	191
V.2. Conditions de l'essai	191
V.3. Protocole expérimental	194
V.3.1. Préparation des moules	194
V.3.2. Mesures physiologiques	194
V.3.3. Détermination de l'efficacité d'assimilation	195
V.4. Résultats des mesures physiologiques	197
V.4.1. Taux de filtration	197
V.4.2. Consommation d'oxygène	199
V.4.3. Taux d'excrétion	201

V.5. Les bilans énergétiques	201
V.5.1. Les paramètres de l'énergie assimilée	201
V.5.2. Le potentiel énergétique de croissance	202
V.6. Discussion	204

**4ème PARTIE : EXTENSION A D'AUTRES MICROPOLLUANTS
ET DISCUSSION DE L'UTILITE ECOTOXICO-
LOGIQUE DE *DREISSENA*** 209

**CHAPITRE I : Evaluation de l'utilité écotoxicologique des fonctions
physiologiques de *Dreissena*** 209

I.1. Introduction	211
I.2. Effets physiologiques de deux micropolluants organiques et d'un effluent industriel sur <i>Dreissena</i>	211
I.2.1. Effets d'un agent de surface non ionique	211
I.2.1.1. Toxicité létale	211
I.2.1.2. Effets sur le TF	213
I.2.1.3. Effets sur la VO ₂	213
I.2.2. Effets d'un organochloré : le Lindane	213
I.2.2.1. Toxicité létale	215
I.2.2.2. Effets sur le TF	215
I.2.3. Cas d'un effluent industriel	217
I.2.3.1. Prélèvement et stockage	217
I.2.3.2. Déroulement des essais	217
I.2.3.3. Effets létaux	219
I.2.3.4. Effets sur le TF	219
I.2.3.5. Effets sur la VO ₂	220
I.2.3.6. Discussion	220
I.3. Discussion générale de l'utilité écotoxicologique des fonctions physiologiques de <i>Dreissena</i>	220
I.3.1. Choix de la fonction de filtration (TF) comme critère de toxicité sublétale à moyen et long terme	220
I.3.2. Intérêt du paramètre "consommation d'O ₂ "	223
I.3.3. Intérêt du calcul du potentiel énergetique de croissance (PEC)	224

CHAPITRE II : Utilisation de la réponse comportementale de <i>Dreissena</i> comme outil biologique de visualisation de la toxicité	227
II.1. Introduction	227
II.2. Définition d'une méthode d'essai pour la visualisation de la toxicité basée sur la réponse comportementale de <i>Dreissena</i>	228
II.2.1. Principe	228
II.2.2. Intérêt de l'étude du mode de filtration par rapport à l'étude des mouvements valvaires	229
II.2.3. Domaines d'application de l'étude du mode de filtration	229
II.2.4. Matériel et procédure	229
II.2.5. Limites de détection de l'essai comportemental pour quelques substances toxiques	232
II.2.6. Comparaison de la sensibilité du mode de filtration par rapport à l'activité valvaire	233
II.2.7. Comparaison avec d'autres essais de visualisation de la toxicité : l'essai bactérien Microtox et l'activité respiratoire du poisson	234
II.2.8. Discussion générale	236
 SYNTHESE ET PERSPECTIVES	 237
 BIBLIOGRAPHIE	 241
 ANNEXES	 257

INTRODUCTION GENERALE ET SITUATION DU TRAVAIL

I.1. IMPORTANCE DES ETUDES DE TOXICITE SUBLETALE EN ECOTOXICOLOGIE

Les essais d'évaluation de la toxicité aiguë constituent une première approche de l'écotoxicité, ils renseignent sur l'importance du risque de l'exposition à une substance (ou à un effluent) sur les biocénoses (Giesy et Graney, 1989). La simplicité de leur principe et la rapidité de leur exécution ont permis de les adopter comme moyen de visualisation (screening) de la toxicité dans la réglementation concernant les substances chimiques nouvelles et les effluents industriels. On utilise notamment, à ces fins réglementaires, des essais normalisés (standardisés) tels que l'essai d'immobilisation de *Daphnia* sp (Norme française, NF T 90-301), l'essai d'inhibition de la croissance d'une population d'algues (NF T 90-304) et l'essai de toxicité aiguë vis-à-vis du poisson *Brachydanio rerio* (NF T 90-303) (AFNOR, 1990).

Cependant, la valeur prédictive des essais de toxicité aiguë est contestée par certains auteurs (Brown, 1979 ; Sindermann, 1979 ; Malins, 1989) qui reprochent au critère de létalité d'être trop extrême pour pouvoir renseigner sur la nocivité d'une substance, et qu'aucune information ne découle de ces essais à propos de la compréhension des mécanismes de toxicité (Sindermann, 1979). De plus, on est en mesure de se demander "jusqu'à quel point la mort d'un amphipode ou d'une larve d'huître renseigne sur l'impact d'un toxique sur un écosystème complexe" (Malins, 1989) ; l'auteur affirme que la démonstration scientifique n'a jamais été faite sur la pertinence de la démarche. Pour Brown (1981) et Maltby et Calow (1989), il faut être très critique sur la généralisation faite à partir des essais de toxicité aiguë.

La recherche sur la toxicité sublétales est donc nécessaire pour la compréhension des effets toxiques autres que létaux, puisque ce sont eux qui s'expriment le plus souvent dans les situations réelles de pollution de l'environnement.

Les effets autres que létaux sont nombreux : effets physiologiques, biochimiques, histopathologiques, comportementaux, et sur la croissance et la reproduction. La recherche de ces effets, bien que longue et coûteuse, ne pose pas de problèmes insurmontables puisqu'elle bénéficie des connaissances et techniques acquises dans les sciences fondamentales correspondantes.

La recherche sur les effets physiologiques des substances toxiques sur les espèces animales revêt actuellement une grande importance en écotoxicologie. Les poissons et certains groupes d'invertébrés (crustacés, mollusques, vers et insectes) sont les plus utilisés dans ce domaine. Dans la suite, nous nous référerons essentiellement aux invertébrés et, notamment, aux mollusques bivalves auxquels appartient notre matériel biologique (*Dreissena polymorpha*). Ce groupe est

largement utilisé dans les études de surveillance de l'état de contamination de l'environnement par différents polluants : métaux, PCB, pesticides, hydrocarbures, etc... (Phillips, 1976 ; Goldberg *et al.*, 1978 ; Farrington *et al.*, 1983 ; Léglize et Crochard, 1987 ; Fischer, 1988). De nombreuses recherches sont effectuées actuellement en vue de leur utilisation dans le domaine de l'évaluation de la toxicité sublétales (Bayne *et al.*, 1985 ; Bayne *et al.*, 1988 ; Kramer *et al.*, 1989).

I.2. SITUATION DU TRAVAIL

L'étude que nous présentons s'inscrit dans le cadre des études entreprises au Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Metz sur la moule *Dreissena polymorpha* en vue de son utilisation comme bioindicateur en milieu d'eau douce. Les données acquises montrent la bonne capacité de bioaccumulation pour différents types de micropolluants tels que les métaux, les PCB et les organochlorés (Léglize et Crochard, 1987 ; Benyahia *et al.*, 1987 ; Maarouf, 1988 ; Mersch, 1989 ; Jeanjean, 1989).

Notre étude s'intéresse à un autre aspect de la recherche écotoxicologique sur la moule, celui qui concerne les effets des substances toxiques sur les fonctions physiologiques. Elle porte particulièrement sur les effets de cinq métaux lourds (cuivre, cadmium, mercure, zinc et plomb).

En fonction des résultats acquis, une extension des essais à d'autres substances est effectuée afin de discuter l'utilité des fonctions physiologiques de *Dreissena* comme indicateurs de la toxicité sublétales.

I.3. CRITERES D'EVALUATION DE LA TOXICITE PHYSIOLOGIQUE

I.3.1. Les effets comportementaux

La première réponse évidente à la toxicité chez les animaux est la réaction comportementale. Le comportement est intéressant à étudier parce qu'il intègre plusieurs processus cellulaires et qu'il est essentiel pour la viabilité de l'organisme, la population et la communauté. Le critère d'évaluation dans une telle étude représente la capacité de l'animal à interagir normalement avec son environnement (Sindermann, 1988). Dans ce domaine, beaucoup d'intérêt est actuellement accordé aux invertébrés, et notamment aux bivalves chez lesquels les mouvements valvaires et l'activité de fouissement sont pris comme critères d'évaluation de la toxicité sublétales (Stirling, 1975 ; Akberali et Black, 1981 ; Manley, 1983).

Les modifications du comportement de filtration de la moule *Dreissena polymorpha* sont étudiées, dans le présent travail, en tant que premier critère de toxicité physiologique.

I.3.2. Les mesures respiratoires

L'activité respiratoire en tant qu'indicateur de l'intensité métabolique est intéressante à étudier. On mesure le plus souvent le taux de consommation d'oxygène associé parfois à la production de dioxyde de carbone. Il est intéressant de noter que ce paramètre peut varier dans les deux sens selon les toxiques en présence (augmentation ou diminution), ce qui est parfois considéré comme un inconvénient pour exprimer la toxicité (Hunter, 1978) ; la toxicité étant le plus souvent assimilée à une inhibition de la fonction mesurée.

Le taux respiratoire de *Dreissena* est utilisé comme deuxième critère de toxicité sublétales dans le présent travail.

I.3.3. Le taux de consommation de nourriture

Ce critère consiste à mesurer l'action du toxique étudié sur le niveau d'alimentation des organismes exposés (statut alimentaire) ; sa signification est évidente par rapport aux besoins énergétiques pour le maintien et la croissance. On utilise également l'absorption, qui est l'énergie consommée moins ce qui est rejeté dans les fèces (Crisp, 1971).

Chez les bivalves filtreurs, c'est le taux de filtration qui reflète la prise de nourriture. Il sera étudié dans le présent travail comme troisième critère de toxicité sublétales.

I.3.4. Les bilans énergétiques

L'intégration des effets physiologiques par l'évaluation du statut énergétique de l'animal est une méthode utile et à grande signification écologique dans les études de toxicité sublétales (Bayne *et al.*, 1985).

Cette méthode est relativement facile à mettre en oeuvre chez les bivalves ; les fonctions à mesurer sont la consommation d'oxygène, le taux de filtration et le taux d'excrétion. Elle est utilisée dans le présent travail pour l'évaluation de la toxicité chronique de deux métaux (cadmium et cuivre) sur *Dreissena* ; elle sera reprise en détail par la suite.

1ère PARTIE
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I : ECOPHYSIOLOGIE DES BIVALVES

I.1. L'ACTIVITE DE FILTRATION

I.1.1. Principe

Chez les bivalves eulamellibranches, la collecte de la nourriture se fait par filtration de l'eau. C'est la fonction des branchies, situées des deux côtés de la masse viscérale et divisant la cavité du manteau en chambres infra et suprabranchiales.

L'eau pompée dans le milieu entre dans la cavité palléale par l'ouverture inhalante (différenciée en siphon ou non) où elle passe à travers le filtre branchial ; ce processus permet la rétention des particules alimentaires qui seront conduites vers les sillons alimentaires où elles sont acheminées vers la bouche.

L'eau ainsi filtrée passe au niveau de la cavité suprabranchiale pour être expulsée par le siphon exhalant. Les particules non prises par les courants alimentaires sont agglutinées en pseudo-fèces et expulsées par le siphon inhalant (Fig. 1 et 2).

I.1.2. Mécanisme

Les filaments branchiaux portent des ensembles ciliaires (Fig. 3) bien définis et qui remplissent différentes fonctions. Les cils latéraux, situés des deux côtés du filament et arrangés en frange continue, créent par leurs battements les courants inhalants et exhalants. La coordination de ces mouvements est d'origine nerveuse, elle prend naissance au niveau du ganglion viscéral et progresse via le nerf branchial (Morton, 1983).

Les cils frontaux servent au transport des particules, aussi bien dorsalement que ventralement, en direction des gouttières alimentaires qui les envoient vers la bouche.

La filtration proprement dite est assurée par les cils latéro-frontaux situés des deux côtés du filament (Fig. 4). Ceux-ci sont disposés de façon à former un maillage rigide entre les filaments branchiaux. Ils battent à angle droit par rapport au grand axe du filament, ce qui renvoie les particules retenues vers les cils frontaux. Là, elles sont prises dans le courant de surface qui les conduit vers les gouttières alimentaires (Moore, 1971 ; Owen, 1974).

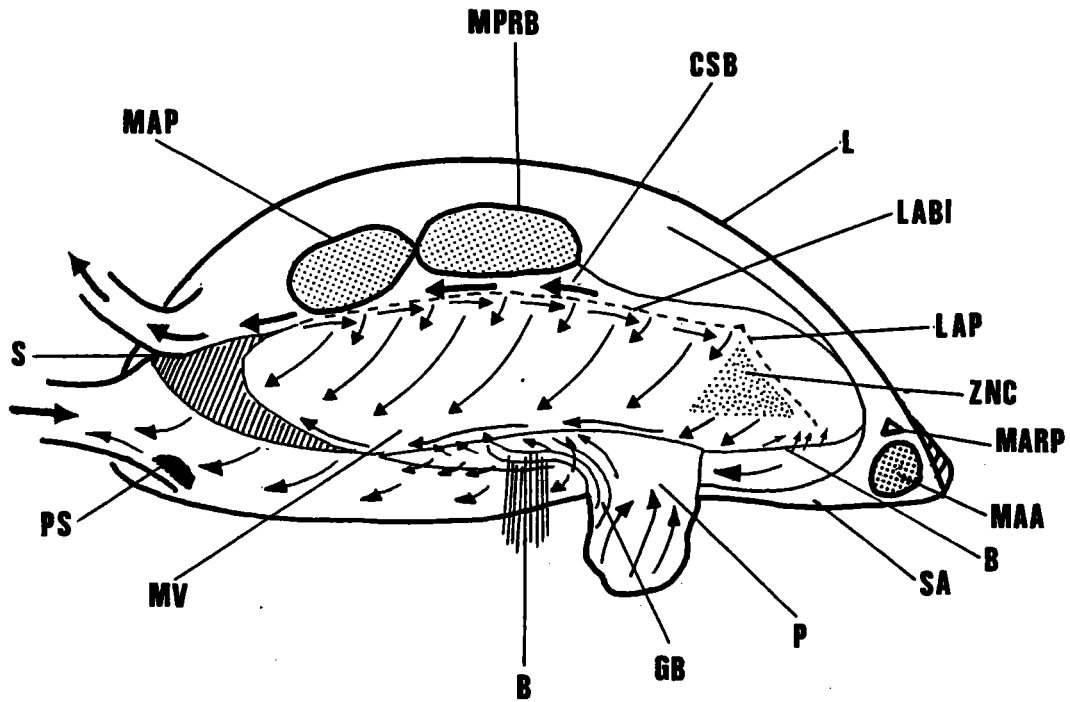


Fig.1 : Les courants de filtration et les courants nettoyeurs du manteau, de la masse viscérale et du pied chez la moule *Dreissena polymorpha* (manteau et branchie droits enlevés). D'après Morton (1969a).

Légende :

- B : Bouche.
- By : Byssus.
- CSB : Chambre suprabranchiale.
- GB : Glande du byssus.
- L : Ligament.
- LABI : Ligne d'attache de la branchie interne.
- LAP : Ligne d'attache des palpes.
- MAA : Muscle adducteur antérieur.
- MAP : Muscle adducteur postérieur.
- MARP : Muscle adducteur rétracteur du pied.
- MPRP : Muscle postérieur rétracteur du pied.
- MV : Masse viscérale.
- P : Pied.
- PS : Pseudofèces.
- S : Septum.
- SA : Septum apical.
- ZNC : Zone non ciliée.

- ← Courants nettoyeurs.
- ← Sens du transit de l'eau.

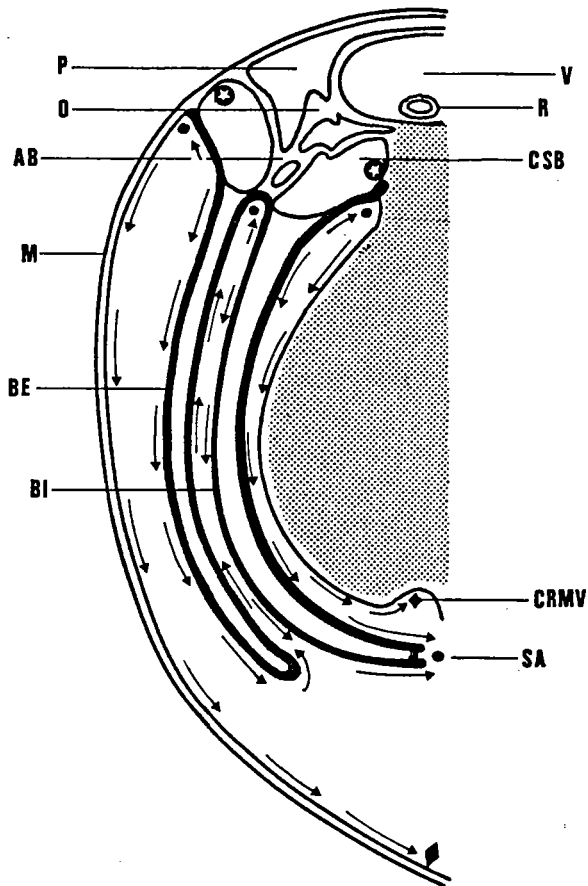


Fig.2 : *Dreissena polymorpha*, coupe transversale dans la moitié de l'animal montrant les différents courants ciliaires. ● : courants dirigés vers la bouche, ◆ : courants postérieurs nettoyeurs, ⊕ : courants postérieurs de la chambre suprabranchiale. D'après Morton (1969a).

Légende :

- AB : Axe de la branchie.
- BE : Branchie externe.
- BI : Branchie interne.
- CSB : Chambre suprabranchiale.
- CRMV : Courants de rejet de la masse viscérale.
- M : Manteau.
- O : Oreillette.
- P : Péricarde.
- R : Rectum.
- SA : Sillon alimentaire.
- V : Ventricule.

Malgré quelques différences dans la densité des différents groupes ciliaires et dans leur disposition sur le filament branchial chez les différentes familles de la classe des bivalves, le mécanisme est le même chez tous les bivalves filtreurs (Morton, 1983).

I.1.3. L'efficacité de rétention

La distance entre les cils latéro-frontaux adjacents (le filtre branchial) est en général de 2 à 3,5 μm , ce qui explique la rétention efficace des particules de plus grande taille. Cependant, la branchie retient aussi bien des particules de taille plus faible. Par exemple, *Dreissena polymorpha* retient des particules de 0,7 μm mais le maximum d'efficacité est atteint pour 5 μm (Sprung et Rose, 1988). Chez *Cardium edule*, le maximum d'efficacité est atteint pour des particules de 7 μm et en dessous de 1 μm , il n'y a pas de rétention (Vahl, 1973).

Foster-Smith (1975) a expliqué la rétention des particules de faible taille par la présence d'une fine couche de mucus qui couvre la branchie et qui constituerait le vrai filtre branchial. Vahl (1973) a également remis en cause le rôle déterminant du filtre composé par les cils latéro-frontaux ; il a remarqué l'absence de corrélation entre le type de la branchie et l'efficacité de rétention. Pour des raisons hydrodynamiques, il semble qu'il faille considérer la branchie comme une unité fonctionnelle dans la rétention des particules (Jorgensen, 1981).

Jorgensen (1975, 1976, 1981) a étudié la filtration chez plusieurs espèces et spécialement chez *Mytilus edulis*. Il a proposé un mécanisme hydrodynamique pour la rétention des particules. Selon ce mécanisme, les cils latéro-frontaux auraient pour fonction de s'opposer au mouvement de l'eau dans l'espace interfilamentaire au lieu de servir de filtre aux particules. En repoussant l'eau vers la surface frontale du filament, ils participent, avec les cils frontaux, à la création des courants de surface. La conjugaison des battements des deux groupes ciliaires crée un mode d'écoulement tridimensionnel complexe qui fait que les particules échappent au courant pénétrant l'espace interfilamentaire pour être prises en charge par les courants de surface (Fig. 4).

I.1.4. Quantification de la filtration : taux de pompage et taux de filtration

La filtration est la principale activité physiologique chez les bivalves. Elle détermine la nutrition de l'animal, sa respiration et son excrétion. Du point de vue biologique et physiologique, il est donc intéressant de pouvoir la quantifier, notamment pour l'évaluation des échanges énergétiques entre l'animal et son milieu ainsi que pour l'évaluation de l'efficacité de production (croissance). Deux grands types de méthodes sont utilisés pour déterminer le taux de passage de l'eau dans la cavité palléale : des méthodes directes et des méthodes indirectes.

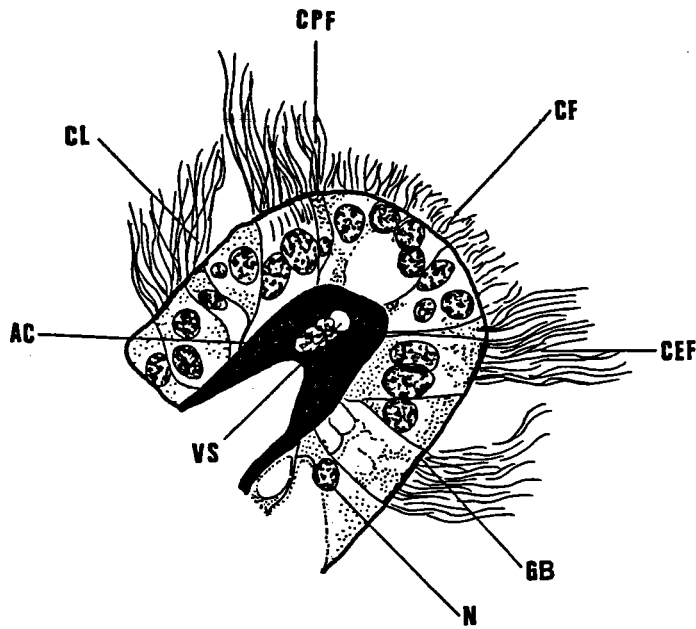


Fig.3 : coupe transversale de la partie frontale d'un filament branchial chez *Dreissena polymorpha* montrant l'agencement des groupes ciliaires. D'après Morton (1969a).

- AC : Axe calcifié.
- CEF : Cils eulatero-frontaux.
- CF : Cils frontaux.
- CL : Cils latéraux.
- CPF : Cils prolatero-frontaux.
- GB : Granules basaux.
- N : Noyau.
- VS : Vaisseau sanguin

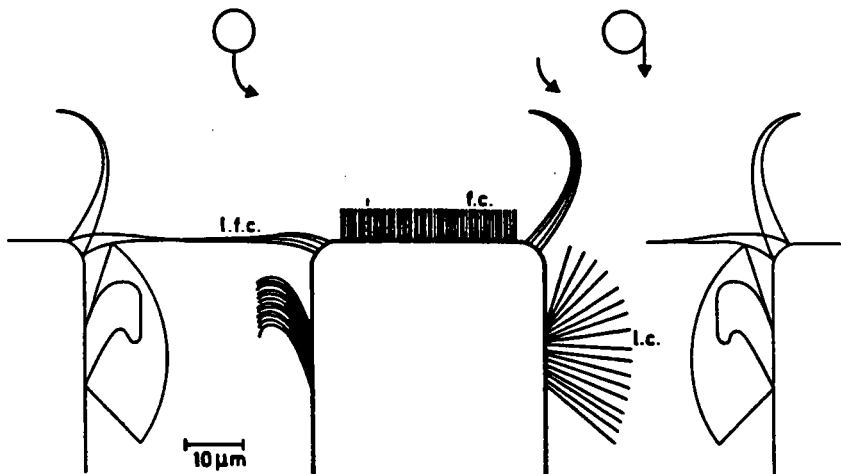


Fig.4 : Section transversale schématique de la surface branchiale de *Mytilus edulis* montrant le mécanisme de rétention des particules (explications dans le texte). fc : cils frontaux, lc : cils latéraux, lfc : cils latéro-frontaux. D'après Jorgensen (1981).

I.1.4.1. Les méthodes directes

De nombreux auteurs ont essayé d'isoler le courant exhalant pour le mesurer directement (taux de pompage). La méthode consiste à canaliser le courant dans un tube fixé autour du siphon (Davids, 1964 ; Hildreth, 1976) ou à appliquer une membrane qui sépare le siphon inhalant du siphon exhalant (Famme *et al.*, 1986) ; le volume d'eau est ensuite mesuré et rapporté à une unité de temps. Coughlan et Ansell (1964) ont utilisé une substance colorante pour différencier le courant exhalant. His (1982) a cherché à établir une relation entre le débit palléal mesuré et l'activité valvaire enregistrée mécaniquement.

Considérant que ces méthodes de canalisation étaient traumatisantes pour l'animal et pouvaient donc modifier la filtration normale, Mc Cammon (1965) a développé une méthode directe qui consiste à mesurer le débit exhalant à l'aide de thermistances. La méthode de l'anémométrie à film chaud basée sur le même principe a été utilisée chez les ascidies (Fiala-Medioni, 1978) et chez certains bivalves (Amouroux *et al.*, 1975 ; Amouroux, 1982). Cette technique exige que le siphon soit de grande taille, ce qui limite son utilisation chez les bivalves de petite taille comme *Dreissena* ; elle peut néanmoins servir dans des études qualitatives chez les petites espèces. Cette technique sera utilisée dans le présent travail ; elle sera reprise dans le chapitre consacré aux matériels et méthodes.

I.1.4.2. Les méthodes indirectes

* Principe : la majorité des études sur la filtration utilise des méthodes indirectes. Une substance en suspension dans l'eau est filtrée et ingérée par l'animal, ceci provoque la diminution de sa concentration dans le milieu. Le taux de filtration est calculé d'après cette diminution de concentration en fonction du temps.

Les suspensions utilisées par les auteurs sont très variées. Elles peuvent être de nature inerte comme le rouge neutre (Watling, 1981 ; Mohan *et al.*, 1986a) ; le latex (Hornbach *et al.*, 1984) ou encore le graphite colloïdal, substance la plus utilisée (Jorgensen et Goldberg, 1953 ; Morton, 1971 ; Wilson et Seed, 1974 ; Abel, 1976 ; Wright *et al.*, 1982). La suspension peut être également de nature vivante : algues unicellulaires, en culture monospécifique (Ballantine et Morton, 1956 ; Ali, 1970 ; Wilson, 1983 ; Kryger et Riisgard, 1988) ou en mélange de deux ou plusieurs espèces (Mohlenberg et Riisgard, 1979 ; Shumway *et al.*, 1985 ; Riisgard, 1988 ; Sprung et Rose, 1988). D'autres auteurs se servent de suspensions bactériennes (Wright *et al.*, 1982 ; Matthews *et al.*, 1989). Widdows *et al.* (1979, 1982) ont employé les particules naturelles (seston) en suspension dans l'eau de mer.

L'utilisation de suspensions de différentes natures et les différences entre procédures expérimentales rendent délicate la comparaison des résultats obtenus pour une même espèce et a fortiori pour des espèces différentes. Il faut noter que les méthodes indirectes mesurent le taux de filtration (clarification de la suspension) qui est inférieur au taux de pompage, sauf si la rétention des particules est efficace à 100% (Coughlan et Ansell, 1964), ce qui n'est pas toujours le cas. Les bivalves sélectionnent les particules selon la taille (Vahl, 1972 ; Jorgensen, 1975) ; la majorité retient les particules dont le diamètre est supérieur à 4 µm avec une efficacité de 100%. Les particules de 1 µm de diamètre sont retenues avec une efficacité réduite, généralement moins de 50% (Vahl, 1972 ; Jorgensen, 1975 ; Shumway *et al.*, 1985). Parfois la sélection se fait selon la nature chimique des particules (Ten Winkle et Davids, 1982).

* Estimation du taux de filtration (TF) : la méthode indirecte étant basée sur le taux de clarification d'une suspension, les conditions suivantes sont sensées être réalisées (Coughlan, 1969) :

- a - la réduction de la concentration en particules est due à la filtration par l'animal ainsi qu'à la décantation ;
- b - le pompage par l'animal est constant durant l'expérience ;
- c - la rétention des particules est efficace à 100%, ou bien la réduction se fait à pourcentage constant ;
- d - la suspension est homogène pendant la durée de l'expérience.

Le calcul du TF se fait d'après l'équation de Coughlan (1969) :

$$TF = \frac{M}{n.t.} \ln \frac{C_0}{C_t} \text{ avec :}$$

TF : taux de filtration (en ml/h)

C_0 et C_t : concentrations en particules au début et à la fin de la mesure (en nombre/ml)

M : volume de la suspension (en ml)

n : nombre d'animaux en expérience

t : durée de la mesure (en h).

Le TF est parfois exprimé par rapport au poids sec ($\text{ml.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ de poids sec).

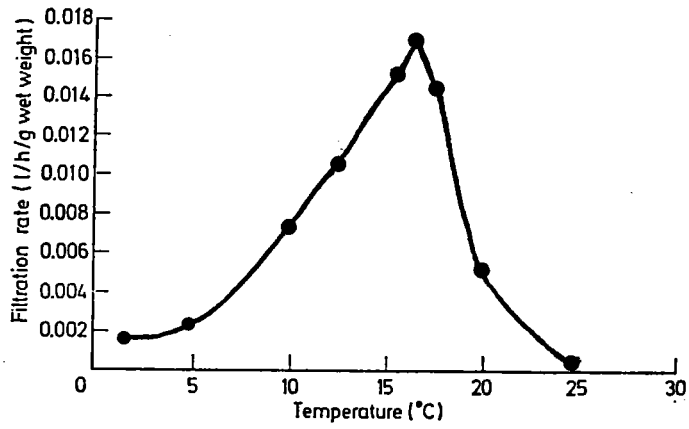


Fig.5 : Exemple de la relation entre le taux de filtration et la température (chez *Hiatella arctica*); d'après Ali (1970).

I.1.5. Les rythmes de filtration

Les rythmes d'ouverture sont imposés aux bivalves du littoral par le mouvement des marées. A marée basse, la coquille est fermée ou légèrement ouverte, mais il n'y a pas d'activité. En laboratoire, ce rythme disparaît en cas d'immersion continue (Davenport et Woolmington, 1982). Chez les bivalves d'eau douce, certains auteurs ont identifié des rythmes de filtration ; Salanki (1964) chez *Anodonta cygnea* et Morton (1969b, 1971) chez *Dreissena polymorpha*. Selon ces auteurs, c'est l'alternance jour/nuit qui régit ce rythme (ouverture la nuit). Walz (1978), Wallet (1984) et Sprung et Rose (1988) n'ont pas retrouvé un tel rythme chez *Dreissena*.

I.1.6. Facteurs de variation et mécanismes de contrôle

En tant que fonction physiologique, la filtration est sous la dépendance de facteurs intrinsèques et environnementaux.

* Variation avec la taille : la relation entre la taille et le TF est non linéaire. Beaucoup de données bibliographiques décrivent cette relation (Ali, 1970 ; Walne, 1972 ; Vahl, 1973 ; Bayne *et al.*, 1976 ; Kryger et Riisgard, 1988). Tous trouvent qu'elle est de la forme : $TF = a W^b$ où W est la taille, et a et b des coefficients spécifiques. b varie entre 0,20 et 0,80 chez *Mytilus* (Bayne *et al.*, 1976) mais est toujours inférieur à l'unité, ce qui signifie que le TF augmente avec la taille mais que cette augmentation s'atténue progressivement quand on atteint les grandes tailles ; il en résulte aussi que l'efficacité de la croissance corporelle (qui est liée à la filtration) décroît avec l'âge.

* Variation avec la température : la température est un facteur déterminant dans l'activité et le métabolisme des poïkilothermes. Néanmoins, même s'ils sont incapables de réguler leur taux d'échange de chaleur avec l'environnement, les bivalves peuvent varier leur TF de manière à le garder relativement indépendant de la température extérieure (Bayne *et al.*, 1976). Ces adaptations se font en continu dans la nature (acclimatation).

En laboratoire, on montre que le TF change quand on impose des variations de température. Il augmente à partir des basses températures jusqu'à un maximum, puis diminue dans les températures élevées défavorables (exemple sur la figure 5).

* Variation avec la saison : l'acclimatation permet aux bivalves de garder un TF relativement constant tout au long de l'année (Bayne *et al.*, 1976). Chez *Mytilus*, Widdows (1978) trouve la même activité de filtration quelle que soit la saison.

* Variation avec la taille des particules : une bonne rétention requiert une taille minimum pour les particules ; cette limite dépend des espèces (largeur des espaces interfilamentaires). Au-dessus, le TF ne dépend plus de ce paramètre. Chez *Dreissena*, Sprung et Rose (1988) ont caractérisé cette limite à 0,7 μm de diamètre. Chez *Mytilus*, Vahl (1972) a montré que les particules entre 2 et 8 μm sont retenues avec une efficacité de 80 à 100%.

* Variation avec la concentration des particules : le courant de filtration existe même en absence de particules, mais il est bas (besoins respiratoires et d'excrétion). Des TF plus soutenus sont initiés par un seuil de concentration en particules (Bayne *et al.*, 1976). Par contre, la filtration est inhibée à partir de concentrations élevées, critiques, selon les espèces, vraisemblablement du fait de la saturation des mécanismes de rétention (Davids, 1964 ; Ali, 1970 ; Schulte, 1975 ; Widdows *et al.*, 1979). La formation de pseudo-fèces est interprétée comme le signal de cette saturation. Les particules sont agglutinées par du mucus et rejetées via le siphon inhalant.

* Variation sous l'action de substances toxiques : des altérations de l'activité de filtration sont observées, *in situ* et en laboratoire, en réponse à l'exposition aux toxiques (métaux, pesticides, détergents, hydrocarbures). Cet aspect sera repris en détail par la suite en ce qui concerne l'action des métaux.

* Contrôle de l'activité de filtration : le mécanisme de filtration fait intervenir les mouvements valvaires, l'ouverture des siphons inhalants et exhalants, et le tissu branchial (espaces interfilamentaires) avec son système ciliaire. Face à des conditions défavorables, les bivalves peuvent réduire le contact avec le milieu extérieur en réduisant la filtration ou en l'arrêtant complètement par la fermeture de la coquille. Par exemple, quand la suspension est dense, il y a une réduction du TF chez *Mytilus* ; Dral (1968) lie cette réduction à des modifications de l'activité des cils latéraux et à des changements de position des branchies.

Foster-Smith (1976) a montré que le contrôle de l'écoulement d'eau est plus efficace par les modifications de l'ouverture exhalante. Ce contrôle peut s'exercer de trois façons :

- fermeture périodique de l'ouverture exhalante
- restriction de son diamètre
- contraction et extension rapides et répétitives du siphon exhalant.

I.2. L'ACTIVITE RESPIRATOIRE

I.2.1. Mécanisme d'extraction de l'oxygène

Les besoins en oxygène chez les bivalves comprennent les demandes métaboliques pour l'activité ciliaire, pour l'assimilation de la nourriture, pour la croissance et la reproduction, et la demande pour la locomotion (réduite chez les bivalves) et les mouvements valvaires (Bayne *et al.*, 1976).

Il fut longtemps admis que la prise d'oxygène chez les bivalves se fait au niveau de la branchie (comme chez les poissons), celle-ci ayant une double fonction : amener les courants alimentaires pour les trier et extraire l'O₂ pour la respiration. Le rôle respiratoire était considéré comme principal et le rôle alimentaire comme secondaire (Ghiretti, 1966 ; Bayne *et al.*, 1976). La structure de la branchie était considérée comme étant bien adaptée aux échanges gazeux puisque la surface d'échange est grande et bien fournie en milieu intérieur (Bayne *et al.*, 1976).

Cependant, l'efficacité d'extraction de l'O₂ n'excède pas 12% de l'oxygène dissous présent dans le milieu (Bayne *et al.*, 1976). Les faibles taux d'utilisation de l'O₂ conduisent à remettre en cause la prédominance du rôle respiratoire de la branchie chez les bivalves. Famme et Kofoed (1980) ont montré, chez *Mytilus*, que le taux de consommation d'O₂ (VO₂) n'est pas affecté quand les branchies sont sectionnées ; ils ont suggéré que l'échange gazeux se fait au niveau de toute la surface intérieure indifférenciée et que la branchie a surtout un rôle alimentaire. Selon Jorgensen *et al.* (1986), la branchie des bivalves présente une structure adaptée à la prise de nourriture tandis que la fonction respiratoire est dévolue à la surface générale de la cavité du manteau. La nature indifférenciée (non spécialisée) de celui-ci expliquerait la faiblesse d'extraction de l'O₂ par ces organismes.

Le milieu intérieur des bivalves ne contient pas de pigment respiratoire. Le transport d'O₂ se fait par simple diffusion de gaz dissous à travers le corps de l'animal (Bayne *et al.*, 1976 ; Jorgensen *et al.*, 1986). La circulation de l'hémolymphe assure le transport d'une partie mineure de l'O₂ consommé. Booth et Mangum (1979) trouvent que chez *Modiolus demissus*, la ligature de l'aorte antérieure réduit de 10 à 15% seulement la VO₂. Chez *Mytilus*, l'activité cardiaque n'a pas de fonction respiratoire significative (Famme, 1981).

I.2.2. Facteurs de variation de la consommation d'oxygène

La respiration chez les bivalves est sujette à des variations associées à des facteurs intrinsèques et environnementaux. Les facteurs environnementaux sont : la température, la pression d'O₂

(pO_2), l'abondance de la nourriture (qui détermine l'état nutritionnel) et la saison (qui détermine l'état reproductif).

* Influence de la taille : la relation entre la taille corporelle exprimée en poids (W) et la VO_2 est souvent exprimée sous la forme d'une équation de la forme : $VO_2 = a W^b$. a et b sont des coefficients spécifiques ayant une signification biologique (Bayne *et al.*, 1976 ; Widdows, 1978).

La valeur du coefficient b est très variable selon les auteurs et les conditions de mesure chez la même espèce ; par exemple chez *Mytilus*, Hamburger *et al.* (1983) trouvent pour b la valeur de 0,90 chez les larves véligères puis une décroissance avec l'âge : $b = 0,88$ chez les jeunes moules et $b = 0,66$ chez les adultes. Widdows (1978) montre que b varie avec la saison et la ration alimentaire, mais calcule un b de 0,65 commun à toutes les conditions, tandis que Riisgard *et al.* (1980) donnent une valeur de 1,14 pour les jeunes de *Mytilus*.

En fait, la valeur de b est liée à d'autres facteurs tels que la température, la saison et la disponibilité de la nourriture (Widdows, 1978).

* Influence de l'état nutritionnel (ration alimentaire) : trois niveaux de VO_2 ont été identifiés chez *Mytilus* par Thompson et Bayne (1972). Un taux standard ou de base, typique d'un animal privé de nourriture et qui montre une filtration faible ; un taux actif (VO_2 maximum) quand l'animal est nourri après une période de jeûne ; et enfin un taux de routine associé à un état nutritionnel satisfaisant (Bayne *et al.*, 1976). Par rapport à la situation en milieu naturel, ce sont les taux de routine qui rendraient le mieux compte de la consommation d' O_2 normale des animaux.

* Influence du cycle sexuel (effet de la saison) : plusieurs auteurs ont remarqué un effet spécifique du cycle saisonnier sur le taux respiratoire des bivalves, même si on exclut l'effet de la température et celui de la taille (Bayne *et al.*, 1976). Les variations de la VO_2 s'expliquent par les différences des besoins en énergie de l'organisme en fonction du cycle gamétogénétique (Bayne et Thompson, 1970 ; Widdows et Bayne, 1971 ; Newell et Bayne, 1980 ; Shafee, 1982).

En période de gamétogenèse active (développement et maturation des gamètes), les besoins métaboliques de l'animal sont élevés, d'où un fort taux respiratoire, alors qu'en période de repos sexuel, après la ponte, les besoins métaboliques sont faibles et expliquent les faibles taux respiratoires (Widdows, 1978).

Chez *Mytilus*, les forts taux de VO_2 s'observent au printemps et en été (gamétogenèse active), les faibles taux en automne et en hiver (Widdows, 1978). Un cycle similaire a été observé chez *Cardium edule* par Newell et Bayne (1980). Il est intéressant de noter que le taux de filtration reste

constant tout au long de l'année (chapitre I.1.6.), ce qui confirme que les variations saisonnières de la VO_2 sont d'origine physiologique "innée" (Bayne *et al.*, 1976).

* Influence de la température : les effets des changements de température sur la VO_2 ont été longuement revus par Bayne *et al.* (1976) ; ces auteurs distinguent deux catégories d'adaptation selon la durée permise à l'animal pour effectuer les régulations physiologiques.

On distingue une compensation immédiate (réponse aiguë) au changement de la température qui s'observe dans les heures qui suivent ce changement et des ajustements compensatoires qui demandent plusieurs jours voire des semaines. Ces ajustements sont désignés sous le terme "acclimatement" (acclimatisation en anglais) par les auteurs quand ils ont lieu dans la nature et "acclimatation" (acclimation en anglais) quand ils ont lieu en réponse à la seule variation de température en laboratoire.

a - La réponse aiguë à la variation de température : d'une manière générale, en partant des températures faibles, la VO_2 croît avec la température jusqu'à un maximum, puis chute brutalement, on atteint alors les limites supérieures de tolérance thermique pour l'espèce (Woynarovich, 1961 ; Read, 1962 ; Bayne *et al.*, 1976 ; Newell *et al.*, 1977 ; Williams, 1984). Chez *Dreissena*, Woynarovich (1961) a trouvé que la VO_2 augmente régulièrement entre 0,5 et 28°C et chute entre 28 et 30°C.

b - L'acclimatation en laboratoire permet la compensation des effets aigus et le retour à un niveau de VO_2 relativement indépendant de la température ; Widdows et Bayne (1971) ont montré chez *Mytilus* un comportement d'acclimatation remarquable après 14 jours pour des écarts de température de $\pm 5^\circ\text{C}$ à partir de 15°C.

Dans le milieu naturel, si l'on considère les variations saisonnières à la température, l'effet sur la VO_2 est constamment compensé, mais un effet indirect s'exerce à travers le contrôle de la gamétogénèse par les variations saisonnières de la température (associées au niveau trophique) et l'on observe alors les conséquences relatées dans le paragraphe précédent.

* Influence de la tension d' O_2 (pO_2) : les bivalves occupent différents milieux dont la pO_2 est variable. L'adaptation de la VO_2 à ces variations de la pO_2 a suscité beaucoup d'intérêt et cet aspect de la physiologie des bivalves est bien documenté. Les études de l'effet de l'hypoxie sur la VO_2 ont conduit les auteurs à classer les espèces en deux catégories (Ghiretti, 1966 ; Bayne, 1971 ; Mangum et Van Winkle, 1973 ; Mc Mahon, 1979 ; Famme, 1980) :

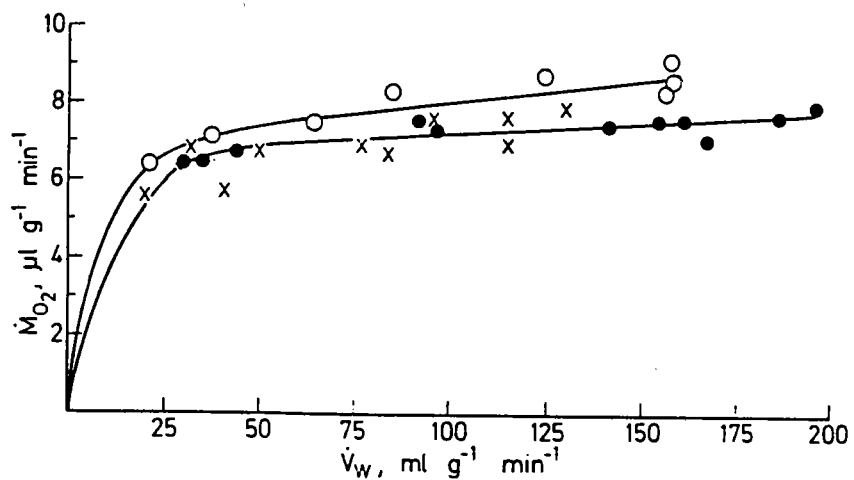


Fig.6 : Relation entre la consommation d'O₂ ($\dot{M}_{O_2} = \dot{V}O_2$) et la ventilation ($\dot{V}_w = TF$) chez *Mytilus edulis*. Résultats sur 3 animaux (●, ○, ×). D'après Jorgensen *et al.* (1986).

- Les espèces régulatrices : des mécanismes leur permettent de maintenir la VO_2 indépendante de la pO_2 .

- Les espèces non régulatrices : espèces dont la VO_2 suit les variations de la pO_2 dans les deux sens. Famme et Kofoed (1980) ont trouvé une relation hyperbolique entre la VO_2 et la pO_2 chez *Mytilus* tandis que Mangum et Van Winkle (1973) proposent un modèle polynomial pour décrire cette relation. Bayne *et al.* (1976) notent qu'il n'y a pas d'expression universelle de cette relation, même pour la même espèce. Elle dépendrait des conditions expérimentales et vraisemblablement de la taille.

I.2.3. Relation entre le taux de filtration et le taux de consommation d'oxygène

Cette relation a été revue et réinterprétée par Jorgensen *et al.* (1986) en tenant compte des particularités de la respiration chez les bivalves, à savoir :

- L'absence de pigment respiratoire.
- Le rôle insignifiant de la circulation de l'hémolymphe dans la prise d' O_2 .
- Le rôle insignifiant des branchies dans la respiration (dans les conditions normales) et de là, le fait que la prise d' O_2 se fait au niveau de la surface intérieure indifférenciée.

Ces particularités font que l'oxygène est disponible pour le corps de l'animal par diffusion physique dépendant de l'épaisseur de la couche d'eau potentiellement disponible pour la diffusion. Les auteurs rediscutent l'affirmation selon laquelle le taux de filtration est trop grand pour les besoins respiratoires. Utilisant les résultats de Famme (1980) et Famme et Kofoed (1980) sur la relation entre VO_2 , pO_2 et TF chez *Mytilus*, ainsi que leurs propres résultats avec des moules ventilées artificiellement, Jorgensen *et al.* (1986) ont montré que la VO_2 dépend du taux de filtration quand il est inférieur à 20% de sa valeur maximale ; au-delà, la VO_2 est indépendante du taux de filtration (Fig. 6). Il faut noter que, selon cette vision physique, l'interprétation "physiologique" qui tient compte du coût métabolique du pompage et de la régulation de la respiration par le pompage n'est pas valable. Les termes ayant des implications physiologiques comme "régulateurs" et "non régulateurs" de la VO_2 perdent également leur validité.

Tableau 1 : Métaux lourds employés dans les principales industries. D'après Dean *et al.* (1972) in Forstner et Wittmann (1981).

Secteurs d'activités	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Pb	Ni	Sn	Zn
Pulpe de bois, pâte à papier, cartonnage, scierie		+	+		+		+	+		+
Chimie organique, pétrochimie	+	+		+	+		+		+	+
Chimie minérale, bases, chlorés	+	+		+	+		+		+	+
Fertilisants	+	+	+	+	+	+	+	+		+
Raffinage du pétrole	+	+	+	+			+	+		+
Fonderies d'acier	+	+	+	+	+		+	+	+	+
Fonderies de métaux non ferreux	+	+	+		+		+			+
Moteurs de véhicules, placage, finissage	+	+	+		+			+		

CHAPITRE II : ASPECTS DE LA CONTAMINATION DES HYDROSYSTEMES PAR LES METAUX LOURDS

II.1. GENERALITES

Constituants normaux de la biosphère, les métaux lourds ont vu leurs conditions de circulation modifiées par l'activité humaine. Cela crée un bouleversement des cycles géochimiques des différents éléments métalliques, avec comme conséquence leur introduction généralisée, et à des taux élevés, dans les milieux aquatiques (continentaux et marins). Le problème posé par cette contamination est préoccupant ; les métaux sont d'une part indestructibles par dégradation, contrairement à la majorité des composés organiques et, d'autre part accumulables dans les systèmes hydriques, notamment par les sédiments, selon différents processus physico-chimiques (adsorption, complexation, etc...).

Les recherches sur la contamination métallique de l'environnement se sont multipliées depuis une trentaine d'années, surtout à la suite des maladies causées par certains métaux au Japon : la maladie de Minamata due à une contamination par le mercure et la maladie d'Itai Itai causée par une intoxication au cadmium.

II.1.1. Sources de contamination

En général, cinq sources peuvent être distinguées pour la contamination de l'environnement par les métaux : (1) les processus naturels d'érosion ; (2) l'activité minière ; (3) l'utilisation industrielle des métaux et composés métalliques ; (4) le lessivage des zones d'épandage et de stockage de déchets industriels ou domestiques et (5) les excréctions animales et humaines qui contiennent des métaux (Forstner et Wittmann, 1981).

Si l'enrichissement des eaux par les métaux à partir des gisements naturels est inéluctable et constitue "un bruit de fond" qui sert de niveau de référence, il est fortement augmenté par les effluents issus des activités d'extraction minière.

Cet enrichissement reste relativement limité aux zones d'activités minières. Plus répandu et préoccupant se trouve être l'enrichissement du fait des effluents émis par les industries utilisant les métaux et composés métalliques (Tableau 1). En Lorraine, les études conduites au Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Metz sur la contamination de la rivière Moselle par les rejets sidérur-

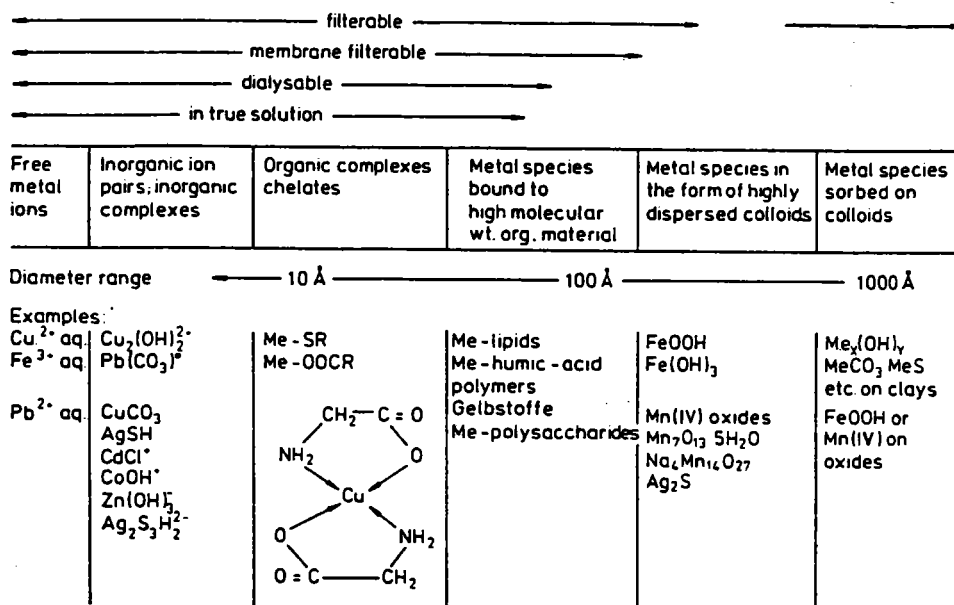


Fig.7 : Formes possibles de la spéciation métallique (Me=metal).D'après Stumm et Morgan (1981) in Forstner (1987).

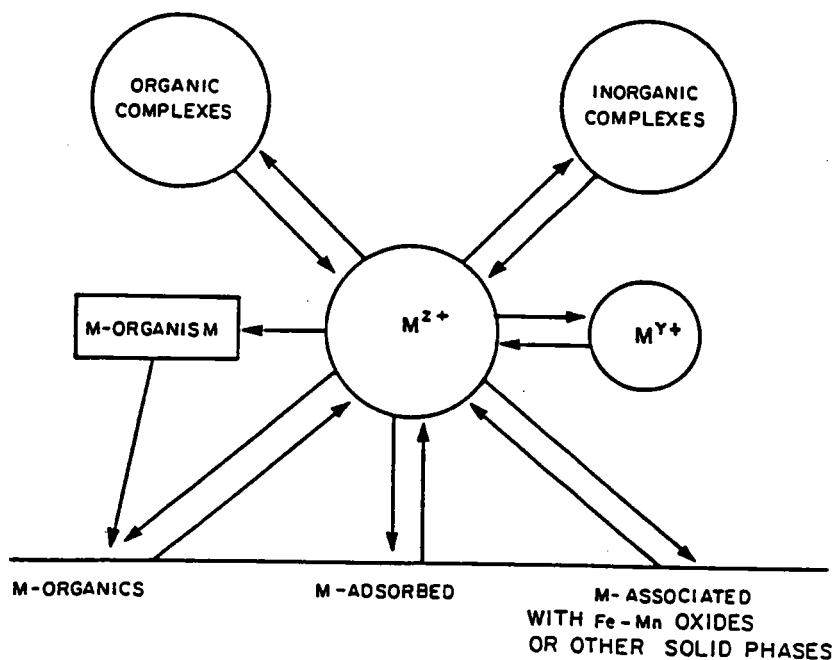


Fig.8 : Représentation schématique de la distribution des métaux en milieu aquatique (M=metal). D'après Tessier et Campbell (1987).

giques constituent une bonne illustration de cet enrichissement (Nourisson et Pihan, 1985 ; Légilize et Crochard, 1987).

Une autre source de contamination des eaux par les métaux est la gestion des matériaux métalliques ou organiques usagés ; c'est le cas de la pollution par le cadmium liée à l'incinération des matières plastiques. Les boues des stations d'épuration et les effluents d'origine domestique constituent également une source importante de contamination des eaux.

II.1.2. Spéciation

Les études biologiques ont montré que la toxicité et l'accumulation des métaux sont fortement influencées par les formes (les espèces) chimiques présentes dans le milieu lors du transfert des métaux (Waldichuk, 1974 ; Nelson et Donkin, 1985 ; Morrison et Revitt, 1987 ; Forstner, 1987 ; Tessier et Campbell, 1987 ; Luoma, 1989). La complexité et la diversité du comportement d'un métal dans l'eau sont dues à la variabilité des caractéristiques physico-chimiques des milieux (pH, dureté, salinité, composés organiques, matières en suspension). Le métal peut être libre ou absorbé sur des particules dont la taille est variable. Les auteurs séparent les formes suivantes : dissoute, colloïdale et particulaire (Morrison et Revitt, 1987).

Cependant, il n'y a pas de limite stricte entre forme dissoute et particulaire ; les auteurs utilisent arbitrairement la frontière de filtration de $0,45 \mu\text{m}$ (Mouvet, 1984). La forme dissoute comprend le métal libre (ionisé) et le métal complexé, mais en solution vraie (Forstner, 1987) (Fig. 7). Les relations entre les différentes formes peuvent être résumées par le schéma général présenté dans la figure 8 (Tessier et Campbell, 1987).

C'est à la forme dissoute qu'on attribue principalement la toxicité des métaux puisque c'est la forme la plus biodisponible. Il a été en effet montré que plus un métal est complexé, moins il est toxique pour les organismes exposés (Forstner et Wittmann, 1981 ; Nelson et Donkin, 1985). Les études expérimentales concernant ces phénomènes de complexation utilisent des chélatants simples tels que l'EDTA (acide éthylènediamine tétraacétique) et le NTA (acide nitrotriacétique) (Ravera *et al.*, 1973 ; Sunda *et al.*, 1978 ; Zamuda et Sunda, 1982 ; Holwerda *et al.*, 1988 ; Maarouf, 1988). Il est intéressant de noter qu'en milieu naturel la rétention des métaux par les sédiments atténue leur toxicité immédiate, mais peut être responsable d'une toxicité différée en cas de remobilisation des métaux complexés ; ce phénomène de relargage est notamment favorisé par l'acidification des milieux (Forstner et Prosi, 1979 ; Forstner, 1987). Les méthodes d'explication et de prévision de l'effet de la géochimie du sédiment sur la biodisponibilité du métal sont encore peu développées (Luoma, 1989).

II.1.3. Le passage transmembranaire

Pour exercer une action toxique vis-à-vis d'organismes aquatiques, le métal doit franchir la barrière biologique constituée par la membrane cellulaire. Ce passage pose le problème de l'affinité avec les constituants de la membrane dont la double couche de phospholipides, hydrophobes, semble rendre difficile le passage des ions libres. Les formes électriquement neutres ont donc plus de chance pour le passage. En fait, le mécanisme exact du passage transmembranaire des métaux chez les animaux n'est pas encore élucidé (George et Viarengo, 1985). Plusieurs mécanismes ont été proposés ; tous écartent l'entrée de l'ion libre. Parmi ces mécanismes il y a :

- * La diffusion passive de molécules électriquement neutres comme le $(\text{HgCl}_2)^\circ$ (Gutknecht, 1981), le complexe pouvant être aussi formé avec une molécule organique (Simkiss, 1983).
- * La pénétration par compétition avec d'autres ions (comme Ca^{++}) sur les canaux transmembranaires de ceux-ci (Holwerda *et al.*, 1989).
- * Le transfert du métal par des ligands membranaires de force croissante (Williams, 1981).
- * La pinocytose pour les formes colloïdales telles que les hydroxydes (George, 1980).

Il est vraisemblable que chaque métal a son propre mode de pénétration transmembranaire en relation avec son comportement particulier dans la cellule.

II.2. LES EFFETS DES METAUX LOURDS SUR LA FAUNE AQUATIQUE

II.2.1. Statut des métaux dans les systèmes biologiques

Les différents aspects de la toxicité des métaux sur les espèces aquatiques sont actuellement bien documentés. Depuis une trentaine d'années, de nombreuses recherches ont été consacrées à l'évaluation de cette toxicité, d'abord chez les poissons et, depuis les années 70, de plus en plus chez les invertébrés (Maciorowski et Clarke, 1980). Parmi les métaux qui présentent un risque de toxicité pour les populations aquatiques et du fait de notre recherche, nous nous intéresserons dans cette synthèse bibliographique surtout aux métaux suivants : zinc (Zn), cuivre (Cu), mercure (Hg), plomb (Pb) et cadmium (Cd).

- Le Cu est largement distribué dans la nature, c'est un métal essentiel qui intervient dans le métabolisme normal des êtres vivants, notamment dans plusieurs métalloprotéines : l'hémocyanine,

Tableau 2 : Exemples de CL50 des métaux chez quelques groupes d'invertébrés.

Métal	Groupe taxonomique	Espèces	CL50 (ppm)	Dureté de l'eau (D en mgCaCO ₃ /l) ou salinité (S en ‰)	Référence
Hg ⁺⁺	Protozoaires	<i>Vorticella convallaria</i>	0,005 (12 h)	-	Sartory et Lloyd (1976)
	Rotifères	<i>Philodina acuticornus</i>	0,7-0,8 (96 h) 1,6-2,1 (96 h)	D : 25 D : 81	Buikema et al. (1974)
	Polychètes	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	0,022 (96 h)	-	Reish et al. (1976)
	Oligochètes	<i>Tubifex sp</i>	0,18 (48 h)	-	Sloof (1983)
	Crustacés	<i>Gammarus sp</i>	0,01 (96 h)	D : 50	Rehbold et al. (1973)*1
		<i>Asellus aquaticus</i>	0,59 (72 h)	D : 50	Martin et Holdich (1986)
		<i>Palaemonetes pugio</i>	0,060 (96 h)	S : 25	Curtis et al. (1979)
<i>Panesus setiferus</i>		0,020 (96 h)	S : 25	Green et al. (1976)	
Diptères	<i>Chironomus sp</i>	0,020 (96 h)	D : 50	Rehbold et al. (1973)	
Cu ⁺⁺	Rotifères	<i>Brachionus rubens</i>	0,019 (24 h)	D : 80-100	Snell et Persoone (1989a)
		<i>Brachionus plicatilis</i>	0,120 (24 h)	S : 15	Snell et Persoone (1989a)
	Polychètes	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	0,30 (96 h)	-	Reish et al. (1976)
		<i>Capitella capitata</i>	0,20 (96 h)	-	Reish et al. (1976)
	Crustacés	<i>Daphnia pulex</i>	0,05 (24 h)	-	Mound et Norberg (1984)*2
		<i>Daphnia magna</i>	0,14 (24 h)	-	Foulquier et Baudin-Jaulent (1981)
		<i>Palaemonetes pugio</i>	37,0 (96 h)	S : 25	Curtis et al. (1979)
Diptères	<i>Ephemerella subvaria</i>	0,32 (48 h)	D : 44	Warnick et Bell (1969)	
Cd ⁺⁺	Rotifères	<i>Brachionus rubens</i>	0,81 (24 h)	D : 80-100	Snell et Persoone (1989b)
		<i>Brachionus plicatilis</i>	54,90 (24 h)	S : 15	Snell et Persoone (1989b)
	Oligochètes	<i>Tubifex sp</i>	0,18 (48 h)	-	Sloof (1983)
	Polychètes	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	12,0 (96 h)	-	Reish et al. (1976)
		<i>Capitella capitata</i>	7,5 (96 h)	-	Reish et al. (1976)
	Crustacés	<i>Simocephalus serrulatus</i>	0,007 (48 h)	D : 11,1	Giesy et al. (1977)
		<i>Daphnia magna</i>	0,21 (24 h)	-	Foulquier et Baudin-Jaulent (1981)
		<i>Palaemonetes pugio</i>	0,2 (96 h)	S : 5	Sunda et al. (1978)
		<i>Gammarus pulex</i>	0,08 (48 h)	-	Sloof (1983)
	Diptères	<i>Chironomus sp</i>	> 56 (48 h)	-	Sloof (1983)

*1 in Moore et Ramamoorthy (1983)

*2 in Snell et Persoone (1989a)

Tableau 2 : Exemples de CL50 des métaux chez quelques groupes d'invertébrés. (suite)

Métal	Groupe taxonomique	Espèces	CL50 (ppm)	Dureté de l'eau (D en mgCaCO3/l)	Référence
Pb ⁺⁺	Protozoaires	<i>Vorticella convallaria</i>	0,0036 (12 h)	-	Sartory et Lloyd (1976)
	Crustacés	<i>Daphnia hyalina</i>	0,055 (48 h)	-	Baudouin et Scoppa (1974)*1
		<i>Asellus aquaticus</i>	670 (48 h)	D : 250	Fraser (1980)*1
	Polychètes	<i>Neanthes arenaceodentata</i>	> 10,0 (96 h)	-	Reish et al. (1976)
<i>Capitella capitata</i>		6,8 (96 h)	-	Reish et al. (1976)	
Diptères	<i>Tanytarssus dissimilis</i>	0,26 (96 h)	D : 46,8	Anderson et al. (1980)*1	
Zn ⁺⁺	Protozoaires	<i>Vorticella convallaria</i>	0,29 (12 h)	-	Sartory et Lloyd (1976)
	Crustacés	<i>Asellus aquaticus</i>	26,4 (72 h)	D : 50	Martin et Holdich (1986)
		<i>Daphnia magna</i>	25,0 (24 h)	-	Foulquier et Baudin-Jaulent (1981)
		<i>Capitella capitata</i>	3,5 (96 h)	-	Reish et al. (1976)
	Oligochètes	<i>Tubifex tubifex</i>	0,1 (48 h)	D : 0,1	Brkovic-Popovic et Popovic (1977)*1
	Diptères	<i>Ephemerella subvaria</i>	16 (10 j)	D : 44	Warnick et Bell (1969)

la cytochrome oxydase, la tyrosinase, la laccase, la céruloplasmine, etc... Dans toutes ces protéines, le Cu est en liaison avec les groupes azotés, oxygénés et/ou soufrés (Moore et Ramamoorthy, 1983).

Des troubles pathologiques peuvent apparaître en cas d'excès ou de déficience en cuivre.

- Le Zn est également un métal essentiel. Il est trouvé comme composant de certaines enzymes et faiblement lié à d'autres (Wolfe, 1970). Chez les mammifères, plus de vingt métalloenzymes ont été identifiées incluant l'anhydrase carbonique, la phosphatase alcaline et l'alcool déshydrogénase. Le Zn joue un rôle essentiel dans la biosynthèse des acides nucléiques, des ARN-polymérase et des ADN-polymérase (Moore et Ramamoorthy, 1983).

- A la différence du Zn et du Cu, on ne connaît pas de rôle, dans le métabolisme normal, au Cd, au Pb et au Hg. Néanmoins, ces métaux se retrouvent dans les tissus des êtres vivants, parfois en grande concentration à cause de l'exposition à la pollution métallique. Ils se comportent souvent de la même façon que le Cu et le Zn au niveau des systèmes cellulaires (George, 1982). Cette similitude de comportement peut être à l'origine de déséquilibres dans le métabolisme des métaux essentiels (Zn et Cu).

Nous nous limiterons dans cette synthèse aux effets des métaux chez les invertébrés en général, puis chez les mollusques bivalves plus en détail.

II.2.2. Effets des métaux lourds sur les invertébrés

II.2.2.1. Toxicité aiguë

La connaissance des effets aigus des métaux sur les invertébrés est ample. Un nombre considérable d'espèces appartenant à divers groupes taxonomiques a été utilisé pour l'évaluation de ces effets. Le tableau 2 présente quelques exemples de concentrations létales moyennes (CL50) chez les groupes les plus étudiés.

La toxicité létale est très variable selon le métal, l'espèce étudiée et les conditions d'essai, notamment la physico-chimie du milieu expérimental.

Le Cu et le Hg sont les plus toxiques (Tableau 3), suivis par le Cd puis le Zn et le Pb. La spéciation du métal joue un rôle important dans la toxicité.

Les stades jeunes sont en général plus sensibles que les stades adultes ; les organismes qui muent montrent une sensibilité plus élevée juste après la mue (Benfield et Buikema, 1980).

Tableau 3 : Gammes générales de la toxicité létale des métaux chez les invertébrés aquatiques (d'après Moore et Ramamoorthy, 1983).

Métal	Cu	Hg	Cd	Pb	Zn
CL50, 96h (en ppm)	< 0,5	0,005-1	0,003-0,5	0,1-10	0,5-5

II.2.2.2. Toxicité sublétale

Le tableau 4 résume quelques données sur les effets sublétaux des métaux chez les invertébrés. L'action sur la reproduction et la croissance des embryons est la plus marquée compte tenu des concentrations auxquelles elle s'exerce. Celles-ci sont faibles par rapport aux concentrations létales. John et Miller (1982) ont montré, par la méthode des bilans énergétiques, un ralentissement du développement larvaire et la réduction de la croissance somatique chez le crabe *Cancer irroratus* exposé au Cd (50 ppb) ou au Cu (10 ppb). L'analyse énergétique a montré que la réduction de croissance était due à l'augmentation du coût de maintenance métabolique et non à une réduction de l'assimilation d'énergie.

II.3. EFFETS DES METAUX CHEZ LES MOLLUSQUES BIVALVES

II.3.1. Voies de prise et mécanismes de détoxification

L'aptitude des mollusques à accumuler les métaux lourds, à des concentrations largement plus élevées que leur environnement, n'est plus à démontrer. Les études de terrain, comme celles de laboratoire, ont montré que l'on peut corréler les charges métalliques corporelles avec les concentrations dans le milieu (Phillips, 1976 ; Goldberg *et al.*, 1978 ; George *et al.*, 1978 ; Hemelraad *et al.*, 1986 ; Léglize et Crochard, 1987 ; Fischer, 1988 ; Holwerda *et al.*, 1988 ; Maarouf, 1988). Cette aptitude d'accumulation fait des bivalves un groupe de choix pour la surveillance de l'état de contamination de l'environnement.

Tableau 4 : Exemples d'effets sublétaux des métaux chez les invertébrés aquatiques.

Critère de toxicité	Espèce	Métal	Modalités de l'essai	Effets toxiques	Références
Respiration	<i>Monodonta articulata</i> (gastéropode)	Hg	0,2 - 1 ppm - 6 h	Réduction de la VO ₂	Saliba et Vella (1977)
	<i>Cancer irroratus</i> (crustacé)	Cd	0,12 ppm - 1 ppm - 48 h	Réduction de la VO ₂ branchiale	Thurberg et al. (1973)
	<i>Carcinus maenas</i> (crustacé)	Cu	10 ppm - 2 h	Réduction de la VO ₂	Depledge (1984)
		Hg	1 ppm - 2 h	Réduction de la VO ₂	Depledge (1984)
	<i>Pectinaria koreni</i> (polychète)	Cu	0,01 - 0,04 - 48 h	Elévation de la VO ₂	Neuhoff et Theede (1984)
Reproduction et croissance	<i>Haliotis rufescens</i> (gastéropode)	Zn	> 0,041 ppm - 48 h	Développement anormal des larves (CE50 = 0,068 ppm)	Hunt et Anderson (1989)
		Zn	> 0,019 ppm - 9 j	Inhibition des métamorphoses (CE50 = 0,05 ppm)	Hunt et Anderson (1989)
	<i>Biomphalaria glabrata</i> (gastéropode)	Pb	0,1 ppm - 51 j	Retard du développement embryonnaire	Ravera (1977)
		Cd	0,1 ppm - 48 h	Développement embryonnaire incomplet	Ravera (1977)
		Cu	0,1 ppm - 48 h	Développement embryonnaire incomplet	Ravera (1977)
	<i>Hydra littoralis</i> (cnidaire)	Cu	0,002 - 0,012 ppm - 11 j	Inhibition de la reproduction asexuée	Stebbing et Pomroy (1978)
<i>Cancer irroratus</i> (crustacé)	Cd	0,005 - 0,3 ppm	Développement retardé chez la larve	Johns et Miller (1982)	
	Cu	0,003 - 0,2 ppm	Développement retardé chez la larve	Johns et Miller (1982)	

Tableau 4 : Exemples d'effets sublétaux des métaux chez les invertébrés aquatiques. (suite)

Critère de toxicité	Espèce	Métal	Modalités de l'essai	Effets toxiques	Références	
Biochimie	<i>Nucella lapillus</i> (gastéropode)	Cd	0,2 - 0,6 ppm - 14 j	Réduction du taux de glycogène	Abdullah et Ireland (1986)	
	<i>Libellula sp</i> (insecte)	Pb	0,02 ppm - 6 semaines	Diminution de l'activité des enzymes oxydatives du système nerveux	Meyer et al. (1986)	
	<i>Homarus americanus</i> (crustacé)	Cd	0,003 - 0,006 ppm	Stimulation : - ATPase - glucose déshydrogénase - pyruvate kinase	Calabrese et al. (1977a)	
	<i>Lymnea luteola</i> (gastéropode)	Cu	2 ppm - 6 h	Inhibition : cytochrome oxydase Stimulation : peroxydase	Babu et Rao (1985)	
Histopathologie	<i>Penaeus duorarum</i> (crustacé)	Cd	0,76 ppm - 15 j	Nécrose tissulaire, vacuolisation des cellules branchiales	Cough (1977)	
	<i>Eirene viridula</i> (cnidaire)	Zn	3 - 10 ppm)	Changements morphologiques	Karbe (1972)*
		Pb	1 - 10 ppm)		
		Cd	0,3 - 10 ppm)		
		Cu	0,06 - 1 ppm)		
Hg		0,003 - 0,1 ppm)	Réorganisation tissulaire		

* In Waldichuk (1974)

II.3.1.1. Prise de métal

Chez les bivalves, toute la cavité palléale baigne dans le milieu environnant. Le métal soluble est pris par les téguments exposés (le manteau et la branchie). Le métal particulaire est pris par le tube digestif. Il est difficile de faire la part entre les deux voies de prise, cela dépend de la spéciation très complexe du métal dans le milieu (George, 1980 ; Simkiss et Mason, 1983). Certains auteurs ont insisté sur l'importance de la voie indirecte (digestive) à cause de la capacité de filtration et d'ingestion des particules par les bivalves (Schulz-Baldes, 1974 ; George et Pirie, 1980). Par contre, d'autres auteurs ont mis en évidence l'importance de la voie directe (branchie et manteau), c'est le cas du Cd chez *Mytilus* (Riisgard *et al.*, 1987) et du Zn et Pb chez *Dreissena polymorpha* (Giamberini, 1987 ; Maarouf, 1988).

II.3.1.2. Devenir du métal dans l'organisme

Les études de laboratoire montrent que les métaux se distribuent dans les principaux organes de prise : manteau, branchies et glande digestive, puis après un certain temps de latence, dans le rein (organe d'excrétion) et en plus faibles teneurs dans les autres organes (Coombs et George, 1978 ; Robinson *et al.*, 1985 ; Hemelraad *et al.*, 1986 ; Hietanen *et al.*, 1988).

Le métal une fois pris doit être détoxifié par l'organisme afin de prévenir les manifestations de toxicité qu'il est susceptible d'induire (George et Viarengo, 1985). Il est évident que si la concentration du métal dans le milieu dépasse la capacité de détoxification de l'organisme, la toxicité ne pourra être complètement évitée, l'ion métallique étant capable de réagir très vite avec des sites électronégatifs, notamment les enzymes. La détoxification se fait à deux niveaux : au niveau de la circulation et au niveau des tissus.

II.3.1.2.1. Détoxification au niveau de la circulation

Le milieu intérieur qui transporte les métaux dans l'organisme est aussi le premier lieu de leur détoxification. Le métal est pris en charge, en partie ou en totalité, par les protéines du plasma ; c'est le cas du Zn et du Cu (George *et al.*, 1978 ; George et Pirie, 1980 ; Robinson *et al.*, 1985). La fraction restante est prise en charge par les cellules circulantes (hémocytes). Celles-ci sont en interaction continue avec le plasma et sont capables de phagocyter les protéines qui s'y trouvent (George, 1980). La grande mobilité intratissulaire des hémocytes (on les appelle également amébocytes) fait d'eux un lieu de transport principal du métal jusqu'aux tissus (George *et al.*, 1978).

La distribution du métal dans les tissus est très rapide (George et Pirie, 1979 ; Schulz-Baldes, 1978). Robinson *et al.* (1985) ont par exemple montré qu'au septième jour d'exposition au Cd, seules quelques traces subsistent dans l'hémolymphe de *Mercenaria mercenaria*.

II.3.1.2.2. Détoxification tissulaire

La littérature traitant des sites de détoxification intracellulaire des métaux est très abondante. Les données acquises relatent les différents aspects et systèmes intervenant dans la séquestration du métal (éléments du cytosol, notamment les protéines et les structures subcellulaires : membranes, lysosomes, vésicules golgiennes, etc...). Nous évoquerons d'abord ces différents aspects, mais il sera intéressant par la suite d'en faire une synthèse dans le cadre d'un schéma général concernant le métabolisme intracellulaire des métaux.

a - Dans la fraction cytosolique : le métal peut s'y lier à toute molécule qui présente un site de fixation ; les protéines sont les premières concernées, elles sont classées selon leur poids moléculaire (PM) par les auteurs.

* Les protéines de haut PM, > 40000 D en général (Harrison et Lam, 1985). Le métal peut se fixer sur les groupements fonctionnels tels que les imidazoles, les sulfhydriles, les carboxyles, les amines et les peptides. Ce groupe de protéines contient les métalloenzymes qui peuvent subir ainsi un changement d'activité par la fixation de métaux (Viarengo, 1985).

* Les protéines de faible PM, entre 5000 et 40000 (Harrison et Lam, 1985). Cette catégorie contient des protéines spécifiques appelées métallothionéines.

Les métallothionéines se caractérisent par un PM entre 6000 et 10000, une teneur élevée en cystéine (jusqu'à 30%), l'absence d'acides aminés aromatiques et par leur inductibilité en présence de métaux comme le Cd, Cu, Hg et Zn (Frankenne *et al.*, 1980 ; Roesijadi, 1981 ; Engel et Brouwer, 1984).

Malgré leur richesse en groupements sulfhydriles, ces molécules ne présentent pas de ponts disulfures (Cosson, 1987). Elles ont une forte affinité pour les métaux.

Les métallothionéines (MT) sont trouvées chez la plupart des groupes taxonomiques, aussi bien animaux que végétaux. Elles ont suscité une grande discussion quant à leur rôle physiologique. On leur attribue une fonction physiologique normale dans l'homéostasie des métaux essentiels (Zn et Cu) ; elles représenteraient dans ce contexte un pool de métaux interchangeable. En cas d'exposi-

tion, leur synthèse est induite et représenterait ici un moyen de détoxification (Simkiss *et al.*, 1982 ; George et Viarengo, 1985 ; Viarengo *et al.*, 1987).

Chez les bivalves, des protéines de type métallothionéines ont été trouvées chez plusieurs espèces (George *et al.*, 1979 ; Frankenne *et al.*, 1980 ; Viarengo *et al.*, 1985 ; Johansson *et al.*, 1986). Cependant, peu de molécules ont été purifiées et caractérisées et, pour cette raison, les auteurs parlent parfois de protéines similaires aux métallothionéines (PSMT).

Le Cd, le Cu, le Zn, le Hg et le Fe ont été trouvés liés à des PSMT (Roesijadi, 1981) ; seul le Pb ne semble pas s'y fixer.

* Les métaux peuvent enfin se lier à des substances de très faible PM (< 5000) : acides aminés, nucléotides, polypeptides, etc...

b - Dans la fraction particulière : le métal est séquestré dans des structures limitées par une membrane et qui assurent ainsi sa détoxification. Elles sont appelées granules ou vésicules membranaires et sont de morphologie variable, résultat généralement d'une évolution dans le cas d'un métal précis (Brown, 1982). Ces granules sont trouvés au niveau de la branchie, du manteau, et surtout du rein où ils peuvent occuper 20% de la cellule (George et Pirie, 1980). Au sein du granule, le métal peut être associé à d'autres métaux ou à d'autres éléments tels que le phosphore, le calcium ou le soufre (Schulz-Baldes, 1978 ; Marshall et Talbot, 1979 ; Harrison et Lam, 1985).

Brown (1982) a noté que, malgré leurs origines diverses (Corps de Golgi, réticulum endoplasmique, membrane plasmique), ces organites peuvent être incorporés dans un schéma général de fonction lysosomale aboutissant à un corps résiduel (Fig. III.4).

La phase finale de la détoxification est l'excrétion des granules par exocytose (George, 1980).

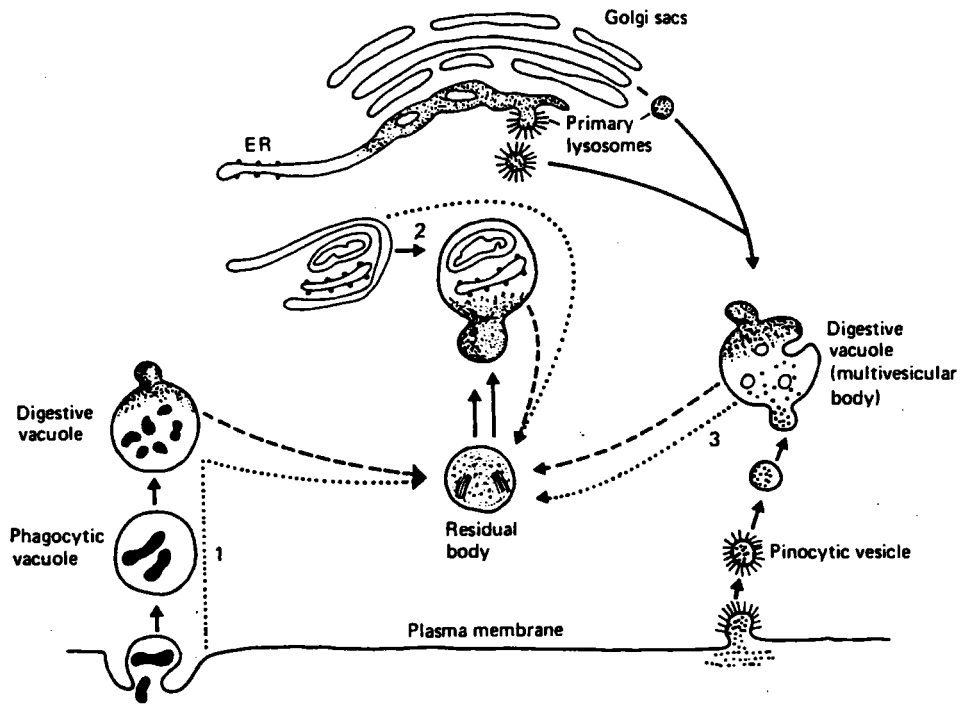


Fig. 9 : Schéma de synthèse des origines et fonctions possibles des différents types de lysosomes. D'après Brown (1982).

II.3.1.3. Schéma de l'homéostasie intracellulaire des métaux

George et Viarengo (1985) ont revu les connaissances acquises sur la prise et la détoxification des métaux. Ils ont proposé un modèle qui intègre, comme l'avait suggéré auparavant Brown (1982), tous les aspects de la détoxification autour de la fonction lysosomale.

Selon le modèle (Fig. 10), le métal entrant dans la cellule se lie d'abord d'une manière non spécifique aux protéines de haut PM. Après quelques heures, il devient lié aux MT qui ont une affinité plus grande avec les métaux. La fixation du zinc demanderait la synthèse de nouvelles molécules alors que le Cu et le Cd se fixeraient en déplaçant le Zn des MT déjà existantes. Quand celles-ci sont saturées, de nouvelles synthèses ont lieu.

La complexation par les MT réduit ainsi le pool de métal libre et limite sa toxicité, mais il constitue aussi une réserve en cas de demande.

Le métabolisme des MT, et plus particulièrement leur dégradation, fait intervenir le lysosome ; c'est à ce niveau que les métaux en sont séparés. Ils peuvent alors repartir dans le cytosol pour la coordination de nouvelles MT. Cependant, l'aptitude de la matrice lysosomale à former des polymères peroxydés insolubles fait que l'excès de métal y est piégé et devient entièrement indisponible.

Le lysosome tertiaire constitue ainsi un système tampon efficace pour les métaux.

La phase terminale du métabolisme des métaux est l'excrétion des lysosomes tertiaires par exocytose.

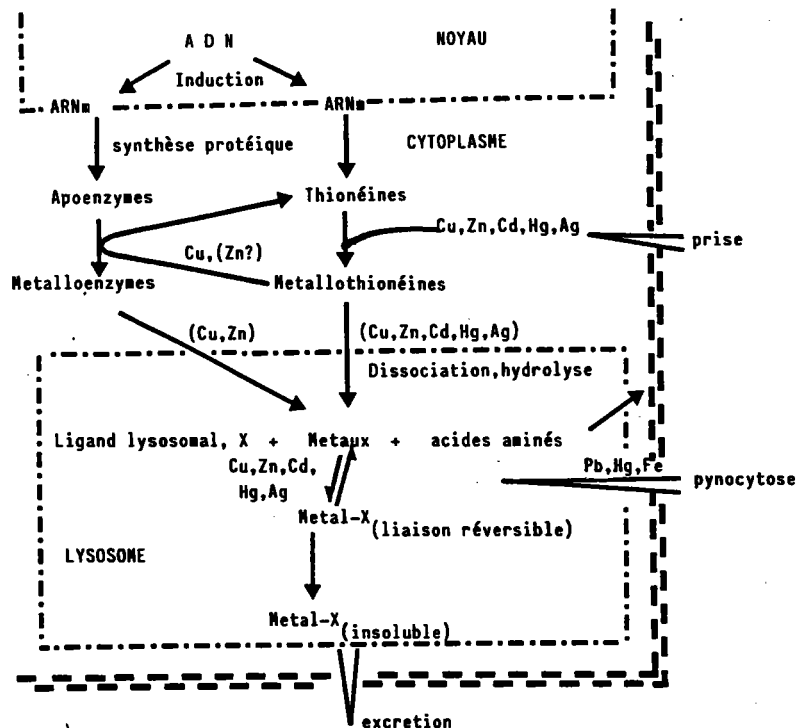


Fig. 10 : Chemins métaboliques pour les métaux lourds dans la cellule animale. D'après George and Viarengo (1985).

Il est à noter enfin que le Pb semble échapper quelque peu à ce modèle puisqu'il n'a jamais été trouvé lié à des MT. Selon George et Viarengo (1985), le Pb soluble ainsi que celui pris par pinocytose sont directement pris par le lysosome où ils sont ensuite immobilisés.

II.3.2. Toxicité létale

Parmi les invertébrés, les mollusques bivalves sont considérés comme étant un des groupes les plus résistants aux métaux, du moins pour les expositions de courte durée.

Tableau 5 : Niveaux de concentrations létales des métaux chez les bivalves.

Métal	Espèce	Concentration létale (ppm)	Modalités de l'essai	Référence	
Cu++	<i>Mytilus edulis</i>	0,3	55% mortalité, 7 jours	Scott et Major (1972)	
		0,3	CL50, 7 jours	Martin et al. (1975)	
		0,4	CL50, 8 jours	Delhaye et Cornet (1975)	
		0,15	100% de mortalité, 5-6 jours	Grace et Gainey (1987)	
		0,18	CL50, 169 h	Davenport et Manley (1978)	
		0,4	CL50, 24 h	Sunila (1981)	
		0,127	CL50, 10 jours	Kaitala (1988)	
		0,48	CL50, 96 h	Amiard-Triquet et al. (1986)	
		<i>Perna perna</i>	0,25	CL50, 96 h	Watling (1981)
		<i>Perna viridis</i>	0,62	CL50, 96 h	Chan (1988)
		<i>Corbicula fluminea</i>	0,04	CL50, 96 h	Rodgers et al. (1980)
		<i>Villorita cyprinoides</i>	1,214	CL50, 96 h	Sathyanathan et al. (1988)
<i>Scrobicularia plana</i>	0,5	CL50, 168 h	Akberali et Black (1981)		
<i>Tellina tenuis</i>	1	CL50, 96 h	Stirling (1975)		
Hg++	<i>Villorita cyprinoides</i>	1,57	CL50, 96 h	Sathyanathan et al. (1988)	
	<i>Perna viridis</i>	1	CL50, 48 h	Mohan et al. (1986a)	
		0,23	CL50, 96 h	Mohan et al. (1986a)	
	<i>Argopecten irradians</i>	0,089	CL50, 96 h	Nelson et al. (1976)	
	<i>Mercenaria mercenaria</i> (embryons)	0,0048	CL50, 48 h	Calabrese et al. (1977b)	
	<i>Mytilus edulis</i>	0,15	CL50, 7 jours	Martin et al. (1975)	
		1	100% mortalité, 4-8 jours	Breitmayer et al. (1981)	
	2,51	CL50, 96 h	Micallef et Tyler (1987)		
Cd++	<i>Argopecten irradians</i>	1,48	CL50, 96 h	Nelson et al. (1976)	
	<i>Perna viridis</i>	2,5	CL50, 96 h	Mohan et al. (1986a)	
		1,57	CL50, 96 h	Chan (1988)	
	<i>Mytilus edulis</i>	4	CL50, 24 h	Sunila (1981)	
		2,5	CL50, 7 jours	Martin et al. (1975)	
	<i>Crassostrea gigas</i>	0,8	CL50, 96 h	Watling (1981)	
	<i>Perna perna</i>	> 10,0	CL50, 96 h	Watling (1981)	
<i>Crassostrea margaritace</i>	> 5	CL50, 96 h	Watling (1981)		

Tableau 5 : Niveaux de concentrations létales des métaux chez les bivalves. (suite)

Métal	Espèce	Concentration létale (ppm)	Modalités de l'essai	Référence	
Zn ⁺⁺	<i>Mytilus edulis</i>	2,5	CL50, 96 h	Ahsanullah (1976)	
		20,8	expo 24 h	Hietanen et al. (1988)	
	<i>Perna viridis</i>	> 5,0	mortalité 41 j après	CL50, 96 h	Amiard-Triquet et al. (1986)
		7,8	CL50, 96 h	Abel (1976)	
		2,31	CL50, 48 h	D'Silva et Kureishy (1978)	
		6,09	CL50, 96 h	Chan (1988)	
		10	CL50, 143,5 h	Akberali et al. (1981)	
		10,88	CL50, 28 jours	Maarouf (1988)	
		6,04	CL50, 96 h	Rodgers et al. (1980)	
		0,166	CL50, 48 h	Calabrese et Nelson (1974)	
<i>Scrobicularia plana</i>					
<i>Dreissena polymorpha</i>					
<i>Corbicula fluminea</i>					
<i>Mercenaria mercenaria</i> (embryons)					
<i>Macoma balthica</i>	25	25% mortalité, 15 j	Eldon et al. (1980)		
Pb ⁺⁺	<i>Perna viridis</i>	4,46	CL50, 168 h	Tan et Lim (1984)	
		8,82	CL50, 96 h	Chan (1988)	
	<i>Crassostrea gigas</i>	> 5,0	CL50, 96 h	Watling (1981)	
	<i>Chromomytilus meridionalis</i>	> 5,0	CL50, 96 h	Watling (1981)	
	<i>Mercenaria mercenaria</i> (embryons)	0,78	CL50, 48 h	Calabrese et Nelson (1974)	
		1,2	100% mortalité, 48 h	Calabrese et Nelson (1974)	

Les études de toxicité létale ont surtout porté sur les bivalves marins ou d'estuaire, à cause de leur intérêt économique et de leur abondance. Le tableau 5 présente les CL50 rapportées chez diverses espèces.

La résistance des bivalves à l'action létale des métaux est liée à des particularités comportementales de ces organismes, compte tenu de la durée de l'essai. En effet, les mollusques bivalves ont la possibilité de fermer hermétiquement leur coquille ou de fermer leur siphon exhalant, arrêtant ainsi toute filtration, en réponse à un stress environnemental (Rodgers *et al.*, 1980 ; Watling, 1981 ; Manley, 1983). Ces réactions isolent l'animal de son milieu et lui permettent d'éviter l'intoxication aiguë (Scott et Major, 1972 ; Davenport, 1977 ; Davenport and Manley, 1978 ; Akberali, 1978). Par exemple, le bivalve marin *Scrobicularia plana* peut s'isoler 5 à 7 jours quand il est placé dans des conditions défavorables (Akberali, 1978). Cette particularité des bivalves pose le problème de la significativité des résultats des essais de court terme. Akberali *et al.* (1981) ont proposé que l'essai de mortalité soit prolongé chez les bivalves à 8 jours au minimum.

Parmi les polluants métalliques, le cuivre est le plus toxique pour la létalité chez les bivalves, suivi du mercure. Bien qu'il soit difficile de faire un classement général à cause des différences de sensibilité entre espèces, le classement suivant est souvent vérifié :

$Cu^{++} > Hg^{++} \gg Cd^{++} > Zn > Pb^{++}$ (Rodgers *et al.*, 1980 ; Watling, 1981 ; Mohan *et al.*, 1986a ; Chan, 1988 ; Sathyanathan, 1988).

- **Toxicité du cuivre** : c'est le métal le plus toxique chez les bivalves, la CL50, 96 h dépasse souvent 1 ppm et est le plus souvent inférieure à 0,5 ppm (Tableau 5). D'après Davenport et Manley (1978), le seuil de concentration létale pour *Mytilus edulis* est de 0,09-0,10 ppm. La CL50, 96 h la plus faible a été établie chez le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea* (0,040 ppm ; Rodgers *et al.*, 1980). Il est à noter que l'effet létal peut se manifester même après l'arrêt de l'exposition ; chez *Mytilus*, Sunila (1981) a enregistré des mortalités 6 jours après l'arrêt de l'exposition (0,4 ppm), ce qui indique que les atteintes subies étaient irréversibles.

L'effet létal semble s'accroître pendant la période de reproduction ; cela a été montré par Delhay et Cornet (1975) chez *Mytilus*. Selon ces auteurs, l'activité métabolique, intense pendant cette période, oblige l'animal à filtrer de grandes quantités d'eau et à s'ouvrir en continu, ce qui l'empêche de pouvoir se fermer pour éviter l'intoxication.

La possibilité pour l'animal de se fermer face à des conditions défavorables peut rendre la relation concentration-taux de mortalité d'allure non linéaire pour les durées d'exposition courtes. Ce cas a été rapporté par Watling (1981) qui trouve chez *Chromomytilus meridionalis* deux valeurs distinctes de CL50, 96 h pour le Cu : 0,25 ppm et 3 ppm. Entre 0,5 ppm et 2 ppm Cu, il y a plus de 70% d'animaux survivants. L'auteur a suggéré que la concentration de 0,5 ppm serait le seuil de

fermeture pour cette espèce ; en deçà, les animaux sont exposés continuellement, d'où la première CL50 de 0,25 ppm ; au-delà de 0,5 ppm, ils sont fermés mais s'ouvrent de temps en temps, et c'est pendant ces moments d'ouverture que la toxicité s'exerce, proportionnellement à la concentration (Fig. III.6). Le cas de *C. meridionalis* contraste avec celui de *Perna perna* qui présente une relation concentration-mortalité classique ; le seuil de fermeture est vraisemblablement plus bas.

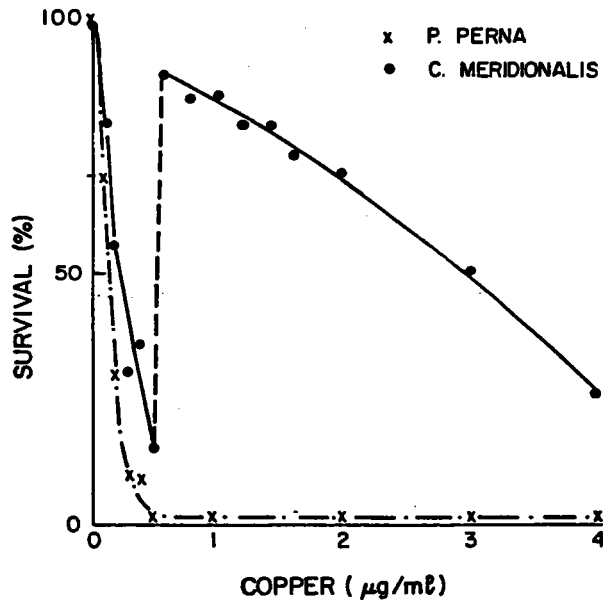


Fig. 11 : Toxicité létale du cuivre pour *C. meridionalis* et *P. perna*, d'après Watling (1981).

- Le mercure : sa toxicité est proche de celle du cuivre bien qu'en général légèrement inférieure. Les CL50, 96 h se situent souvent en dessous de 1,5 ppm (Tableau III.5). La létalité est plus importante si l'essai est plus long. Calabrese *et al.* (1977b) rapportent des CL50, 12 jours de 0,015 et 0,012 ppm respectivement pour *Mercenaria mercenaria* et *Crassostrea virginica*. Les stades embryonnaires et jeunes sont plus sensibles à l'action létale du Hg (Calabrese et Nelson, 1974). Nelson *et al.* (1976) trouvent chez les jeunes *Argopecten irradians* une CL50, 96 h de 0,089 ppm Hg, la quasi totalité des organismes (95%) étaient morts en présence de 0,150 ppm.

L'action létale des organomercurels ne semble pas se manifester à court terme. Dorn (1976) a rapporté une mortalité non significative chez la moule exposée 72 heures à 2,8 ppm de méthylmercure. En revanche, Pelletier (1988) note 54% de mortalité chez la même espèce après 32 jours d'exposition à 0,003 Hg-méthylmercure. Il semble donc que les effets de cette forme organique du mercure demandent un certain temps de latence.

- Toxicité du cadmium : sa toxicité létale est très variable selon les espèces étudiées et indépendamment des conditions d'essai. En effet, Watling (1981) trouve, dans les mêmes conditions expé-

rimentales, une CL50, 96 h de 0,8 ppm pour *Crassostrea gigas*, alors qu'elle est supérieure à 10 ppm pour *Perna perna* (Tableau 5). La tolérance des bivalves en général envers le Cd est illustrée par le seuil élevé de fermeture des valves face à ce métal. Chez *Mytilus* par exemple, il faut une concentration de 3 ppm Cd pour provoquer ce mécanisme (Sunila, 1981).

- Toxicité du zinc : Dans les expositions de court terme, les bivalves sont très tolérants au zinc et il est souvent nécessaire d'atteindre des concentrations de plusieurs mg/l pour observer des mortalités (Tableau 5). Cependant, une létalité différée peut se manifester longtemps après l'arrêt de l'exposition. Hietanen *et al.* (1988) ont montré chez *Mytilus* qu'après une exposition unique de 24 heures à 25 ppm de Zn (qui se termine sans mortalité), on atteint progressivement 50% de mortalité en 40 jours. Ce résultat conduit à relativiser la valeur des essais de court terme et montre que les altérations subies peuvent être irréversibles à moyen terme.

Comme pour le Hg, les premiers stades des bivalves sont très sensibles au Zn. Calabrese et Nelson (1974) ont enregistré une mortalité de 50% chez des embryons de *Mercenaria mercenaria* et *Crassostrea virginica* après 48 heures d'exposition respectivement à 0,166 ppm et 0,310 ppm Zn.

- Toxicité du plomb : peu d'études ont été consacrées à ses effets chez les bivalves. Le Pb est considéré comme étant le métal le moins toxique pour ces organismes. Les CL50, 96 h dépassent souvent 4 ppm (Tableau 5). On constate cependant des mortalités significatives pour des durées d'exposition plus longues. C'est le cas chez *Dreissena* qui montre un taux de mortalité de 32% avec 1,5 ppm Pb dans un essai de 3 semaines (Benyahia *et al.*, 1988).

Il faut noter également la plus grande vulnérabilité des stades embryonnaires face au Pb (Calabrese et Nelson, 1974).

- Toxicité combinée des métaux : des études de toxicité combinée ont mis en évidence des cas d'effets plus qu'additifs (synergisme). Par exemple, Mohan *et al.* (1986a) ont trouvé une interaction de ce type entre le Hg et le Cd chez *Perna viridis*. En revanche, Rodgers *et al.* (1980) ont décrit un antagonisme entre le Zn et le Cu chez *Corbicula fluminea*, le Zn diminuant l'effet toxique du Cu. Une simple additivité a été rapportée pour ces deux derniers métaux chez des embryons de *Crassostrea virginica* (Mac Innes et Calabrese, 1978).

II.3.3. Effets sublétaux

Bien qu'ils soient résistants aux métaux du point de vue de l'action létale, les mollusques bivalves répondent très bien au niveau physiologique et au niveau comportemental à des concentrations sublétales. De nombreux auteurs se sont intéressés à l'évaluation de ces réponses. C'est

Tableau 6 : Réponses comportementales aux métaux chez les bivalves.

Métal	Espèce étudiée	Modalités de l'étude	Réponses comportementales	Références
Cu	<i>Mytilus edulis</i>	0,2 à 10 ppm - réponse immédiate	. Fermeture immédiate des valves à 10 ppm (durée : 15 h)	Scott et Major (1972)
		0,005 à 1 ppm - réponse immédiate	. Fermeture de 15 mn à 1 ppm puis réouverture	Davenport et Manley (1978)
		0,1 à 5 ppm - 24 h	. Adductions intermittentes des valves dès 0,021 ppm, fermeture complète à 0,2 ppm	Sunila (1981)
	<i>Scrobicularia plana</i>	0 à 2 ppm - 30 mn exposition progressive	. Fermeture immédiate à toutes les concentrations ; CE50 = 0,06 ppm	Manley (1983)
		0 à 0,4 ppm	. 0,037 ppm cause la première adduction des valves	Grace et Gainey (1987)
	<i>Tellina tenuis</i>	0,05 à 0,5 ppm	. Fermeture immédiate à 0,2 ppm	Akberali et Black (1981)
<i>Dreissena polymorpha</i>	0 à 1 ppm - 24 h-96 h	. Fermeture immédiate à 0,5 ppm (6 h)	Stirling (1975)	
<i>Macoma balthica</i>	0 à 0,046 ppm	. Fermeture dès 0,01 mais réouverture partielle	Slooff et al. (1983)	
		0 à 0,046 ppm	. Inhibition de l'activité de fouissement dès 0,25 ppm	Eldon et al. (1980)
		0 à 2 ppm - 24 h	. Adductions intermittentes dès 0,030 ppm	
			. Inhibition de l'activité de fouissement (40% inhibition à 0,2 ppm)	

Tableau 6 : Réponses comportementales aux métaux chez les bivalves. (suite)

Métal	Espèce étudiée	Modalités de l'étude	Réponses comportementales	Références
Zn	<i>Macoma balthica</i>	0,5 à 50 ppm - 24 h	. Stimulation de l'activité de fouissement à 0,5 et 1 ppm	Eldon et al. (1980)
	<i>Scrobicularia plana</i>	0,1 à 20 ppm - 6 h	. Inhibition à 2 ppm	Akberali et al. (1981)
	<i>Corbicula fluminea</i>	0 à 0,9 ppm - 24 h	. Fermeture après 10 mn à 1 ppm, à 10 ppm fermeture prolongée . Fermeture 9h/24h à 0,5 ppm . Fermeture 16h/24h à 0,9 ppm	Doherty et al. (1987)
Hg	<i>Macoma balthica</i>	0 à 1 ppm - 24 h	. Inhibition de l'activité de fouissement dès 0,05 ppm	Eldon et al. (1980)
	<i>Modiolus sp</i>	0,02 à 0,14 ppm - 12 h	. Inhibition complète à 1 ppm	Mohan et al. (1986b)
	<i>Mytilus edulis</i>	0 à 5,6 ppm	. Fermeture à toutes les concentrations . Fermeture à 3,2 ppm	Micallef et Tyler (1987)
Cd	<i>Mytilus edulis</i>	0,5 à 25 ppm - 24 h	. Fermeture immédiate à 3 ppm CE50 = 12,5 ppm	Sunila (1981)
	<i>Dreissena polymorpha</i>	0 à 0,56 ppm	. Adductions intermittentes à 0,37 ppm	Slooff et al. (1987)
	<i>Corbicula fluminea</i>	0 à 0,4 ppm - 24 h	. Première fermeture après 42 mn à 0,4 ppm	Doherty et al. (1987)
	<i>Macoma balthica</i>	0,5 à 1 ppm - 24 h	. Stimulation du fouissement à 0,5 ppm . Inhibition à 1 ppm	Eldon et al. (1980)
Pb	<i>Macoma balthica</i>	0,5 à 20 ppm - 24 h	. Légère inhibition du fouissement à 0,5 ppm . Inhibition de 75% à 20 ppm	Eldon et al. (1980)

l'activité de filtration qui a attiré le plus d'attention, ceci à cause de son rôle vital dans le fonctionnement de l'organisme. L'action sur la filtration est souvent associée à celle sur le comportement (mouvements valvaires). D'autres recherches ont porté sur la respiration, les processus biochimiques, la croissance, l'organisation tissulaire et la reproduction.

II.3.3.1. Le bivalve face au métal, la réponse comportementale

L'aptitude des bivalves à fermer leur coquille pour s'isoler du milieu est à l'origine de leur résistance à l'intoxication aiguë (létale) par les métaux (Brown et Newell, 1972 ; Scott et Major, 1972 ; Delhay et Cornet, 1975 ; Manley, 1983). Cependant, en se fermant, l'animal ne filtre plus et l'effet (sublétal) qui en résulte est très étudié pour le cuivre. La détermination des seuils de concentration qui déclenchent la fermeture est importante dans la compréhension de l'effet sur la filtration ; la séquence entre le début de l'exposition et la première fermeture est également très commentée (Davenport, 1977 ; Davenport et Manley, 1978 ; Akberali et Black, 1981 ; Akberali *et al.*, 1981 ; Manley, 1983).

II.3.3.1.1. La réponse comportementale au cuivre (Tableau 6)

Davenport (1977) a montré que *Mytilus* peut survivre pendant 6 heures à une concentration de 0,5 ppm Cu sans effets délétères mesurables grâce à la fermeture de la coquille. Cet auteur émit alors l'hypothèse que, si dans le milieu naturel l'arrivée d'eau contaminée alternait avec une eau propre toutes les six heures, on ne verrait pas d'effets toxiques. Davenport et Manley (1978) ont testé des concentrations croissantes en Cu et ont montré que la réaction était séquentielle.

L'animal répond par une brusque adduction de ses valves dès 0,010 ppm Cu mais cette réaction n'est pas suivie de fermeture. Ensuite, à partir de 0,020 ppm intervient une phase d'adductions intermittentes que les auteurs ont appelée "comportement de test" (testing behaviour), et enfin à 0,2 ppm Cu on enregistre une fermeture totale (Tableau III.7). Le comportement de test doit son nom au fait qu'il est considéré comme une phase où l'animal teste son environnement avant de se fermer. Manley (1983) a confirmé cette séquence mais remarque en plus que, pendant le comportement de test, le siphon exhalant montre une alternance d'ouvertures et de fermetures. Les ouvertures correspondent aux périodes de large ouverture des valves. Le siphon inhalant montre un comportement similaire mais, selon l'auteur, sa réaction n'est pas aussi nette que celle du siphon exhalant.

Tableau 7 : Réactions comportementales au Cu chez *Mytilus edulis* d'après Manley (1983).

Cuivre (ppm)	Nombre d'animaux montrant l'une des composantes de la réaction comportementale (nombre total : 9)		
	adduction valvaire brusque	comportement de test	fermeture valvaire
0	1	-	-
0,005	1	-	-
0,010	4	-	-
0,020	5	5	2
0,040	8	7	6
0,050	9	9	6
0,100	9	9	5
0,200	9	9	9
0,500	9	9	9
1,000	9	9	9

Grace et Gainey (1987) ont confirmé ces résultats chez *Mytilus* ; Sloof *et al.* (1983) notent un comportement similaire chez *Dreissena*. D'autres auteurs ont décrit plutôt les périodes de fermeture et le délai à la première réouverture (Akberali et Black, 1981 ; Sunila, 1981). Akberali et Black (1981) notent que *Scrobicularia plana* peut détecter 0,01 ppm Cu ; la réponse initiale est la fermeture, puis entre 0,01 et 0,1 ppm l'animal se s'ouvre à nouveau après 2-3 heures ; à 0,5 ppm Cu, la fermeture est continue pendant les 6 heures d'expérience.

La réaction comportementale immédiate est réversible ; l'animal remis en eau propre reprend rapidement (en quelques mn) son activité normale (Sunila, 1981 ; Akberali et Black, 1981).

II.3.3.1.2. La réponse comportementale aux métaux autres que le cuivre

L'exposition au mercure produit également des modifications comportementales. Mohan *et al.* (1986b) notent que les concentrations de 0,02 à 0,2 ppm Hg provoquent la fermeture des valves chez *Modiolus carvalhoi* et *Modiolus* sp. Chez *Mytilus*, Micallef et Tyler (1987) rapportent que les concentrations élevées (3,2 - 5,6 ppm Hg) provoquent la fermeture totale des animaux, la réouverture intervient en fin d'expérience (96 heures). Il semble que les organomercurels n'aient pas un effet immédiat sur le comportement valvaire. Dorn (1976) note à cet égard que les moules *Mytilus* exposées au méthylmercure jusqu'à 2,8 ppm restent ouvertes la majorité du temps. Ce résultat montre que c'est la forme minérale du métal qui agit au niveau du comportement.

Les modifications causées par le zinc ont été étudiées en détail chez *Scrobicularia plana* par Akberali *et al.* (1981) et chez *Corbicula fluminea* par Doherty *et al.* (1987). Akberali *et al.* (1981) ont montré que la réponse de *Scrobicularia* est immédiate pour les concentrations supérieures à 0,5

Tableau 8 : Quelques données concernant les effets des métaux sur la filtration chez les bivalves.

Métal	Espèce étudiée	Effets sur la filtration	Référence
Cu	<i>Mytilus edulis</i> <i>Perna perna</i> <i>Chromomytilus meridionalis</i> <i>Crassostrea gigas</i> <i>Crassostrea margaritacea</i>	. Réduction du Taux de Filtration (TF) CE50, 1 h = 0,030 ppm	Manley (1983)
		. Réduction du TF ; CE50 = 0,150 ppm	Abel (1976)
		. Réduction du TF ; CE50, 30 mn = 0,094 ppm	Howell et al. (1984)
		. Réduction du TF ; CE50, 5 j = 0,002 ppm	Grace et Gainey (1987)
		. Réduction du TF ; CE50, 8 h = 0,160 ppm	Watling (1981)
		. Réduction du TF ; CE50, 8 h = 0,120 ppm	Watling (1981)
Zn	<i>Mytilus edulis</i> <i>Perna perna</i> <i>Chromomytilus meridionalis</i> <i>Crassostrea gigas</i>	. Réduction du TF ; CE50 = 1,6 ppm	Abel (1976)
		. Réduction du TF ; CE50, 48 h = 0,750 ppm	Watling (1981)
		. Réduction du TF ; CE50 = 1,980 ppm	Watling (1981)
		. Réduction du TF ; CE50 = 1,080 ppm	Watling (1981)
Cd	<i>Perna perna</i> <i>Crassostrea margaritacea</i> <i>Mytilus edulis</i> <i>Perna viridis</i> <i>Modiolus carvalhoi</i> <i>Modiolus sp</i>	. Réduction du TF ; CE50 = 28 ppm	Watling (1981)
		. Réduction du TF ; CE50 = 0,850 ppm	Watling (1981)
		. Pas d'effets significatifs avec 0,1 ppm, 17 j	Poulsen et al. (1982)
		. Réduction du TF ; CE50, 96 h = 0,82 ppm	Mohan et al. (1986a)
		. Réduction du TF ; CE50, 12 h = 2,40 ppm	Mohan et al. (1986b)
		. Réduction du TF ; CE50, 12 h = 0,5 ppm	Mohan et al. (1986b)
Pb	<i>Perna perna</i> <i>Chromomytilus meridionalis</i>	. Réduction du TF ; CE50, 16 h = 4,17 ppm	Watling (1981)
		. Réduction du TF ; CE50, 16 h = 4,40 ppm	Watling (1981)
Hg	<i>Perna viridis</i> <i>Modiolus carvalhoi</i> <i>Modiolus sp</i> <i>Donax spiculum</i> <i>Mytilus edulis</i>	. Réduction du TF ; CE50, 96 h = 0,02 ppm	Mohan et al. (1986a)
		. Réduction du TF ; CE50, 12 h = 0,05 ppm	Mohan et al. (1986b)
		. Réduction du TF ; CE50, 12 h = 0,055 ppm	Mohan et al. (1986b)
		. Réduction du TF ; CE50, 12 h = 0,055 ppm	Mohan et al. (1986b)
		. Réduction du TF de 86% en 24 h avec 0,05 ppm	Micallet et Tyler (1990)

ppm Zn, et pendant 20 mn une série d'adductions (comportement de test) s'installe. Au-dessus de 1 ppm, la fermeture totale dure pendant les 6 heures d'essai. Chez *Corbicula*, la durée d'ouverture sur 24 heures est diminuée par les concentrations croissantes en Zn (de 0,1 à 0,9 ppm). Pour 0,9 ppm Zn, le temps d'ouverture est de 69 mn/24 h alors qu'il est de 600 mn/24 h chez le témoin (Doherty *et al.*, 1987).

Pour le cadmium, les données de Slooff *et al.* (1983) chez *Dreissena* indiquent l'apparition du comportement de test à la concentration de 0,37 ppm Cd. La première fermeture chez *Corbicula* est enregistrée pour 0,4 ppm après 42 mn d'exposition (Doherty *et al.*, 1987). Chez *Mytilus*, la concentration de 3 ppm provoque la fermeture immédiate (Sunila, 1981).

Il convient de noter enfin que la réponse comportementale n'est pas spécifique aux métaux. D'autres polluants ou même des modifications importantes des facteurs environnementaux (salinité par exemple) provoquent des réponses similaires. Slooff *et al.* (1983) l'ont montré chez *Dreissena* pour des polluants organiques comme le lindane et le pentachlorophénol. Chez cette même espèce, Kramer *et al.* (1989) ont rapporté une réponse comportementale au chlore, tributyl-étain et au pétrole brut. Manley (1983) a conclu à cet égard que la réponse de *Mytilus* au Cu n'était qu'un exemple de la réponse générale aux toxiques chez les bivalves.

II.3.3.2. Effets sur le taux de filtration

Les données expérimentales indiquent que les métaux, à des concentrations bien inférieures aux seuils létaux, provoquent chez les bivalves des réductions de la quantité d'eau pompée et, de ce fait, de la quantité de nourriture ingérée par unité de temps.

* Effets du Cu sur le TF

Les concentrations qui provoquent 50% de réduction du TF (CE50) se situent généralement en deçà de 0,2 ppm (Tableau 8). Les concentrations seuils sont beaucoup plus faibles. Abel (1976) a déterminé chez *Mytilus* une CE50 de 0,150 ppm Cu après une exposition immédiate tandis que la CE50 après une heure, calculée par Manley (1983), est de 0,030 ppm ; le seuil d'inhibition étant de 0,010 ppm. Plus intéressant est l'effet après plusieurs jours d'exposition. Grace et Gainey (1987) ont trouvé, chez la même espèce, une CE50, 5 jours de 0,002 ppm Cu, concentration largement rencontrée dans l'environnement (Forstner et Wittmann, 1981).

Concernant les effets chroniques, les données sont rares. Smith (1985) rapporte une stimulation de la filtration sous l'effet de faibles concentrations (de 0,0001 à 0,01 ppm Cu) après 62 jours.

Notons que ce résultat est relevé par l'auteur pour des mesures de TF de 20 mn et qu'il ne le retrouve pas si la mesure est portée à 30 mn ou 40 mn, ce qui met sa fiabilité en doute.

*** Effets du mercure sur le TF**

Peu de données existent concernant l'effet du Hg sur le TF, mais d'après les résultats de Mohan *et al.* (1986a) et Mohan *et al.* (1986b), sa toxicité paraît très proche de celle du cuivre (Tableau 8).

*** Effets du zinc sur le TF**

Moins toxique que le Cu et le Hg vis-à-vis de la filtration, le zinc agit néanmoins à des concentrations très inférieures aux seuils létaux (Tableau 8). Watling (1981) a par exemple trouvé des CE50 de 0,75 et 1,98 ppm Zn respectivement pour *Perna perna* et *Chromomytilus meridionalis* ; les CL50, 96 h étaient supérieures à 12 ppm pour les deux espèces. L'auteur note cependant un retour à la filtration normale (égale au témoin) après 48 heures d'exposition et attribue ce phénomène à une acclimatation des animaux au métal.

*** Effets du cadmium sur le TF**

Les CE50 sont très variables pour ce métal. Watling (1981) considère qu'il a peu d'effets sur le TF ; les CE50, 8 heures trouvées par cet auteur vont de 0,61 à 35 ppm pour quatre espèces de bivalves (Tableau 8).

Dans un essai d'exposition chronique, Ward (1982) rapporte que l'exposition de *Saccostrea commercialis* pendant 45 jours à 0,05 et 0,10 ppm Cd provoque des réductions du TF de 19 et 27%.

*** Effets du plomb sur le TF**

Les données sont très rares concernant ce métal. Il semble peu toxique vis-à-vis du TF. Watling (1981) trouve par exemple des CE50, 16 h supérieures à 4 ppm pour *Perna* et *Chromomytilus*.

II.3.3.3. Mécanisme d'inhibition de la filtration

L'atteinte de la filtration peut provenir selon Mohan *et al.* (1986b) de trois facteurs :

- la fréquence des fermetures valvaires
- le taux de l'activité ciliaire
- les modifications du niveau d'irrigation des branchies.

Il faut y ajouter un autre facteur essentiel selon Foster-Smith (1976) qui est l'état d'ouverture du siphon exhalant.

Le mécanisme exact par lequel les métaux exercent leur toxicité sur la filtration n'est pas encore complètement élucidé. La recherche en ce sens est essentiellement une recherche des mécanismes de détection du métal et de la mise en place de la réaction comportementale, et éventuellement ciliaire, qui s'en suivent.

L'action du Cu est la mieux étudiée de tous les métaux et certaines conclusions peuvent en être tirées sur le mécanisme mis en jeu. De nombreux auteurs considèrent que c'est la réaction comportementale qui est à l'origine de la réduction du TF sous l'effet du Cu (Rodgers *et al.*, 1980 ; Sunila, 1981 ; Watling, 1981 ; Manley, 1983) ; ceci paraît évident puisque l'altération des mouvements valvaires et de l'état d'ouverture du siphon exhalant se répercute nécessairement sur la quantité d'eau qui transite par la cavité de l'animal. D'autres auteurs soutiennent cependant que les mouvements valvaires n'ont pas de rôle dans le mécanisme d'inhibition de la filtration, celle-ci étant attribuée à l'activité ciliaire (Howell *et al.*, 1984 ; Smith, 1985 ; Grace et Gainey, 1987).

Howell *et al.* (1984) ont constaté que chez des *Mytilus* dont les muscles adducteurs antérieurs ont été sectionnés, la réduction du TF existe même si l'animal ne se ferme plus (CE50, 30 mn = 0,094 ppm Cu). Ils concluent alors que l'inhibition n'est pas due à la réaction comportementale. Il semble que les auteurs aient négligé l'inhibition qui pourrait s'exercer par le contrôle de l'ouverture du siphon. Les auteurs ont ensuite traité les animaux par de la réserpine qui est un antidopamine (la dopamine étant le neurotransmetteur inhibiteur du nerf branchial ; Paparo et Finch, 1972). Après ce traitement, l'exposition au Cu n'affecte plus le TF. Les auteurs suggèrent alors que l'action du Cu (et peut-être des autres polluants) est exercée via un effet inhibiteur du nerf branchial sur les battements ciliaires. Cet effet suppose l'existence de chemorécepteurs capables de détecter l'augmentation de la concentration en métal dans l'eau.

Cependant, l'effet sur les battements ciliaires est particulier au Cu. Le zinc par exemple n'a aucun effet, même à la concentration de 500 ppm (Brown et Newell, 1972). En revanche, la réaction comportementale est commune aux différents métaux.

L'intervention du nerf branchial dans la réaction au cuivre est rapportée également par Smith (1985) qui enregistre une élévation du taux de dopamine dans le ganglion viscéral des moules exposées pendant 62 jours au Cu (0,0001 à 0,010 ppm) ; l'auteur insiste sur l'importance de cet effet dans la compréhension du mécanisme de toxicité du Cu et des autres métaux chez les bivalves.

L'existence de chemorécepteurs a été mise en évidence par Akberali *et al.* (1981) chez *Scrobicularia plana* ; il s'agit du complexe du muscle cruciforme (Fig. 12) qui contient une fente s'ouvrant sur la cavité du manteau et contenant un ganglion sensoriel relié au nerf viscéral par une branche du nerf palléal postérieur (Franc, 1960). Ce complexe ganglio-musculaire, particulier aux tellinacés, fonctionne par le jeu de la tension des muscles : la fente se dilate quand celle-ci est élevée et rétrécit dans le cas opposé ; normalement elle baigne constamment dans le milieu extérieur et assure le contrôle de sa qualité. Akberali *et al.* (1981) ont coupé les muscles cruciformes pour supprimer la tension et rétrécir la fente ; ils constatent alors que le zinc à 1 et 10 ppm n'a pas d'effet sur le siphon inhalant alors que normalement il provoque sa contraction.

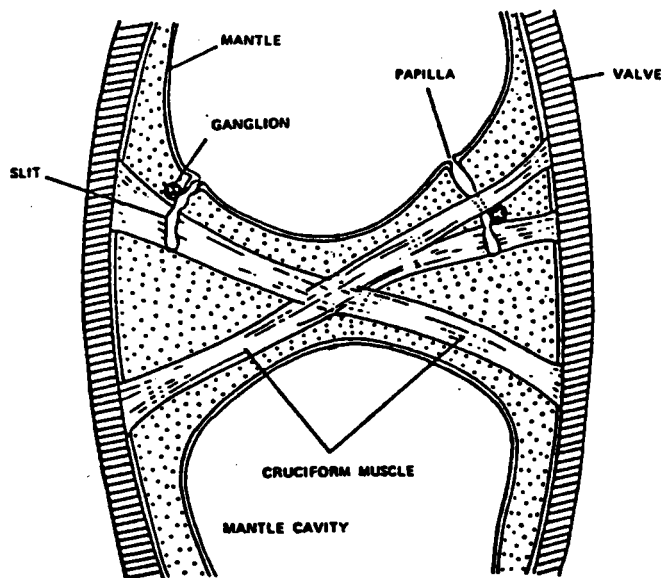


Fig.12 : Schéma de la coupe longitudinale du complexe musculaire cruciforme montrant le système sensoriel ; d'après Akberali *et al.* (1981).

Tableau 9 : Quelques données bibliographiques concernant les effets des métaux sur la respiration des bivalves.

Métal	Espèce étudiée	Effets sur la respiration	Référence
Cu	<i>Mytilus edulis</i> <i>Villorita cyprinoides</i>	<ul style="list-style-type: none"> . Réduction de la VO₂ de 50% à 500 ppm (animaux dont le muscle adducteur est sectionné) . Réduction immédiate de la VO₂ de 33% à 0,5 ppm . Réduction de la VO₂ de 50% à 0,25 ppm . Réduction immédiate de la VO₂ de 58,3% à 0,2 ppm . Réduction de la VO₂ de 32% à 0,6 ppm, 48h 	<p>Brown et Newell (1972)</p> <p>Scott et Major (1972)</p> <p>Delhay et Cornet (1975)</p> <p>Manley (1983)</p> <p>Sathyanathan et al. (1988)</p>
Zn	<i>Mytilus edulis</i> (branchie) <i>Mytilus galloprovincialis</i> (embryons)	<ul style="list-style-type: none"> . Pas d'effets sur la VO₂ avec 500 ppm . Réduction de la VO₂ de 17% après 48 h d'exposition à 0,1 ppm 	<p>Brown et Newell (1972)</p> <p>Pavicic (1980)</p>
Hg	<i>Perna viridis</i> <i>Villorita cyprinoides</i>	<ul style="list-style-type: none"> . Réduction de la VO₂ ; CE50, 96 h = 0,059 ppm . Réduction de 28% de la VO₂ ; 0,6 ppm, 48h 	<p>Mohan et al. (1986a)</p> <p>Sathyanathan et al. (1988)</p>
Cd	<i>Argopecten irradians</i> <i>Perna viridis</i> <i>Mytilus edulis</i>	<ul style="list-style-type: none"> . Elévation de la VO₂ après 96 h d'exposition à 0,940 ppm . Réduction de la VO₂ ; CE50,96h = 0,76 ppm . Pas d'effets significatifs sur la VO₂ avec 0,010 et 0,100 ppm après 17 jours 	<p>Nelson et al. (1976)</p> <p>Mohan et al. (1986a)</p> <p>Poulsen et al. (1982)</p>

II.3.3.4. Effets des métaux sur l'activité respiratoire

La consommation d'oxygène (VO_2), qui reflète l'activité métabolique en aérobie, subit des effets variés chez les bivalves exposés aux métaux. Trois approches sont utilisées pour évaluer ces effets :

- L'étude sur l'animal intact.
- L'étude sur l'animal ayant subi une manipulation : section des adducteurs, ouverture forcée ; destruction de parties de la coquille. Ces manipulations visent à éviter l'effet de la fermeture des valves afin de vérifier l'effet sur la respiration tissulaire proprement dite.
- L'étude sur organe ou partie isolée de l'animal (branchie, manteau, glande digestive, etc...).

* Effets du Cu sur la VO_2 : comme pour la filtration, c'est le métal le plus étudié pour ses effets vis-à-vis de la VO_2 (Tableau 9). Brown et Newell (1972) ont montré que 500 ppm Cu réduisait immédiatement de 50% la VO_2 de l'animal entier (*Mytilus*). Observant l'activité ciliaire branchiale, ils ont noté l'inhibition de cette activité ; la branchie isolée montrait aussi une inhibition de sa VO_2 . Ces auteurs ont attribué l'effet sur la VO_2 chez l'animal entier à l'inhibition de l'activité ciliaire. La respiration de la glande digestive dans les mêmes conditions n'est pas affectée.

Utilisant des concentrations beaucoup plus faibles en Cu, Scott et Major (1972) ont noté que 0,5 ppm réduisait de 33% la VO_2 chez *Mytilus* ; ils remarquent cependant une reprise rapide (90 mn après le début de l'exposition) de la VO_2 normale ; cette reprise est attribuée à la neutralisation de l'effet du métal par l'organisme. En présence de 0,2 ppm Cu, il n'y a pas d'effets sur la VO_2 ; signalons que ces auteurs ont mesuré la VO_2 à partir de la réouverture des moules. Delhay et Cornet (1975) ont montré les mêmes effets ; le Cu à 1 ppm inhibe la VO_2 à 90% dans les heures qui suivent l'exposition, les moules utilisées ayant subi une destruction partielle de la coquille pour pallier la fermeture des valves.

Manley (1983) trouve chez l'animal entier une réduction de 58% de la VO_2 après exposition à 0,2 ppm pendant 60 mn. Discutant les résultats de Delhay et Cornet (1975), Manley remarque que, même avec une coquille détruite sur les bords, l'animal peut contracter les bords du manteau et s'isoler ainsi de l'extérieur.

Les essais sur des animaux ayant subi la section des adducteurs postérieurs sont très intéressants car cette opération supprime effectivement la fermeture des valves et du manteau chez *Mytilus*. Ces animaux montrent une réduction non significative de 10,3% de la VO_2 sous l'action de 0,2 ppm Cu contre 58% de réduction chez les animaux intacts. Exposés à 0,5 ppm, la réduction est de seulement 33%. A cette concentration, l'activité ciliaire n'est pas affectée mais le tissu épithélial branchial commence à se désintégrer (Manley, 1983). L'absence d'effets à 0,2 ppm montre, selon

l'auteur, qu'il n'y a pas d'action du cuivre à part l'action indirecte due à la fermeture des valves et/ou au contrôle des états d'ouverture du siphon exhalant.

Les résultats de Brown et Newell (1972) qui montrent une inhibition de l'activité ciliaire, responsable selon eux de la réduction de la VO_2 , ont été obtenus avec des concentrations trop grandes (250 et 500 ppm) pour avoir une signification physiologique (Davenport and Redpath, 1984).

Les études des effets des autres métaux sur la respiration des bivalves sont rares. Brown et Newell (1972) rapportent que 500 ppm Zn n'a aucun effet immédiat sur la respiration de la branchie. Chez des embryons de *Mytilus galloprovincialis*, Pavicic (1980) met en évidence une réduction de la VO_2 après 48 heures d'exposition au zinc à 0,1 ppm ; il semble que l'effet nécessite un certain temps de latence.

* Effet du mercure : comme le cuivre, il est toxique pour la respiration. Chez *Villorita cyprinoïdes*, Sathyanathan *et al.* (1988) enregistrent une diminution de 28% de la VO_2 après 48 heures d'exposition à 0,6 ppm Hg ; ils notent cependant une reprise entre 48 et 96 heures, la réduction est alors de 12%. Chez *Perna viridis*, la CE50, 96 h est 0,059 ppm (Mohan *et al.*, 1986a). Signalons cependant que, dans les mêmes conditions, la CE50, 96 h pour le TF est de 0,2 ppm Hg, cette concentration n'ayant pas d'effet significatif sur la VO_2 . La respiration semble donc moins sensible au Hg que la filtration.

* Effet du cadmium : il réduit la VO_2 chez *Perna*. Mohan *et al.* (1986a) ont déterminé une CE50, 96 h de 0,76 ppm Cd. Une exposition plus prolongée (17 jours) à une faible concentration en Cd (0,100 ppm) ne semble pas affecter la VO_2 chez *Mytilus* (Poulsen *et al.*, 1982). Un autre effet intéressant est l'élévation de la VO_2 constatée chez de jeunes *Argopecten irradians* après 96 heures d'exposition à 0,94 ppm (Nelson *et al.*, 1976).

Un autre aspect de l'intoxication par les métaux est l'installation d'une respiration anaérobie pendant la fermeture. Akberali et Black (1981) ont suggéré cette possibilité chez *Scrobicularia* pour soutenir le métabolisme basal ; ils ont montré que durant cette phase le calcium est remobilisé à partir de la coquille. Cette respiration est considérée par les auteurs comme une adaptation supplémentaire au stress environnemental ; ils remarquent cependant que l'animal est obligé de s'ouvrir après un certain temps pour évacuer les déchets de cette respiration et de l'excrétion.

II.3.3.5. Effets biochimiques et cellulaires

Grâce à leurs propriétés de liaison, les métaux peuvent se lier à différents groupes électro-négatifs, notamment les groupes SH sur les protéines et les enzymes, conduisant ainsi à des changements dans les activités enzymatiques, les synthèses organiques et le métabolisme en général.

Chez *Villorita* une exposition au Cu et au Hg (0,300 et 0,600 ppm) provoque une élévation de la teneur en caroténoïdes en 48 heures ; à 0,600 ppm elle est quatre fois supérieure au témoin (Sathyanathan *et al.*, 1988). Ces auteurs trouvent également une augmentation de l'acide lactique et une diminution du glycogène. L'élévation des caroténoïdes est considérée comme une adaptation à l'intoxication ; ils constitueraient une réserve intracellulaire d'O₂ pour pallier l'état d'hypoxie.

Mizrahi et Achituv (1989) ont montré les effets enzymatiques à court terme des métaux chez le bivalve *Donax trunculus* ; 24 heures d'exposition à 0,1 ppm Cd suffisent à provoquer une légère inhibition de la cytochrome oxydase et de la lactase déshydrogénase. L'inhibition est beaucoup plus importante à 1 et 10 ppm Cd ainsi qu'à 1 et 10 ppm Hg. Ces mêmes auteurs trouvent que le zinc à 10 ppm réduit de 50% l'activité de la cytochrome oxydase. Le Hg à 10 ppm réduit l'activité de la malate déshydrogénase à 70%. Le plomb n'a aucun effet sur les enzymes étudiés.

Travaillant sur des populations de *Mytilus edulis* d'une région polluée, Gilfillan *et al.* (1985) ont mis en évidence une corrélation entre la teneur corporelle en Cd et l'activité de la glucose-6-phosphatase d'une part, et entre la teneur en Cu et l'activité de l'aspartate amino-transférase d'autre part. Les auteurs pensent qu'il y a un lien de cause à effet entre le niveau du métal et l'activité enzymatique.

Un aspect intéressant de la réponse biochimique au métal a été rapporté récemment par Sanders (1988) chez *Mytilus*. Il s'agit de l'apparition de protéines nouvelles liées au stress (Stress Proteins Response) constatée après 72 heures d'exposition à 10⁻⁹M Cd. L'auteur considère cette réponse comme générale à toute condition défavorable, puisque les mêmes synthèses sont constatées lors du stress dû à un choc thermique.

D'autre part, la synthèse de protéines spécifiques capables de détoxifier les métaux (métalloprotéines) est une réponse très répandue chez les bivalves comme chez tous les êtres vivants (chapitre II.3.1.). Il faut signaler ici l'augmentation de l'activité lysosomale provoquée par les métaux (Viarengo *et al.*, 1987). Pickwell et Steinert (1984) ont observé une telle augmentation chez des *Mytilus* soumis à 0,1 et 0,7 ppm Cu pendant 3 jours. Au cours des premières heures d'exposition, ils notent une augmentation rapide de l'activité protéolytique.

Les métaux agissent aussi sur les mécanismes de défense immunitaire. Cheng (1988) a par exemple montré que le cuivre exerce une inhibition sur la phagocytose chez *Crassostrea virginica* (1

ppm, 24 h, 72 h, 1 semaine et 2 semaines). Dans les mêmes conditions, le Cd a un effet stimulateur.

II.3.3.6. Effets histopathologiques

Des atteintes histologiques causées par les métaux ont été rapportées par différents auteurs. Un effet indirect est la coupure de fragments des siphons observée chez *Scrobicularia* exposé à 10 et 20 ppm Zn. Elle est provoquée par le pincement des siphons au cours de la fermeture rapide et brutale de la coquille (Akberali *et al.*, 1981). Un effet similaire a été signalé chez *Macoma* par Eldon *et al.* (1980). Des lésions du tissu épithélial causent la désintégration en 24 heures des filaments branchiaux de *Mytilus* exposé à 5 et 10 ppm Cd ou 0,5 ppm Cu (Sunila, 1981 ; Manley, 1983).

Les effets chroniques du Cd et du Cu s'avèrent plus graves ; Yevich et Yevich (1985) rapportent l'apparition de lésions pathologiques chez *Placopecten magellanicus* après exposition à 0,020 ppm Cd/Cu pendant 7 semaines. Les lésions concernent le rein, le diverticule digestif et les tubes reproducteurs. Pendant la détoxification, l'état histologique s'améliore sauf pour le rein. La mort des animaux est attribuée à la destruction progressive et irréversible du rein. Sunila (1986) a montré que l'exposition unique de 24 heures (0 à 0,8 ppm Cd/0 à 0,8 ppm Cu) chez *Mytilus* suffit pour que des lésions persistent une année après. Sous les cellules latéro-postérieures branchiales, des cavités se forment. Des déformations dues à des fusions de filaments voisins et opposés apparaissent chez les individus ayant été exposés au Cu. Ces fusions sont considérées comme des erreurs de réparation des lésions dues au métal.

Ces résultats sont cependant en désaccord avec ceux de Giraud *et al.* (1986) concernant le Cd chez *Mytilus* ; en effet, ces auteurs n'ont remarqué aucune lésion histopathologique après l'exposition de 4 semaines (0 à 0,350 ppm Cd) et attribuent l'absence d'effets à l'action protectrice des métallothionéines contre la toxicité du Cd.

Les lésions dues au zinc semblent demander de fortes concentrations, du moins à court terme. Ainsi, dans les mêmes conditions que celles de Sunila (1986), Hietanen *et al.* (1988) ont constaté que 5 ppm Zn pendant 24 heures avaient comme effet de dilater la veine branchiale tandis qu'il faut 25 ppm Zn pour provoquer l'apparition de cellules inflammatoires dans l'espace sanguin et entre les cellules épithéliales. Ces observations étant faites 41 jours après l'exposition.

II.3.3.7. Effets sur la croissance et la reproduction

L'exposition à long terme aux métaux lourds provoque une réduction du potentiel de reproduction (Earnshaw *et al.*, 1986). Gould *et al.* (1985) ont mis en évidence des altérations dans les processus gamétogénétiques chez *Placopecten magellanicus* exposé au Cu et au Cd (0,020 ppm Cd ou Cu, 7 semaines). Le cadmium provoquait une maturation précoce des gamètes alors que le cuivre avait un effet inhibiteur. Chez les individus dont les gonades sont bien différenciées, le cuivre provoque la régression de celles-ci. Une restauration partielle a lieu pendant la phase de détoxification. Une autre étude de Gould *et al.* (1988) sur la même espèce montre un fort effet inhibiteur du Cu sur la production et la maturation des gamètes. De même chez *Mytilus* 0,5 ppm Cu inhibe complètement la croissance des ovocytes et la vitellogenèse (Myint et Tyler, 1982).

Le développement des stades larvaires et jeunes peut, sous l'effet des métaux, subir des altérations compromettant la viabilité de l'animal. Chez *Mytilus galloprovincialis*, le Zn et le Cd provoquent des anomalies du développement embryonnaire (CE50, 48 h : 0,137 ppm pour le Zn et 4,1 ppm pour le Cd) (Pavicic, 1980). Chez *Mercenaria mercenaria*, cet auteur montre également que le zinc (0,045 à 0,150 ppm) induit des irrégularités morphologiques et une réduction de croissance de la coquille primaire de la larve ; le Cd réduit aussi la croissance, mais exerce un effet antagoniste du zinc quand les deux métaux sont combinés.

Un effet inhibiteur de la croissance par le zinc (de 0,025 à 1 ppm, 30 jours) a été mis en évidence par Belanger *et al.* (1986) chez *Corbicula* ; l'effet était mesurable dès le 10^{ème} jour pour 0,5 ppm et plus. Les auteurs notent que cet effet implique un retard chez le groupe pour arriver à la maturité sexuelle, d'où une atteinte à l'effort de reproduction de la population. Ils remarquent également que la concentration seuil pour cet effet correspond au niveau considéré par l'U.S.E.P.A. comme sans danger pour la vie aquatique (0,047 ppm Zn).

L'action sur la croissance est également illustrée par les résultats de Stromgren (1986) qui montrent que 0,003 et 0,006 ppm Cu réduisent le taux de croissance de 21% et 47% respectivement chez *Mytilus*. Signalons que de telles concentrations sont largement répandues dans l'environnement.

L'action du cadmium sur la croissance a été étudiée du point de vue du bilan énergétique chez *Mytilus* (Poulsen *et al.*, 1982). Les concentrations utilisées (0,010 et 0,100 ppm, 17 jours) se sont avérées sans effet sur le potentiel de croissance.

De nombreux auteurs considèrent que l'inhibition de la croissance est avant tout due à l'action des métaux pour la prise et l'assimilation de la nourriture (Gilfillan *et al.*, 1985 ; Belanger *et al.*, 1986 ; Stromgren, 1986 ; Farris *et al.*, 1989). Nous avons déjà évoqué les effets sur l'activité de

filtration (chapitre III.3.3.2.). Quant à l'assimilation de la nourriture, elle peut être rendue moins efficace par l'action toxique sur les enzymes (Belanger *et al.*, 1986). Farris *et al.* (1989) ont montré une telle action par le zinc (0,034 à 1,1 ppm, 30 jours) sur la cellulase chez *Corbicula*. L'activité de cette enzyme diminue avec les concentrations croissantes en métal.

2ème PARTIE
MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE I : MATERIELS BIOLOGIQUES

I.1. *DREISSENA POLYMORPHA*

I.1.1. Systématique et répartition géographique

Dreissena polymorpha est une moule d'eau douce qui a gardé une grande ressemblance avec la moule marine *Mytilus edulis*, tant sur le plan morphologique que sur le plan biologique (Morton, 1969a). Elle a pour appartenance systématique :

. Embranchement	Mollusques
. Classe	Lamellibranches (Bivalves)
. Famille	Dreissenidae
. Genre	<i>Dreissena</i>
. Espèce	<i>polymorpha</i> (Pallas, 1771).

Dreissena polymorpha est une espèce très répandue sur l'ensemble du continent européen (Léglize, 1981). Originaire de la mer Caspienne et de la mer Noire, *Dreissena* a pu coloniser la majorité des cours d'eau et lacs d'Europe grâce, d'une part à la larve véligère libre et mobile et, d'autre part à la possibilité de se fixer, par le byssus, sur des substrats inoccupés par d'autres bivalves (Morton, 1969a). Elle peut notamment s'établir sur tout substrat stable, organique (végétation) ou inorganique jusqu'à une limite granulométrique de la dimension des sables (Testard, 1991). Sa grande adaptabilité physiologique est probablement un facteur également décisif dans cette expansion.

Le fait nouveau est qu'elle a été signalée récemment dans le continent nord américain, dans les grands lacs au Canada (Hebert *et al.*, 1989). Les auteurs indiquent qu'elle est en cours de devenir un invertébré dominant du macrobenthos des eaux peu profondes dans l'ensemble des grands lacs inférieurs. En France, d'après Tuffery (1978) et une enquête du Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Metz (Léglize, 1981), *Dreissena* a été recensée dans toutes les régions sauf le Midi-Pyrénées et la Corse. La limite de sa colonisation est caractérisée par un maximum thermique de 28°C (Testard, 1991).

L'importance de *Dreissena* dans l'écologie des lacs (clarification, sédimentation et équilibre biologique) a été largement étayée par différents auteurs (Stanczykowska *et al.*, 1975 ; Walz, 1978 ; Reeders *et al.*, 1989). Les données bibliographiques sur sa biologie et son écologie en Europe ont été revues récemment en détail par Testard (1991).

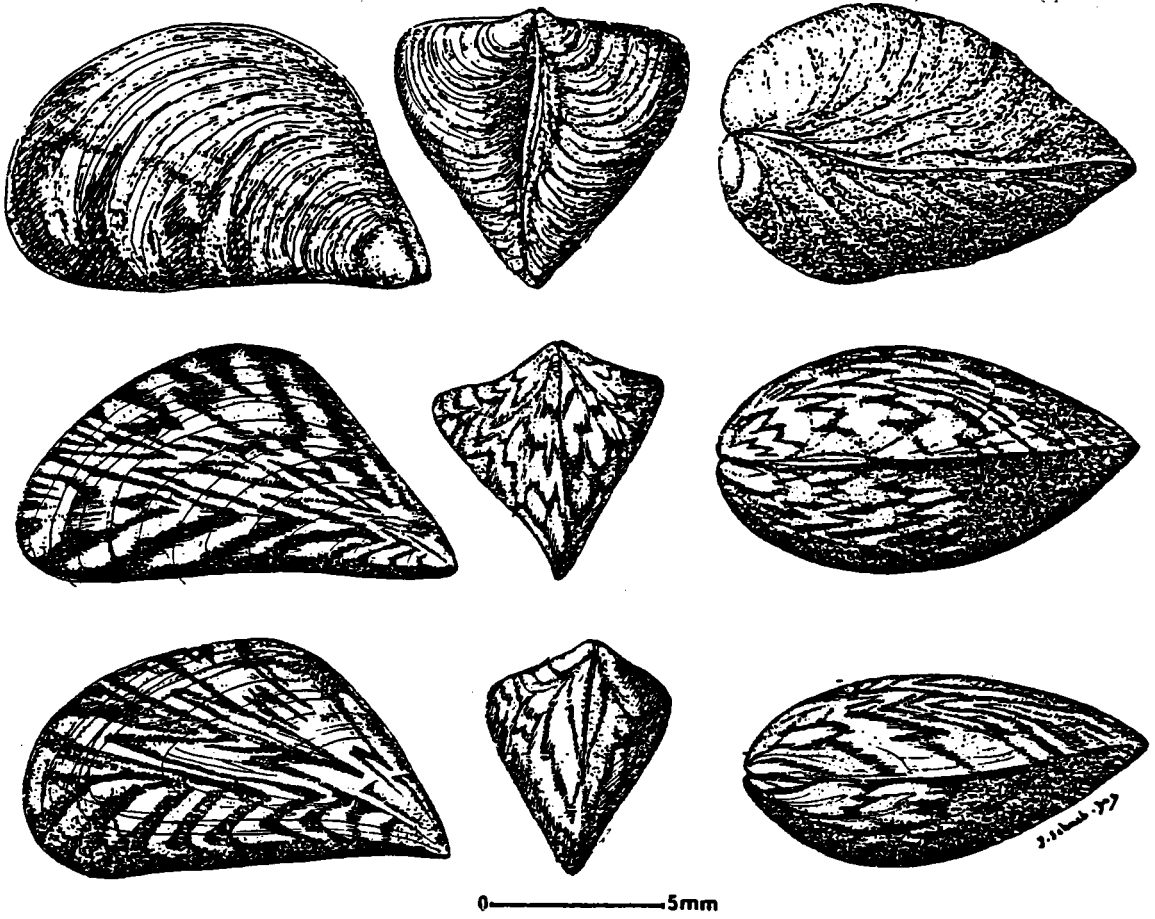


Fig.13 : Exemples des variations morphologiques de la coquille chez *Dreissena polymorpha*. D'après Testard (1991).

I.1.2. Aspects anatomiques et biologiques

. Morphologie et anatomie générale

Comme l'indique son nom, la coquille de *Dreissena polymorpha* est de forme très variable, globalement mytiliforme (fig. 13) et zébrée de bandes en Z irrégulières noires sur fond crème (Morton, 1969a ; Wallet, 1984). La taille maximale donnée par les auteurs est comprise entre 40 mm (Wallet, 1984) et 43 mm (Morton, 1969a). Pour la région lorraine, les plus grandes tailles retrouvées en Moselle atteignent 40 mm (nos propres observations) mais sont très rares.

L'anatomie générale de *Dreissena* est celle des lamellibranches siphonnés. Les bords du manteau sont soudés, à l'exception d'une ouverture pédieuse qui sert aussi au passage du byssus, et des deux ouvertures pour les siphons (fig. 1, 1ère partie, chap. I.1.). Le manteau est cilié à l'intérieur, les courants ciliaires sont nettoyeurs sauf ceux qui sont dirigés vers la bouche. Les siphons sont courts et séparés ; le siphon inhalant a une ouverture ronde relativement large et tentaculée tandis que le siphon exhalant dirigé dorsalement est conique avec une ouverture plus petite et sans tentacules.

Les branchies sont typiques, elles possèdent deux hémibranchies subégales disposées selon la forme caractéristique en W en coupe transversale (fig. 2, 1ère partie, chap. I.1.). Les branchies sont plates, de type lamellibranche. Les filaments branchiaux ont une largeur de 40 μm (Morton, 1969a). La figure 3 (1ère partie, chap. I.1.) montre les différents groupes ciliaires du filament branchial ; leur fonctionnement est conforme au schéma général des bivalves (Sprung et Rose, 1988).

La bouche porte des palpes labiaux ciliés qui permettent de contrôler la prise des particules alimentaires.

La glande péricardique est un organe excréteur rejetant les déchets dans le péricarde d'où ils sont évacués par les conduits excréteurs (Giamberini, 1987).

. Biologie

La maturité sexuelle est atteinte chez *Dreissena* à la fin de la première année, quand la taille est de 9-10 mm (Walz, 1978). Tourari (1988) a décrit en détail le cycle sexuel des populations de la rivière Moselle ; d'après ses résultats, la saison froide correspond au repos sexuel tandis que le développement et la maturation des gamètes débutent au printemps, et leur émission commence à la fin de cette saison et se poursuit pendant l'été. Sprung (1989) a enregistré le pic majeur de ponte à fin mai-début juin (1985) dans le lac Fuhlinger près de Cologne. L'auteur a montré qu'en fait la ponte dépend des conditions climatiques ; elle est précoce si l'hiver n'est pas trop froid.

La larve séjourne dans la phase planctonique entre 30 et 100 jours selon la température ; plus celle-ci est élevée, plus la durée de cette phase est courte (Sprung, 1989). Cet auteur a trouvé que le stade larvaire subit une mortalité de 60% à 89%.

Les données bibliographiques sur le comportement, la filtration et la respiration seront discutées dans la troisième partie consacrée aux résultats expérimentaux.

I.1.3. Dreissena dans la recherche écotoxicologique

I.1.3.1. Dreissena comme indicateur de pollution

Le pouvoir bioaccumulateur de la moule vis-à-vis des micropolluants (métaux, pesticides,...) a incité de nombreux chercheurs à l'utiliser et à la recommander, au même titre que d'autres bivalves (*Mytilus*, *Unio*,...), comme organisme "sentinelle" (Ravera, 1985) dans l'évaluation *in situ* de l'importance et de l'étendue de la contamination (Karbe *et al.*, 1975 ; Léglize et Crochard, 1987 ; Jeanjean, 1989 ; Mersch, 1989). Selon Léglize et Crochard (1987), *Dreissena* se révèle être un bon indicateur du gradient de contamination métallique des cours d'eau soumis aux rejets sidérurgiques ; une corrélation simple liant la teneur en métal particulaire aux teneurs dans les organismes a été mise en évidence par Léglize et Nourisson (1983).

Les arguments qui militent en faveur de l'utilisation de *Dreissena* comme organisme indicateur de pollution sont, outre sa capacité de bioaccumulation établie, sa large répartition géographique en Europe, son abondance et son accessibilité toute l'année, et la commodité analytique. Bias et Karbe (1985) l'ont proposé comme l'équivalent, en milieu d'eau douce, de la moule marine *Mytilus* qui est utilisée dans le programme du "mussel watch" pour la surveillance de la pollution en milieu marin (Goldberg *et al.*, 1978 ; Farrington *et al.*, 1983).

Des études de laboratoire ont confirmé le pouvoir bioaccumulateur des métaux chez *Dreissena* ; signalons à ce propos les recherches de Bias et Karbe (1985) sur le cadmium, de Maarouf *et al.* (1987) et Maarouf (1988) sur le zinc, de Benyahia *et al.* (1987) sur le plomb, et de Herwig *et al.* (1989) sur le cadmium.

I.1.3.2. Dreissena comme outil d'évaluation de la toxicité

Dreissena a été proposée comme moyen d'évaluation du risque toxique des produits chimiques et des effluents industriels et urbains (Slooff *et al.*, 1983 ; Kramer *et al.*, 1989). Les essais

proposés sont basés sur la réaction comportementale valvaire. Ils seront largement évoqués dans le chapitre II de la 4ème partie.

I.2. CHLORELLA VULGARIS

I.2.1. Choix de l'espèce

Cette algue a été utilisée comme nourriture dans certaines expériences et dans un essai d'évaluation du taux de filtration. C'est une algue unicellulaire, solitaire, non flagellée, de forme ellipsoïdale ou sphérique (Férard, 1987). Sa taille varie entre 2 et 10 μm selon les souches.

Cette espèce a été choisie, d'une part parce qu'elle est bien retenue par les branchies de *Dreissena* (Jorgensen *et al.*, 1984 ; Kryger et Kiisgard, 1988) et, d'autre part, pour sa commodité de culture intensive.

I.2.2. Conditions de culture

Le milieu de culture utilisé est le milieu universel de Lefevre-Czarda modifié par l'incorporation d'oligo-éléments d'après Mugel et Férard (1978) (Annexe I).

La culture est réalisée en milieu liquide et stérile, dans des ballons de 2 l, selon le protocole de Férard (1987). La solution algale est constamment aérée, ce qui assure l'agitation et un apport gazeux. Le local de culture est une salle thermostatée à 21°C, la photopériode est de 16 heures d'éclairage/8 heures d'obscurité.

Un repiquage hebdomadaire est effectué pour renouveler le milieu et éviter le vieillissement des cultures.

I.3. CHLAMYDOMONAS VARIABILIS

Cette chlorophycée biflagellée est plus volumineuse que *Chlorella* (11-12 μm de diamètre), unicellulaire, libre et mobile. Elle a été préférée à *Chlorella* dans une expérience d'exposition en continu au cadmium et au cuivre parce qu'elle n'a pas de paroi et est donc, en principe, mieux digérée par *Dreissena*.

Les conditions de culture sont identiques à celles de *Chlorella*.

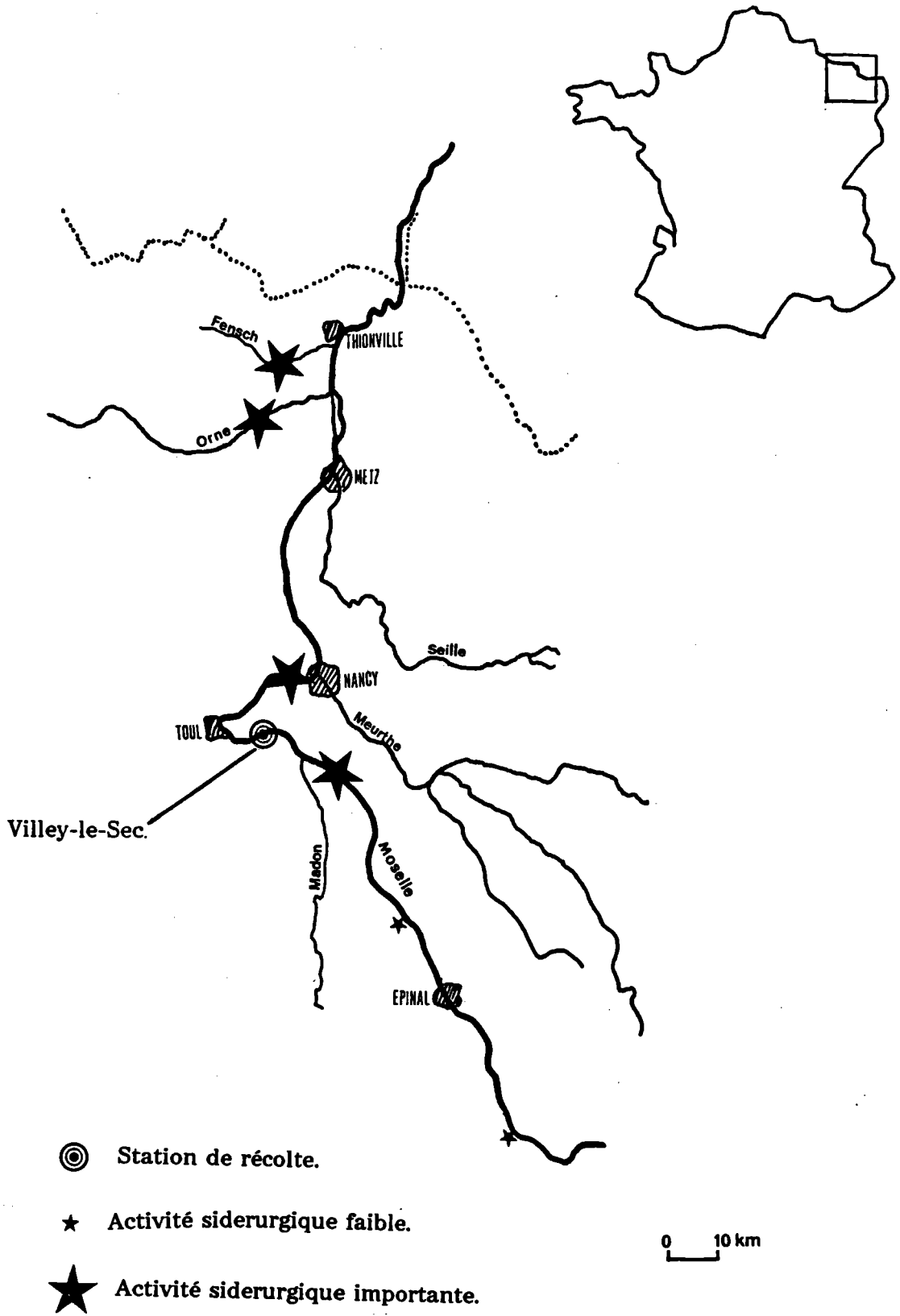


Fig.14 : Localisation de la station témoin de récolte des dreissenés: Villey-le-Sec.

CHAPITRE II : APPROCHE METHODOLOGIQUE

II.1. PRELEVEMENT ET MAINTENANCE DES MOULES

II.1.1. La station de prélèvement

L'objectif de nos expériences étant en premier lieu l'évaluation d'effets toxiques sur la moule *Dreissena*, nous avons choisi de les conduire en laboratoire sur des échantillons prélevés au sein de populations naturelles. Il était donc important de disposer d'une population suffisamment nombreuse, facilement accessible toute l'année et peu ou pas soumise à une pollution métallique, ceci afin de disposer de témoins fiables.

Des études antérieures du Laboratoire d'Ecologie (Nourisson et Pihan, 1985) sur la contamination métallique de la rivière Moselle et ses affluents ont mis en évidence une pollution significative dans la zone aval de la confluence avec l'Orne (fig. 14). La zone en amont s'est avérée peu ou pas contaminée selon les métaux. Dans cette zone, la station de Villey-le-Sec, située à 15 km au Sud de la ville de Nancy, a été choisie comme site de prélèvement de référence pour ses caractéristiques de station peu contaminée (bien que soumise aux rejets du premier site sidérurgique de la vallée de la Moselle (Neuves-Maisons). Le tableau 10 donne quelques caractéristiques physico-chimiques de la station.

II.1.2. Récolte des animaux

L'échantillonnage des moules s'effectue sur la berge droite de la station. Les moules sont prélevées sur des blocs de pierres jusqu'à 1 m de profondeur ; le byssus est délicatement coupé au scalpel. Une première appréciation de la taille permet de ne garder que les moules de la classe de taille 20-25 mm. Les échantillons sont ramenés au laboratoire dans des glacières isothermiques contenant l'eau du site. Un volume de 120 l de cette eau est également prélevé pour servir de milieu de maintenance lors de la phase d'acclimatation et aussi pour la nourriture des moules pendant certaines expériences (voir le détail dans les protocoles des expériences).

II.1.3. Acclimatation aux conditions de laboratoire

L'acclimatation aux conditions du laboratoire est très importante lors des mesures physiologiques chez les bivalves, en particulier les mesures respirométriques (Bayne *et al.*, 1976). Il est donc nécessaire que cette acclimatation se fasse dans des conditions non stressantes pour les moules.

Sauf cas particuliers (qui seront précisés par la suite), les essais de toxicité aiguë, de respirométrie, de filtration et de comportement se font à la température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Cette température a été choisie en tenant compte de la tolérance thermique de la moule, 20° étant une température favorable à sa physiologie (Woynarovich, 1961 ; Tourari, 1988), et aussi en raison de la commodité expérimentale.

Une fois transportées au laboratoire, les moules sont soigneusement lavées pour éliminer les organismes épibiontes (éponges, algues) ; elles sont mesurées une deuxième fois pour ne garder que la classe de taille 20-24 mm. On contrôle alors leur bonne condition générale en essayant d'écarter légèrement les valves. Les individus qui n'opposent pas de résistance à cette manipulation sont éliminés.

La fixation sur les supports (plaques de PVC de 10 x 10 cm ou 20 x 10 cm ou 30 x 10 cm, selon les expériences) et l'acclimatation se font en une semaine, conformément à la majorité des données bibliographiques et à nos propres essais préliminaires sur les lots témoins. Les moules placées sur les supports séjournent trois jours dans l'eau de station et quatre jours dans de l'eau de conduite déchlorée (par passage sur charbon actif) qui constitue le milieu d'essai pour toutes les expériences.

La température est progressivement augmentée à partir de la température du site (si elle est inférieure à 20°) jusqu'à atteindre 20° au sixième jour. Cette régulation se fait au moyen de thermostats automatiques (type RENA-100W). Si la température d'origine est supérieure à 20°C , on laisse refroidir l'eau de maintenance jusqu'à 20°C dans la salle d'expérience thermostatée à cette température. Le milieu d'acclimatation est changé quotidiennement pour éliminer les fèces, il est constamment oxygéné par diffusion d'air (pompes à air type IDEAL).

Les caractéristiques physico-chimiques de l'eau de conduite sont légèrement différentes de celles du milieu de prélèvement (Tableau 11) mais les dreissènes s'y maintiennent parfaitement.

Au terme de cette semaine d'acclimatation, les moules qui ne seront pas fixées (mauvaise condition physiologique) sont éliminées. Les essais commencent au huitième jour.

Tableau 10 : Physico-chimie de l'eau de la station de Villey-le-Sec. Mesures effectuées entre 1986 et 1988 ; 30 échantillons analysés (Benyahia, comm. pers.).

Paramètres	Minimum	Moyenne	Maximum
pH	7	7,6	8,0
O ₂ %	75	90	100
Ca ²⁺ (mg/l)	41	50	70
Mg ²⁺	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
SO ₄ ²⁻	37,5	60,0	90,0
PO ₄ ³⁻	0,10	0,45	1,25
NO ₃ ⁻	2,5	5,5	7,92
HCO ₃ ⁻	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

Tableau 11 : Physico-chimie du milieu expérimental (eau de conduite déchlorée).

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

II.2. L'EXPOSITION AUX TOXIQUES

II.2.1. Les systèmes d'essai en laboratoire

Dans la recherche en écotoxicologie aquatique en laboratoire, le choix du système d'exposition aux toxiques pose le problème de la commodité expérimentale et de la pertinence des résultats en relation avec le coût matériel. Trois types de dispositifs sont couramment utilisés dans les études sur les poissons et les invertébrés :

* Le système statique : la substance à tester est mélangée à l'eau d'essai au début de l'expérience pour donner la concentration désirée. Les organismes sont placés dans la solution toxique et y demeurent jusqu'à la fin de l'essai ou jusqu'à leur mort. Ce système est simple et peu coûteux mais a des inconvénients importants en rapport avec les modifications du milieu (Ravera, 1985) :

- Diminution de la concentration de la substance testée du fait de son adsorption sur les parois, sa précipitation éventuelle et son absorption par les animaux.
- Réduction de l'oxygène dissous à cause de la respiration des animaux.
- Variation du pH et accumulation des produits d'excrétion.

Ces modifications peuvent affecter la sensibilité des organismes. De plus, ce système ne se prête pas à des études de moyen et long terme.

* Le système à circuit ouvert : le milieu d'exposition est continuellement remplacé, soit par un flux constant, soit par addition de petites quantités du milieu à quelques minutes d'intervalle. Ce système a l'avantage de simuler au mieux la réalité dans le milieu naturel (OECD, 1987), de supprimer ou du moins minimiser les causes d'erreur engendrées par l'utilisation du système statique

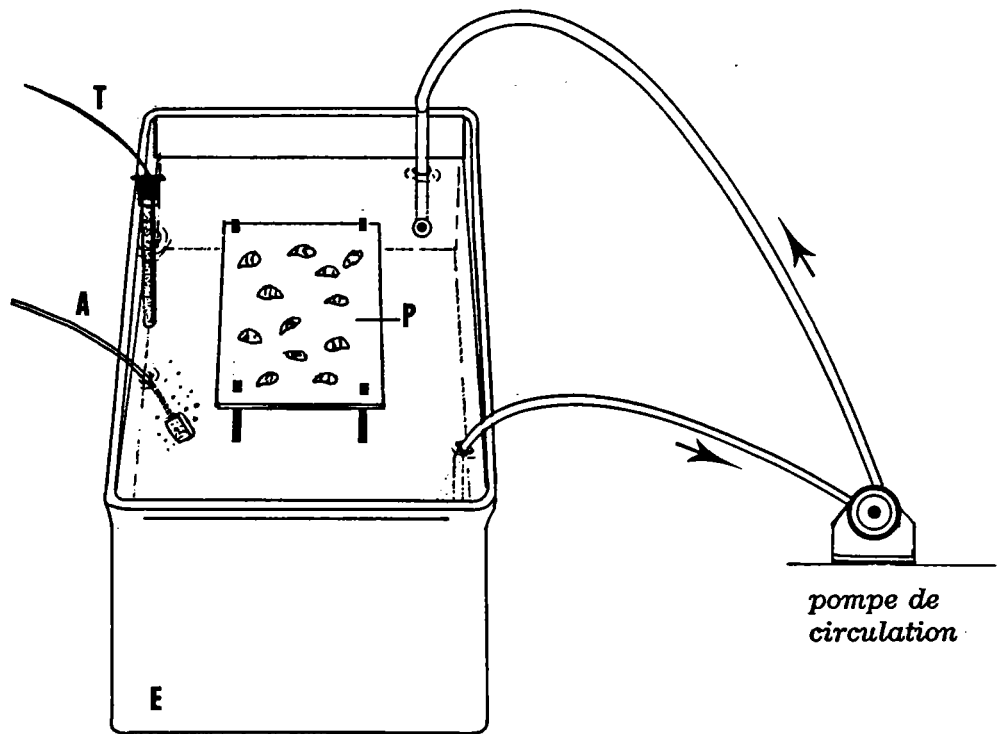


Fig.15 : Schéma d'une unité d'exposition avec renouvellement périodique.

A : diffuseur d'air, E : enceinte d'exposition, P : portoire avec les dreissènes fixées, T : résistance chauffante à thermostat.

(Ravera, 1984). Il permet aussi de réaliser des expériences à moyen et long terme. Cependant, le système ouvert a des inconvénients dont le coût élevé (matériel et produits consommables) et la nécessité d'une surveillance en continu des variations de concentration. Cette dernière contrainte exige un personnel qualifié.

* Le système à renouvellement périodique : ce système constitue un compromis entre le deux précédents. Le milieu d'exposition est remplacé périodiquement, généralement toutes les 24 ou 48 heures. Ce système offre l'avantage d'être peu coûteux et simple à réaliser. Il pallie en partie les inconvénients du système statique et se prête bien aux études à moyen terme. Il a cependant l'inconvénient de perturber les organismes lors du renouvellement (Ravera, 1984).

II.2.2. Les dispositifs expérimentaux

Nous avons choisi le système intermédiaire à savoir le système fermé avec renouvellement du milieu, sauf pour une expérience dont les modalités ont nécessité une exposition en continu (voir II.2.2.3.).

II.2.2.1. Dispositif à renouvellement périodique et avec circulation d'eau

Ce dispositif est utilisé dans la majorité des essais d'exposition aux métaux (fig. 15). Il est constitué d'un bac en polyéthylène de 20 l pourvu d'une pompe centrifuge d'aquarium d'un débit de 6 l/mn (EHEIM type 1021) qui assure le brassage et la circulation continue du milieu. Une bonne homogénéisation est ainsi réalisée. L'oxygénation est assurée par un bullage d'air, la température est maintenue constante avec un thermoplongeur.

II.2.2.2. Dispositif à renouvellement périodique et avec agitation

Pour certaines expériences n'exigeant pas un grand volume de milieu, nous avons opté pour un système à renouvellement constitué d'un cristalliseur en verre de 2 l mis sur un agitateur magnétique à vitesse réglable (Prolabo type ROTAMAG 12 ou IKA-COMBIMAC type RCO). L'agitation assure l'homogénéisation du milieu et son oxygénation.

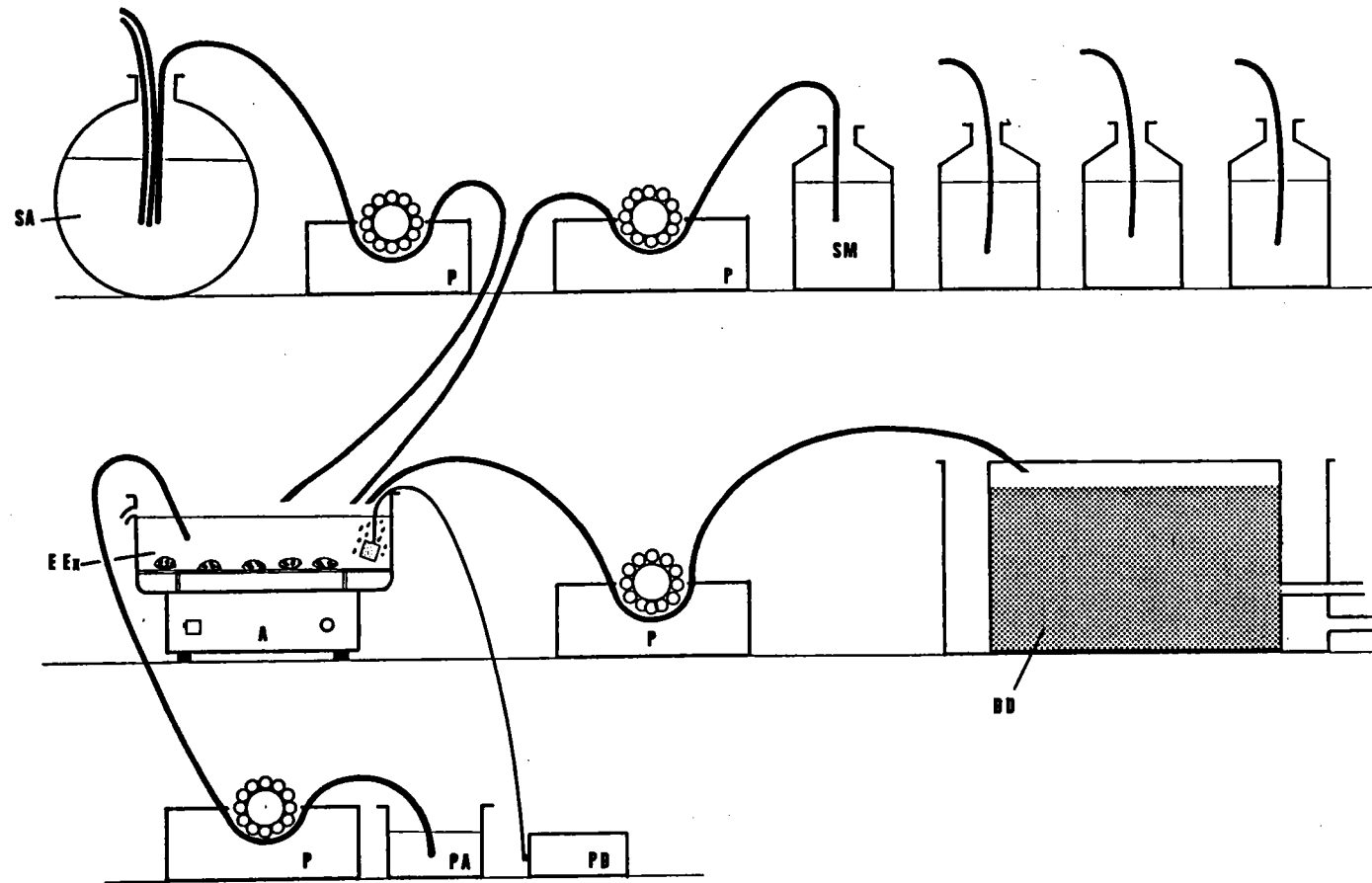


Fig.16 : Dispositif d'exposition à circuit ouvert.

- A : agitateur magnétique.
- BD : bac de déchloration sur charbon actif.
- EEx: enceinte expérimentale.
- P : pompe péristaltique.
- PA : prélèvement pour analyse.
- PB : pompe de bullage.
- SA : suspension algale.
- SM : solution métallique.

II.2.2.3. Dispositif à circuit ouvert

Pour conduire une expérience d'évaluation des effets à moyen terme (28 jours) du cuivre et du cadmium sur le bilan énergétique de *Dreissena*, nous avons utilisé un système d'exposition à circuit ouvert. Notre essai fait partie d'une étude de la cinétique d'accumulation de ces deux métaux chez la dreissène (*) en relation avec les effets sublétaux.

Dans ce dispositif, l'unité d'exposition est un bac en polyéthylène de 10 l où l'on place les moules fixées sur leur support. L'unité comprend (fig. 16) :

- une arrivée d'eau de dilution délivrée par une pompe MASTERFLEX à partir d'un bac de déchloration au charbon actif,
- une arrivée de solution du métal délivrée par une pompe péristaltique (ISMATEC type JPS16),
- une arrivée de nourriture algale assurée par une pompe du même type à partir d'une solution mère de *Chlamydomonas variabilis* ($3,5-4,5 \cdot 10^6$ cellules/ml),
- une prise en continu pour le milieu, pour les analyses physico-chimiques et le contrôle des concentrations réelles en métal (pompe de même type),
- et un trop-plein assurant l'évacuation du milieu pour son renouvellement.

II.2.3. Modalités de contamination

II.2.3.1. Système fermé avec renouvellement

Le milieu d'exposition est renouvelé toutes les 24 heures, les supports des moules sont enlevés, les bacs sont vidés et remplis à nouveau d'eau de dilution préalablement déchlorée et amenée à la température de l'expérience. Les pompes sont réamorçées et les solutions de métal injectées manuellement. Les moules sont remises dans les bacs après quelques minutes d'homogénéisation.

Ces opérations sont effectuées rapidement (30 mn) pour limiter, pour les moules, la durée passée à l'air. Pour certaines expériences où l'on a opté pour une alimentation des organismes, la période de changement de milieu est utilisée à cet effet (1 h 30).

La procédure est identique pour l'exposition en milieu agité.

(*) Etude réalisée par Jacques Mersch

II.2.3.2. Système à circuit ouvert

L'eau de dilution est délivrée à un débit de 75 ml/mn, le métal et la nourriture sont délivrés à un débit de 0,15 ml/mn, les solutions mères sont préparées de façon à donner, dans le milieu, la concentration voulue en métal. La nourriture est à une concentration d'environ 9000 cellules/ml. L'homogénéisation instantanée est assurée par un agitateur magnétique.

II.2.4. Les solutions métalliques

Les solutions mères de métal sont préparées à 1 g/l ou 10 g/l (selon les essais) dans de l'eau distillée et acidifiée à 1% à l'acide nitrique. Les sels minéraux utilisés sont :

- le sulfate de cuivre hydraté, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Extrapur, Merck)
- l'acétate de zinc hydraté, $\text{Zn}(\text{COOCH}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Normapur, Prolabo)
- l'acétate de plomb hydraté, $\text{Pb}(\text{COOCH}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Normapur, Prolabo)
- le chlorure de cadmium anhydre, CdCl_2 (pour analyse, Merck)
- le chlorure de mercure, HgCl_2 (pour analyse, Merck).

Les solutions sont gardées à 4°C.

II.3. LES TECHNIQUES D'ETUDE DES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES

II.3.1. Méthode d'étude du comportement de filtration : l'anémométrie à film chaud

II.3.1.1. Principe de l'approche

L'activité de filtration a été couramment étudiée par le suivi de l'activité valvaire, l'ouverture étant assimilée à une période de filtration active tandis que la fermeture correspond à un arrêt (Sallanki et Lukascovics, 1967 ; Morton, 1971 ; Samant et Agarwal, 1978 ; Walz, 1978). Cependant, l'étude de l'activité du siphon exhalant en période d'ouverture a montré que celle-ci constituait, avec l'activité valvaire, un moyen de contrôle de la filtration (Foster-Smith, 1976). Il nous est donc apparu nécessaire de nous intéresser à l'activité du siphon dans l'évaluation de la réponse comportementale de *Dreissena* aux toxiques. La technique de l'anémométrie à film chaud offre cette possibilité tout en indiquant l'activité valvaire (fermeture et ouverture).

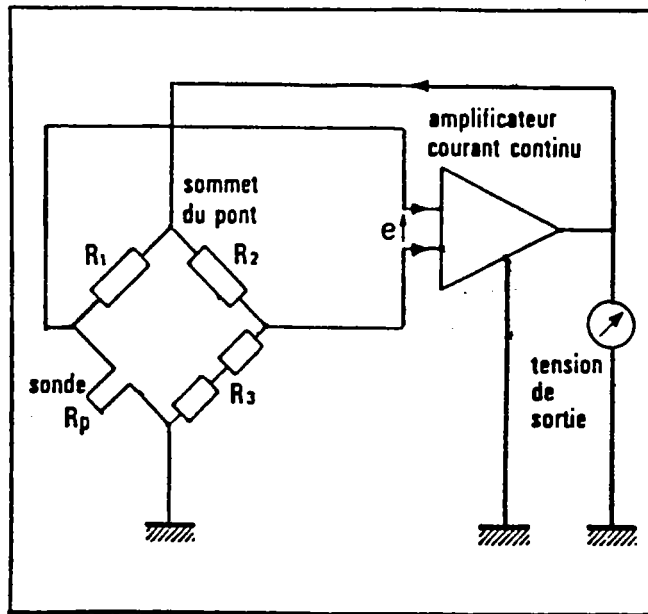


Fig.17 : Schéma du montage de l'anémomètre CTA.
D'après DISA (1981)

II.3.1.2. Principe de la technique

L'anémomètre à température constante (CTA) est un pont de Wheatstone alimenté par un courant continu (fig. 17) et dont l'une des résistances est la sonde à film chaud (R_p). La partie sensible de cette sonde (film chaud) est maintenue à température constante, supérieure à la température ambiante, par un système d'asservissement électronique (la température ambiante doit être elle-même constante). Le système fonctionne alors comme un vélocimètre. Le principe est basé sur le fait que la quantité de chaleur cédée par le film chaud au fluide ambiant dépend de la vitesse d'écoulement de ce dernier. Les variations de vitesse du fluide modifient donc le niveau des échanges thermiques entre le film et le milieu et, de ce fait, modifie également la tension qu'il faut fournir au capteur pour maintenir sa température constante. Il est possible d'enregistrer les variations de cette tension en sortie ; elles correspondent alors aux variations de vitesse du fluide au niveau du capteur. Le suivi peut se faire en continu.

II.3.1.3. Dispositif expérimental

L'utilisation de cette technique en milieu liquide est très aisée ; elle requiert peu d'entraînement et un réglage simple pour une étude qualitative comme la nôtre. La sonde utilisée est une sonde robuste DISA 55A76 dont le capteur est un film de nickel de 0,1 mm de diamètre, enrobé dans un tube protecteur en acier inoxydable de 1,1 mm de diamètre. Cette sonde est sensible à la composante de vitesse perpendiculaire à son axe. Elle est montée sur un support mobile et reliée à un anémomètre à température constante DISA CTA 56C16 dont la tension de sortie en position de repos (stand by) est préalablement réglée à 5V. Un enregistreur potentiométrique PERKIN ELMER 56 est relié à l'anémomètre pour l'enregistrement de l'activité (fig. 18A et 18B).

II.3.1.4. Milieu d'essai et mode opératoire

Le milieu d'essai est constitué de 1,5 l d'eau de conduite déchlorée à 20-22°C dans un cristalliseur de 2 l. La moule est fixée par la base de l'une de ses valves sur un bloc de verre au moyen d'une colle rapide et insoluble. On positionne le capteur de la sonde à 3 mm environ du siphon exhalant, perpendiculairement à son axe. Cette opération est effectuée sous la loupe binoculaire. Le sélecteur de l'anémomètre est alors mis sur la position d'écoulement "Flow" et le positionnement de la sonde est finement ajusté de façon à avoir la plus grande réponse en tension de sortie. Les variations de tension traduisent alors les variations des courants de filtration. Les enregistrements ont lieu généralement pour une vitesse de déroulement du papier de 0,5 cm/mn. Le suivi de l'activité est le plus souvent fait sur des cycles de 24 heures.

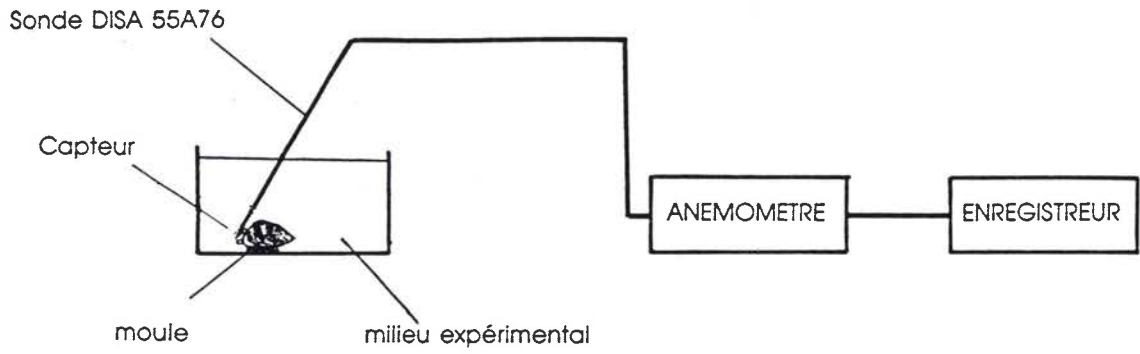


Fig.18A : Schéma du dispositif d'enregistrement de l'activité de filtration.

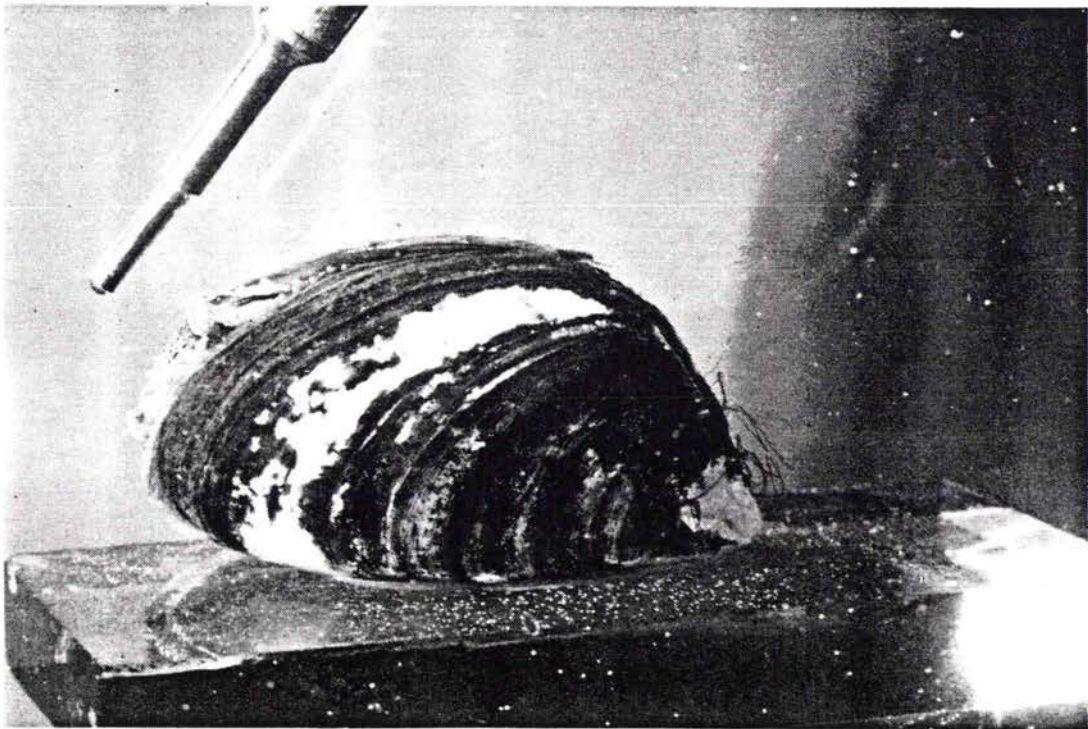


Fig.18B : Détail de la position de la sonde par rapport au siphon exhalant de *Dreissena*.

II.3.1.5. Lecture des enregistrements

L'exemple d'enregistrement présenté sur la figure 19 montre :

- Une ligne de Base (I) correspondant à l'absence de courant (siphon fermé).
- Dès qu'il y a émission d'un courant par le siphon, la tension augmente instantanément, provoquant le déplacement du curseur de l'enregistreur (II).
- Tant que le courant est maintenu, la tension reste élevée en variant d'amplitude (III) en fonction de facteurs tels que la vitesse d'écoulement (qui est variable) et la position du siphon par rapport à la sonde (mouvements latéraux).
- Lors d'un écoulement continu, des fermetures brusques et instantanées du siphon peuvent intervenir, provoquant la chute et la reprise instantanées de la tension (IV).
- L'événement (V) représente une fermeture prolongée du siphon (1 minute).

II.3.2. La mesure du taux de filtration

Les méthodes d'estimation du taux de filtration (TF) ont été revues et discutées dans la première partie, chap. I.1.4.

La technique anémométrique a été utilisée pour l'étude quantitative de la filtration chez des ascidies (Fiala-Medioni, 1978) et chez des bivalves (Amouroux *et al.*, 1975 ; Amouroux, 1982).

Malheureusement, l'application à *Dreissena* s'est avérée impossible à cause de la taille trop petite de l'ouverture exhalante. Nous avons donc utilisé la méthode indirecte à savoir la clarification d'une suspension (Première partie, chap. I.1.4.2.).

II.3.2.1. Dispositif de mesure

Les mesures du TF sont effectuées dans des cristallisoirs de 2 l placés sur des agitateurs magnétiques. L'agitation permet d'éviter la décantation de la suspension utilisée et assure l'oxygénation du milieu. La mesure consiste à laisser filtrer une suspension des particules par un lot de moules afin de déterminer les concentrations initiales et finales, puis de calculer le TF.

Le mode opératoire sera présenté dans le chapitre consacré aux résultats des effets des métaux sur le TF de *Dreissena* (Troisième partie).

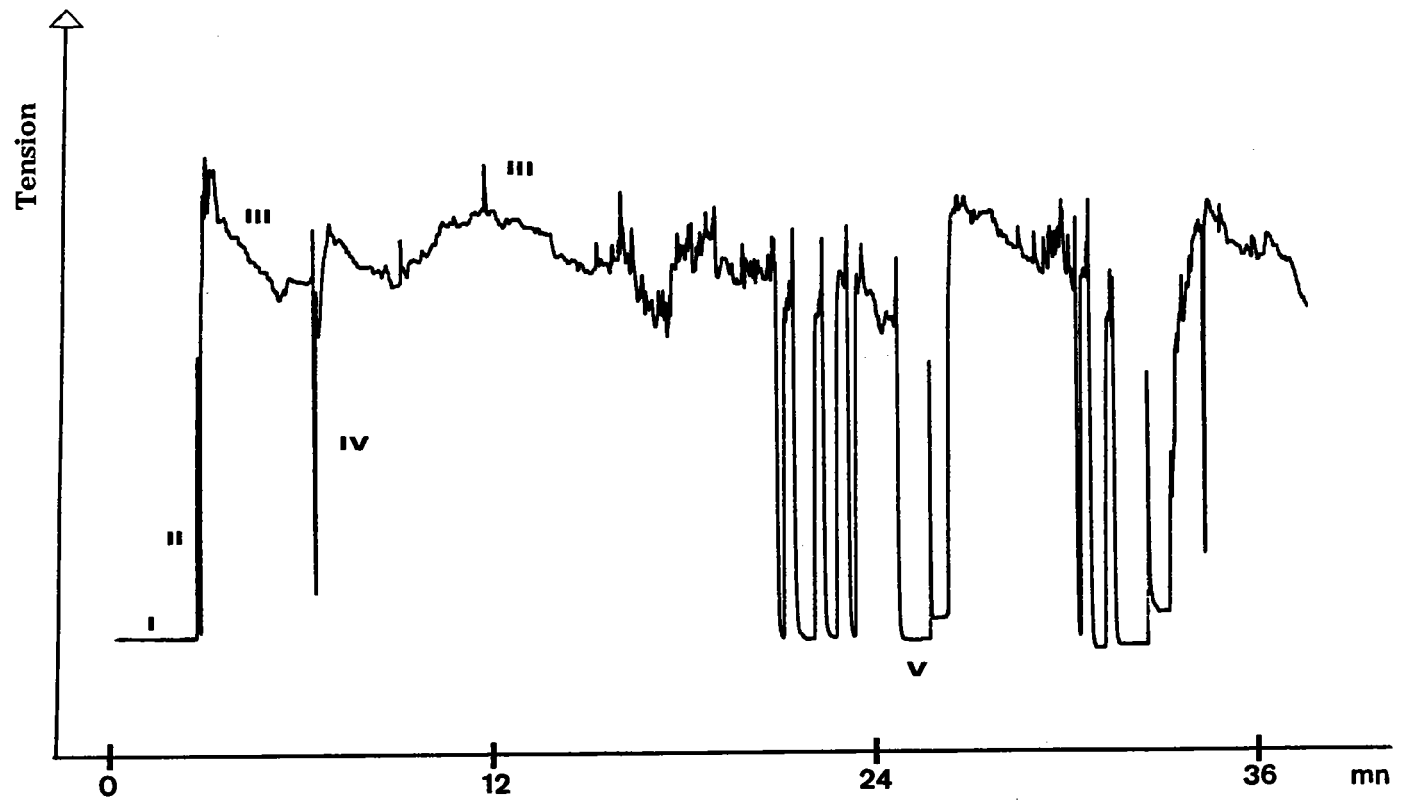


Fig.19 : Exemple d'enregistrement de l'activité de filtration de *Dreissena* (explications dans le texte).

II.3.2.2. Les suspensions

II.3.2.2.1. La suspension de graphite colloïdal

Dans les expériences d'évaluation des effets toxiques sur le taux de filtration de *Dreissena*, nous avons choisi d'utiliser une suspension de particules inertes : le graphite colloïdal qui est couramment utilisé dans les études de filtration (Morton, 1971 ; Abel, 1976 ; Kuppusamy et Ramalingam, 1982 ; Wright *et al.*, 1982 ; Grace et Gainey, 1987). Ce type de suspension offre l'avantage de ne demander aucune préparation préalable et donc d'alléger le protocole de mesure.

La suspension mère de graphite est préparée avec 0,5 ml du colloïde Aquadag (Acheson Colloids) dans 100 ml d'eau distillée. A partir de cette suspension mère, on prépare une gamme de concentrations (0,0075% ; 0,015% ; 0,025% ; 0,050% et 0,1%) pour établir la corrélation entre le nombre de particules et la densité optique (DO à 650 nm).

Les volumes à injecter dans le milieu d'essai (2 l d'eau déchlorée) sont calculés pour obtenir les concentrations voulues en particules.

II.3.2.2.2. Les suspensions algales

Chlorella vulgaris a été utilisée dans une expérience pour comparer les résultats avec ceux obtenus avec le graphite colloïdal. *Chlamydomonas variabilis* a été utilisée dans l'expérience sur les effets du Cu et du Cd sur le bilan énergétique de *Dreissena*. Cette algue servant également de nourriture en continu. Les suspensions sont préparées à partir de cultures de 7 à 8 jours (phase exponentielle de croissance).

Pour *Chlorella* on procède à une centrifugation de la culture à 4750 tr/mn pendant 10 mn, puis une remise en suspension dans de l'eau déchlorée (filtrée sur filtre 0,45 µm) ; cette opération permet d'éliminer le milieu de culture qui contient des sécrétions pouvant être toxiques pour la moule (Morton, 1971).

La gamme de concentrations est préparée pour établir la corrélation entre le nombre de cellules et la DO ou, dans le cas de faibles concentrations (de l'ordre de 10^4 cellules/ml), entre le nombre de cellules et la fluorescence.

II.3.2.3. Comptage des particules

II.3.2.3.1. Comptage à la cellule de Thoma

Les comptages effectués à la cellule de Thoma sont destinés à établir la corrélation entre le nombre de particules par ml et leur DO. Les déterminations des concentrations se font ensuite par mesure de l'opacimétrie.

Le comptage s'effectue par microscopie avec un objectif 40, l'échantillon à numérer est infiltré sous une lamelle calibrée, soigneusement appliquée sur la cellule de Thoma. Le nombre de grands carrés comptés dépend de la concentration en particules de l'échantillon, mais 5 carrés sur les 16 sont au minimum comptés chaque fois. Cinq à dix répétitions sont effectuées par échantillon ; leurs moyennes sont utilisées dans l'étalonnage des suspensions.

II.3.2.3.2. Mesure de l'opacité

Pour déterminer les concentrations en particules, on établit la relation entre le nombre de particules comptées à la cellule de Thoma et la densité optique (DO) transmise par l'échantillon à une longueur d'onde donnée.

* Pour le graphite colloïdal : la DO est mesurée à 650 nm (Jorgensen et Goldberg, 1953 ; Kuppusamy et Ramalingam, 1982).

* Pour les suspensions algales : la DO est mesurée à 665 nm. D'après Mugel et Féraud (1978), il n'y a pas de différence significative entre les DO mesurées entre 430 et 700 nm ; nous avons choisi arbitrairement 665 nm qui correspond cependant au maximum d'absorption de la chlorophylle a.

Les DO sont mesurées avec un spectrophotomètre KONTRON modèle Uvikon 810.

II.3.2.3.3. Mesure de la fluorescence

Nous avons utilisé cette mesure dans une expérience des bilans énergétiques où les concentrations algales utilisées (de l'ordre de 10^4 cellules/ml) étaient trop faibles pour pouvoir être déterminées avec précision en mesurant l'opacité au spectrophotomètre.

La mesure est faite à l'aide d'un spectrofluorimètre PERKIN ELMER LS-3B. Le principe est le suivant : une source (lampe à arc de xénon ou à vapeur de mercure) produit une radiation dont une

portion monochromatique est isolée au moyen d'un filtre ou monochromateur primaire. Cette lumière d'excitation produit dans l'échantillon une lumière de fluorescence dont une partie, émise à 90° de l'axe primaire, traverse un filtre ou monochromateur secondaire pour frapper un détecteur.

Les mesures se font dans des cuves en quartz, à 438 nm d'excitation et 683 nm d'émission, ces longueurs d'ondes correspondent respectivement aux pics maximum d'absorption en excitation et en émission chez *Chlorella*.

Une gamme de concentrations de *Chlamydomonas* est préparée pour établir la corrélation entre le nombre de cellules par ml comptées à la cellule de Thoma et la fluorescence. Les concentrations dans les échantillons d'essai sont alors déterminées à partir de cette corrélation.

II.3.2.4. Expression des résultats

Après la détermination des concentrations initiale et finale en particules et du poids sec des parties molles de l'ensemble des moules de l'échantillon, on calcule le taux de filtration (TF) selon la formule générale de suivante adaptée de Coughlan (1969) :

$$TF = \frac{V (\text{Ln } C_o - \text{Ln } C_f)}{t \cdot PS}$$

où :

V est le volume du milieu d'essai en ml

C_o et C_f représentent respectivement la concentration initiale et finale en particules en nombre de cellules/ml

t est la durée de la mesure en h

PS est le poids sec des parties molles en g

TF est exprimé en $\text{ml} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

II.3.3. La mesure respirométrique

II.3.3.1. Le dispositif de mesure

Nous avons choisi de mesurer la VO_2 de la dreissène en milieu fermé (méthode dite de confinement aquatique). Ce système qui a l'avantage d'être simple répond parfaitement à l'objet de l'étude (estimation du taux de consommation d'oxygène) sans que l'animal subisse le stress du manque d' O_2 pendant la mesure. Le milieu est préalablement saturé en O_2 , puis complètement fermé sur lui-même.

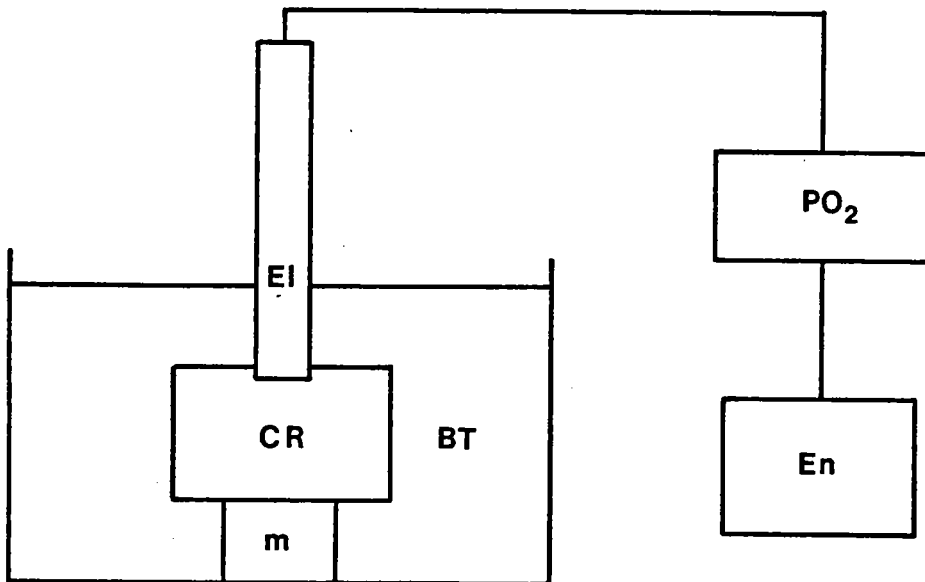


Fig.20 : Schéma de la chaîne de mesure respirométrique. EI : électrode à oxygène, CR : cuve respirométrique, BT : bain thermostaté, PO₂ : analyseur d'oxygène, m : agitateur magnétique à entraînement pneumatique, En : enregistreur.

Le dispositif de mesure est présenté dans la figure 20. Il comprend une cuve respirométrique d'une contenance de 125 ml, une électrode polarographique à oxygène (Radiometer E5040) et un analyseur de pression d'oxygène (Radiometer pHm 73, qui comprend également un analyseur de pression de CO₂ et un pHmètre), celui-ci est relié à un enregistreur potentiométrique avec un amplificateur de haute sensibilité (Radiometer REA 112).

La cuve respirométrique est en plexiglas. Elle est munie d'un agitateur à entraînement pneumatique ; l'agitation assure une bonne homogénéité du milieu, condition nécessaire pour la validité de la mesure en milieu fermé (Quetin et Mickel, 1983).

Un bain thermostaté de haute précision permet de maintenir constante la température et de la faire varier dans une gamme de 8 à 30°C ($\pm 0,1^\circ\text{C}$) grâce à un thermomètre de contact.

II.3.3.2. Précaution d'utilisation et entretien

Il est essentiel que les mesures effectuées avec l'électrode soit parfaitement reproductibles ; la sensibilité de l'électrode doit à cet égard être constante. Or, celle-ci peut souffrir essentiellement de la variation de température, du vieillissement et de la pression hydrostatique exercée sur elle (Hale, 1983). La variation de température est évitée par l'utilisation du bain thermostaté.

Le vieillissement (dû au dépôt de microorganismes et de matières en suspension) nécessite la régénération de la membrane (en polypropylène) tous les quinze jours. Enfin, il est nécessaire de manipuler très délicatement afin d'éviter une surpression sur la membrane lors de la mise en place de l'électrode sur la chambre respirométrique.

L'étalonnage de l'électrode est fait entre une eau dépourvue d'O₂ (solution saturée en sulfite de sodium, signal 0) et une eau saturée en O₂ par bullage d'air.

II.3.3.3. Mode opératoire

Chaque mesure respirométrique porte sur un lot de deux moules (trois pour quelques expériences). Les moules sont placées dans la cuve remplie d'eau saturée en O₂. L'électrode ferme hermétiquement la cuve. La mesure dure entre une et deux heures. A la fin de l'expérience, les animaux sont séchés à 105°C pendant 24 heures pour déterminer le poids sec des parties molles. A la fin de chaque série de mesures la consommation propre de l'électrode et du milieu sans moules est mesurée ; elle est soustraite dans le calcul de la VO₂ des animaux.

II.3.3.4. Expression des résultats

A partir des enregistrements, la VO_2 est calculée par la relation suivante, qui tient compte du fait que le volume d' O_2 dissous par unité de volume est proportionnel à la pression partielle de gaz dans l'eau :

$$VO_2 = \frac{\alpha \cdot \Delta pO_2 \cdot V}{760 \cdot t \cdot PS}$$

où :

VO_2 est le taux de consommation d' O_2 en $mg O_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ de poids sec

α est la solubilité de l'oxygène à température et à pression données, en $mg O_2 \cdot l^{-1}$

ΔpO_2 est l'écart de pression d' O_2 (pO_2) choisi pour le calcul, en mm Hg

V est le volume du respiromètre en litres

PS est le poids sec des parties molles, en grammes

t est le temps correspondant à ΔpO_2 , en heures.

ΔpO_2 est systématiquement pris au moins une demi-heure après le début de l'enregistrement, période considérée nécessaire pour l'animal, pour se remettre du stress de la manipulation.

α est déterminé à partir de l'abaque (Annexe II) d'après Rodier (1984).

II.3.4. Evaluation du potentiel énergétique de croissance

II.3.4.1. Principe de méthode

La production est estimée de la différence entre l'énergie absorbée de la nourriture et l'énergie dépensée via la respiration et l'excrétion. L'équation du bilan énergétique est :

$$P = A - (R + U) \quad (\text{Widdows, 1985}).$$

où : A est l'énergie absorbée à partir de la nourriture (entrées) en Joules/heure/gramme de poids sec

R est l'énergie associée à la respiration (sorties), en $J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$

U est l'énergie associée à l'excrétion (sorties), en $J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$

P est l'énergie potentiellement disponible pour la croissance somatique et la production de gamètes (potentiel énergétique de croissance, P.E.C.), en $J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$.

Les mesures physiologiques nécessaires pour le calcul du P.E.C. sont : (1) le taux de filtration, (2) l'efficacité d'absorption de la nourriture, (3) le taux de consommation d'oxygène et (4) le taux d'excrétion ammoniacale (TE).

II.3.4.2. Les calculs énergétiques

II.3.4.2.1. Calcul de l'énergie assimilée (A)

L'énergie assimilée est obtenue en multipliant la quantité d'énergie consommée (C) par l'efficacité d'absorption (e)

$$A = C \times e$$

II.3.4.2.1.1. Calcul de l'énergie consommée (C)

Elle est obtenue en multipliant le TF (en $l \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$) par la charge particulaire du milieu (CP, en $mg \cdot l^{-1}$) ; le résultat est ensuite converti en équivalent énergie en multipliant par le contenu énergétique des particules alimentaires (CE, en $J \cdot mg^{-1}$ de poids sec)

$$C (J \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}) = TF (l \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}) \times CP (mg \cdot l^{-1}) \times CE (J \cdot mg^{-1}).$$

II.3.4.2.1.2. Calcul de l'efficacité d'absorption (e)

(e) représente l'efficacité par laquelle l'animal absorbe le matériel filtré de la suspension ; ce paramètre est calculé par le rapport de Conover (Conover, 1966, cité par Widdows, 1985) :

$$e = \frac{F - E}{(1 - E) F}$$

où F est le rapport du poids sec sans cendre (PSSC) et du poids sec (PS) pour la nourriture, et E est le rapport du PSSC et du PS pour le fèces.

II.3.4.2.2. Calcul de l'énergie associée à la respiration (R)

Dans le contexte de l'approche énergétique, le taux de consommation d'oxygène (VO_2) est une mesure de l'énergie requise pour soutenir les processus métaboliques. Le taux de dissipation de

l'énergie dans le métabolisme est obtenu à partir de la VO_2 en utilisant le coefficient oxycalorique unique de 20,33 Joules/ml O_2 (Crisp, 1971) ; l'équation est la suivante :

$$R \text{ (J.h}^{-1}\text{.g}^{-1}\text{)} = VO_2 \text{ (ml } O_2\text{.h}^{-1}\text{.g}^{-1}\text{)} \times 20,33 \text{ (J/ml } O_2\text{)}.$$

II.3.4.2.3. Calcul de l'énergie associée à l'excrétion (U)

Une partie de l'énergie absorbée par l'animal est excrétée sous forme de déchets métaboliques. Il est établi que l'excrétion azotée est dominée chez les invertébrés aquatiques par l'ammoniaque (Cockcroft, 1990). C'est le cas par exemple chez *Mytilus*, qui montre des produits d'excrétion azotée dont 80 à 90% sont constitués de NH_4^+ , le reste étant sous forme d'urée et d'acides aminés (Bayne et Scullard, 1977).

Le taux d'excrétion d'ammoniaque est incorporé dans l'équation énergétique après conversion en équivalent énergie, sachant que 1 mg $N-NH_4^+$ équivaut à 24,87 Joules.

II.3.4.3. La mesure du taux d'excrétion

II.3.4.3.1. Incubation des échantillons

Le principe de la mesure est basé sur le dosage de l'ammoniaque libéré par les organismes après un certain temps d'incubation dans un milieu fermé.

Les échantillons (portoirs de 8 moules) sont placés dans des cristallisoirs en verre contenant un litre d'eau déchlorée et filtrée, où on les laisse au moins une demi-heure pour reprendre leur activité normale. Après une brève agitation (pour homogénéiser le milieu), on prélève 10 ml et on recouvre le cristallisoir. On laisse incuber ainsi pendant 3 heures, après quoi on effectue un deuxième prélèvement de 10 ml après une brève agitation. Les échantillons d'eau sont alors utilisés pour le dosage colorimétrique de l'azote ammoniacal.

II.3.4.3.2. Dosage de l'azote ammoniacal

II.3.4.3.2.1. Principe de la méthode

Il s'agit de la méthode spectrophotométrique au bleu d'indophénol selon la norme française NF T90015 (AFNOR, 1983) et dont le principe est basé sur la formation, en milieu alcalin ($10,4 <$

pH < 11,5), d'un composé type indophénol par réaction des ions ammonium avec du phénol et de l'hypochlorite, en présence de nitroprussiate comme catalyseur. La coloration obtenue est mesurée par spectrophotométrie à 630 nm.

II.3.4.3.2.2. Mode opératoire

La préparation des réactifs est conforme à la norme NF T90015 (Annexe III). Dans chaque prise d'essai de 10 ml on introduit 1 ml de solution de phénol et nitroprussiate et 1 ml de solution alcaline et chlorée, on agite et on met à l'obscurité pendant au moins 6 heures. Les mesures sont alors effectuées au spectrophotomètre (Uvikon 810). Des mesures sur eau déchlorée et filtrée sans moules (essais témoins) sont effectuées parallèlement.

II.3.4.3.3. Expression des résultats

Une courbe d'étalonnage est construite selon les recommandations de la norme NF T90015. Les teneurs en azote ammoniacal sont déduites de cette courbe et exprimées en mg N-NH₄/l/g de poids sec.

II.4. TRAITEMENT DES DONNEES

La significativité des effets observés est testée par le test t de Student dans le cas de la comparaison de deux moyennes et par l'analyse de variance quand il s'agit de plus de deux moyennes. Le seuil de significativité de ce test est fixé à $\alpha = 0,05$.

3ème PARTIE

**ETUDE EXPERIMENTALE
RESULTATS ET DISCUSSION**

CHAPITRE I : TOXICITE LETALE DES METAUX CHEZ *DREISSENA*

I.1. INTRODUCTION

L'évaluation des effets sublétaux (physiologiques) s'intéresse par définition à des concentrations sans effet léthal pour la durée de l'essai envisagé. Il est donc nécessaire, dans le cadre de notre étude, d'établir les seuils de concentrations létales ainsi que l'évolution de la mortalité au-delà de ces seuils. Dans ce contexte, la détermination de la concentration létale moyenne (CL50) est utile pour la comparaison avec d'autres espèces. Nous avons ainsi choisi de déterminer la CL50-96 h qui est la concentration métallique qui provoque, en 96 heures, la mort de 50% des organismes en expérience. La durée de 96 heures est une durée conventionnelle très employée dans les études de toxicité, notamment chez les bivalves bien qu'elle soit critiquée par certains auteurs (Akberali et Black, 1981). Ce choix nous permet de comparer la sensibilité de *Dreissena* à celle des autres espèces.

Dans un premier temps, un essai préliminaire est conduit afin de déterminer les concentrations provoquant entre 0 et 100% de mortalité, ce qui donne une indication approximative sur la CL50. Ensuite, sur la base des résultats de ce premier essai, un essai définitif est réalisé pour déterminer avec précision la CL50-96 h.

La concentration maximale utilisée dans les essais préliminaires a été délibérément limitée à 10 ppm. Si une mortalité significative (10%) n'est pas observée, aucun essai supplémentaire n'est entrepris.

Remarque : Dans ce chapitre et les suivants, les concentrations sont exprimées en ppm (partie par million) pour les mg/l et en ppb (partie pour billion) pour les µg/l. Ce mode d'expression a été préféré aux moles/l afin de pouvoir comparer nos résultats avec ceux rapportés dans la bibliographie (où les mg/l et les µg/l sont les plus utilisés).

I.2. CONDITIONS D'ESSAI ET PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les moules sont acclimatées en lots de 20 individus sur des supports de 20 x 10 cm selon la procédure décrite dans la deuxième partie, chap. II.1.3.

Les essais sont effectués dans un dispositif à circuit fermé avec renouvellement quotidien (deuxième partie, chap. II.2.2.1.). Le volume du milieu est de 10 l par unité expérimentale. Les caractéristiques de l'eau de conduite déchlorée sont données dans le tableau 11 (deuxième partie, chap. II.1.3.). On note que ce milieu d'essai est caractérisé par une forte dureté.

Avant chaque renouvellement du milieu, la mortalité est contrôlée dans chaque unité expérimentale. Une moule est considérée comme morte quand les valves sont ouvertes et ne se ferment pas en réponse à un stimulus tactile (Davenport et Manley, 1978). Pour les individus fermés lors du contrôle, on essaie d'écarter légèrement les valves. L'absence de résistance et la non fermeture immédiate indiquent la mort (Rodgers *et al.*, 1980).

Les individus morts sont retirés de l'unité expérimentale et comptabilisés.

I.3. EXPRESSION DES RESULTATS

A la fin de l'essai, on calcule la mortalité cumulée pour chaque concentration. Pour la validité de l'essai, nous nous sommes fixé la condition qu'il n'y ait pas de mortalité parmi les témoins.

Le calcul de la CL50-96 h est effectué par la méthode des probits au moyen d'un programme informatique qui calcule l'équation de la courbe de régression de la mortalité (probit) en fonction du log de la concentration (Ph. Rousselle, Laboratoire d'Ecologie, Metz).

La CL50-96 h est exprimée en concentrations nominales au début de l'essai.

Si, à l'issue de l'essai, la CL50-96 h ne peut être déterminée, la plus forte mortalité est indiquée avec la concentration correspondante.

I.4. TOXICITE LETALE DU ZINC

Un essai préliminaire réalisé avec des concentrations de 2, 4, 6 et 10 ppm de Zn n'a révélé aucune mortalité après 4 jours d'expérience ; nous n'avons pas effectué d'essai supplémentaire conformément à la concentration limite fixée.

Il apparaît que le zinc, aux concentrations, testées pourtant très élevées, n'a pas d'effet létal à court terme sur *Dreissena*.

Des observations visuelles directes ont permis de constater, d'une part que les animaux passaient de longues périodes fermés et, d'autre part, qu'il y avait une production abondante de mucus. Ces deux phénomènes n'ont pas été observés chez les témoins. La production de mucus pourrait être un moyen de lutte contre la pénétration du métal par l'adsorption de celui-ci, puis son élimination sous cette forme hors de la cavité de l'animal. George et Pirie (1980) ont suggéré cette possibilité chez *Mytilus edulis*.

Maarouf (1988) a réalisé un essai de mortalité à moyen terme (28 jours) avec le Zn sur *Dreissena* dans des conditions expérimentales proches des nôtres, sauf pour le renouvellement du milieu qui était effectué toutes les 48 heures. Selon l'auteur, la CL50-28 j est de 10,88 ppm Zn. En fin d'expérience, la mortalité ne dépasse pas 10% en présence de 8 ppm et 30% en présence de 9 et 10 ppm Zn.

L'effet létal du Zn ne se manifeste donc que lors d'expositions chroniques à de fortes concentrations.

En comparaison avec d'autres bivalves, *Dreissena* montre une résistance élevée au Zn. Par exemple, la CL50-96 h pour *Mytilus edulis* a été établie à 2,5 ppm Zn par Ahsanullah (1976) et à 7,8 ppm par Abel (1976). Chez *Corbicula fluminea* elle est de 6,04 ppm (Rodgers *et al.*, 1980) et chez *Perna viridis* elle est de 6,09 ppm (Chan, 1988).

L'absence d'effet létal à court terme ne permet cependant pas d'exclure toute toxicité ; ainsi les effets sublétaux seront intéressants à évaluer, notamment au niveau respiratoire et nutritionnel.

I.5. TOXICITE LETALE DU CUIVRE

Considérant les données bibliographiques (Delhaye et Cornet, 1975), il nous a semblé intéressant de réaliser l'essai à deux périodes de l'année, distinctes du point de vue du cycle de reproduction de la moule, afin d'évaluer l'effet éventuel de celui-ci sur la toxicité létale du cuivre. Ainsi, un essai fut réalisé en automne (octobre, repos sexuel) et un autre au printemps (avril, gamétogenèse active).

Tableau 12 : Evolution de la mortalité au cours de l'essai préliminaire (automne) pour le Cu (nombre d'animaux par concentration : 20).

temps d'exposition	[Cu] ppb	50	250	500	1000
24 h		0	0	1	6
48 h		0	7	7	12
72 h		0	7	9	2
96 h		0	4	2	
total		0	18	19	20

Tableau 13 : Evolution de la mortalité au cours de l'essai définitif (automne) pour le Cu (nombre d'animaux par concentration : 20).

temps d'exposition	[Cu] ppb	50	100	150	200	250
24 h		0	0	0	0	0
48 h		0	0	0	1	9
72 h		0	0	1	3	3
96 h		0	0	2	10	3
total		0	0	3	14	15

Tableau 14 : Valeur de la CL50-96 h du cuivre chez *Dreissena polymorpha*.

CL50 - 96 h (ppb)	Equation de la courbe de mortalité
191	$Y = 5,084 + 7,832 (\log C - 2,292)$

I.5.1. Essai en automne

I.5.1.1. Essai préliminaire

La revue des données bibliographiques concernant la toxicité du Cu chez les bivalves nous a incité à choisir pour l'essai préliminaire la gamme de concentrations suivante : 0, 50, 250, 500 et 1000 µg/l (ppb).

Les résultats (Tableau 12) montrent que la concentration de 50 ppb ne provoque aucune mortalité pour l'exposition de 4 jours. La mortalité se manifeste dès 24 h pour 500 et 1000 ppb, puis à 48 h pour 250 ppb. 100% de mortalité sont atteints en 72 h avec 1000 ppb Cu.

I.5.1.2. Essai définitif

Au vu des résultats de cet essai préliminaire, un essai définitif a été réalisé aux concentrations suivantes : 0, 50, 100, 150, 200 et 250 ppb Cu.

Les résultats (Tableau 13) montrent que 100 ppb Cu n'ont pas d'effet létal au bout de 96 h d'exposition. Les premières mortalités apparaissent après 48 h aux concentrations de 200 et 250 ppb et après 72 h pour 150 ppb. A 96 h, le taux de mortalité pour 250 ppb est de 75%, ce qui est inférieur à la valeur constatée lors de l'essai préliminaire (90%).

La CI_{50-96 h} calculée est de 191 ppb Cu (Tableau 13).

I.5.1.3. Discussion

Les résultats montrent que le cuivre exerce une toxicité létale à des concentrations relativement faibles. Le seuil de toxicité peut être situé à 150 ppb en Cu tandis que 100 ppb est la concentration sans effet pour l'exposition de 96 h. Ces niveaux seuils situent *Dreissena* parmi les espèces les plus sensibles à l'action létale du Cu. Par comparaison, les données de Scott et Major (1972) et de Davenport et Manley (1978) indiquent, chez *Mytilus*, un seuil de létalité entre 100 et 200 ppb pour une exposition de 4 jours. Un résultat similaire est rapporté chez *Scrobicularia plana* par Akberali *et al.* (1981). Chez d'autres espèces comme *Perna viridis* et *Chromomytilus meridionalis*, les concentrations seuils pour la létalité sont supérieures à 200 ppb (Watling, 1981).

Tableau 15 : Evolution de la mortalité au cours de l'essai du printemps pour le cuivre (répétition n° 1 : 20 individus par concentration).

temps d'exposition	[Cu] ppb	150	180	210	240
24 h		0	0	0	0
48 h		0	2	6	5
72 h		0	3	2	7
96 h		3	4	4	2
total		3	9	12	14

Tableau 16 : Evolution de la mortalité au cours de l'essai du printemps pour le cuivre (répétition n° 2 : 20 individus par concentration).

temps d'exposition	[Cu] ppb	150	180	210	240
24 h		0	0	0	0
48 h		0	1	4	3
72 h		4	3	2	4
96 h		1	5	8	6
total		5	9	14	13

Tableau 17 : Valeur de la CL50-96 h pour le cuivre (printemps) chez *Dreissena*.

CL50 - 96 h moyenne (ppb)	Droite de régression de la mortalité
193	Y1 = 4,950 + 7,384 (log C - 2,288) Y2 = 5,03 + 5,724 (log C - 2,284)

La sensibilité marquée de *Dreissena* vis-à-vis du Cu ressort également du calcul de la CL50-48 h à partir de l'essai préliminaire qui est de 437 ppb. Cette valeur est inférieure aux CL50-96 h de plusieurs espèces telles que *Mytilus edulis* (CL50-96 h = 480 ppb, Amiard-Triquet *et al.*, 1986) et *Tellina tenuis* (CL50-96 h = 1000 ppb, Stirling, 1975).

D'après les données bibliographiques, le bivalve d'eau douce *Corbicula fluminea* semble être la seule espèce plus sensible au Cu que *Dreissena* (CL50-96 h = 40 ppb, Rodgers *et al.*, 1980).

La toxicité élevée du Cu chez *Dreissena* n'est cependant pas surprenante, ce métal est connu pour être un molluscicide efficace. Le mécanisme de cette toxicité n'est pas entièrement élucidé. Nous avons remarqué de fortes réactions de fermeture pendant les premières 48 h de l'exposition tandis qu'au troisième et au quatrième jour, les animaux réagissent plus lentement. Un état d'affaiblissement est perceptible au moment du contrôle de mortalité par le stimulus tactile. Il est vraisemblable que dès le début de l'exposition, le métal exerce une forte toxicité physiologique et cellulaire pendant les périodes d'ouverture mais également pendant les fermetures, car il continue à être absorbé à partir du liquide palléal. Cette forte toxicité rendrait l'animal incapable par la suite d'assurer une bonne fermeture pour s'isoler du milieu extérieur. Cette baisse de réaction conduit à la poursuite de l'exposition effective de l'animal donc à plus de toxicité, aboutissant finalement à la mort de l'organisme. Des atteintes histologiques graves (rupture des jonctions interfilamentaires au niveau de la branchie, décollement des cellules de l'épithélium branchial ; Sunila, 1981 ; Manley, 1983) peuvent se conjuguer aux effets physiologiques et biochimiques et conduire à la mort.

1.5.2. Essai du printemps

Les concentrations testées sont : 0, 150, 180, 210 et 240 ppb Cu avec deux répétitions par concentration.

Les résultats sont présentés dans les tableaux 15, 16 et 17. La CL-50-96 h moyenne est de 193 ppb de Cu. Cette valeur est quasi égale à la CL50-96 h d'automne (191 ppb de Cu).

La toxicité létale du Cu ne varie donc pas avec le cycle de reproduction. Ce résultat est remarquable dans la mesure où il montre que ce métal semble agir dès qu'on atteint une concentration critique, et ce indépendamment de l'état de maturité génitale. Il est établi que des changements métaboliques notables accompagnent le cycle sexuel chez les bivalves ; la période de repos sexuel correspond à des niveaux métaboliques (consommation d'O₂) bas alors que la période de gamétogenèse active correspond à des niveaux élevés (Widdows, 1978).

Tableau 18 : Mortalité au cours de l'essai préliminaire (automne) pour le Hg (nombre d'animaux par concentration : 20).

temps d'exposition	[Hg] ppb	50	250	500	1000
24 h		0	0	1	4
48 h		0	0	6	8
72 h		0	0	8	6
96 h		0	0	4	2
total		0	0	19	20

Tableau 19 : Mortalité au cours de l'essai définitif (automne) pour le Hg (nombre d'animaux par concentration : 20).

temps d'exposition	[Hg] ppb	250	300	350	400	450
24 h		0	0	0	0	0
48 h		0	0	2	3	2
72 h		0	3	0	5	7
96 h		0	2	0	1	4
total		0	5	2	9	13

Tableau 20 : Valeur de la CL50-96 h pour le Hg (automne) chez *Dreissena*.

CL50 - 96 h (ppb)	Equation de la courbe de mortalité
420	$Y = 4,68 + 7,12 (\log C - 2,58)$

Cette absence d'effet de la saison sur la toxicité du Cu chez la moule d'eau douce contraste avec les données de Delhaye et Cornet (1975) selon lesquelles il y a chez *Mytilus* une intensification de la toxicité en période de ponte par rapport à la période de repos sexuel. Les auteurs expliquent ce phénomène par la nécessité pour l'animal de s'ouvrir, même en présence de métal, afin d'assurer ses besoins respiratoires élevés en cette période, avec pour conséquence une exposition effective plus prolongée qu'en période de repos sexuel. Dans le cas de *Dreissena*, la durée d'ouverture ne change pas avec la saison (Walz, 1978), cela pourrait expliquer la différence avec *Mytilus*.

I.6. TOXICITE LETALE DU MERCURE

L'étude a été réalisée en même temps et dans les mêmes conditions que l'étude concernant le cuivre.

I.6.1. Essai d'automne

I.6.1.1. Essai préliminaire

Sur la base des données bibliographiques, les concentrations suivantes ont été testées : 50, 250, 500 et 1000 ppb Hg. Les résultats (Tableau 18) montrent que les premières mortalités interviennent dès 24 heures d'exposition à 500 et 1000 ppb. La concentration de 250 ppb est sans effet létal pour la durée de l'essai. 95% et 100% de mortalité sont atteints, en fin d'expérience, respectivement pour 500 et 1000 ppb Hg.

I.6.1.2. Essai définitif

Les concentrations testées sont : 0, 250, 300, 350, 400 et 450 ppb Hg. L'essai est effectué sans répétition.

D'après les résultats (Tableau 19), la concentration de 300 ppb est la plus faible concentration responsable de mortalité. Il semble donc que le seuil de toxicité létale se situe entre 250 et 300 ppb, ce qui est proche du seuil de 320 ppb en Hg rapporté chez *Mytilus* par Micallef et Tyler (1987).

Notons également qu'en fin d'expérience, la concentration de 350 ppb n'a provoqué que 2 morts alors qu'on enregistre 5 morts à 300 ppb (Tableau 19). Il pourrait s'agir d'une manifestation

Tableau 21 : Mortalité au cours de l'essai du printemps pour le Hg, répétition n° 1 (nombre d'animaux par concentration : 20).

temps d'exposition	[Hg] ppb	380	410	430	460
24 h		0	0	0	0
48 h		0	0	0	0
72 h		1	3	4	2
96 h		1	3	5	8
total		2	6	9	10

Tableau 22 : Mortalité au cours de l'essai du printemps pour le Hg, répétition n° 2 (nombre d'animaux par concentration : 20).

temps d'exposition	[Hg] ppb	380	410	430	460
24 h		0	0	0	0
48 h		0	1	0	0
72 h		3	3	3	4
96 h		2	3	3	8
total		5	7	6	12

Tableau 23 : Valeur moyenne de la CL50-96 h du Hg chez *Dreissena* (essai du printemps).

CL50 - 96 h moyenne (ppb)	Droite de régression de la mortalité
450	Y1 = 4,61 + 14,91 (log C - 2,63)
	Y2 = 4,69 + 10,21 (log C - 2,62)

de la réponse au métal. La durée de fermeture pour 300 ppb serait moins longue que pour 350 ppb et, de ce fait, les animaux seraient plus exposés à 300 ppb. Les animaux exposés à 350 ppb réussiraient à franchir la durée de 96 heures sans grand dommage grâce à une fermeture plus longue. Il découle de cette interprétation que pour 400 ppb, même si la durée de fermeture est longue, l'activité du métal est suffisante pour que la toxicité subie pendant la période d'ouverture soit mortelle. Cette notion de concentration critique a été suggérée par d'autres auteurs pour le cuivre (Delhaye et Cornet, 1975 ; Watling, 1981).

La CL50-48 h calculée à partir des résultats de l'essai préliminaire est de 772 ppb. La CL50-96 h est de 420 ppb (Tableau 20). Comme pour le cuivre, ces données situent *Dreissena* parmi les bivalves les plus sensibles au mercure. A titre de comparaison, la CL50-96 h est de 1570 ppb chez *Villorita cyprinoïdes* (Sathyanathan *et al.*, 1988), de 2510 ppb chez *Mytilus edulis* (Micallef et Tyler, 1987). *Dreissena* est cependant moins sensible au Hg que *Perna viridis* qui montre une CL50-96 h de 230 ppb (Mohan *et al.*, 1986a).

I.6.2. Essai du printemps

Cet essai a été réalisé avec les concentrations suivantes : 0, 380, 410, 430 et 460 ppb Hg, avec deux répétitions par concentration.

Les résultats (Tableaux 21 et 22) montrent une sensibilité plus faible que lors de l'essai d'automne (Tableau 19). Aucune mortalité n'est observée au bout de 48 heures d'exposition à l'exception d'un seul individu mort à 410 ppb dans la répétition n° 2 (Tableau 22).

La CL50-96 h moyenne des deux essais est de 450 ppb (Tableau 23), elle est supérieure à la valeur trouvée en automne (420 ppb Hg). En tenant compte des intervalles de confiance (374-472 ppb pour l'automne et 428-476 ppb pour le printemps), cette différence n'est pas statistiquement significative. On peut néanmoins estimer que la résistance de *Dreissena* au Hg est légèrement plus élevée au printemps qu'en automne. Breittmayer *et al.* (1981) ont rapporté chez *Mytilus* un maximum de sensibilité en septembre (repos sexuel) et une sensibilité moindre en novembre (gamétogenèse ; Seed, 1976). Dans leur interprétation de ces variations saisonnières, les auteurs écartent l'effet du cycle de reproduction puisque la variation de sensibilité touche également les jeunes, qu'ils considèrent (sans le vérifier) comme non matures. Il faut noter cependant que *Mytilus edulis* peut atteindre la maturité sexuelle très jeune (Lucas *et al.*, 1978 cité par Parache, 1985). L'action du cycle sexuel est donc probable. Le mécanisme de cette action demande cependant à être élucidé. On peut émettre l'hypothèse que la bonne condition générale de *Dreissena* en période de gamétogenèse (abondance des réserves énergétiques) confère à l'animal une meilleure résistance à l'intoxication

par le Hg. Cela pourrait se traduire par une détoxification plus efficace du métal. Si cette interprétation est admise, l'absence d'effet de saison pour l'action létale du cuivre enregistrée précédemment indiquerait que l'atout de la bonne condition des animaux est annulé par la toxicité très élevée de ce métal. Il est possible que les atteintes biochimiques soient plus violentes.

I.7. TOXICITE LETALE DU CADMIUM

I.7.1. Essai préliminaire

Les données bibliographiques concernant le Cd montrent que la gamme des concentrations létales pour les bivalves est très large. Elle est comprise entre 0,8 ppm et plus de 10 ppm. En l'absence de données sur *Dreissena*, nous avons utilisé une large gamme de concentrations : 0 ; 1 ; 1,5 ; 2 ; 2,5 ; 3 ; 4 ; 6 et 8 ppm Cd. L'essai est effectué sans répétition.

Tableau 24 : Résultats de la mortalité au cours de l'essai préliminaire pour le Cd (nombre d'animaux par concentration : 20).

temps d'exposition	[Cd] ppm	1	1,5	2	2,5	3	4	6	8
	72 h		0	0	0	0	0	0	1
96 h		0	1	0	0	0	1	1	2
Total		0	1	0	0	0	1	2	4

Les résultats (Tableau 24) ne montrent aucune mortalité après 48 heures d'exposition. Au troisième jour, les premières mortalités sont constatées à 6 et 8 ppm de Cd. En fin d'expérience 20% de mortalité sont atteints en présence de 8 ppm.

I.7.2. Essai définitif

Partant des résultats de l'essai préliminaire, un deuxième essai a été mené avec les concentrations suivantes : 0, 8, 10, 11, 12 et 14 ppm Cd.

Cet essai n'a montré qu'un seul cas de mortalité au quatrième jour à la concentration de 14 ppm Cd.

I.7.3. Discussion

Les résultats des deux essais semblent incohérents puisque les concentrations supérieures à 8 ppm n'ont pas d'effet létal, alors que 4, 6 et 8 ppm provoquent une certaine mortalité. De plus, la mortalité observée pour 8 ppm dans l'essai préliminaire n'est pas retrouvée dans l'essai définitif. Ces résultats suggèrent que l'effet létal à court terme du Cd chez *Dreissena* est très faible aux concentrations jusqu'à 14 ppm.

Les lots utilisés dans nos expériences sont distribués au hasard dans les enceintes expérimentales et sont rigoureusement contrôlés pour leur bonne condition (bonne fixation au support) avant l'expérience. Il est donc peu probable que les mortalités observées pour 4, 6 et 8 ppm, dans le premier essai, soient le fait d'échantillons en mauvaise condition au départ. L'interprétation de ces résultats est plutôt à lier avec le rapport entre durée d'ouverture et durée de fermeture en fonction des concentrations en métal. Au-delà de 8 ppm, la fermeture prolongée des animaux leur éviterait des dommages pouvant être létaux. En deçà de 8 ppm la durée d'ouverture serait suffisante pour que le métal exerce une certaine toxicité.

Plusieurs espèces de bivalves sont, comme *Dreissena*, peu sensibles au Cd pour l'action létale. Watling (1981) rapporte à cet égard que la CL50-96 h chez *Perna perna* et *Chromomytilus meridionalis* est supérieure à 10 ppm. D'autres espèces montrent par contre une sensibilité importante, c'est le cas de *Crassostrea margaritacea* dont la CL50-96 h est de 0,8 ppm (Watling, 1981).

I.8. TOXICITE LETALE DU PLOMB

Un essai de toxicité létale du Pb vis-à-vis de *Dreissena* a été réalisé par Benyahia (comm. pers.). Les concentrations utilisées sont : 1 ; 2,5 ; 5 ; 7,5 et 10 ppm Pb. Nous n'avons donc effectué aucun essai supplémentaire.

Les résultats de Benyahia (comm. pers.) montrent que jusqu'à 10 ppm le Pb n'a aucun effet létal après 96 heures d'exposition. La mortalité cumulée après 15 jours d'essai est de 25% pour 5, 7,5 et 10 ppm Pb.

Dans un essai de bioaccumulation du Pb chez *Dreissena*, Benyahia *et al.* (1988) ont obtenu 32% de mortalité avec 1,5 ppm après 3 semaines d'exposition (6% de mortalité étant enregistrés chez les témoins). Il semble donc que la toxicité du Pb ne se manifeste que lors d'expositions chroniques.

La résistance à court terme de *Dreissena* au Pb est constatée pour d'autres espèces de bivalves tels que *Perna perna*, *Chromomytilus meridionalis*, *Crassostrea gigas* et *Crassostrea margaritacea* (Watling, 1981).

Il est vraisemblable que le Pb ne provoque pas d'atteintes physiologiques ou biochimiques aiguës.

I.9. DISCUSSION GENERALE DE LA TOXICITE LETALE A COURT TERME DES METAUX LOURDS CHEZ DREISSENA

Tableau 25 : Tableau récapitulatif des CL50-96 h des métaux lourds chez *Dreissena*.

Métal	CL50 - 96 h (ppm)
Zn	> 10
Cu	0,191 (automne) 0,193 (printemps)
Hg	0,420 (automne) 0,450 (printemps)
Cd	> 14
Pb	> 10 *

* Benyahia (comm. pers.)

Pour pouvoir classer les métaux selon leur toxicité, il faut tenir compte du fait que l'action toxique a lieu au niveau molaire et, par conséquent, il faut tenir compte des différences entre les poids molaires de chaque métal. En exprimant la CL50-96 h en $\mu\text{mol/l}$, on trouve qu'elle est environ

de 3,03 $\mu\text{mol/l}$ pour le Cu et 2,1 $\mu\text{mol/l}$ pour le Hg. On voit donc que le Hg est plus toxique que le Cu en ce qui concerne l'effet létal. Il n'est pas possible de faire une classification globale des métaux puisqu'en fait le Pb et le Zn n'ont pas d'effet létal à court terme (pour des concentrations de plusieurs ppm) et l'effet du Cd est très mitigé. Il est fondé de ne parler d'effets létaux à court terme que pour le Cu et le Hg (CL50-96 h inférieures à 0,5 ppm).

Le système d'exposition (en circuit fermé avec renouvellement périodique) et les caractéristiques physico-chimiques de notre milieu d'essai (notamment la forte dureté) ont probablement une influence sur les résultats par rapport à ce qu'on pourrait obtenir avec un système à flux continu et une eau moins dure. En effet, nos propres analyses pour le Cu et le Hg, celles de Maarouf (1988) pour le Zn et celles de Benyahia *et al.* (1988) pour le Pb montrent qu'il y a une forte perte en métal dissous pendant le cycle de 24 heures (entre 35 et 50% pour le Cu, entre 40 et 70% pour le Zn et près de 70% pour le Pb). Cette perte en métal dissous, due essentiellement à sa précipitation et à son adsorption sur les parois des bacs expérimentaux, équivaut à une baisse progressive de la biodisponibilité du métal pour les organismes. Les résultats étant présentés en fonction des concentrations nominales au début de l'essai, il y a une sous-estimation de la toxicité par rapport à un système à flux continu. La forte dureté du milieu participe probablement aussi à l'atténuation des effets des métaux (Moore et Ramamoorthy, 1983).

Les différences de toxicité entre métaux suggèrent que leurs modes d'action au niveau cellulaire et physiologique soient différents. Il est clair que la réaction de fermeture est commune à tous les métaux (et vraisemblablement à tout stress environnemental ; Manley, 1983) bien que les seuils de concentration qui provoquent la pleine réponse soient très différents d'un métal à l'autre. Le fait que la mortalité à court terme n'intervienne pas nécessairement pour tous les métaux suggère que les altérations cellulaires et physiologiques sont irréversibles avec certains métaux (Cu et Hg) tandis qu'elles sont faibles pour d'autres (Zn, Pb, Cd). Dans le dernier cas, la mortalité à moyen terme serait due à un processus cumulatif.

Dans la suite de notre travail, nous nous intéresserons aux effets physiologiques et comportementaux de concentrations sublétales des métaux lourds sur *Dreissena*.

CHAPITRE II :

EFFETS DE L'EXPOSITION AUX METAUX SUR LE COMPORTEMENT DE FILTRATION DE *DREISSENA POLYMORPHA*

II.1. ANALYSE DES ENREGISTREMENTS

II.1.1. Définitions

II.1.1.1. Activité "normale" ou continue

Nous appelons "activité normale" ou "activité continue" une période de filtration comme celle présentée dans la figure 21, et qui se caractérise par une émission continue de courants sur plusieurs minutes et où interviennent des interruptions brèves, plus ou moins fréquentes, dues à des fermetures brusques du siphon exhalant. Durant cette activité il n'y a pas d'interruption prolongée du courant exhalant. Elle est appelée "normale" parce qu'elle correspond à l'enregistrement obtenu chez les moules témoins en situation de bonne acclimatation (cf II.2.) avec les valves largement ouvertes et les siphons protractés.

II.1.1.2. Activité discontinue

Nous appelons ainsi des types d'activité comme ceux présentés dans la figure 22. C'est une activité qui diffère de la précédente par le fait que les émissions de courants sont fréquemment interrompues par des périodes où le flux d'eau cesse à cause de fermetures durables et intermittentes (quasi rythmiques) du siphon exhalant. Ces fermetures sont de durée de quelques secondes à plusieurs minutes. L'animal qui adopte ce mode de filtration se présente généralement avec des valves qui ne sont pas ouvertes au maximum.

II.1.2. Analyse du cycle de 24 heures

L'analyse du cycle d'activité de 24 heures se fait en comptabilisant les durées des différents types d'activité enregistrés, à savoir l'activité normale, l'activité discontinue et la durée totale de fermeture des valves. On compte également le nombre de fermetures des valves.

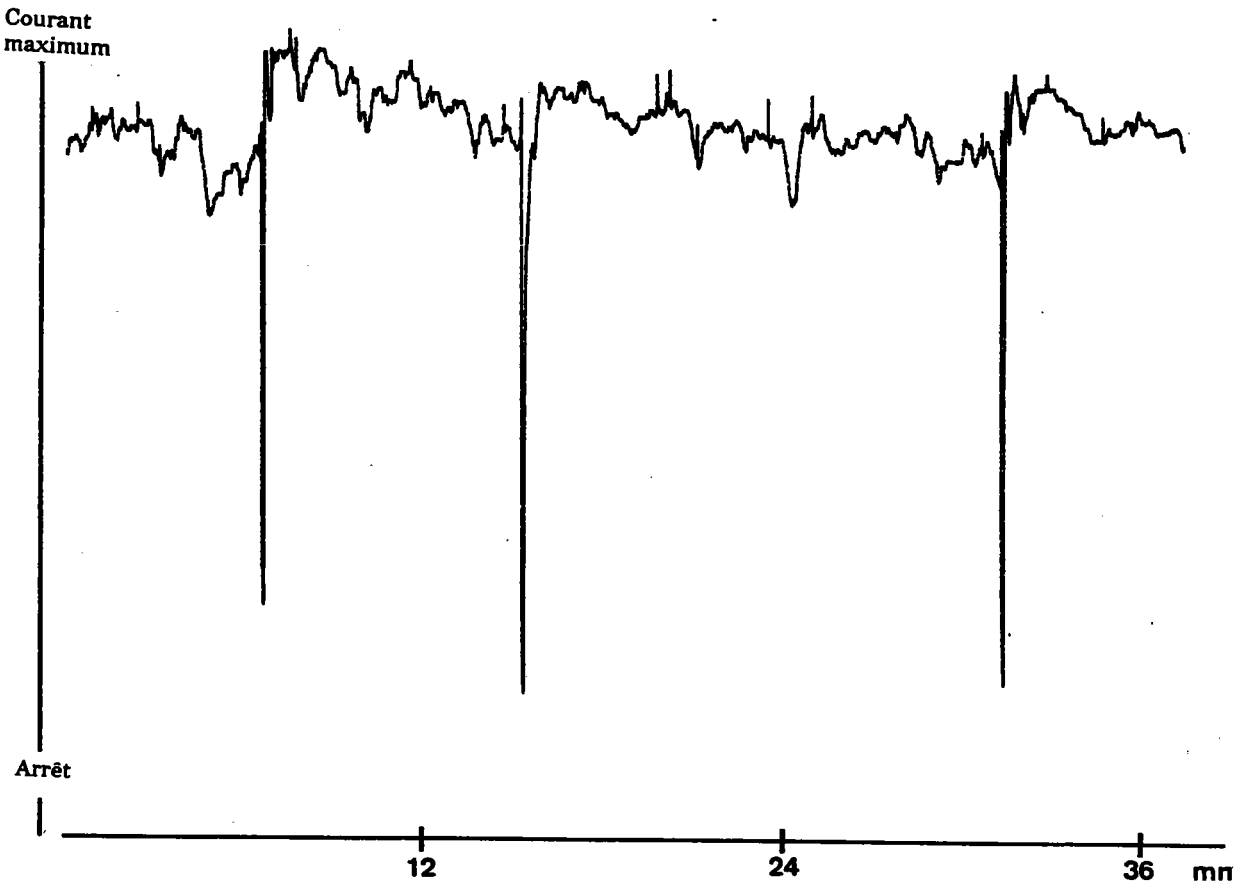
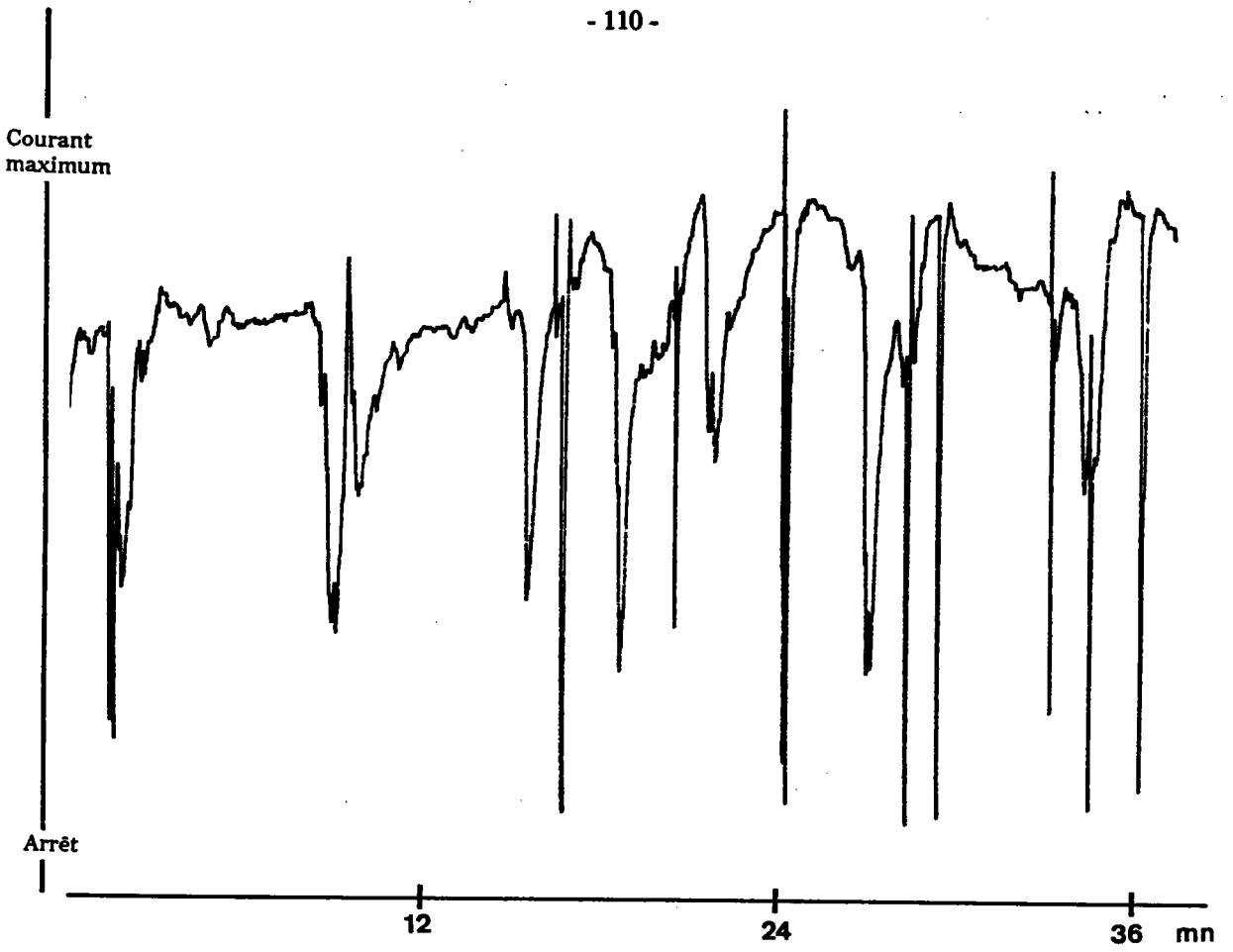


Fig.21 : Exemples d'enregistrements de l'activité de filtration normale de *Dreissena*.

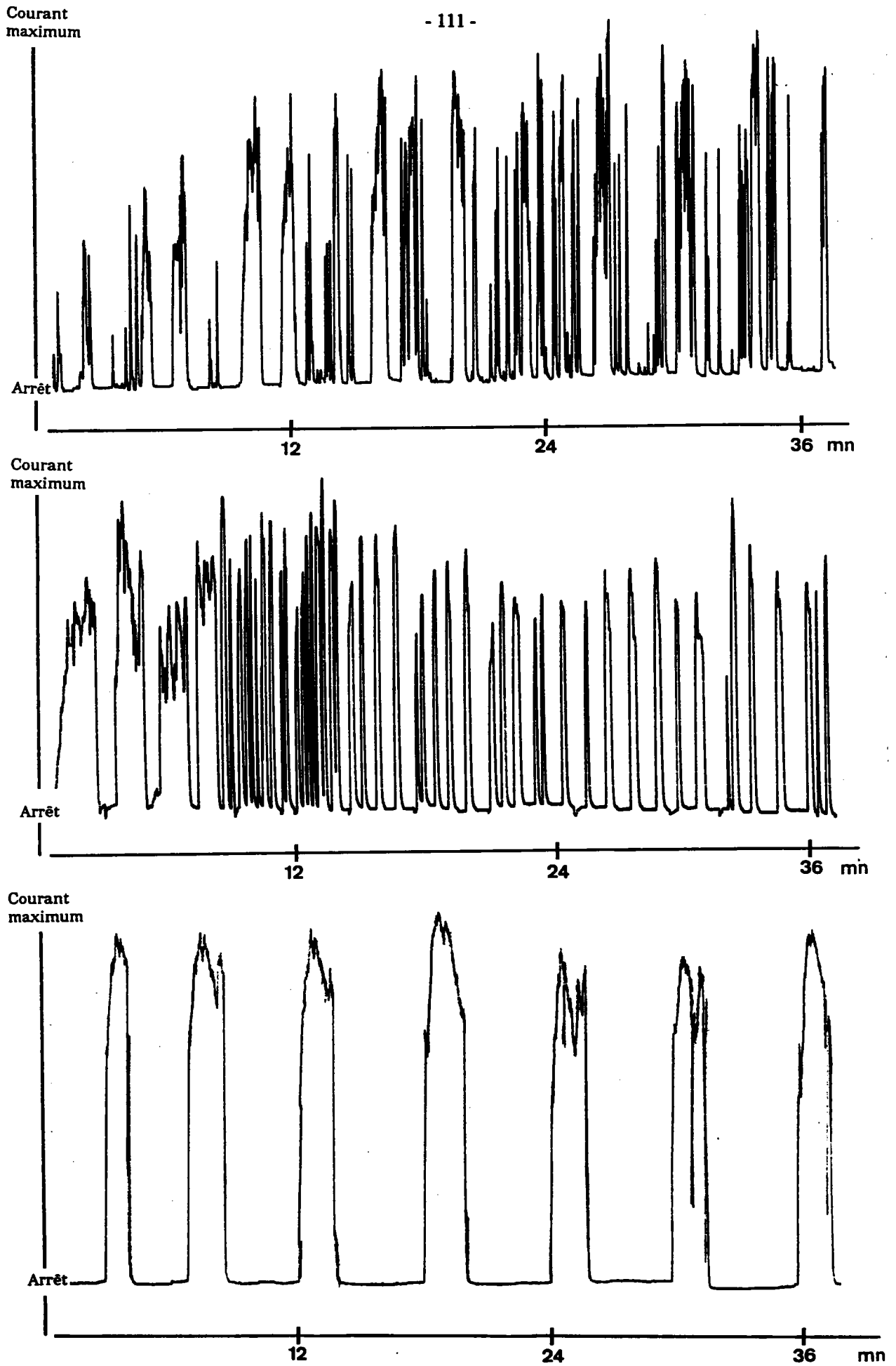


Fig.22 : Exemples d'enregistrements de périodes d'activité discontinue chez *Dreissena*.

II.2. DESCRIPTION DE L'ACTIVITE DE FILTRATION TEMOIN

II.2.1. Conditions expérimentales

Des moules sont acclimatées une semaine au minimum au laboratoire, une attention particulière est apportée à leur bonne condition générale. Il faut notamment qu'elles aient effectué une bonne fixation par le byssus durant cette période.

L'enregistrement se fait dans de l'eau déchlorée préalablement oxygénée et amenée à 20-22°C, sous la photopériode naturelle, et pour des raisons techniques (dépôt de particules sur le capteur et donc perte de sensibilité), sans nourriture.

II.2.2. Résultats

Les observations sur l'état d'ouverture des valves et des siphons sont effectuées à la loupe binoculaire sur plusieurs individus. Elles sont couplées avec des enregistrements des courants exhalants.

Une moule qui filtre normalement se présente avec des valves bien ouvertes et des siphons protractés et bien ouverts. Le siphon exhalant montre une ouverture large qui peut cependant varier quelque peu ; il présente chez quelques individus des changements d'orientation par rapport à l'axe vertical de l'animal.

L'émission des courants de filtration est continue sur des périodes très variables. Dans la majorité des cas, le flux continu dure plusieurs minutes et est interrompu par des fermetures très brèves du siphon sans que l'état d'ouverture des valves change. L'intervention de ces interruptions de courant semble aléatoire ; on peut en effet observer des phases de flux continu pouvant durer jusqu'à trente minutes sans interruption (illustration, fig. 21).

L'enregistrement sur 24 heures montre que les valves sont ouvertes en moyenne 20,7 h/24 h (soit 86% du temps), et fermées 3,3 h/24 h (soit 14% du temps) avec 1,3 fermetures/24 h en moyenne (Tableau 26).

Pendant la phase d'ouverture, l'animal filtre en mode continu 19,5 h en moyenne (soit 94% du temps d'ouverture) ; le reste du temps, il présente une filtration de type discontinu 1,1 h au total en moyenne. Ces périodes courtes de filtration discontinue précèdent les fermetures des valves (fig. 23).

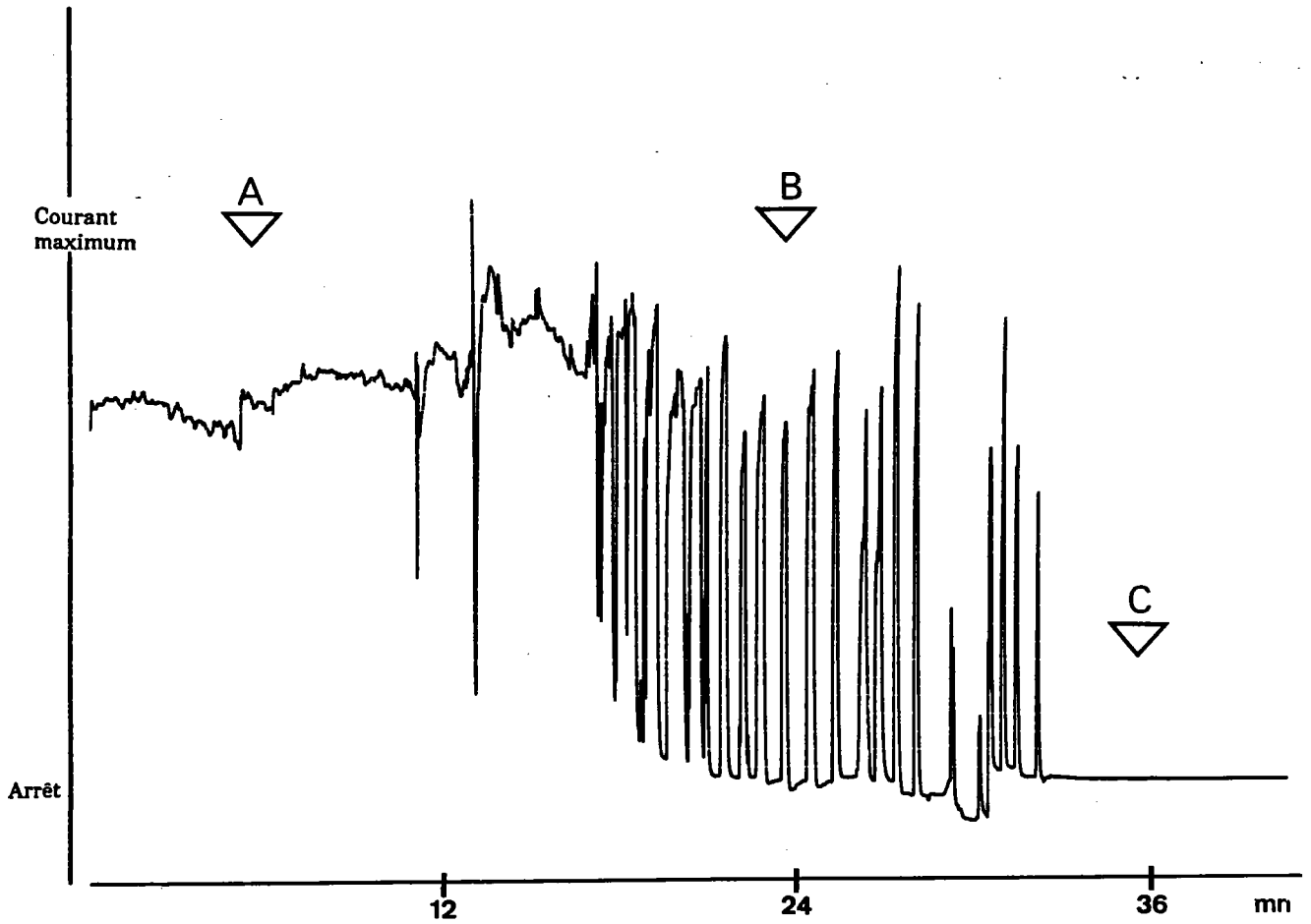


Fig.23 : Exemple d'enregistrement montrant le changement du mode d'activité suivi de fermeture chez une moule témoin.

- A : activité continue.
- B : activité discontinue.
- C : fermeture des valves.

Tableau 26 : Durées relatives des différents types d'activité de filtration chez *Dreissena polymorpha*

Activité sur 24 heures (h)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	Moyenne ± écart
Activité continue	19,8	21,9	24	19,3	18,2	22	19,4	22,3	16,9	16,2	14,4	24	16,5	18,3	19,2	19,5 ± 2,9
Activité discontinue	0	2,1	0	1,5	1,2	2	0,4	0,5	1,2	1,3	2,7	0	0,5	1	2,6	1,1 ± 0,9
Durée de fermeture	4,2	0	0	3,2	4,2	0	4,2	1,2	5,9	6,5	6,8	0	7	4,7	2,2	3,3 ± 2,6
Nombre de fermetures	2	0	0	1	3	0	1	1	3	2	3	0	1	2	1	1,3 ± 1,1

L'analyse des résultats ne révèle aucun rythme de filtration en fonction de la photopériode ; l'animal filtre aussi bien de jour que de nuit, sans préférence apparente.

II.2.3. Discussion

Le comportement de filtration de *Dreissena* a été décrit par plusieurs auteurs (Morton, 1969b, 1971 ; Walz, 1978 ; Wallet, 1984 ; Sprung et Rose, 1988).

Nos observations sont en désaccord avec celles de Morton (1969b), qui a constaté un rythme circadien pour l'activité avec une ouverture de 12 h/24 h correspondant à la phase nocturne, l'animal se fermant pendant la phase diurne. Elles confirment en revanche celles de Walz (1978), Wallet (1984), Sprung et Rose (1988), qui n'ont pas identifié un tel rythme. Les données de Morton (1969b) pourraient refléter une particularité des populations d'Angleterre par rapport aux populations continentales (différenciation géographique). Wallet (1984), Sprung et Rose (1988), qui ont employé la technique anémométrique, ont décrit un mode de filtration similaire à celui que nous avons observé ; les derniers auteurs ont travaillé en présence de nourriture. Il est donc intéressant de noter que l'absence de nourriture dans nos essais n'affecte pas le mode de filtration.

Nos résultats montrent que l'animal a les valves ouvertes la plupart du temps ; la période d'ouverture de 20,7 h/24 h que nous trouvons ici est plus élevée que celle calculée statistiquement par Walz (1978) (16,8 h/24 h soit 70,1% du temps). Cet auteur a observé un grand échantillon de moules (174 individus) ; il a également noté l'absence de variations saisonnières pour la durée d'ouverture. Selon ses résultats, la fréquence d'ouverture et de fermeture des valves sur un cycle de 24 heures suit une distribution statistique de type loi de Poisson. Cette distribution décrit des événements aléatoires et relativement rares. Le nombre de fermetures que nous avons calculé montre une grande variabilité ($1,3 \pm 1,1$ fermetures/24 h) mais est inférieur à celui calculé par Walz (1978) (2,4 fermetures/24 h), alors que Kramer *et al.* (1989) ont observé des durées de fermeture plus courtes (0,5 à 1 h/24 h).

La fermeture est précédée d'une phase d'émission discontinue dont l'origine n'est pas claire. Nous avons observé, dans certains cas, que cette phase correspond à une "gêne" des mouvements du siphon due à des fèces accrochées et que l'animal n'arrive pas à expulser. L'excitation due à cette présence de fèces pourrait expliquer ce changement de mode d'émission du courant exhalant. Jenner *et al.* (1989) ont noté un phénomène équivalent en étudiant l'activité valvaire. Ces auteurs ont trouvé que pendant la période d'expulsion des fèces et des pseudo-fèces, l'animal présente des adductions valvaires fréquentes. Ces mouvements correspondent vraisemblablement à une période d'activité de filtration discontinue comme celle que nous avons observée ici.

Tableau 27 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 0,25 ppm Zn

Activité sur 24h	M1	M2	M3	M4	Moyenne ± SD
Activité normale	13,7	12,8	3,5	3,8	8,4 ± 5,5
Activité discontinue (AD)	2,3	5,5	8,4	7,4	5,9 ± 2,7
Durée de fermeture	8	5,7	12,1	12,8	9,6 ± 3,4
Nombre de fermetures	3	4	3	2	3 ± 0,8

Tableau 28 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 0,5 ppm Zn

Activité sur 24h	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	10,3	7,4	6,6	8,1 ± 1,9
Activité discontinue (AD)	10,5	9,1	12,9	10,8 ± 1,9
Durée de fermeture	3,2	7,5	4,5	5,1 ± 2,2
Nombre de fermetures	3	4	2	3 ± 1
Délai d'apparition de l'AD	0	4,3	2,5	2,3 ± 2,1

Tableau 29 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 1 ppm Zn

Activité sur 24h	M1	M2	M3	M4	Moyenne ± SD
Activité normale	2,6	5,6	0	12,2	5,1 ± 5,3
Activité discontinue (AD)	18,9	18,4	15,8	11,8	16,2 ± 3,2
Durée de fermeture	2,5	0	7,2	0	2,4 ± 3,4
Nombre de fermetures	1	0	2	0	0,7 ± 0,9
Délai d'apparition de l'AD	0,7	5,6	0	2,3	2,15 ± 2,5

Tableau 30 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 4 ppm Zn

Activité sur 24h	M1	M2	M3	M4	Moyenne ± SD
Activité normale	0	0	0	0	0
Activité discontinue (AD)	11,3	23,3	6,9	1	10,6 ± 9,4
Durée de fermeture	12,7	0,7	17,1	23	13 ± 9,4
Nombre de fermetures	4	1	10	13	7 ± 5,6
Délai d'apparition de l'AD	0	0	0	0	0

Enfin, cette caractérisation de l'activité du témoin constitue la référence pour l'interprétation des effets de l'exposition aux métaux chez *Dreissena*.

II.3. EFFETS DU ZINC SUR LE COMPORTEMENT DE FILTRATION DE *DREISSENA*

II.3.1. Exposition de court terme (24 heures)

II.3.1.1. Protocole expérimental

Les moules sont contrôlées pour leur bon comportement de filtration avant l'exposition au métal. Pour cela, on enregistre l'activité pendant plusieurs heures et ce n'est qu'après vérification de sa conformité à l'activité normale que l'animal est validé pour l'expérience. Dans certains cas, l'enregistrement témoin est effectué sur 24 heures. Cette procédure est commune à tous les essais avec les métaux.

Les concentrations testées sont 0,25 ; 0,5 ; 1 ppm et 4 ppm Zn. L'addition du métal dans le milieu (1 l d'eau déchlorée) se fait toujours avec l'animal ouvert. Une brève agitation magnétique assure l'homogénéisation de la solution. Des essais à blanc (sans injection de métal) ont montré que cette opération n'affecte pas le mode de filtration de l'animal ; la réouverture intervient rapidement (en moins d'une minute) après l'arrêt de l'agitation.

L'enregistrement reprend dès que le milieu redevient calme (2 à 3 mn) et se poursuit au moins 24 heures. Le comportement est également observé visuellement (loupe oculaire) pendant la première heure d'exposition. 3 à 4 répétitions sont effectuées pour la même concentration.

II.3.1.2. Résultats

*** Activité en présence de 0.25 ppm Zn (Tableau 27)**

Par rapport à l'activité témoin, cette concentration en Zn provoque une réduction du temps d'activité normale (57% de réduction en moyenne) et corrélativement l'apparition de périodes prolongées d'activité discontinue ainsi que du temps de fermeture.

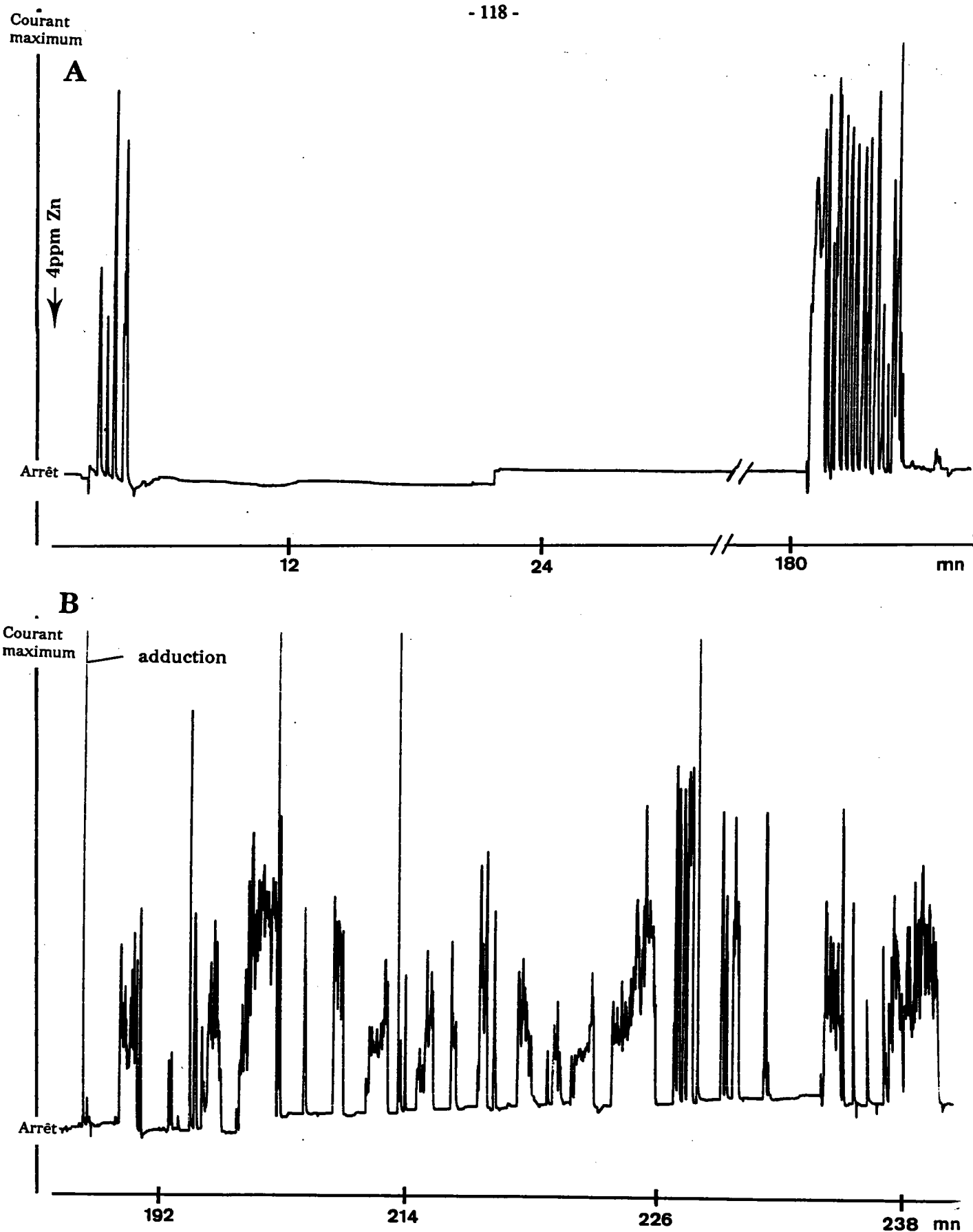


Fig.24 : Réaction comportementale immédiate de *Dreissena* à 4ppm de Zn (extrait de l'enregistrement de la moule M₁). A : début de l'exposition (flèche), B : suite de l'enregistrement.

*** Activité en présence de 0,5 ppm Zn (Tableau 28)**

Les résultats confirment l'effet observé pour 0,25 ppm Zn avec, ici, une nette réduction de l'activité normale et une nette augmentation de l'activité discontinue et de la durée de fermeture.

Un paramètre intéressant est le délai d'apparition de la première période d'activité discontinue ; il renseigne sur le temps de latence de la réponse comportementale. Pour 0,5 ppm les résultats montrent que ce délai est variable (0 à 4,3 h).

*** Activité en présence de 1 ppm Zn (Tableau 29)**

Les effets observés pour 0,5 ppm Zn se confirment ici également.

L'analyse individuelle montre que pour les animaux M_1 , M_2 et M_3 , le mode d'émission des courants est exclusivement de type discontinu après la 8^{ème} heure d'exposition ; ce temps semble donc être le délai de l'installation définitive du mode d'activité discontinue pour la concentration de 1 ppm Zn.

*** Activité en présence de 4 ppm Zn (Tableau 30)**

Cette concentration provoque une modification immédiate de l'activité des animaux. L'activité normale disparaît complètement. L'animal montre une série d'ouvertures et de fermetures de la coquille et, pendant les ouvertures, le siphon exhalant émet les courants en mode discontinu (illustrations fig. 24 et 25), cette activité étant régulée par les contractions et relâchements du siphon exhalant ; à l'observation visuelle, on constate que le siphon inhalant se comporte de manière identique et synchrone.

Pour les moules M_1 et M_4 , la première fermeture (de plus de 0,5 h) a lieu après quelques minutes. Pour la moule M_3 , elle intervient après 1,1 h tandis que la moule M_2 ne se ferme qu'après 23 h d'exposition. Cette dernière a montré une activité exclusivement discontinue alors que les trois autres ont montré des fermetures fréquentes et, pendant les périodes d'activité, des adductions brusques des valves interviennent. Par ailleurs, une forte production de mucus a été constatée à cette concentration. L'expulsion de celui-ci par le siphon exhalant était visible dès la quatorzième heure d'exposition ; il devient très abondant en fin d'expérience.

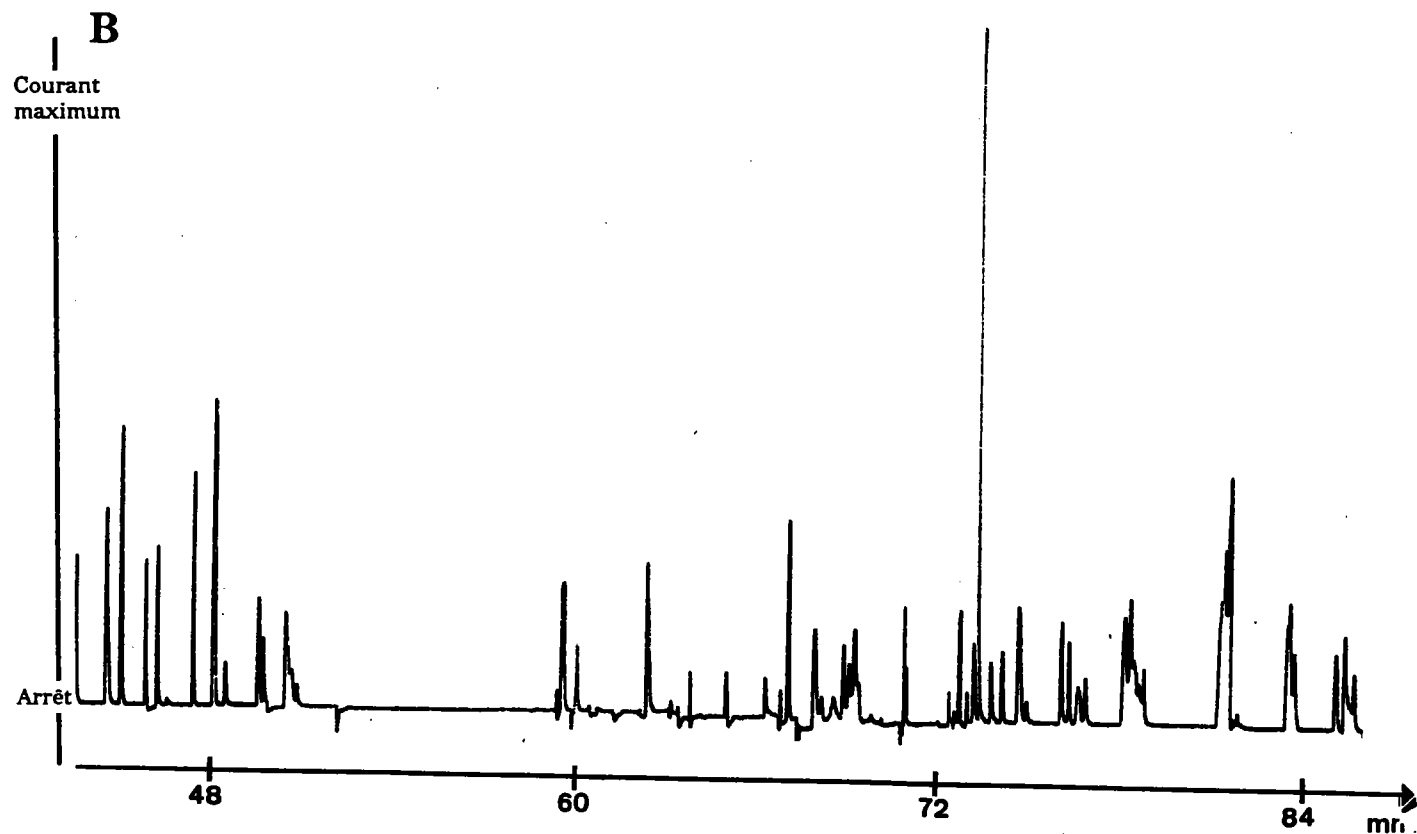
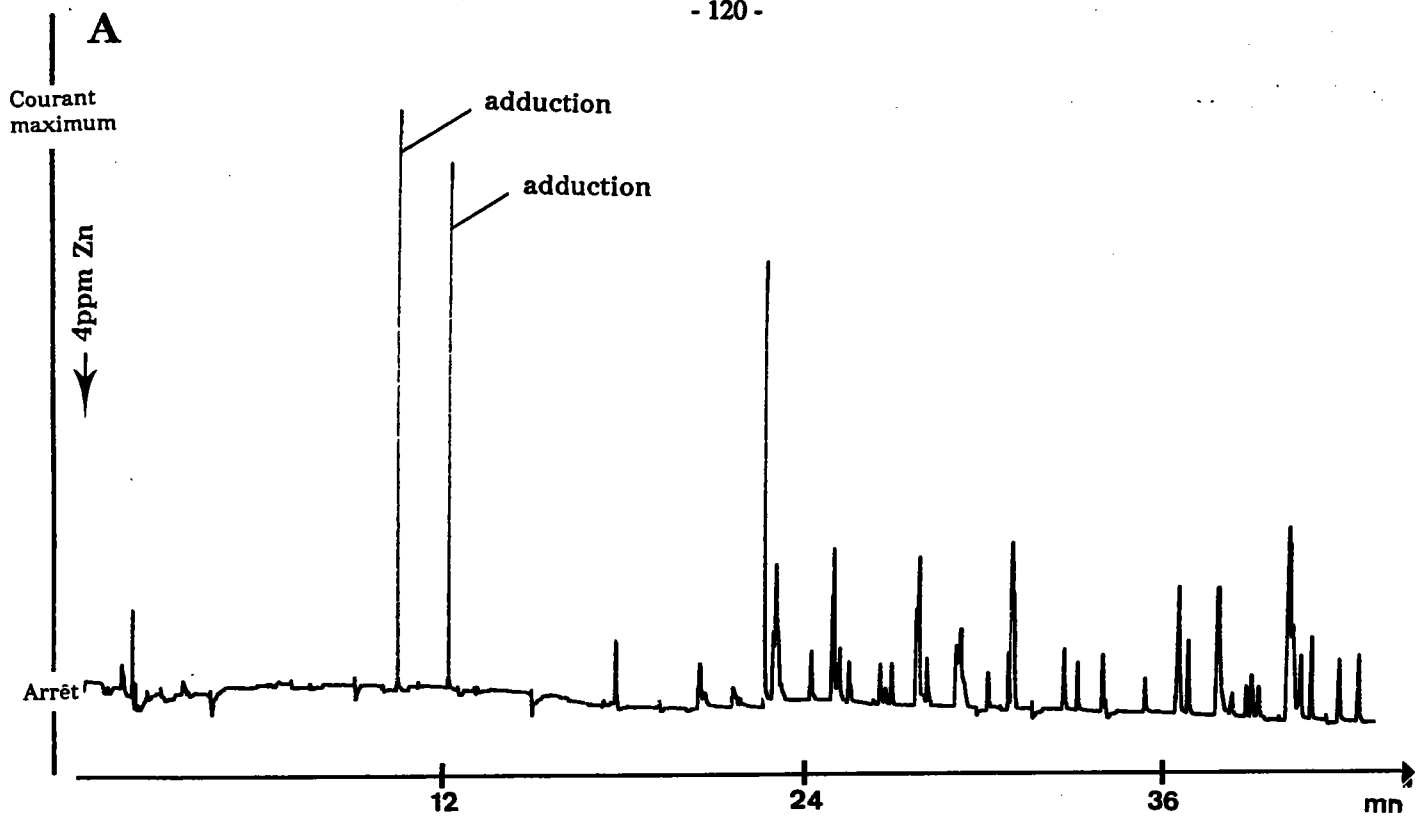


Fig.25 : Réaction comportementale immédiate de *Dreissena* à 4ppm de Zn (extrait de l'enregistrement de la moule M₂). A : début de l'exposition (flèche), B : suite de l'enregistrement.

II.3.1.3. Discussion

L'action toxique se manifeste par une réduction progressive, en fonction des concentrations croissantes, du temps de filtration normale (équivalent à celui des témoins) et, corrélativement, par l'apparition d'un mode de filtration discontinue avec augmentation de la durée totale de fermeture. L'effet est très clair en présence de 4 ppm Zn ; l'animal réagit immédiatement et adopte une activité de filtration intermittente contrôlée par les ouvertures et fermetures périodiques du siphon exhalant. Les valves ne sont plus largement ouvertes et présentent des adductions fréquentes pendant les premières heures (fig. 24 et 25). Les phases de fermeture sont fréquentes et durent plus longtemps que chez les témoins ; il faut cependant remarquer la grande variabilité de ces deux dernières données, la fermeture n'est pas systématique.

La réaction comportementale initiale en présence de 4 ppm Zn est similaire à celle généralement décrite chez les bivalves face à différents toxiques. Les auteurs étudient essentiellement l'activité valvaire (Davenport, 1977 ; Davenport et Manley, 1978 ; Akberali *et al.*, 1981 ; Slooff *et al.*, 1983 ; Hietanen *et al.*, 1988 ; Kramer *et al.*, 1989 ; Salanki et Balogh, 1989). Akberali *et al.* (1981) se sont également intéressés aux effets toxiques sur l'activité du siphon inhalant. Par contre, les effets sur l'activité du siphon exhalant n'ont jamais été systématiquement étudiés. Davenport (1977) a considéré que, pendant la réponse valvaire, l'animal teste la qualité du milieu avant de se fermer complètement si celui-ci est toxique ; l'auteur a désigné cette phase d'adductions intermittentes sous le nom de "comportement de test" (testing behavior). Chez *Dreissena*, la réaction comportementale au zinc se manifeste progressivement, d'abord par les fermetures intermittentes du siphon (pour 0,25 ; 0,5 et 1 ppm Zn) avant l'apparition évidente en début d'exposition à 4 ppm Zn de la séquence du comportement de test. Il s'agit d'une modification du mode de filtration induisant ce que l'on peut appeler "une activité de stress" qui n'est pas nécessairement précédée de ladite séquence. Le seuil d'apparition immédiate du comportement de test semble se situer entre 1 et 4 ppm Zn. Kramer *et al.* (1989) ont montré, par le suivi des mouvements valvaires, que *Dreissena* réagit dans les 24 heures à la présence de 0,5 ppm Zn. Dans le présent essai, l'effet se manifeste dès 0,25 ppm par l'apparition de quelques périodes d'activité de stress.

L'effet du Zn chez *Dreissena* est proche de celui exercé par ce métal chez *Scrobicularia plana* (Akberali *et al.*, 1981) et *Mytilus edulis* (Hietanen *et al.*, 1988). Les données de ces auteurs montrent que la réaction valvaire immédiate nette est obtenue avec des concentrations supérieures à 1 ppm Zn. Akberali *et al.* (1981) constatent également des contractions du siphon inhalant sous l'effet du Zn. En présence de 10 ppm Zn, il présente un état de contraction permanente. Nous avons observé un comportement identique chez *Dreissena* en présence de 4 ppm Zn. Les données de Doherty *et al.* (1987) chez *Corbicula fluminea* montrent que chez cette espèce, l'effet du Zn se manifeste déjà avec 0,1 ppm Zn par une diminution du temps d'ouverture sur 24 heures, cet effet

Tableau 31 : Durées relatives (en h) des différentes activités après 3 semaines d'exposition au Zn (essai sans répétitions)

	Témoin			0,25 ppm Zn			1 ppm Zn			2 ppm Zn		
	1S	2S	3S	1S	2S	3S	1S	2S	3S	1S	2S	3S
Activité normale	22,3	15,7	16,8	21,7	-	5,7	0	0	0	0	0	0
Activité discontinue	0,5	7,7	4,3	2,3	-	9,3	24	11,2	19,2	24	12,8	14,3
Durée de fermeture/24h	1,2	0,7	2,8	0	-	9	0	12,8	4,8	0	11,2	9,7
Nombre de fermetures	1	1	1	0	-	2	0	5	1	0	3	3

s'accroissant avec les concentrations croissantes. Les auteurs ont également observé une augmentation de la durée totale de fermeture mais, comme chez *Dreissena*, il n'y a pas de relation linéaire entre cet effet et la concentration.

II.3.2. Effets à moyen terme du Zn sur le comportement de filtration de *Dreissena*

II.3.2.1. Modalités de l'expérience

L'essai consiste à tester l'effet de l'exposition prolongée au zinc (0,25 ; 1 et 2 ppm) sur le comportement de filtration de *Dreissena*. L'exposition des animaux s'est faite dans le cadre d'une expérience qui visait également l'évaluation des effets sur la respiration (cf chap. IV.2.2.). La mesure s'effectue dans un dispositif fermé avec renouvellement du milieu toutes les 48 heures (cf 2^{ème} partie, chap II.2.2.1.) et sans nourriture. L'enregistrement de l'activité a lieu après 1, 2 et 3 semaines d'exposition. Compte tenu des résultats de l'essai de court terme et pour des raisons techniques (une seule sonde disponible), l'essai est réalisé sans répétition.

II.3.2.2. Résultats et discussion (Tableau 31)

L'enregistrement de l'activité du témoin montre une réduction du temps de filtration normale à partir de la deuxième semaine. Cette réduction est probablement due à l'absence de particules alimentaires dans le milieu ; il est établi que le jeûne prolongé provoque la diminution de la filtration (Bayne *et al.*, 1976).

L'activité n'est pas altérée avec 0,25 ppm après une semaine d'exposition. A la troisième semaine, il y a une nette réduction de l'activité normale et une augmentation de la durée de fermeture. Pour 1 et 2 ppm, aucune activité normale n'est constatée durant les 3 semaines ; les animaux ne filtrent plus qu'en mode discontinu et la durée de fermeture est élevée par rapport au témoin.

Ces résultats confirment ceux trouvés dans l'essai de 24 heures ; ils prouvent que la réaction comportementale au métal persiste tant que l'exposition dure, ils montrent également que pour les expositions d'une semaine et plus, la concentration de 1 ppm est suffisante pour provoquer une modification totale et durable du mode de filtration chez *Dreissena*. Pour 0,25 ppm, il semble que l'animal s'adapte bien à cette concentration au bout d'une semaine et, au bout de 3 semaines on constate encore des périodes de filtration continue. Ainsi, il semble que le seuil de toxicité comportementale à moyen terme pour le Zn chez *Dreissena* se situe entre 0,25 et 1 ppm.

Tableau 32 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité durant l'exposition de 24 h à 20 ppb Cu

Type d'activité	M1	M2	M3	M4	Moyenne ± SD
Activité normale	2,70	12,24	10,96	12,24	9,53 ± 4,60
Activité discontinue (AD)	12,38	4,08	7,60	6,3	7,59 ± 3,51
Durée de fermeture	8,92	7,68	5,44	5,46	6,87 ± 1,72
Nombre de fermetures	3	4	3	1	2,75 ± 1,25
Délai d'apparition de l'AD	2,7	0	0	0	

Tableau 33 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité durant l'exposition de 24 h à 40 ppb Cu

Type d'activité	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	0	0	0	0
Activité discontinue (AD)	12	8,08	13,54	11,21 ± 2,81
Durée de fermeture	8	15,92	10,06	11,33 ± 4,11
Nombre de fermetures	6	3	2	3,66 ± 2,08
Délai d'apparition de l'AD	0	0	0	0

Tableau 34 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité durant l'exposition de 24 h à 80 ppb Cu

Type d'activité	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	0	0	0	0
Activité discontinue (AD)	1,3	2,7	5,6	3,2 ± 2,2
Durée de fermeture	22,7	21,3	18,4	20,8 ± 2,2
Nombre de fermetures	8	8	5	7 ± 1,7
Délai d'apparition de l'AD	0	0	0	0

II.4. EFFETS DU CUIVRE SUR LE COMPORTEMENT DE FILTRATION DE *DREISSENA*

L'évaluation des effets du cuivre ainsi que des autres métaux qui seront étudiés par la suite porte sur les 24 premières heures d'exposition.

II.4.1. Protocole expérimental

Compte tenu des résultats de l'essai de toxicité létale (cf chap I.5.), nous avons choisi des concentrations inférieures au seuil de mortalité pour l'exposition de 96 heures. Les concentrations testées sont : 20 ppb (4 répétitions), 40 et 80 ppb (3 répétitions).

II.4.2. Résultats

* Activité en présence de 20 ppb Cu (Tableau 32)

Pour trois animaux sur quatre, l'injection du métal dans le milieu déclenche immédiatement le changement du mode d'activité du siphon, celui-ci devenant intermittent. Pour le quatrième animal, l'effet apparaît 2,7 h après le début de l'exposition. A l'observation visuelle, on constate qu'au début, la modification de l'activité du siphon s'accompagne de légers mouvements d'adduction valvulaire qui coïncident avec chaque contraction du siphon. La durée de la première période d'activité discontinue varie entre 0,4 et 5,3 h, après quoi l'animal reprend une activité normale puis montre dans la suite de l'exposition d'autres phases d'activité discontinue et des périodes de fermeture.

* Activité en présence de 40 ppb Cu (Tableau 33)

Le métal provoque immédiatement la modification de l'activité ; on constate une séquence très nette du comportement de test qui dure entre 0,5 et 1,3 h et comprenant des adductions valvulaires brusques et intermittentes (1 à 4 mn de fermeture) et, durant les ouvertures, des contractions fréquentes du siphon exhalant. Sur les enregistrements, cette séquence se traduit par une filtration discontinue avec des interruptions d'une à cinq minutes. Le comportement de test est suivi d'une fermeture qui dure entre 2,5 et 8 h, après quoi l'activité se compose d'alternances de périodes d'activité discontinue (où interviennent des adductions fréquentes) et de périodes de fermeture, celles-ci constituant en moyenne la moitié du cycle de 24 h. On n'observe aucune période d'activité normale.

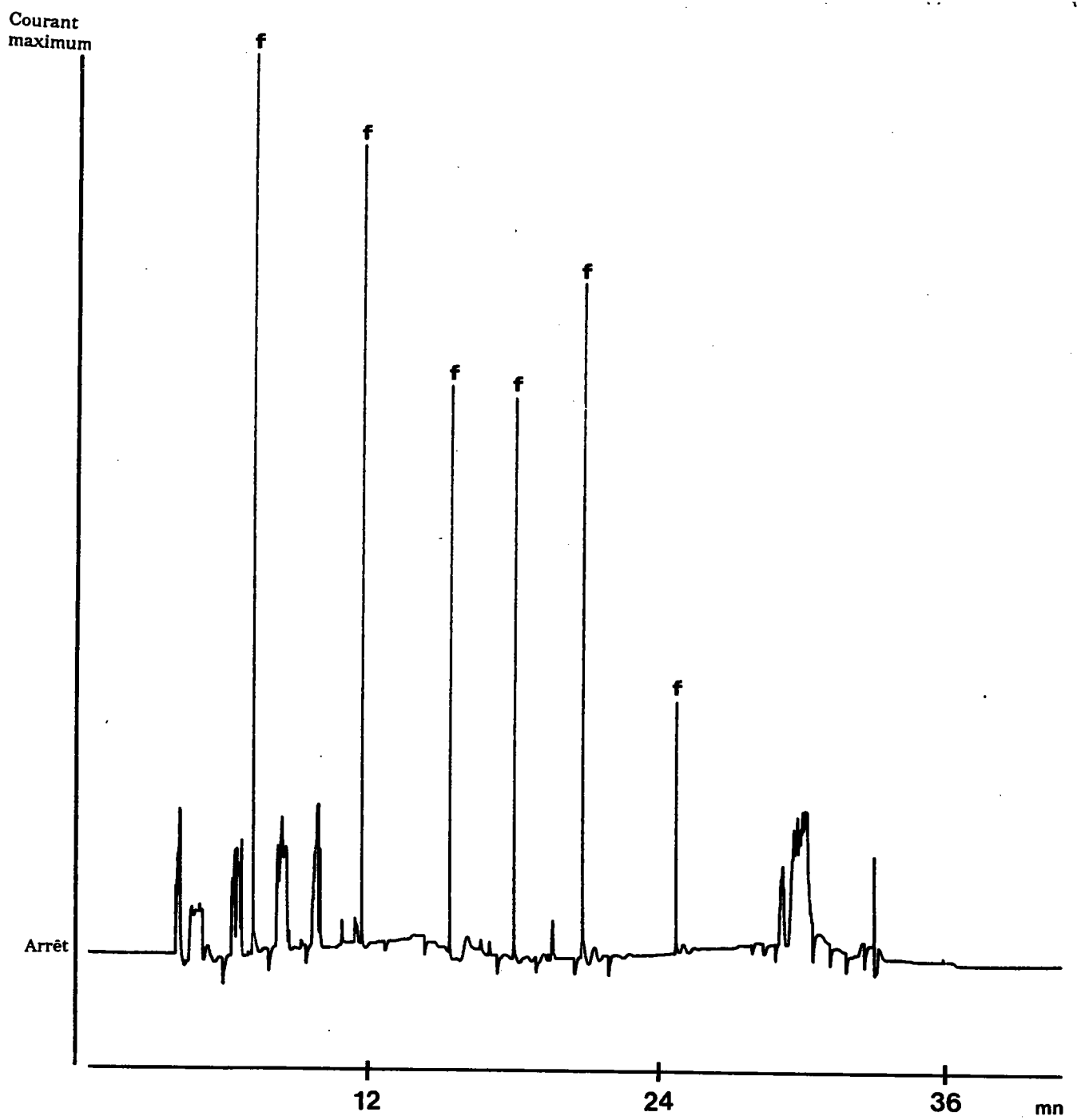


Fig.26 : Séquence de l'activité de filtration durant une période d'ouverture d'une moule exposée à 80 ppb de Cu (moule M₂, 12^e heure).
f : fermeture brusque des valves.

* Activité en présence de 80 ppb Cu (Tableau 34)

Les effets observés en présence de 40 ppb Cu sont plus accentués dans le présent essai, l'apparition du comportement de test est immédiate. La première fermeture a lieu 6 à 50 mn après le début de l'exposition, elle dure entre 3 à 5 heures. Le nombre de fermetures par 24 heures est de 7 en moyenne. L'animal passe la majeure partie du temps fermé (20,8 h/24 h en moyenne). On constate que les périodes d'ouverture dépassent rarement 1 heure et que l'activité y est très faible (émissions de courant intermittentes et très faibles). De fréquentes adductions y interviennent également (fig. 26).

II.4.3. Discussion

Les résultats montrent que des perturbations importantes de l'activité de filtration de *Dreissena* sont observées en présence de 20 ppb Cu. L'effet se manifeste dès le début par la modification de l'activité du siphon et le rétrécissement de l'ouverture des valves. Il ne s'agit toutefois pas de toutes les composantes de la séquence du comportement de test. Celui-ci apparaît clairement en présence de 40 et 80 ppb Cu. On peut donc situer le seuil d'apparition immédiate de ce comportement entre 20 et 40 ppb Cu. Cette estimation correspond aussi au seuil de disparition de l'activité normale. La durée totale de fermeture augmente en fonction des concentrations croissantes du métal. Ces données sont en accord avec celles de Slooff *et al.* (1983) qui notent l'apparition du comportement de test chez *Dreissena* à 30 ppb Cu.

Les effets du Cu sur le comportement de *Dreissena* sont très proches de ceux rapportés pour d'autres bivalves (1^{ère} partie, chap II, Tableau 6). Chez *Mytilus*, le comportement de test apparaît à partir de 20 ppb (Davenport et Manley, 1978). Chez cette même espèce, Kramer *et al.* (1989) rapportent que la fermeture intervient en quelques minutes en présence de 37,5 ppb. Chez *Scrobicularia plana*, le seuil de fermeture immédiate est plus élevé (100 ppb ; Akberali et Black, 1981). Chez le bivalve d'eau douce *Anodonta cygnea*, Salanki et Balogh (1989) rapportent que 10 ppb Cu n'ont pas d'effet sur les durées d'ouverture et de fermeture pendant les premières 24 heures tandis que 100 ppb provoquent une forte réduction de la phase d'ouverture.

Par rapport à l'action du Zn, la toxicité du Cu est beaucoup plus importante, compte tenu des concentrations efficaces respectives. Les travaux de Akberali *et al.* (1981) concernant le siphon inhalant isolé de *Scrobicularia plana* illustrent cette différence de toxicité ; le Cu (250 et 500 ppb) provoque de fortes contractions tandis que le Zn (1000, 5000 et 10000 ppb) n'a aucun effet. Les auteurs ont interprété l'effet du Cu par une action présumée au niveau de la jonction neuromusculaire dans le siphon où il provoquerait la libération d'acétylcholine ; cette jonction serait par contre

Tableau 35 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité durant l'exposition de 24 h à 20 ppb Hg

20 ppb Hg	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	0,7	8,7	11,8	7,1 ± 5,7
Activité discontinue (AD)	13,3	7,6	4,20	8,4 ± 4,6
Durée de fermeture/24h	10	7,7	8	8,6 ± 4,6
Nombre de fermetures	2	4	2	2,7 ± 1,1
Délai d'apparition de l'AD	0	0,3	0	

Tableau 36 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité durant l'exposition de 24 h à 50 ppb Hg

50 ppb Hg	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	2,3	3,4	0	1,9 ± 1,7
Activité discontinue (AD)	8	5,9	13	9 ± 3,6
Durée de fermeture	13,7	14,7	11	13,1 ± 1,9
Nombre de fermetures	2	5	3	3,3 ± 1,5
Délai d'apparition de l'AD	0	0	0	0

Tableau 37 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité durant l'exposition de 24 h à 100 ppb Hg

100 ppb Hg	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	0	0	0	0
Activité discontinue (AD)	6,7	6,6	6,2	6,5 ± 0,3
Durée de fermeture	17,3	17,4	17,8	17,5 ± 0,3
Nombre de fermetures	3	4	7	4,7 ± 2,1
Délai d'apparition de l'AD	0	0	0	0

insensible au Zn. En fait, l'expérience de ces auteurs montre l'existence, au niveau du siphon, d'un réseau nerveux périphérique autonome sensible à des stimuli chimiques. Ce réseau est formé de cellules ganglionnaires réparties dans la zone proche de l'extrémité du siphon chez *Scrobicularia* (Pieron, 1941, cité par Franc, 1961). La rapidité de l'effet du Cu sur le siphon exhalant chez *Dreissena* suggère l'existence d'un tel système sensoriel qui réagirait en premier aux concentrations de Cu inférieures au seuil de fermeture des valves.

II.5. EFFETS DU MERCURE SUR LE COMPORTEMENT DE FILTRATION DE *DREISSENA*

Compte tenu des résultats de l'essai de toxicité létale (cf chap I.6.), les concentrations testées, inférieures au seuil de mortalité, sont 20, 50 et 100 ppb Hg.

II.5.1. Résultats

*** Activité en présence de 20 ppb Hg (Tableau 35)**

L'addition du métal provoque la modification de l'activité de filtration. Le comportement de test apparaît chez tous les animaux. La première fermeture intervient après moins de 30 mn chez deux animaux et après 4,8 h chez le troisième. La durée de fermeture est en moyenne 8,6 h/24 h. Des périodes d'activité normale sont observées dès la sixième heure.

*** Activité en présence de 50 ppb Hg (Tableau 36)**

Cette concentration provoque un comportement de test caractérisé par des adductions fortes et fréquentes. La première fermeture intervient après 30-55 mn. Pendant les périodes d'ouverture, l'activité est discontinue et très faible. On constate chez deux animaux sur trois une activité normale en fin d'exposition. La durée totale de fermeture est en moyenne de 13,1 h/24 h.

*** Activité en présence de 100 ppb Hg (Tableau 37)**

Le comportement de test est très court. La première fermeture a lieu après 3-20 mn. La durée totale de fermeture est de 17,5 h/24 h (73% du temps). Des ouvertures de quelques minutes (jusqu'à

3 mn) interviennent pendant les fermetures. Aucune activité normale n'est observée pour cette concentration.

II.5.2. Discussion

Les résultats montrent que la toxicité du mercure est proche ou légèrement supérieure à celle exercée par le Cu. Le seuil d'apparition du comportement de test peut être situé à 20 ppb Hg. L'effet apparaît clairement dans l'augmentation, en fonction de la concentration, de la durée totale de fermeture et du nombre de périodes de fermeture.

Certains auteurs ont remarqué la forte toxicité du Hg vis-à-vis de l'activité de filtration des bivalves. Mohan *et al.* (1986b) ont constaté que des concentrations entre 20 et 140 ppb Hg provoquent la fermeture des valves chez *Modiolus sp.*, *Modiolus carvalhoi* et *Donax spiculum* dans une exposition de 12 heures. Chez *Mytilus edulis*, Micallef et Tyler (1987) ont noté que la fermeture complète intervient pour les concentrations supérieures à 3200 ppb Hg ; ce seuil de fermeture est étonnamment élevé. Signalons que ces remarques ont été rapportées lors d'études sur le taux de filtration et il n'existe pas d'étude détaillée de l'effet du mercure sur le comportement de filtration.

Le mode d'action du Hg vis-à-vis de l'activité de filtration n'est pas connu, mais étant donné la forte similitude avec l'effet du cuivre, il est vraisemblable que les mécanismes impliqués soient les mêmes pour les deux métaux ; ils ont été précédemment discutés (cf chap II.4.3.).

II.6. EFFETS DU CADMIUM SUR LE COMPORTEMENT DE FILTRATION DE DREISSENA

Les concentrations testées sont 150, 200, 400 et 1000 ppb.

II.6.1. Résultats

* Activité en présence de 150 ppb Cd (Tableau 38)

On ne constate pas de séquence typique du comportement de test. Le délai d'apparition d'une activité perturbée (discontinue) est variable (0 à 5,6 h). L'effet du métal se manifeste par une diminution du temps de filtration normale et l'installation d'une activité discontinue.

Tableau 38 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 150 ppb Cd

150 ppb Cd	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	1,5	10,6	0	4,0 ± 5,7
Activité discontinue (AD)	20,1	7,8	24	17,3 ± 8,5
Durée de fermeture/24h	2,4	5,6	0	2,7 ± 2,8
Nombre de fermetures	1	3	0	1,3 ± 1,5
Délai d'apparition de l'AD	1,5	5,6	0	2,4 ± 2,9

Tableau 39 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 200 ppb Cd

200 ppb Cd	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	0	8,5	2	3,5 ± 4,4
Activité discontinue (AD)	16,5	8,8	3,5	9,6 ± 6,5
Durée de fermeture/24h	7,5	6,7	18,5	10,9 ± 6,6
Nombre de fermetures	2	3	4	3 ± 1
Délai d'apparition de l'AD	0	4	0	1,3 ± 2,3

Tableau 40 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 400 ppb Cd

400 ppb Cd	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	1,2	2,4	2,3	2 ± 0,7
Activité discontinue (AD)	15,3	18,5	13,4	15,7 ± 2,6
Durée de fermeture/24h	7,5	3,1	8,3	6,3 ± 2,8
Nombre de fermetures	3	2	3	2,7 ± 0,6
Délai d'apparition de l'AD	0	0	0	0

Tableau 41 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 1000 ppb Cd

1000 ppb Cd	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	1,8	0,4	0,9	1,0 ± 0,7
Activité discontinue (AD)	11,8	17,6	12,3	13,9 ± 3,2
Durée de fermeture	10,4	6	10,8	9,1 ± 2,7
Nombre de fermetures	2	4	4	3,3 ± 1,1
Délai d'apparition de l'AD	0	0	0	0

* Activité en présence de 200 ppb Cd (Tableau 39)

Les effets sont similaires au cas précédent. La durée totale de fermeture est supérieure à celle des témoins, mais le délai d'apparition de la première fermeture est très variable (0,5 à 9,5 h).

* Activité en présence de 400 ppb Cd (Tableau 40)

Les effets sont plus homogènes à cette concentration. La modification de l'activité est immédiate, elle correspond au début à une séquence typique du comportement de test. La majeure partie du temps d'ouverture correspond à une activité discontinue. L'activité normale est très réduite (11% du temps d'ouverture). Le délai d'apparition de la première fermeture se situe entre 0,6 et 5,5 h.

* Activité en présence de 1000 ppb Cd (Tableau 41)

Les effets enregistrés pour la concentration précédente sont ici amplifiés ; l'activité normale ne dure pas plus que 1 h/24 h en moyenne et les fermetures représentent 38% du cycle de 24 h. Le délai d'apparition de la première fermeture se situe entre 3 et 5 heures.

II.6.2. Discussion

Cet essai montre que les effets du Cd sur le comportement de filtration de *Dreissena* se manifestent à toutes les concentrations testées ; le seuil de toxicité comportementale est donc inférieur à 150 ppb. Les résultats de Kramer *et al.* (1989) montrent que *Dreissena* manifeste les premiers signes de stress (visualisés par l'activité valvaire) pour des concentrations inférieures à 100 ppb, mais les auteurs ne précisent pas ces concentrations ni l'ampleur des effets.

Nos résultats montrent qu'à partir de 400 ppb, une séquence très nette du comportement de test est observée ; cette valeur est proche du seuil de 370 ppb Cd rapporté par Slooff *et al.* (1983) chez *Dreissena*.

En présence de Cd, la durée totale de fermeture est très élevée par rapport aux témoins mais, à la différence du Hg et du Cu, on ne décèle pas de corrélation nette entre cette donnée et les concentrations en Cd ; un résultat similaire a été rapporté chez *Corbicula fluminea* lors d'une exposition de 24 heures (100 à 400 ppb Cd ; Doherty *et al.*, 1987). Le délai d'apparition de la première fermeture ne montre pas non plus de corrélation avec les concentrations en Cd. Il semble donc que l'apparition rapide de la première fermeture requiert des concentrations plus élevées. Sunila (1981) a montré chez *Mytilus* que la fermeture rapide intervient pour des concentrations supérieures à 3 ppm.

II.7. EFFETS DU PLOMB SUR LE COMPORTEMENT DE FILTRATION DE *DREISSENA*

Les concentrations testées sont 0,5 ; 1 et 2 ppm.

II.7.1. Résultats (Tableaux 42, 43 et 44)

Les effets de modification de l'activité sont visibles dès la concentration de 0,5 ppm ; on constate notamment que le nombre de fermetures et la somme de leurs durées par 24 heures augmentent avec la concentration en Pb ; cependant, la durée de chaque fermeture n'est pas prolongée (entre 1,2 h et 1,9 h en moyenne).

Une forte production de mucus a été constatée en présence de 2 ppm Pb.

II.7.2. Discussion

D'après les résultats de cet essai, le seuil de toxicité du Pb vis-à-vis du comportement de filtration est inférieur à 0,5 ppm. Un seuil similaire a été rapporté par Kramer *et al.* (1989) pour l'effet vis-à-vis de l'activité valvaire.

Chez *Anodonta cygnea* qui possède naturellement un rythme d'ouverture et de fermeture, Salanki et Balogh (1989) rapportent qu'une concentration en plomb de 0,5 ppm provoque la réduction graduelle (exposition de 10 jours) de la durée des périodes d'ouverture, et réduit légèrement la durée des périodes de fermeture ; les animaux montrent de fréquentes ouvertures et fermetures au bout de quelques jours d'exposition.

Le fait marquant de l'action du Pb chez *Dreissena* est que la phase initiale ne contient pas de séquence du comportement de test, même en présence de 2 ppm dont les effets se révèlent après, être très importants. Il semble donc que l'expression de la toxicité du Pb requiert un certain temps de latence. Celui-ci pourrait être expliqué par l'insensibilité du réseau nerveux périphérique au Pb (du moins aux concentrations testées) ; la réaction observée mettrait plutôt en jeu un mécanisme régi par le ganglion viscéral (cf ch II.4.3.).

Tableau 42 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 0,5 ppm Pb

0,5 ppm Pb	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	12,1	16	1,8	9,9 ± 7,3
Activité discontinue (AD)	3,1	4,1	16,2	7,8 ± 7,3
Durée de fermeture/24h	8,8	3,7	6	6,2 ± 2,5
Nombre de fermetures	2	1	1	1,3 ± 0,6
Délai d'apparition de l'AD	1	2,1	1,4	1,5 ± 0,6

Tableau 43 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 1 ppm Pb

1 ppm Pb	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	17	4,4	6,2	9,2 ± 6,8
Activité discontinue (AD)	3,2	9	9,8	7,3 ± 3,6
Durée de fermeture/24h	3,8	10,6	8	7,5 ± 3,4
Nombre de fermetures	2	1	3	2 ± 1
Délai d'apparition de l'AD	0	4	5,7	3,2 ± 2,9

Tableau 44 : Durées relatives (en h) des différents types d'activité pendant les premières 24h d'exposition à 2 ppm Pb

2 ppm Pb	M1	M2	M3	Moyenne ± SD
Activité normale	1	1,4	0,4	0,9 ± 0,5
Activité discontinue (AD)	15,3	11,9	4,8	10,7 ± 5,3
Durée de fermeture/24h	7,7	10,7	18,8	12,4 ± 5,7
Nombre de fermetures	4	9	11	8 ± 3,6
Délai d'apparition de l'AD	0,7	1	0,4	0,7 ± 0,3

II.8. DISCUSSION GENERALE DE LA TOXICITE DES METAUX VIS-A-VIS DE L'ACTIVITE DE FILTRATION

Tableau 45 : Seuils de toxicité des différents métaux vis-à-vis de l'activité de filtration.

Métal	Seuil de toxicité comportementale (ppb)
Zn	250
Cu	20
Hg	20
Cd	150
Pb	500

Cette série d'essais a permis de caractériser les différents aspects de la toxicité des métaux vis-à-vis du comportement de filtration de *Dreissena*. L'action s'opère rapidement dès qu'un certain seuil est franchi (Tableau 45) ; celui-ci est variable selon le métal. Etant donné que le poids molaire est de 63,5 pour le Cu, 200,5 pour le Hg, 65,4 pour le Zn, 112,4 pour le Cd et 207,2 pour le Pb, la classification des métaux selon leur toxicité décroissante vis-à-vis du comportement de filtration est la suivante :

$Hg > Cu \gg Cd > Pb > Zn$.

La première manifestation de l'action métallique (aux faibles concentrations) est l'apparition de périodes de filtration discontinue régies par les contractions intermittentes du siphon exhalant. Cette activité "de stress" augmente avec les concentrations métalliques jusqu'à la disparition totale de toute activité continue ; en même temps, les périodes de fermeture des valves deviennent fréquentes et leur durée totale augmente également.

Les effets enregistrés par notre système expérimental statique (par nécessité méthodologique) sont probablement une sous-estimation des effets réels. En effet, étant donné que dans l'exposition de 24 h, l'introduction du métal est unique (au début), sa biodisponibilité (métal dissous) diminue rapidement dans le milieu (cf chap. I.9.), ce qui se traduit vraisemblablement par une réduction de l'action du métal par rapport à ce qu'elle aurait été si la concentration était restée constante. Cette remarque vaut particulièrement pour les concentrations les plus basses testées où la diminution de la biodisponibilité pourrait les réduire en dessous des seuils de toxicité.

Quant au mécanisme d'action, le fait que le Cu et le Hg (et dans une moindre mesure le Cd) soient rapidement détectés indique une possible sensibilité au niveau périphérique (par les cellules ganglionnaires). L'action du Zn et du Pb requiert un certain temps de latence et aurait plutôt pour

origine le système du ganglion viscéral. Pour les concentrations élevées (de l'ordre du ppm), il y aurait également une détection périphérique.

Du point de vue adaptatif, la réaction comportementale permet à l'animal de limiter le contact avec le milieu extérieur défavorable, évitant ainsi l'intoxication aiguë. Cependant, d'un point de vue physiologique, la réduction du temps de filtration qui en résulte peut avoir des conséquences néfastes sur le niveau d'alimentation, avec des effets possibles sur la croissance et la reproduction. D'autres conséquences sur la respiration sont également possibles. Ces aspects de la toxicité des métaux sont abordés dans la suite du travail.

CHAPITRE III : EFFETS DE L'EXPOSITION AUX METAUX SUR LE TAUX DE FILTRATION DE *DREISSENA*

III.1. CONDITIONS EXPERIMENTALES ET MODE OPERATOIRE

Les moules sont réparties par lots de 6 à 8 individus sur des supports en PVC et acclimatées selon la procédure décrite dans la 2^{ème} Partie, chap. II.1.3.

Le dispositif d'exposition est le système fermé à renouvellement quotidien (2^{ème} Partie, chap II.2.1. et II.2.2.1.). Le volume d'essai est de 10 l par unité expérimentale.

Pour chaque métal, trois concentrations sont testées (plus le témoin) à raison de 3 lots (répétitions) par concentration.

A chaque renouvellement du milieu, les moules sont nourries (une heure et demie environ) par apport du plancton contenu dans l'eau de rivière (30 l) oxygénée et amenée à la température d'expérience ; pendant ce temps le nouveau milieu est préparé.

La mesure du TF est effectuée avec une suspension de graphite colloïdal. Les moules n'étant pas en présence de particules pendant le cycle de 24 heures, l'introduction de la suspension de graphite au moment de la mesure pourrait provoquer une excitation de la filtration (Bayne *et al.*, 1976 ; Ebersveiller, 1988) qui risquerait de masquer l'effet des métaux ; pour pallier à cette éventualité, les moules sont mises en présence d'une petite quantité de graphite colloïdal 2 heures avant la mesure.

La mesure elle-même se déroule dans le dispositif décrit précédemment (2^{ème} Partie, chap II.3.2.1.). La suspension de graphite (entre 2,6 et 4 millions de particules/ml) est introduite dans le milieu (2 l d'eau déchlorée contenant le métal à la concentration d'exposition) et après une homogénéisation de 10 mn (agitation), un échantillon de 10 ml est prélevé dans chaque cristallisoir. On laisse alors les moules filtrer les particules pendant 60 mn et on effectue un deuxième prélèvement de 10 ml. Les lots de moules sont remis dans les bacs d'exposition pour les mesures ultérieures. En fin d'expérience, les moules sont séchées à 105°C (24 h) et pesées pour déterminer le poids sec.

Les prélèvements effectués au début et à la fin de la mesure sont destinés à la détermination de la concentration en particules. On mesure l'opacité au spectrophotomètre, puis on déduit la concentration à partir de la courbe d'étalonnage du graphite colloïdal (2^{ème} Partie, chap II.3.2.3.).

III.2. TAUX DE FILTRATION (TF) CHEZ LES TEMOINS

III.2.1. TF mesuré avec le graphite colloïdal

Les mesures effectuées sur les lots de moules avant toute exposition (84 mesures au total) nous servent ici pour discuter le TF chez les témoins.

Elles sont effectuées à différentes périodes (7 groupes de 12 mesures correspondant aux mesures avant exposition à 5 métaux et 2 molécules organiques). Les concentrations en particules de graphite utilisées se situent entre $2,766 \cdot 10^6$ et $4,131 \cdot 10^6$ particules/ml.

Les valeurs obtenues varient entre 751 et 1646 ml.h⁻¹.g⁻¹ de poids sec (PS) (moyennes de 12 mesures, Tableau 46).

Tableau 46 : Valeurs du TF correspondant aux témoins avant exposition à 5 métaux et 2 molécules organiques.

Groupe de mesures (12)	TF (ml.h ⁻¹ .g ⁻¹) moyenne ± SD	Concentration de graphite (10 particules/ml) moyenne ± SD
T (Zn)	1646 ± 290	4,035 ± 0,383
T (Cu)	1405 ± 235	4,131 ± 0,101
T (Lutensol)	1043 ± 140	2,931 ± 0,173
T (Cd)	1036 ± 177	4,001 ± 0,047
T (Hg)	1002 ± 209	3,468 ± 0,083
T (Pb)	822 ± 166	3,382 ± 0,101
T (Lindane)	751 ± 170	2,766 ± 0,064

III.2.2. TF mesuré avec des suspensions algales (Tableau 47)

Une mesure comparative a été effectuée avec l'algue *Chlorella vulgaris*. Nous prendrons également, pour la comparaison, une mesure qui constitue la valeur témoin dans un essai d'évaluation des effets du Cu et du Cd sur le bilan énergétique de *Dreissena* (cf chap V).

Tableau 47 : Valeurs moyennes du TF obtenu avec *Chlorella* et *Chlamydomonas*.

Suspension	Concentration (10 ⁶ cell./ml)	TF (ml.h-1.g-1)	n
<i>Chlorella vulgaris</i>	1,0403 ± 0,0427	1583	3
<i>Chlamydomonas variabilis</i>	0,0571 ± 0,0009	2046	2

III.2.3. Discussion

La taille des particules de graphite est de 0,25-0,50 µm pour les particules isolées et de 0,75-1 µm pour les agrégats de particules. D'après Sprung et Rose (1988), ces gammes de taille de particules ne sont pas retenues à 100% par les branchies de *Dreissena*. Ces auteurs affirment que la rétention commence avec des particules de 0,7 µm ou plus. Jorgensen et al. (1984) ont cependant trouvé une rétention de 90% pour des particules de 1 µm. Il s'agit donc, dans nos résultats avec le graphite, d'un taux de filtration (clarification de la suspension) qui est vraisemblablement inférieur au taux de pompage puisque la rétention n'est pas efficace à 100% (Coughlan et Ansell, 1964). Le TF est de ce fait une sous-estimation du taux de pompage.

La variation du TF entre les différentes séries de mesures s'explique par la différence des concentrations de graphite utilisées. Morton (1971), qui a également utilisé le graphite, a montré que le TF augmente avec les concentrations croissantes en particules. Le TF maximum mesuré par cet auteur est de 40-50 ml/h-animal, ce qui équivaut à 1000-1250 ml.h⁻¹.g⁻¹ si l'on estime le PS de l'animal standard (2,9 cm) à 40 mg (d'après nos propres mesures sur *Dreissena*). Nos valeurs sont du même ordre de grandeur que ces maxima. Elles sont également proches de la valeur moyenne rapportée par Walz (1978) qui a utilisé la diatomée *Nitzschia actinastroides* (77 ml/h-animal ≈ 1870 ml.h⁻¹.g⁻¹ (animaux de 2,5 cm de longueur). Il faut noter que l'auteur ne tient compte que des animaux ouverts alors que nos résultats sont calculés pour l'ensemble des animaux en expérience.

La valeur du TF obtenu avec *Chlorella* est proche des données rapportées par Ebersveiller (1988) mais est très inférieure à celles de Kryger et Riisgard (1988) avec la même algue à la concentration de 10000-12000 cellules/ml (TF = 6820 ml.h⁻¹.g⁻¹, calculé d'après la relation TF = 6,82.PS^{0,88} établie par les auteurs). Le faible TF trouvé dans notre essai serait dû à la concentration algale élevée qui dépasse la capacité d'ingestion de *Dreissena* (Sprung et Rose, 1988).

La valeur calculée avec *Chlamydomonas* est légèrement plus élevée que celles obtenues avec le graphite et *Chlorella*, ainsi que celles rapportées par Dorgelo et Smeenk (1988). Ces auteurs trou-

vent des TF de 1000-1100 ml.h⁻¹.g⁻¹ (recalculés d'après les données des auteurs) avec des suspensions algales (*Chlamydomonas eugametos*) de 9250-80950 cell./ml. La valeur obtenue est par contre proche de celle calculée à partir des données de Sprung et Rose (1988) en présence de 50000 cell./ml (TF = 2250 ml.h⁻¹.g⁻¹).

Le tableau 48 résume les données bibliographiques sur le TF de *Dreissena* ; certaines valeurs ont été recalculées pour homogénéiser l'unité (ml.h⁻¹.g⁻¹) en tenant compte des données pondérales fournies par les auteurs ou estimées d'après la taille des animaux.

Les différences méthodologiques rendent difficile la comparaison de nos propres résultats avec les données bibliographiques. D'autres auteurs ont noté cette difficulté due à l'absence d'une méthode normalisée (Kryger et Riisgard, 1988). Les différences concernent notamment le type de l'étude (*in situ* ou en laboratoire), la nature de la suspension, sa concentration, le dispositif de mesure (fermé ou à flux continu), le temps de mesure (1 h à 24 h) et les animaux pris en compte. Concernant ce dernier point, nous considérons qu'il faut tenir compte de tous les animaux y compris ceux qui sont fermés, étant donné que la fermeture est un comportement normal chez *Dreissena* (Walz, 1978 et chap II.2.). Cette considération a une importance, notamment dans le cadre de l'évaluation des effets toxiques sur le TF.

En conclusion, il apparaît que la filtration chez *Dreissena* comme chez d'autres bivalves, est une activité très sensible, ce qui rend sa quantification délicate.

Pour nos expériences d'exposition aux métaux, nous avons choisi la suspension de graphite qui est d'utilisation la plus simple. Le taux de filtration mesuré est une sous-estimation du taux de pompage, mais rend très bien compte des variations de celui-ci. La précaution expérimentale indispensable est que la concentration en particules au début de la mesure doit être constante dans une même série de mesures.

Tableau 48 : Résumé des données bibliographiques relatives à l'estimation du TF de *Dreissena*.

Suspension de mesure	TF (ml.h-1.g-1)	Référence
suspension naturelle (in situ)	50 - 1250	Mikheev (1967), in Morton (1971)
graphite colloïdal (0,5-1,5µm)	250 - 1250	Morton (1971)
<i>Chlamydomonas globosa</i> (5-7 µm, 80000 cell./ml)	4500 (maximum)	Morton (1971)
suspension naturelle (in situ)	266 à 1500	Stanczykowska et al. (1975)
<i>Nitzschia actinastroides</i>	1875	Walz (1978)
<i>Chlamydomonas eugametos</i> (9250 - 80950 cell./ml)	1000 - 1100	Dorgelo et Smeenk (1988)
<i>Chlorella vulgaris</i> 4-8 µm, 10000-12000 cell./ml 2.10 ⁶ cell./ml	6820 1483	Kryger et Riisgard (1988) Ebersveiller (1988)
<i>Chlamydomonas reinhardii</i> (5000 - 90000 cell./ml)	1250 - 5750	Sprung et Rose (1988)
suspension naturelle (in situ)	1086 (1) - 3070 (2)	Reeder et al. (1989)
graphite colloïdal (4.10 ⁶ particules/ml)	1646	la présente étude
<i>Chlorella</i> (10 ⁶ cell./ml)	1583	la présente étude
<i>Chlamydomonas variabilis</i> (57100 cell./ml)	2046	la présente étude

(1) : moyenne de 3 mesures (décembre) dans 3 lacs de Hollande

(2) : moyenne générale de 3 mesures mensuelles (août, septembre, octobre) dans les 3 lacs (= 9 mesures)

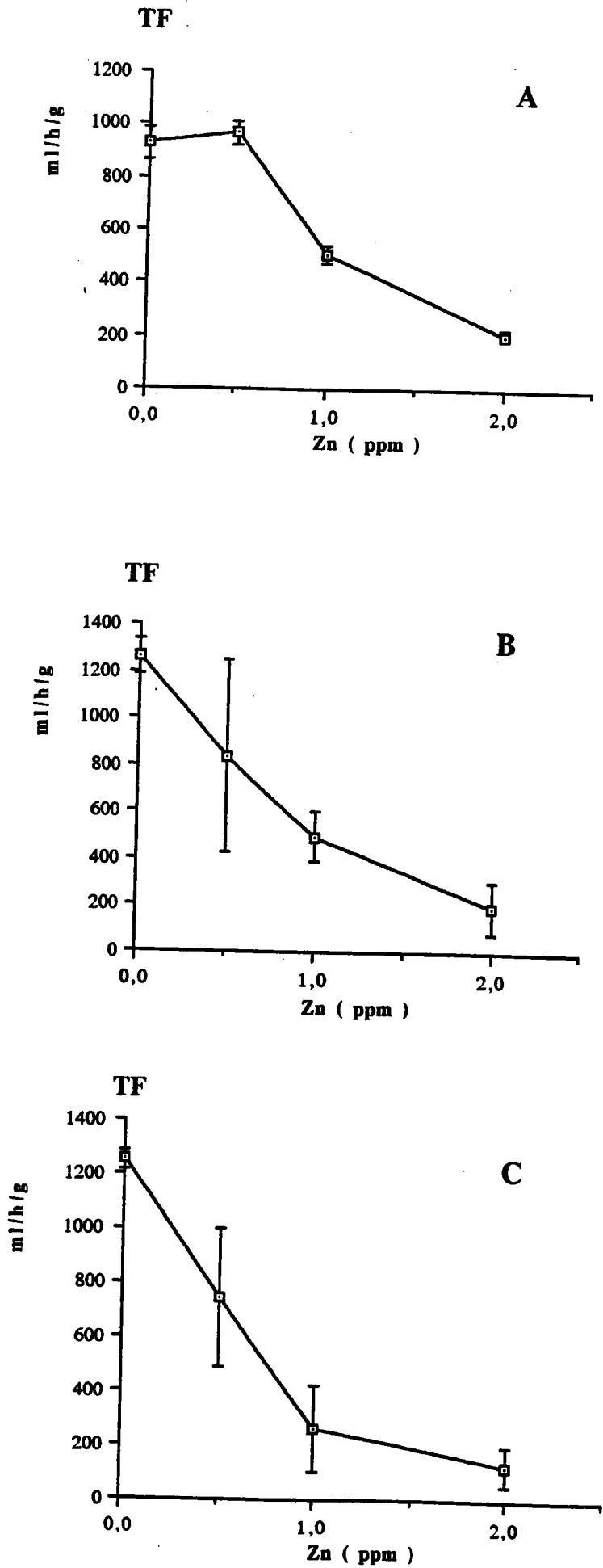


Fig 27 : TF en fonction des concentrations en Zn; A : 48h , B : 8j , C : 15j

III.3. EFFETS DU ZINC SUR LE TF DE DREISSENA

III.3.1. Choix des concentrations

L'étude comportementale (chap II.3.) a révélé que l'action du zinc se manifeste notamment par une modification du mode de filtration et par l'augmentation de la durée de fermeture des valves. Ces effets sont nets à partir de 0,5 ppm Zn. Aussi, nous avons choisi pour cette étude quantitative les concentrations suivantes : 0,5 ; 1 et 2 ppm. Les mesures du TF sont effectuées avant et après une durée d'exposition de 2, 8 et 15 jours.

III.3.2. Résultats (Annexe IV)

Remarque : Des mesures avant exposition au métal ont été effectuées dans cet essai ainsi que dans ceux qui suivent ; elles montrent toutes qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents lots de la même série ; aussi, ces mesures ne seront pas présentées dans les résultats des essais.

* TF après 48 h d'exposition (fig 27A)

La concentration de 0,5 ppm Zn n'a pas d'effet sur le TF à ce stade de l'exposition. Par contre, une inhibition significative est constatée en présence de 1 ppm Zn (45% de réduction par rapport aux témoins) ; cet effet est plus accentué en présence de 2 ppm Zn.

* TF après 1 semaine d'exposition (fig 27B)

La réduction du TF en présence de 0,5 ppm est en moyenne de 34% ; elle n'est pas statistiquement significative au seuil de 5%, le coefficient de variation est de 49% (l'effet est significatif au seuil de 10%). En présence de 1 et 2 ppm, les réductions du TF (très significatives) sont de 60% et 85% ; on remarque qu'elles sont plus importantes que celles observées à 48 h.

En considérant les valeurs moyennes du TF, la CE50-8 j (concentration qui, en 8 jours, est responsable de 50% d'inhibition du TF) est de 0,757 ppm Zn.

*** TF après 2 semaines d'exposition (fig 27C)**

Tous les effets constatés sont significatifs à ce stade de l'exposition ; les réductions du TF sont de 40, 79 et 90% pour, respectivement 0,5 , 1 et 2 ppm Zn. On remarque que les effets liés à 1 et 2 ppm sont plus importants que ceux enregistrés après 1 semaine.

Sur la base des valeurs moyennes, la CE50-15 j est de 0,583 ppm Zn.

III.3.3. Discussion

D'après les résultats exposés, la toxicité du Zn vis-à-vis du TF de *Dreissena* a été observée aux concentrations suivantes :

- 1 ppm pour 48 h,
- 0,5 ppm pour 1 semaine,
- 0,5 ppm pour 2 semaines d'exposition.

Si on considère globalement l'essai, on peut affirmer que le seuil de toxicité à moyen terme est au moins égal à 0,5 ppm. Cette valeur se situe bien dans la gamme de concentrations précédemment déterminée comme constituant le seuil de toxicité comportementale (cf chap II.3.), ce qui met en évidence une corrélation étroite entre effets qualitatifs et quantitatifs sur l'activité de filtration de la moule. Il est intéressant de noter qu'après 48 h d'exposition, le TF ne subit pas d'effet en présence de 0,5 ppm alors que dans les premières 24 h, cette concentration affecte significativement le comportement (cf chap II.3.). Ceci paraît indiquer qu'entre 24 et 48 h, l'animal récupère une activité normale, ce qui constituerait une adaptation au métal. Cette adaptation à de faibles concentrations de Zn a été constatée par d'autres auteurs ; par exemple, Watling (1981) a remarqué chez *Perna perna* que l'effet inhibiteur du Zn (0,6 ppm) s'exerce au début de l'exposition mais s'annule au bout de 48 heures ; l'auteur a assimilé ce phénomène à une acclimatation au métal. Chez *Dreissena* même, Ebersveiller (1988) a noté que la réduction du TF qui apparaît le premier jour en présence de 0,35 ppm s'annule dès le quatrième jour. Or, en présence de 0,5 ppm, nos résultats mettent en évidence un effet inhibiteur au 8^{ème} et au 15^{ème} jour d'exposition, ce qui indique un effet cumulatif. L'accentuation apparente des effets des autres concentrations en fonction du temps indique aussi un tel effet.

Un des aspects importants de l'action du Zn est l'allure des courbes concentrations-effets après 1 et 2 semaines d'exposition (fig 29B et C). On constate un effet dépendant de la concentration avec une pente forte entre 0,5 et 1 ppm et modérée entre 1 et 2 ppm. Cette évolution indique l'existence d'un seuil de concentration au-delà duquel l'effet évolue lentement.

L'interprétation de l'effet inhibiteur du Zn vis-à-vis du TF de *Dreissena* nécessite d'élucider les effets sur les facteurs dont dépend essentiellement le niveau de filtration chez les bivalves ; ces facteurs sont (Foster-Smith, 1976 ; Manley, 1983 ; Mohan *et al.*, 1986a) :

- l'activité valvaire, et particulièrement les durées d'ouverture et de fermeture
- l'activité ciliaire, notamment celle des cils branchiaux latéraux, responsables de la création et de l'intensité des courants de filtration
- l'activité des siphons et leur état d'ouverture.

Il est établi que le zinc n'a pas d'effets inhibiteurs directs sur l'activité ciliaire. Brown et Newell (1972) ont montré que de très fortes concentrations (250-500 ppm Zn) n'altèrent pas les mouvements ciliaires sur la branchie isolée de *Mytilus*. Il est donc très improbable que l'action manifestée dans nos expériences soit due à une action ciliaire directe.

Les effets sur l'activité valvaire et siphonale ont été largement décrits dans l'étude comportementale (cf chap II.3.). Nous avons notamment montré qu'en période d'ouverture des valves, l'activité est discontinue et que les durées de fermeture sont nettement prolongées par rapport aux témoins. Il est donc certain que ces effets comportementaux sont à l'origine des réductions du TF observées dans le présent essai.

Il existe peu de données bibliographiques quantitatives sur l'action du Zn sur la filtration chez les bivalves. Abel (1976) a déterminé chez *Mytilus* une CE50 de 1,6 ppm pour l'exposition immédiate. Watling (1981) a également calculé des CE50-15-48 h entre 0,75 et 2 ppm pour quatre bivalves marins (*Perna perna*, *Chromomytilus meridionalis*, *Crassostrea margaritacea*, *Crassostrea gigas*). Nos résultats pour 48 h d'exposition sont proches de ces données et montrent la sensibilité de la fonction de filtration de *Dreissena* vis-à-vis du Zn.

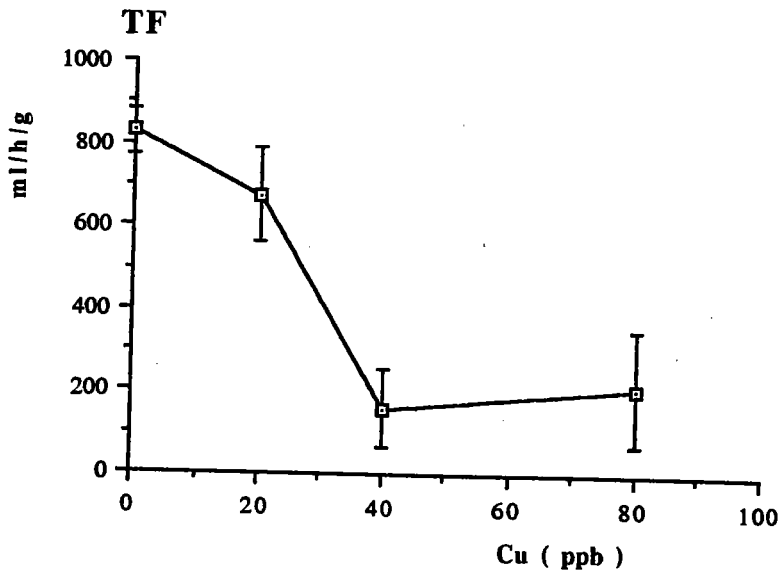


Fig 28 : Taux de filtration après 48h d'exposition au Cu.

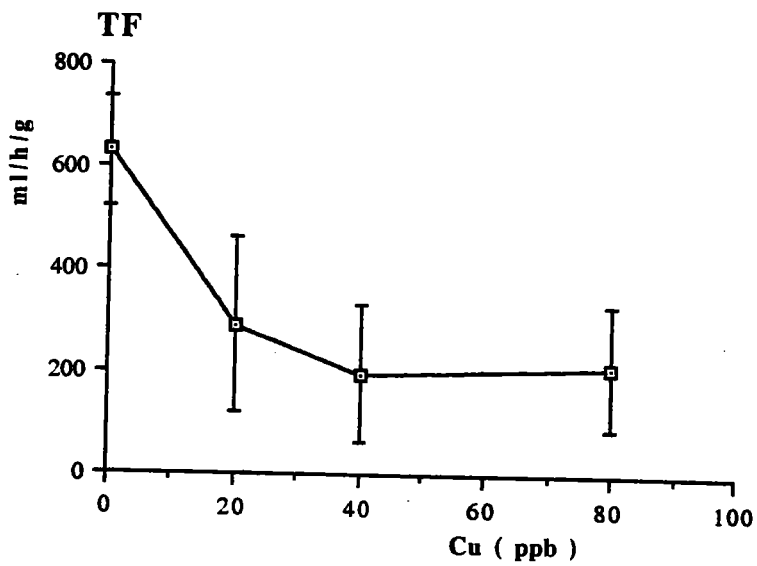


Fig 29 : Taux de filtration après 1 semaine d'exposition au Cu.

III.4. EFFETS DU CUIVRE SUR LE TF DE *DREISSENA*

III.4.1. Choix des concentrations

L'étude comportementale a montré que les concentrations testées (20, 40 et 80 ppb Cu) provoquent toutes des modifications de l'activité dans les 24 premières heures ; ces mêmes concentrations ont été choisies pour le présent essai ; les mesures du TF ont lieu après 48 h et 1 semaine d'exposition.

III.4.2. Résultats (Annexe V)

* TF après 48 h d'exposition (fig 28)

La concentration de 20 ppb Cu provoque une légère réduction (18% en moyenne) non significative ($\alpha = 0,05$) du TF. Par contre, les réductions observées pour les concentrations supérieures sont très fortes avec, en moyenne, 80% pour 40 ppb et 75% pour 80 ppb. Cependant, ces deux valeurs ne sont pas significativement différentes entre elles. En ne tenant compte que des valeurs moyennes, la CE50-48 h est égale à 32,8 ppb.

* TF après 1 semaine d'exposition (fig 29)

A ce stade de l'exposition, l'effet de réduction du TF est significatif à toutes les concentrations testées. Mais la comparaison, deux à deux, des effets des trois concentrations révèle que les effets ne diffèrent pas significativement ($\alpha = 0,05$). En moyenne, la réduction du TF est de 54% pour 20 ppb, 69% pour 40 ppb et 51% pour 80 ppb (moyenne des moyennes : 58%). La CE50-8 j n'a pas pu être calculée. La comparaison des effets respectifs en présence de 40 et 80 ppb indique une atténuation entre 48 h et 1 semaine d'exposition.

III.4.3. Discussion

Le seuil de toxicité du Cu vis-à-vis du TF de *Dreissena* est au moins égal à 20 ppb pour l'exposition d'une semaine ; il est à noter que ce seuil est inférieur d'environ 10 fois à la CE50-96 h (191 ppb Cu). Les résultats indiquent une évolution différente selon les concentrations en métal. Pour 20 ppb, la toxicité ne se manifeste significativement qu'après 1 semaine tandis que pour 40 et 80 ppb, l'effet observé à 48 h semble s'atténuer légèrement au bout d'une semaine. Dans le premier

cas, il s'agit d'un effet cumulatif pour une faible concentration alors que le deuxième cas révèle une légère acclimatation des animaux à la présence de concentrations fortement toxiques au départ.

Au regard des concentrations testées, le Cu s'avère extrêmement toxique pour le taux de filtration de *Dreissena*, avec un effet à court terme (48 h) très marqué. Plusieurs auteurs ont montré des effets importants pour l'exposition immédiate et à court terme au Cu chez les bivalves ; Abel (1976) a trouvé une CE50 de 150 ppb pour l'exposition immédiate chez *Mytilus* tandis que Manley (1983) l'a déterminée à 30 ppb. D'autre part, Watling (1981) a déterminé chez quatre espèces de bivalves marins des CE50-8 h entre 60 et 160 ppb. Les résultats trouvés chez *Dreissena* (CE50-48 h = 32,8 ppb) permettent de situer l'espèce parmi les plus sensibles à l'action du Cu sur le TF. Rappelons que la même conclusion a été dégagée précédemment pour l'effet létal (cf chap. I.5.).

Les effets à moyen terme du Cu sur le TF des bivalves ont été peu étudiés. Les données de Grace et Gainey (1987) révèlent une très forte action après 5 jours d'exposition chez *Mytilus* (CE50 = 2 ppb). Il faut noter cependant que la variabilité des résultats de l'auteur est très élevée. Smith (1985), lors d'une exposition intermittente (1 jour sur 2) pendant 62 jours à de faibles concentrations de Cu (0,1 ; 1 et 10 ppb), a montré une stimulation de la rétention des algues à toutes ces concentrations pour une mesure de 20 mn ; cet effet n'est pas retrouvé quand la mesure se poursuit pendant 40 mn (rétention identique à celle des témoins).

Différentes études attribuent la forte action du Cu sur la filtration des bivalves à son effet sur le comportement (Rodgers *et al.*, 1980 ; Watling, 1981 ; Manley, 1983) et/ou à son effet inhibiteur sur l'activité ciliaire (Howell *et al.*, 1984 ; Grace et Gainey, 1981).

La toxicité comportementale du Cu pour les 24 premières heures a déjà été étudiée (chap. II.4.). Il a été notamment montré que dès 20 ppb, des modifications de l'activité de filtration apparaissent (périodes d'activité intermittente, durées de fermeture des valves plus longues), ces modifications s'accroissant aux concentrations supérieures.

Quant à l'action sur l'activité ciliaire, une inhibition directe au niveau des cils est peu probable compte tenu des concentrations utilisées. Howell *et al.* (1984) ont testé des concentrations allant jusqu'à 800 ppb Cu sur la branchie isolée de *Mytilus* et n'ont relevé aucune inhibition des battements ciliaires. Par contre, une action indirecte via le nerf branchial est probable puisque les auteurs précités ont montré que le Cu (50 à 800 ppb) n'a pas d'effet sur le TF d'animaux traités avec de la réserpine (composé antidopaminergique, la dopamine étant le neurotransmetteur des fibres inhibitrices du nerf branchial) et dont les muscles adducteurs antérieurs ont été sectionnés pour éviter la fermeture des valves. Ces mêmes animaux avaient montré une forte réduction du TF avant l'injection de la réserpine. Les auteurs ont conclu à l'existence de chemorécepteurs qui détectent le Cu,

après quoi le nerf branchial exerce une inhibition sur l'activité ciliaire. Les auteurs attribuent l'effet exclusivement à l'inhibition de l'activité ciliaire puisque les valves restent ouvertes du fait de la section des adducteurs. Ils ont cependant négligé le contrôle très efficace de la filtration par l'activité des siphons, et qui s'exerce même chez l'animal largement ouvert (cf chap II). Smith (1985) a également montré l'augmentation de la concentration en dopamine dans le ganglion viscéral (d'où part le nerf branchial ; Franc, 1960) de *Mytilus* lors d'une exposition chronique au cuivre. L'auteur a observé une diminution parallèle de la densité des sites récepteurs de la dopamine dans la branchie, ce qui pourrait constituer une adaptation compensatrice qui permettrait de limiter l'effet de l'augmentation de la concentration en dopamine. Ce phénomène pourrait être responsable en partie, dans notre essai, de l'acclimatation aux concentrations de 40 et 80 ppb observées après une semaine d'exposition. Cette atténuation de l'effet est probablement aussi le résultat d'une détoxification partielle du métal grâce à la fixation sur des ligands cellulaires comme les protéines, et plus particulièrement les métallothionéines (MT). Les MT sont connues pour leur affinité pour les métaux et interviennent dans leur homéostasie (George et Viarengo, 1985). Plusieurs auteurs ont montré l'induction de la synthèse de MT chez les bivalves suite à l'exposition au Cu (Engel et Brouwer, 1982 ; Harrison et Lam, 1985 ; Viarengo *et al.*, 1985). Le Cu étant un métal essentiel, sa reconnaissance et l'induction des MT correspondantes sont probablement rapides. Par exemple, chez *Mytilus galloprovincialis*, un temps d'exposition de 2 jours à 40 ppb Cu est suffisant pour que cette synthèse soit induite (Viarengo *et al.*, 1985). Dans notre essai, la persistance de la toxicité montre toutefois que la détoxification ne permet pas, à ce stade de l'exposition, de compenser sérieusement l'activité du flux entrant du métal.

III.5. EFFETS DU MERCURE SUR LE TF DE *DREISSENA*

III.5.1. Choix des concentrations

Les concentrations testées sont 50, 100 et 200 ppb Hg. L'étude comportementale a montré que *Dreissena* réagit à des concentrations inférieures, mais 50 ppb ont été retenus comme concentration minimale du fait de leur effet significatif sur le comportement de filtration.

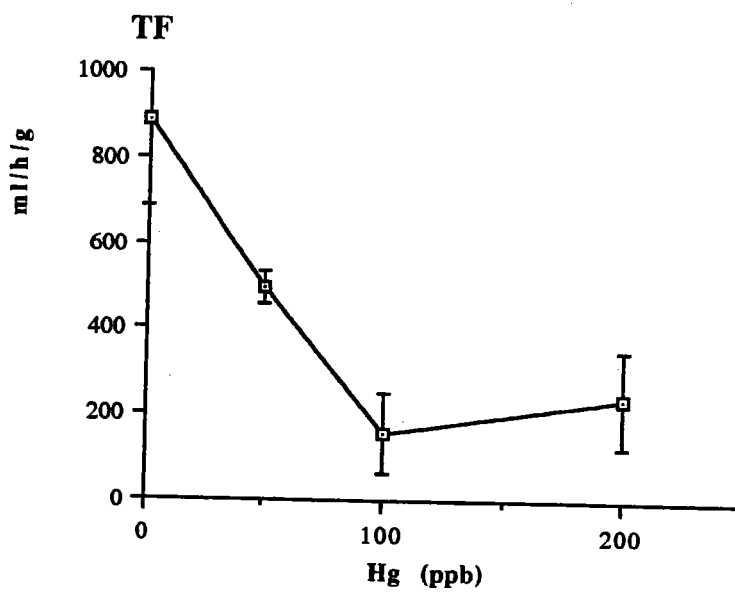


Fig 30 : TF après 48h d'exposition au mercure.

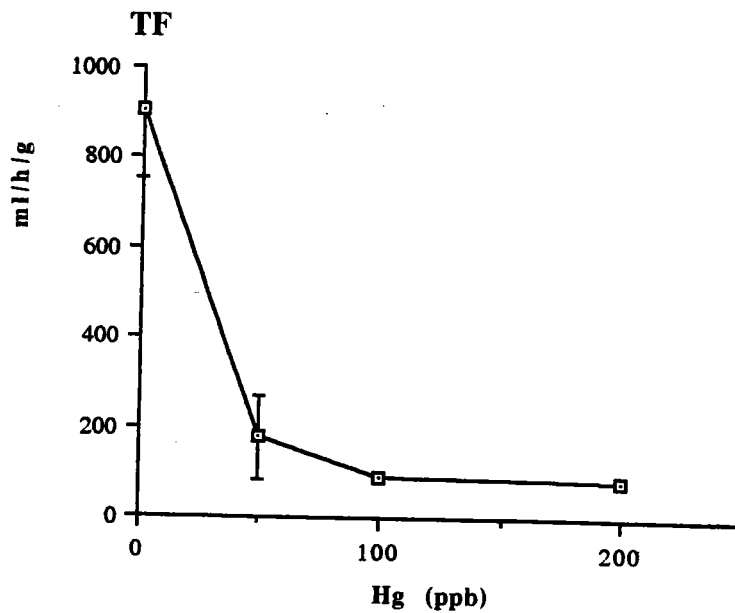


Fig 31 : TF après 1 semaine d'exposition au mercure.

III.5.2. Résultats (Annexe VI)

* TF après 48 heures d'exposition (fig 30)

La concentration de 50 ppb provoque une réduction significative ($\alpha = 0,05$) du TF (56% en moyenne). Des effets plus importants sont enregistrés à 100 et 200 ppb, respectivement 82% et 73%. Ces deux dernières valeurs ne sont pas statistiquement différentes entre elles. La CE50-48 h, calculée à partir des valeurs moyennes, est de 21,2 ppb Hg.

* TF après 1 semaine d'exposition (fig 31)

L'effet inhibiteur de la filtration s'amplifie pour les lots exposés à 50 ppb par rapport à l'effet obtenu à 48 h (ici 80% de réduction par rapport aux témoins). Une amplification de l'effet est également constatée pour 100 et 200 ppb (respectivement 90% et 91% de réduction). Les effets des trois concentrations ne sont toutefois pas différents entre eux ($\alpha = 0,05$). La CE50-1 semaine estimée à partir de ces résultats est de 4,8 ppb Hg.

III.5.3. Discussion

Les résultats de cet essai permettent d'affirmer que le seuil de toxicité du Hg pour le TF de *Dreissena* est inférieur à 50 ppb pour les deux types d'exposition (court et moyen terme). Bien que les résultats ne permettent pas de calculer la CE50-48 h avec une grande fiabilité (il faudrait des résultats encadrant 50% d'effet), la valeur estimée ici permet néanmoins de situer le seuil de toxicité comme étant proche de 20 ppb. Cette valeur est inférieure de plus de 20 fois à la CE50-96 h (420-450 ppb selon la saison, ch I.6.). Ces données concernant *Dreissena* sont très proches de celles rapportées chez d'autres bivalves. Abel (1976) a déterminé chez *Mytilus edulis* une CE50-30 mn de 40 ppb, tandis que Mohan *et al.* (1986b) ont obtenu une CE50-12 h de 50 à 55 ppb chez *Modiolus carvalhoi*, *Modiolus sp* et *Donax spiculum*. Comme dans notre essai, ces auteurs observent peu de différence entre les effets des concentrations supérieures à la CE50 (pour 60 à 140 ppb Hg, l'effet varie de 56% et 70%).

Concernant des expositions de plusieurs jours, les études de Mohan *et al.* (1986a) chez *Perna perna* fixent un niveau de toxicité (CE50-96 h = 20 ppb Hg) remarquablement proche de celui obtenu dans le présent essai. Micallef et Tyler (1990) rapportent un résultat très proche également chez *Mytilus edulis* (86% de réduction du TF en 5 jours, en présence de 50 ppb Hg).

Si on compare les effets respectifs du Cu et du Hg, on remarque que la CE50-48 h du Hg est inférieure à la CE50-48 h du Cu. Il est également intéressant de noter qu'après une semaine d'exposition, il n'y a pas d'atténuation de l'effet du Hg sur le TF, mais plutôt une amplification. Si l'on tient compte des rapports molaires entre les deux métaux, on peut conclure que le mercure exerce une toxicité supérieure à celle du Cu vis-à-vis du TF, notamment lors de l'exposition d'une semaine. Des conclusions identiques ont été rapportées par Abel (1976) chez *Mytilus* et par Watling et Watling (1982) chez *Perna perna*. La toxicité vis-à-vis du TF est certainement la conséquence des effets comportementaux du métal. Ceux-ci ont été précédemment caractérisés pour les 24 premières heures de l'exposition (chap II.5.). L'étude a montré que l'activité devient discontinue et intermittente avec de longues périodes de fermeture. Etant donné les similitudes avec les effets du Cu, il est vraisemblable que le mécanisme de toxicité soit le même pour les deux métaux ; celui-ci a été précédemment discuté (cf chap III.4.3.). Une indication sur l'action au niveau ciliaire a été rapportée récemment par Micallef et Tyler (1990) chez *Mytilus* ; ces auteurs ont montré qu'une concentration de 50 ppb affectait légèrement l'activité ciliaire branchiale lors d'une exposition de 120 h, cette action n'étant cependant significative que pour 96 h. Un tel effet est probable chez *Dreissena* dans le présent essai, surtout en présence de 100 et 200 ppb.

La persistance d'une forte toxicité après une semaine d'exposition indique peut-être une différence du comportement intérieur de ce métal par rapport au Cu. Ce dernier étant un métal essentiel, bien reconnu par la cellule, il est concevable que les mécanismes de sa détoxification, notamment la synthèse de métallothionéines, soient rapidement déclenchés. Le cas du Hg est différent puisque celui-ci est un vrai xénobiotique et l'induction des synthèses de MT demande peut-être un temps de latence plus long.

III.6. EFFETS DU CADMIUM SUR LE TF DE *DREISSENA*

III.6.1. Choix des concentrations

L'étude de toxicité létale (chap. I.7.) a montré que le Cd n'a pas d'effet létal significatif, même à des concentrations aussi élevées que 14 ppm. Néanmoins, l'animal réagit du point de vue comportemental à des concentrations relativement faibles (150-200 ppb). Pour quantifier l'effet au niveau de la filtration, les concentrations suivantes ont été choisies : 0,2 ; 0,4 et 0,8 ppm Cd.

III.6.2. Résultats (Annexe VII)

* TF après 48 heures d'exposition (fig 32)

Une légère réduction (16% en moyenne), non significative ($\alpha = 0,05$), est provoquée par 0,2 ppm Cd. Les réductions constatées avec 0,4 et 0,8 ppm sont respectivement de 32% et 68% en moyenne, mais seul l'effet de 0,8 ppm est statistiquement significatif. Pour l'ensemble des concentrations, on constate une évolution linéaire de la relation concentration-effet. Sur la base des valeurs moyennes du TF, la CE50-48 h calculée est de 0,55 ppm.

* TF après 1 semaine d'exposition (fig 33)

L'effet inhibiteur de la filtration est significatif à partir de 0,4 ppm. On constate une amplification de l'effet des concentrations de 0,2 et 0,4 ppm par rapport à l'exposition de 48 h. La CE50-1 semaine, calculée à partir des valeurs moyennes, est de 0,32 ppm. Il est à noter que pour l'ensemble de l'essai, la plus forte réduction du TF constatée ne dépasse pas 68% (obtenue avec 0,8 ppm Cd après 48 h d'exposition).

III.6.3. Discussion

D'après les résultats obtenus, le seuil de toxicité pour l'ensemble de l'essai semble être inférieur à 0,4 ppm. De même que pour les autres métaux, la toxicité dépend de la concentration en métal pour l'exposition de court terme (48 h), puis cette relation devient moins nette après une semaine du fait de l'amplification de l'effet de 0,2 et 0,4 ppm alors que celui-ci, en présence de 0,8 ppm, reste inchangé.

Les données bibliographiques montrent que l'effet du Cd sur la filtration des bivalves est très variable selon les espèces. Ainsi, Watling (1981) donne des CE50-8 h de 0,61 et 0,85 ppm, respectivement pour *Crassostrea gigas* et *Crassostrea margaritacea* tandis que, dans les mêmes conditions expérimentales, les CE50-8 h pour *Perna perna* et *Chromomytilus meridionalis* sont respectivement égales à 28 ppm et 35 ppm. Mohan *et al.* (1986b) ont déterminé chez trois autres espèces marines des CE50-12 h allant de 0,5 ppm à 3,4 ppm. Au regard de ces données, *Dreissena* se situe parmi les espèces les plus sensibles à l'action du Cd en ce qui concerne la TF ; à l'inverse, l'espèce ne montre pas une grande sensibilité pour l'effet létal.

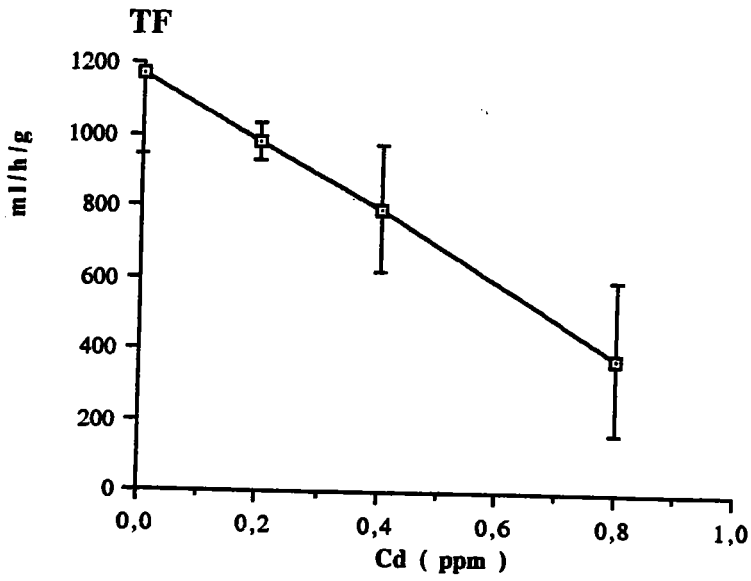


Fig. 32 : TF après 48h d'exposition au Cd.

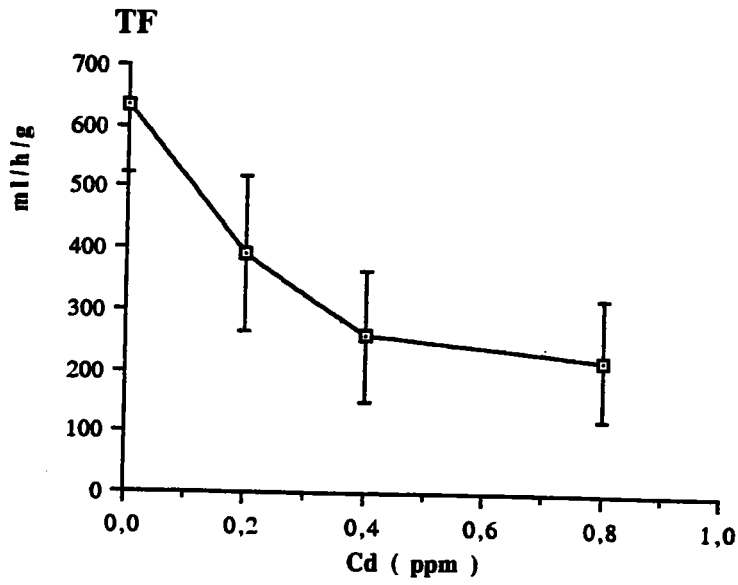


Fig. 33 : TF après 1 semaine d'exposition au Cd.

Dans une exposition de plusieurs jours, Mohan *et al.* (1986a) rapportent une CE50-96 h de 0,82 ppm Cd chez *Perna viridis* mais, comme dans notre essai, les auteurs remarquent que des concentrations supérieures n'intensifient pas énormément l'effet (72% de réduction du TF avec 1,5 ppm Cd).

Il est peu probable qu'aux concentrations utilisées, le Cd puisse exercer un effet inhibiteur sur l'activité ciliaire. Sunila (1981) rapporte à cet égard qu'il faut des concentrations supérieures à 5 ppm pour observer une altération du fonctionnement des cils branchiaux. L'inhibition de la filtration s'exerce donc surtout par l'effet du métal au niveau du comportement. Les résultats concernant les premières 24 h (chap II.6.) montrent que l'exposition s'accompagne d'une modification de l'activité (qui devient intermittente) et de périodes de fermeture des valves prolongées.

La persistance de la toxicité après une semaine d'exposition indique qu'il n'y a pas d'acclimation au métal, du moins en présence des concentrations testées. Il est très probable que l'effet puisse durer lors d'expositions plus prolongées. C'est le cas chez *Saccostrea commercialis* qui montre un TF réduit (19 à 27% de réduction) après 45 jours d'exposition à 0,01 , 0,05 et 0,1 ppm Cd (Ward, 1982).

III.7. EFFETS DU PLOMB SUR LE TF DE *DREISSENA*

III.7.1. Choix des concentrations

L'action du Pb sur le comportement de filtration de *Dreissena* se manifeste déjà à 0,5 ppm (chap II.7.). Cependant, durant l'exposition pendant 24 h à cette concentration, on observe encore des périodes de filtration continue. Pour cette étude quantitative, nous avons choisi les concentrations suivantes : 1, 2 et 4 ppm Pb.

III.7.2. Résultats (Annexe VIII)

* TF après 48 heures d'exposition (fig 34)

Tous les lots exposés montrent des TF significativement inférieurs à celui des témoins. Les réductions subies vont de 54% avec 1 ppm à 80% et 82% pour 2 et 4 ppm respectivement. Les effets de ces deux dernières concentrations ne sont pas significativement différents entre eux. La CE50-48 h calculée à partir des valeurs moyennes est de 0,73 ppm.

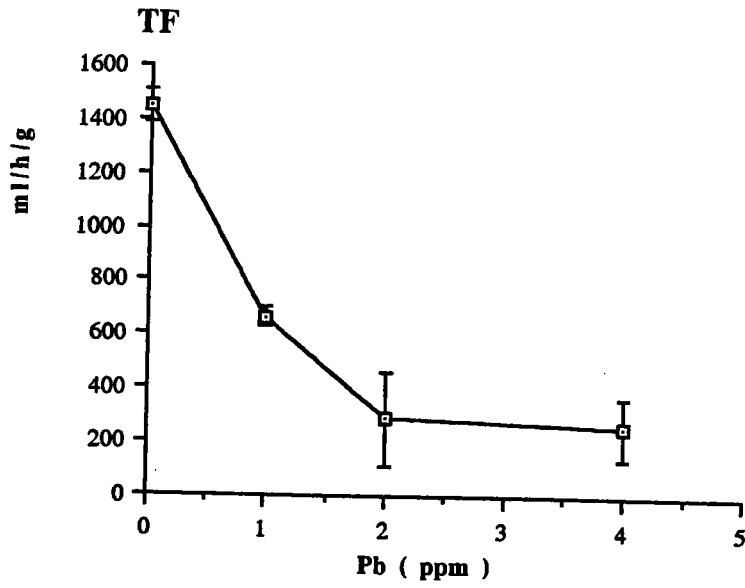


Fig. 34 : TF après 48h d'exposition au Pb.

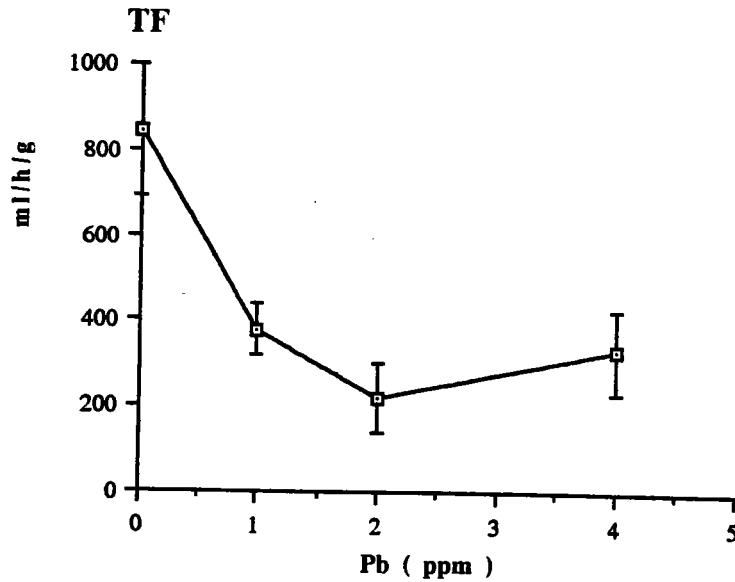


Fig. 35 : TF après 1 semaine d'exposition au Pb.

* TF après 1 semaine d'exposition (fig 35)

Les effets des différentes concentrations testées sont significatifs ici également. Les pourcentages d'inhibition par rapport aux témoins sont de 45%, 74% et 61%, respectivement pour 1, 2 et 4 ppm. La comparaison avec ceux constatés à 48 h indique une légère atténuation de l'effet après 1 semaine d'exposition. La CE50-1 semaine calculée à partir des valeurs moyennes est de 0,84 ppm.

III.7.3. Discussion

Les résultats de cet essai montrent que le seuil de toxicité du Pb vis-à-vis du TF de *Dreissena* est au moins égal à 1 ppm. Mais compte tenu des valeurs des CE50 trouvées à 48 h et à 1 semaine, ce seuil peut être situé comme étant inférieur à 0,7 ppm Pb. L'étude comportementale a révélé que le Pb agit dès les premières 24 h par l'augmentation, la durée de fermeture des valves et la perturbation du débit de filtration ; cette action est observée même en présence de 0,5 ppm. Il est probable que le seuil de toxicité pour le TF soit proche de cette valeur. Elle se poursuit certainement au-delà de 24 h puisque, lors d'une expérience sur l'effet du Pb vis-à-vis de la consommation d'O₂ de *Dreissena* (cf chap IV.6.4.), un suivi de l'activité a montré que celle-ci était très perturbée (intermittente avec longues fermetures) après 1 et 2 semaines d'exposition.

Très peu de données bibliographiques existent sur la toxicité du Pb vis-à-vis de la filtration des bivalves. Les CE50-15 h rapportées par Watling (1981) chez *Perna perna* et *Chromomytilus meridionalis* sont respectivement 4,17 et 4,40 ppm. Ces valeurs sont très inférieures à celles trouvées dans le présent essai pour *Dreissena*.

III.8. DISCUSSION GENERALE DE LA TOXICITE DES METAUX VIS-A-VIS DU TAUX DE FILTRATION DE *DREISSENA*

Tableau 49 : Calcul des niveaux de CE50 des différents métaux vis-à-vis du TF de *Dreissena*.

Métal	CE50 (ppb)
Zn	757 (8 j)
	583 (15 j)
Cu	32,8 (48 h)
Hg	21,2 (48 h)
	4,8 (8 j)
Cd	550 (48 h)
	320 (8 j)
Pb	730 (48 h)
	840 (8 j)

Les données résumées dans le tableau 49 montrent que la toxicité physiologique s'exerce à des niveaux largement inférieurs au seuil de toxicité létale.

Lors des discussions métal par métal, nous avons essayé d'élucider le mécanisme de toxicité vis-à-vis de la filtration. Il est apparu, d'après l'étude comportementale (chap. II) et les différentes données bibliographiques, que la toxicité est essentiellement due à l'action sur le mode de filtration. Selon les données bibliographiques, les conséquences d'une action au niveau de l'activité ciliaire branchiale seraient minimales lors de l'exposition de court terme même pour des métaux dont l'action est puissante (exemple : le mercure, Micallef et Tyler, 1990). De plus, selon le modèle d'interprétation des caractéristiques de la pompe branchiale des bivalves élaboré par Jorgensen *et al.* (1988, 1990), une réduction de l'activité ciliaire n'aurait pas un grand effet sur le taux de pompage. Par contre, selon ce même modèle, ce sont les activités valvaire (niveaux d'ouverture) et siphonale (états d'ouverture) qui déterminent le niveau d'écoulement de l'eau dans la cavité palléale.

Tout au long de cette étude, la comparaison des résultats avec les données sur les autres espèces a permis de situer *Dreissena* parmi les espèces les plus sensibles à l'action des métaux sur le TF. Il semble que seule *Corbicula fluminea* soit plus sensible.

La durée d'une semaine pour les essais a été choisie afin de rendre compte de la toxicité à moyen terme ; il est vraisemblable que, de même que cela a été démontré pour le zinc après 2 semaines, les effets observés subsisteraient au-delà de cette période tant que l'exposition continue. Cette toxicité physiologique engendrerait alors un déficit dans la croissance et la reproduction, voire la mortalité. Il est également vraisemblable que les seuils de toxicité chroniques soient plus faibles que ceux trouvés pour la durée d'une semaine.

Du point de vue de l'utilisation de *Dreissena* pour la surveillance de l'état de contamination de l'environnement, il est évident que si les concentrations effectives dépassent les seuils de toxicité, la moule ne pourra intégrer de manière efficace cette contamination puisqu'elle n'interagirait pas librement avec le milieu du fait de la toxicité. Cette constatation met en question la signification des études de bioaccumulation effectuées en laboratoire avec utilisation de concentrations élevées. La raison généralement évoquée étant le compromis relatif à la durée de l'essai (on augmente les concentrations pour diminuer cette durée), la présente étude met en évidence les biais de telles applications. Il est par contre exact qu'en dessous des seuils de toxicité, l'organisme ne subira aucune contrainte qui l'empêcherait d'interagir librement avec son milieu ; le mode de bioaccumulation dépendra alors d'autres facteurs (biochimiques et environnementaux).

CHAPITRE IV :

EFFETS DE L'EXPOSITION SUBLETALE AUX METAUX SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE CHEZ *DREISSENA*

IV.1. ETUDE PRELIMINAIRE : facteurs de variation et variabilité de la consommation d'oxygène chez *Dreissena*

IV.1.1. But de l'étude

Avant d'entreprendre des expériences de toxicité des métaux vis-à-vis de la respiration chez *Dreissena*, il nous a paru nécessaire d'établir les caractéristiques de la consommation d'oxygène (VO_2) chez la population de référence (Villey-le-Sec), ceci afin de cerner sa variabilité naturelle et l'effet des facteurs biotiques et abiotiques en dehors de toute action toxique.

Il existe quelques données dans la littérature, relatives à ces facteurs de variation (Woynarovich, 1961 ; Dorgelo et Smeenk, 1988), mais étant donné que la physiologie des populations naturelles dépend essentiellement des facteurs environnementaux du site, nous avons jugé utile d'entreprendre cette étude sur la population de référence.

Les facteurs étudiés sont : la température, la diminution de la pression partielle d' O_2 , la taille des individus, la saison et le jeûne.

IV.1.2. Influence de la température sur la VO_2 chez *Dreissena*

IV.1.2.1. Choix des températures

L'intervalle de température testé s'étend de $+5^\circ$ à $+30^\circ C$; cette température supérieure est sans effet léthal sur les dreissènes de la Moselle quand l'acclimatation aux conditions de laboratoire est suffisamment longue (5 jours) (Tourari, 1988).

L'acclimatation se fait progressivement, en 7 jours au minimum, à partir de la température du site de prélèvement qui était de $7^\circ C$ (mois de Mars), soit une élévation maximale de $3^\circ C/jour$.

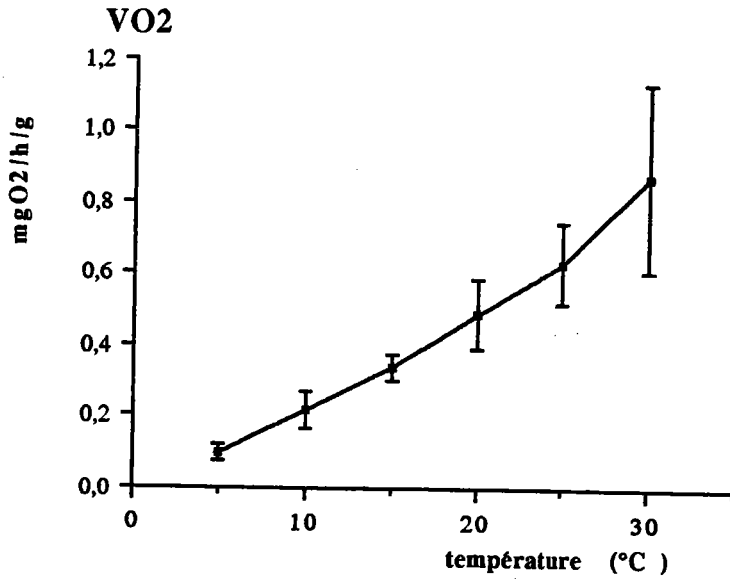


Fig. 36 : Niveaux de VO2 en fonction de la température d'acclimation.

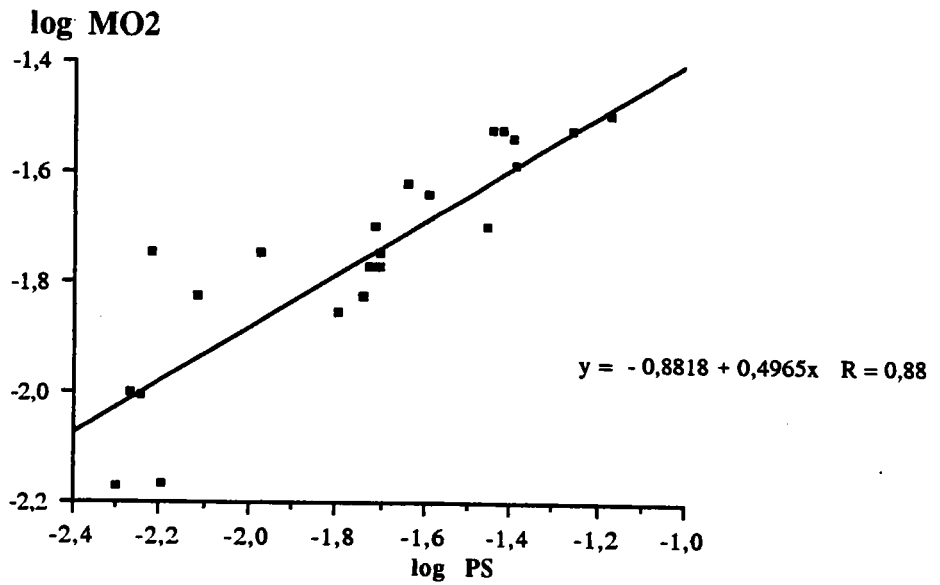


Fig. 37 : droite de régression de la consommation d'oxygène en fonction du poids sec (relation log/log).

IV.1.2.2. Résultats et discussion

La figure 36 montre l'évolution de la VO_2 en fonction des températures croissantes.

On note que la VO_2 croît régulièrement avec l'élévation de la température. La comparaison des valeurs successives deux à deux montre que l'effet d'élévation est significatif dans tous les cas ($\alpha = 0,05$). On note également que la variabilité se situe généralement autour de 20% sauf pour la valeur à 30°C où elle est de 30%, ce qui indiquerait une action néfaste de cette température. D'après les données de Woynarovich (1961), les dreissènes du lac Balaton (Hongrie) meurent déjà à 30°C ; nous n'avons observé aucune mortalité dans nos expériences. Il est vraisemblable que la mortalité observée par l'auteur soit due au choc thermique subi lors d'une acclimatation trop brève (12 heures) (Tourari, 1988).

La variabilité élevée (autour de 20%) est une caractéristique importante de la respiration chez *Dreissena* ; une tendance similaire ressort des données de Woynarovich (1961) (entre 8% et 35%) ainsi que de celles de Dorgelo et Smeenck (1988).

Les valeurs trouvées ici pour la VO_2 sont plus faibles que celles rapportées dans la littérature. Par exemple, pour 20°C nous trouvons une VO_2 de 0,49 $mgO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ alors que Woynarovich (1961) et Dorgelo et Smeenck (1988) rapportent pour la même température des valeurs, respectivement de 1,32 $mgO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ et de 3,35 $mgO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$. Il est difficile de comparer les trois données à cause des différences dans les conditions expérimentales, notamment dans la durée d'acclimatation. En effet, les acclimations de 12 h et 18 h pratiquées respectivement par les auteurs sont vraisemblablement à l'origine de chocs thermiques pour les moules, ce qui expliquerait les VO_2 élevées. Une autre source de différence peut être le stade gamétogénétique des animaux lors de la mesure : nous observons nous-mêmes une différence entre les VO_2 mesurées à différentes saisons de l'année ; cet aspect de la physiologie de la moule sera traité dans le paragraphe IV.1.5.

Nos résultats sont par contre du même ordre de grandeur que ceux trouvés par Hamburger et Dall (1990) ; une VO_2 de 0,41 $mgO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$ peut être calculée d'après leurs données pour la température de 11°C.

Dans nos essais de toxicité des métaux vis-à-vis de la respiration, nous avons choisi de travailler à 20°C qui est une température favorable à l'espèce du point de vue physiologique (Woynarovich, 1961 ; Tourari, 1988).

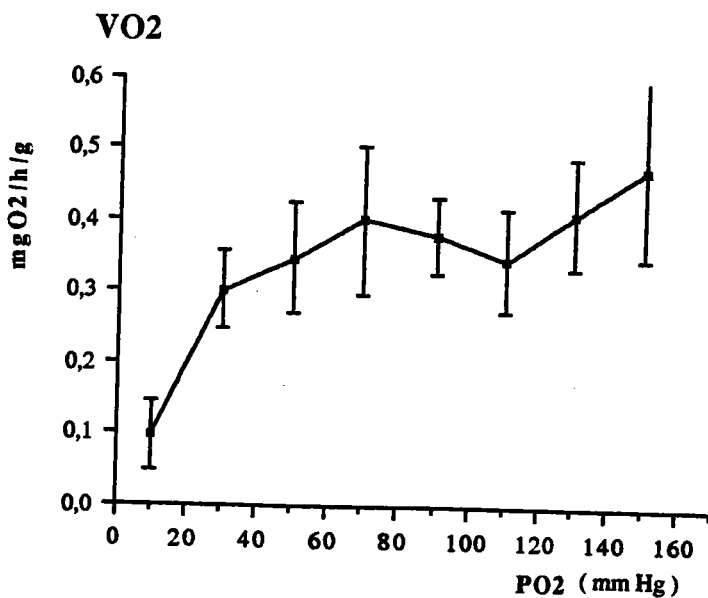


Fig. 38 : Niveaux de VO2 en fonction de la pression partielle d'oxygène.

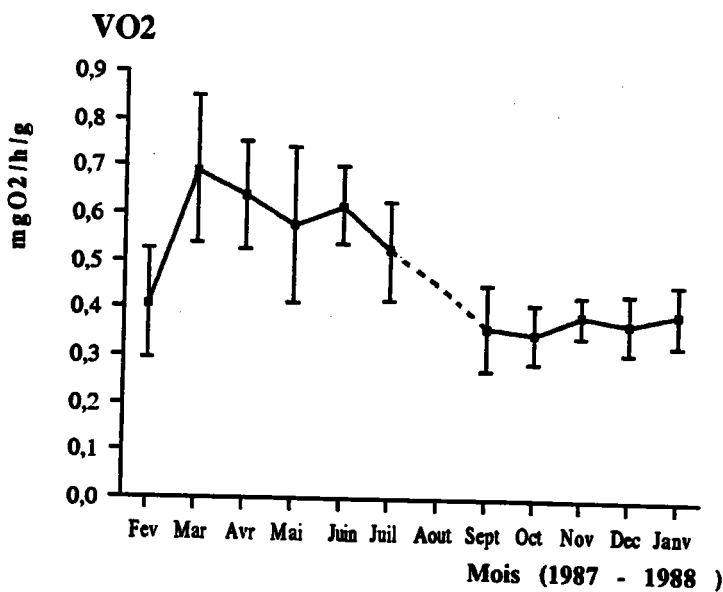


Fig. 39 : Evolution annuelle de la VO2 (acclimatation à 20°C).

IV.1.3. Influence du poids sur la VO₂

Afin d'étudier l'évolution de la VO₂ en fonction de la taille des individus, des moules mesurant entre 10,2 et 28,3 mm ont été acclimatées à 20°C et expérimentées individuellement pour déterminer leur consommation d'oxygène.

Les résultats sont représentés dans la figure 37.

L'équation de régression de la forme $MO_2 = a W^b$ qui décrit l'influence de la taille (W) sur la consommation d'oxygène (MO₂) est la suivante : $MO_2 = 0,131 \cdot W^{0,496}$ ($r = 0,88$). Le coefficient $b = 0,496$ trouvé ici se situe dans la gamme de valeurs rencontrées chez les bivalves (0,4 à 0,9) (Bayne *et al.*, 1976) mais il est inférieur à la valeur moyenne (0,71) revue par Bayne *et al.* (1976). Il est établi que le coefficient b est lié à d'autres facteurs tels que la température, la saison et l'état nutritionnel (Widdows, 1978). La valeur trouvée pour b, inférieure à 1, montre cependant que la VO₂ n'est pas linéairement proportionnelle à la taille, d'où la nécessité de contrôler dans la suite des expériences la variable taille en nous limitant à une classe de taille aussi étroite que possible. Nous avons choisi la classe de taille 20-24 mm qui correspond à des individus matures sexuellement et ayant deux ans au minimum (Tourari, 1988).

IV.1.4. Influence de la diminution de la pression partielle d'O₂ (pO₂) sur la VO₂

L'essai consiste à laisser respirer les lots de moules jusqu'à épuisement de l'oxygène dissous. La VO₂ est ensuite calculée pour chaque intervalle de 20 mm Hg entre 160 mm Hg (saturation) et 0 mm Hg (Figure 38).

L'analyse des résultats montre qu'au-delà d'une pO₂ de 40 mm Hg, il n'y a pas de différence significative ($\alpha = 0,05$) entre les VO₂ en fonction des pO₂. La consommation d'oxygène chez *Dreissena* reste donc indépendante de la diminution de la pO₂ jusqu'à une valeur de 40 mm Hg. Cette évolution concorde bien avec l'interprétation de la relation entre VO₂ et pO₂ formulée par Jorgensen *et al.* (1986). Cette interprétation se résume comme suit : à faible pO₂, l'oxygène qui diffuse dans les tissus est consommé en périphérie ; le chemin de diffusion est donc court et la VO₂ augmente rapidement quand la pO₂ augmente. Mais comme la capacité oxydative des tissus périphériques devient saturée, l'O₂ diffuse plus profondément, ce qui rend le chemin de diffusion plus long et accroît corrélativement la résistance diffusive, ce qui équivaut à une atténuation de l'augmentation de la VO₂ avec la pO₂ croissante. Quand l'O₂ atteint tous les tissus, la VO₂ cesse de dépendre de la pO₂. Ce seuil de pO₂ peut être situé dans notre essai à 40 mm Hg, ce qui est assez bas et explique peut-être qu'on puisse trouver *Dreissena* à des profondeurs où les teneurs en O₂ sont faibles (Walz, 1978). Il est donc important de ne considérer dans le calcul de la VO₂ que la partie de la

courbe supérieure à cette limite de pO_2 . Pour nos expériences et pour plus de sécurité, nous effectuerons les calculs dans la zone supérieure à 80 mm Hg.

IV.1.5. Influence de la saison

Pour caractériser cette influence, la température d'essai a été fixée à 20°C pour éviter les variations qui seraient dues aux différences de température. Les mesures sont effectuées mensuellement durant une année sur des lots fraîchement prélevés et dont l'acclimatation est conduite sur 1 semaine.

Les résultats (Figure 39) montrent qu'il existe une variation saisonnière marquée pour la VO_2 chez *Dreissena*. Le cycle saisonnier se caractérise par des niveaux de VO_2 élevés au printemps-été et des niveaux bas en automne-hiver. Ainsi on note un facteur de multiplication de 2 entre le niveau le plus bas constaté pour ce cycle (0,35 $mgO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$, Octobre) et le niveau le plus élevé (0,69 $mgO_2 \cdot h^{-1} \cdot g^{-1}$, Mars).

L'existence d'un cycle saisonnier de la VO_2 est bien connue chez les bivalves (Bayne *et al.*, 1976 ; Widdows, 1978 ; Newell et Bayne, 1980). Le facteur principal qui semble affecter la VO_2 chez *Dreissena*, comme chez d'autres bivalves, est le cycle saisonnier de la gamétogenèse. En effet, les variations de la VO_2 sont corrélées avec le cycle de reproduction et d'accumulation des réserves tissulaires (Widdows, 1978 ; Tourari et Mouabad, en prép.). Chez *Dreissena*, l'activité gamétogénétique intense au printemps-été (développement, maturation et émission des gamètes) requiert des niveaux élevés de VO_2 pour répondre aux besoins métaboliques importants. La période de faible activité génitale coïncide avec la saison froide, d'où des niveaux faibles de la VO_2 (Tourari, 1988).

Le fait que la période d'émission des gamètes s'étende de fin Mai à Septembre montre que le stade gamétogénétique dans la population à un moment donné est très variable d'un individu à l'autre (Tourari, 1988). Ceci est vraisemblablement à l'origine de la grande variabilité observée généralement dans les mesures de VO_2 chez *Dreissena*. Cette variabilité reste inévitable puisqu'il est impossible de disposer d'un lot homogène du point de vue du stade génital. D'autre part, et puisque le cycle saisonnier de la reproduction est conditionné par l'évolution annuelle de la température, les différents événements de ce cycle sont susceptibles de décalage d'une année à l'autre selon les cycles de température. De ce fait, l'évolution saisonnière de la VO_2 est susceptible de décalage par rapport à ce qui est présenté dans la figure 39.

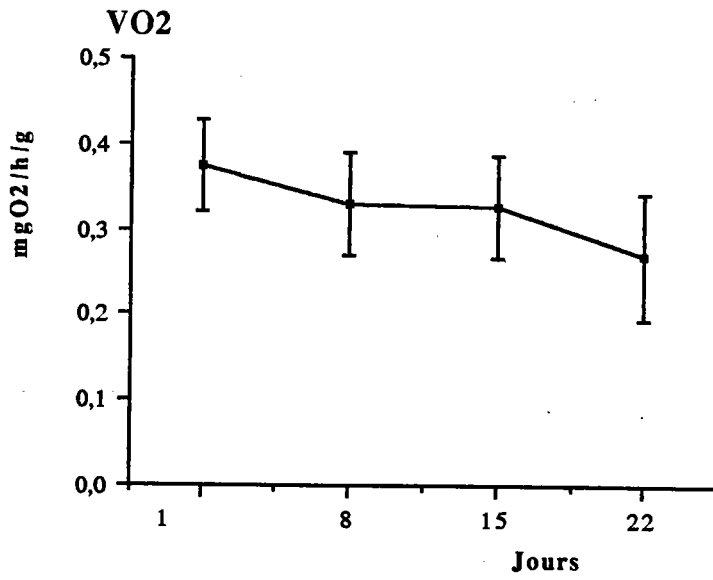


Fig. 40 : Evolution de la VO2 en fonction de la durée du jeune

IV.1.6. Influence du jeûne

Cette analyse est faite sur les valeurs témoins de l'essai de l'action du Zn sur la VO₂ sur 3 semaines (IV.2.2.).

Les mesures de VO₂ effectuées après 1, 2 et 3 semaines de séjour dans de l'eau déchlorée sans nourriture (Figure 40) montrent qu'il n'y a pas d'action significative du jeûne durant cette période ($\alpha = 0,05$). Cependant, la tendance à la diminution de la VO₂ en fonction de la durée du jeûne est visible à la troisième semaine (diminution de 28% en moyenne par rapport à la valeur initiale). La diminution de la VO₂ à cause du jeûne a été interprétée par Bayne *et al.* (1976) comme étant le résultat d'une baisse d'activité et d'une baisse des réserves corporelles. On peut, d'après ces résultats, estimer que 3 semaines sont une durée seuil pour l'apparition d'un effet du jeûne sur la VO₂.

IV.2. EFFETS DU ZINC SUR LA VO₂ DE DREISSENA

Dans cette étude, nous nous intéressons aux effets du Zn sur la consommation d'oxygène de *Dreissena*. Deux types d'exposition sont envisagés : une exposition de court terme (6 h et 24 h) et une exposition de moyen terme (3 semaines).

IV.2.1. Expositions de 6 h et 24 h

IV.2.1.1. Protocole expérimental

L'expérience vise à évaluer l'effet sur la VO₂ de concentrations de zinc connues pour déclencher au niveau comportemental des réactions immédiates très nettes (ch. II.3.) ; nous avons donc choisi les concentrations de 4 et 6 ppm Zn.

. Exposition de 6 h : 2 lots de moules subissent une exposition respectivement à 4 et 6 ppm Zn, un troisième sert de témoin. La VO₂ est mesurée au bout de 6 heures.

. Exposition de 24 h : on mesure chez 2 lots de moules la VO₂ avant (témoins) et après une exposition de 24 heures à 4 et 6 ppm.

IV.2.1.2. Résultats

Tableau 50 : VO₂ (moyenne ± SD, en mgO₂.h⁻¹.g⁻¹) après exposition de 6 heures au Zn.

VO2 (Témoins)	VO2 (lots exposés 6 h)	
	4 ppm Zn	6 ppm Zn
0,415 ± 0,125	0,681 ± 0,278	0,495 ± 0,123
n = 12	n = 6	n = 6

* Exposition de 6 h : par rapport à la valeur chez les témoins, le Zn provoque une augmentation de la VO₂ (Tableau 50). Cet effet est significatif pour 4 ppm mais ne l'est pas pour 6 ppm au seuil d'erreur de 5%.

Tableau 51 : Niveaux de la VO₂ avant et après exposition de 24 heures au Zn (moyennes et écarts-types).

Concentration en Zn (ppm)	VO2 (mgO ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹)	
	Avant exposition	Après exposition
4 ppm	0,410 (± 0,117)	0,519 (± 0,119)
6 ppm	0,445 (± 0,071)	0,636 (± 0,117)
répétitions	7	8

* Comme pour l'exposition de 6 h, on note une augmentation de la VO₂ sous l'effet du Zn. La comparaison des valeurs avant et après exposition montre que cette action est significative pour 6 ppm au seuil de 5% mais ne l'est pas pour 4 ppm. Si l'on s'intéresse aux réponses des lots pris individuellement, on observe une diminution de la VO₂ chez 2 lots sur 7 pour 4 ppm et chez 2 lots sur 8 pour 6 ppm.

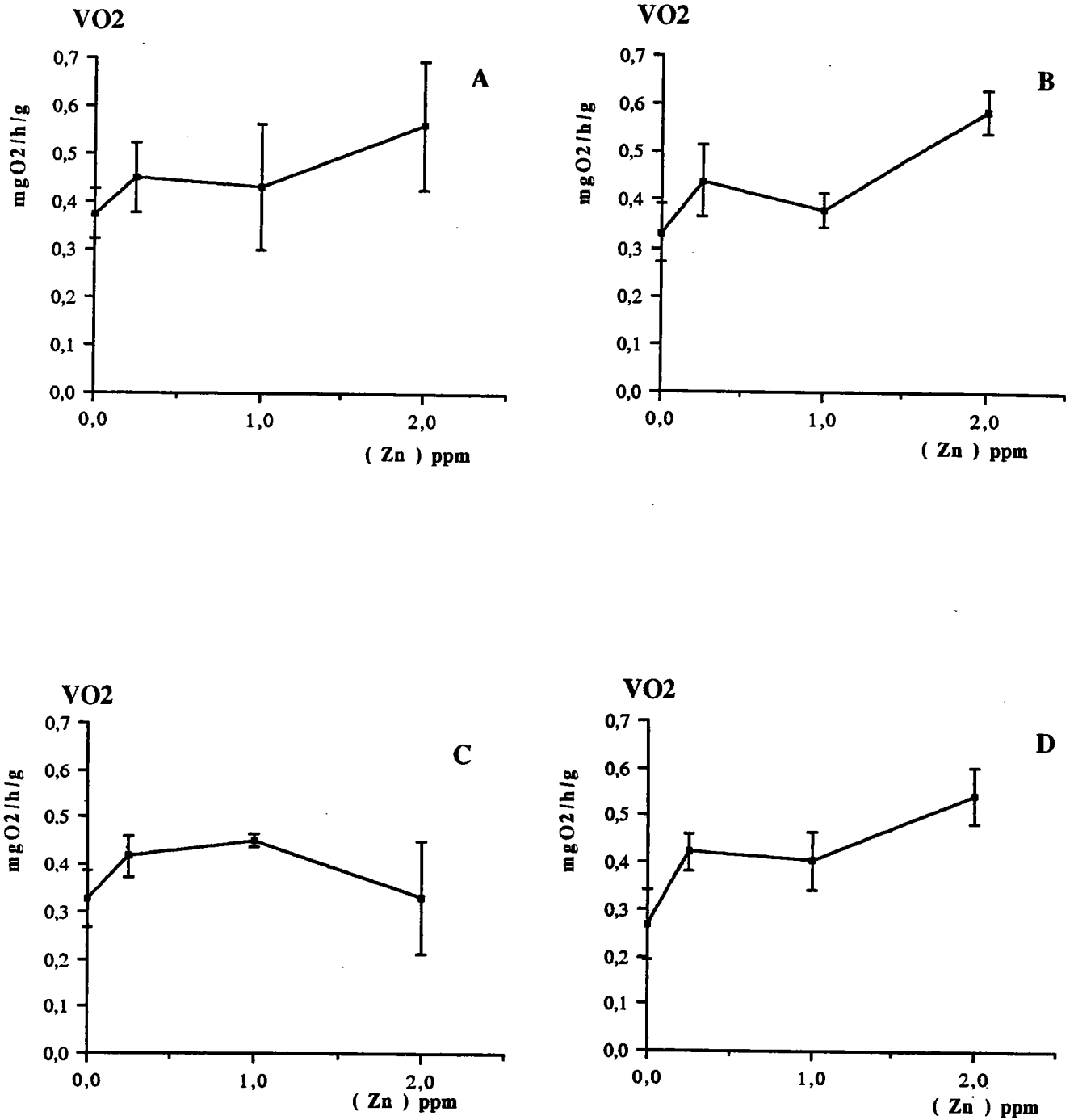


Fig. 41 : Evolution de la VO2 en fonction des concentrations en Zn après des expositions de 24h (A), 7j (B), 15j (C) et 22j (D).

IV.2.2. Exposition de 3 semaines

IV.2.2.1. Protocole expérimental

Les concentrations testées sont 0,25 ; 1 et 2 ppm de Zn. Quatre lots de 60 moules sont mis en expérience, sans nourriture. Le volume d'essai est de 15 l par enceinte expérimentale. Exceptionnellement dans cet essai, le changement de milieu est effectué tous les 2 jours et non quotidiennement.

IV.2.2.2. Résultats

Tableau 52 : VO₂ des lots exposés au Zn après 24 heures, 1, 2 et 3 semaines (moyennes et écarts-types de 4 répétitions).

VO ₂ mgO ₂ .h-1.g-1	[Zn] ppm	0	0,25	1	2
VO ₂ après 24 heures		0,3749 ± 0,0545	0,4483 ± 0,0729	0,4305 ± 0,1328	0,5624 ± 0,1335
VO ₂ après 1 semaine		0,3306 ± 0,0605	0,4401 ± 0,0750	0,3787 ± 0,0630	0,5870 ± 0,0446
VO ₂ après 2 semaines		0,3282 ± 0,0596	0,4173 ± 0,0435	0,4523* ± 0,0150	0,3324 ± 0,1186
VO ₂ après 3 semaines		0,2689 ± 0,0742	0,4219 ± 0,0384	0,4036 ± 0,0624	0,5440 ± 0,0603

* moyenne de 3 mesures

Les résultats (Tableau 52) confirment la constatation faite lors des essais précédents, c'est-à-dire l'augmentation de la VO₂ sous l'effet du Zn.

Toutes les comparaisons statistiques sont effectuées au risque d'erreur de 5%.

. 24 heures (Figure 41A) : l'élévation de la VO_2 par rapport aux témoins est notée à toutes les concentrations (20%, 15% et 48%, respectivement pour 0,25 ; 1 et 2 ppm). Cependant, seul l'effet en présence de 2 ppm est statistiquement significatif.

. 1 semaine (Figure 41B) : on note une réponse similaire à celle constatée à 24 h et ici également, seul l'effet de 2 ppm est significatif.

. 2 et 3 semaines (Figures 41C et D) : mise à part la valeur du lot exposé 2 semaines à 2 ppm, toutes les valeurs sont significativement supérieures à celles des témoins respectifs. No-tons qu'à la troisième semaine, et alors que la VO_2 témoin est tombée à $0,269 \text{ mgO}_2 \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (du fait de l'absence de nourriture, cf IV.1.6.), les niveaux de respiration chez les lots exposés se maintiennent élevés ; par exemple, la VO_2 en présence de 2 ppm est le double de celle des témoins.

Si on considère l'évolution de l'effet en fonction du temps pour chaque concentration (Tableau 52), les résultats montrent que l'augmentation constatée après 24 heures n'évolue que très légèrement par la suite, excepté pour la valeur constatée en présence de 2 ppm de Zn à 2 semaines.

IV.2.3. Effet du Zn en présence d'un chélatant à l'EDTA

IV.2.3.1. Protocole expérimental

La molécule d'EDTA (acide éthylènediaminotétracétique) est utilisée ici pour tester l'effet de la baisse de biodisponibilité du métal dissous sur son action au niveau de la consommation d' O_2 . Il est établi que l'EDTA empêche toute accumulation du Zn chez *Dreissena* (Maarouf *et al.*, 1988).

Les concentrations de Zn testées sont 4 et 6 ppm et le rapport molaire EDTA/Zn = 5 (Maarouf, 1988). L'exposition dure une semaine. Les témoins reçoivent uniquement de l'EDTA à la même concentration que celle utilisée avec 6 ppm de Zn. Les mesures respirométriques ont lieu au 4^{ème} et au 8^{ème} jour d'exposition.

IV.2.3.2. Résultats

Tableau 53 : VO₂ des moules intoxiquées au Zn + EDTA, moyennes et écarts-types (rapport EDTA/Zn = 5).

VO ₂ mgO ₂ .h-1.g-1	[Zn] ppm	0	4	6
VO ₂ après 4 jours		0,3486 ± 0,0316	0,4350 ± 0,0978	0,4606 ± 0,1050
VO ₂ après 8 jours		0,3406 ± 0,0714	0,4395 ± 0,1050	0,6252 ± 0,0568

Comme pour l'expérience précédente, la VO₂ des moules intoxiquées au Zn + EDTA est significativement supérieure à celle des témoins. Cette augmentation de la VO₂ est observée pour les deux concentrations de Zn testées aussi bien au 4^{ème} jour qu'au 8^{ème}.

Avec 4 ppm Zn + EDTA, l'effet ne diffère pas significativement entre le 4^{ème} et le 8^{ème} jour tandis qu'il progresse significativement en présence de 6 ppm Zn + EDTA.

On constate donc que, même en présence du chélatant, le Zn exerce un effet stimulateur sur la VO₂.

IV.2.4. Discussion

Tous les essais montrent que la toxicité du Zn vis-à-vis de la respiration de *Dreissena* s'exprime par l'augmentation de la consommation d'O₂; ce résultat est intéressant par ses éventuelles implications physiologiques et biochimiques. L'action est détectable dès la sixième heure à la concentration de 4 ppm Zn et se confirme dans les résultats de 24 heures dès la concentration de 0,25 ppm (même si elle n'est pas statistiquement significative à ce temps d'exposition) et très nettement à 2 ppm. Les résultats de l'essai de trois semaines mettent en évidence la persistance de l'action observée à court terme.

Au regard de l'ensemble des essais, on peut estimer à 0,25 ppm le seuil de toxicité à moyen terme du zinc pour la consommation d'O₂ de *Dreissena*.

L'effet du Zn sur la respiration a été très peu étudié chez les bivalves. Brown et Newell (1972) rapportent chez *Mytilus* qu'une concentration aussi élevée que 500 ppm n'altère pas la consommation d'oxygène de la branchie isolée, ni celle de la glande digestive. Une action inhibitrice a été constatée sur les oeufs de *Mytilus edulis* (Earnshaw *et al.*, 1986) ainsi que sur des larves de *Mytilus galloprovincialis* (Pavicic, 1980).

Chez *Meretrix casta* (adultes), Mathew et Menon (1983) ont mis en évidence un effet inhibiteur du Zn (0,001 à 0,025 ppm) lors d'une exposition de 12 h, ce qui est en désaccord avec nos résultats.

Les effets de stimulation de la VO₂ par les métaux ont rarement été rapportés chez les bivalves. Les résultats de Thurberg *et al.* (1974) indiquent une élévation de la VO₂ par l'argent (0,005 et 0,1 ppm Ag) chez de jeunes *Spisula solidissima* après une exposition de 4 jours. Les auteurs ont suggéré que l'effet serait dû à l'action du métal au niveau des enzymes respiratoires en provoquant un déficit d'O₂ chez l'animal. Un effet similaire a été mis en évidence avec le cadmium (0,940 ppm) chez de jeunes *Argopecten irradians* lors d'une exposition de 4 jours (Nelson *et al.*, 1976).

Le mécanisme biochimique de stimulation de la prise d'oxygène par la moule sous l'effet du Zn reste entièrement à élucider. Il n'existe pas d'étude à ce propos chez les bivalves. Le fait remarquable est que la réaction est perceptible dès les premières heures d'exposition, ce qui indiquerait qu'elle serait liée au mécanisme de passage transmembranaire du métal. Il est possible que celui-ci soit énergie-dépendant. Le fait que le Zn soit un métal essentiel, reconnu par la membrane cellulaire, expliquerait la rapidité de cette réaction. Une indication du fait que l'action du zinc sur la consommation d'O₂ serait initiée au niveau de la membrane cellulaire plutôt qu'à l'intérieur est fournie par les résultats de l'essai avec l'EDTA. En effet, les données de Maarouf *et al.* (1988) montrent qu'il n'y a aucune accumulation du Zn en présence d'EDTA même après 5 semaines d'exposition (2 et 4 ppm Zn, même rapport EDTA/Zn et mêmes conditions expérimentales que dans notre essai). L'effet du Zn ne peut donc être attribué à un mécanisme qui proviendrait de la présence massive du métal à l'intérieur des cellules.

Un autre aspect intéressant de cette étude apparaît quand on considère ensemble les effets sur la filtration et sur la respiration. En effet, alors que le taux de filtration (TF) subit une forte diminution, on constate en même temps une élévation de la VO₂, ce qui paraît contradictoire puisque c'est l'eau transitant par la cavité palléale qui fournit l'oxygène consommé. En réalité, le fait que la prise d'O₂ se fasse chez les bivalves par simple diffusion physique (absence de pigment respiratoire)

implique qu'elle dépend essentiellement de l'efficacité d'extraction d'O₂ (= coefficient d'extraction d'O₂, E_{O₂}). Or, l'extraction d'O₂ est médiocre chez les bivalves (E_{O₂} ≤ 1% de saturation en O₂ ; Jorgensen *et al.*, 1986) puisqu'elle s'effectue au niveau de la surface générale de la cavité palléale (non différenciée pour la fixation d'O₂, Famme et Kofoed, 1980). Il s'ensuit que la majeure partie de l'O₂ contenu dans l'eau filtrée n'est pas potentiellement disponible pour la respiration. Ainsi, il a été montré (Jorgensen *et al.*, 1986) que le maximum de consommation d'oxygène est atteint à des valeurs basses du TF ; autrement dit, la dépendance de la VO₂ vis-à-vis du TF cesse dès qu'on atteint un certain seuil de filtration. Ces auteurs ont montré que chez *Mytilus*, la VO₂ dépend du TF pour les valeurs entre 0 et 20% de sa valeur maximum (Figure 42).

Il est donc tout à fait concevable que le TF soit fortement réduit (par exemple du fait d'une action toxique) sans que l'on observe systématiquement une réduction de la VO₂.

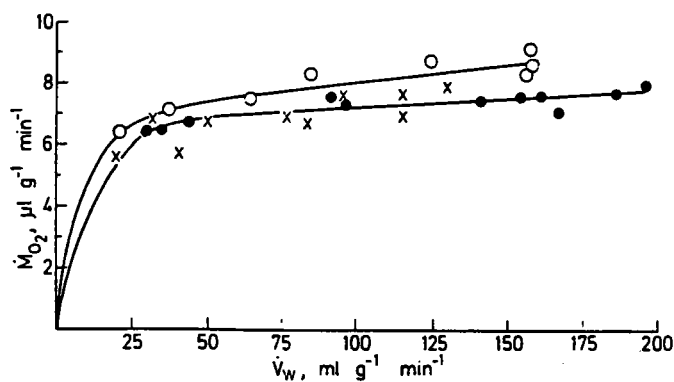


Figure 42 : Relation entre taux de filtration (V_w = ventilation) et taux de consommation d'O₂ (M_{O_2} = VO₂) chez *Mytilus*. D'après Jorgensen *et al.* (1986).

Cependant, dans le cas du zinc, on constate une augmentation de la prise d'oxygène. Cette action peut s'interpréter par une augmentation de l'efficacité de fixation de l'oxygène (capacité oxydative des tissus).

Si on considère par exemple la situation des lots exposés à 2 ppm pendant 1 semaine, on remarque que la VO₂ a augmenté de près de 80% par rapport à la valeur témoin (Tableau 52) alors que le TF est réduit de près de 85% en moyenne par rapport à la valeur témoin (ch. III.3.2., les essais de TF et de VO₂ ont été faits sur des lots différents mais les effets toxiques sont par principe les mêmes). Nous ne connaissons pas en deçà de quel pourcentage du TF maximum il y a dépendance de la VO₂ vis-à-vis du TF chez *Dreissena*. Deux cas sont envisageables :

. Si la réduction constatée du TF n'altère pas la VO₂ sous les conditions normales (c'est-à-dire que le TF résiduel n'est pas limitant pour la VO₂), l'augmentation de la VO₂ sous l'effet du Zn

correspondrait alors à une augmentation proportionnelle de la capacité oxydative des tissus (augmentation de E_{O_2}).

. Si la réduction de la filtration rend le TF limitant pour la VO_2 sous les conditions normales, l'élévation de la VO_2 sous l'effet du Zn correspondrait alors à une augmentation de E_{O_2} supérieure au cas précédent puisque cette augmentation de la capacité oxydative des tissus doit couvrir la diminution de VO_2 qui serait intervenue normalement (sans toxique) du fait du TF limitant en plus de l'augmentation due au Zn.

Pour l'ensemble des lots exposés 1 semaine à 2 ppm, le coefficient E_{O_2} serait multiplié par 1,8 dans le premier cas et par un facteur supérieur à 1,8 dans le deuxième.

Le fait que l'on trouve des valeurs de VO_2 ne différant pas de celles des témoins, par exemple chez les lots exposés à 2 ppm pendant deux semaines (Tableau 52) peut s'expliquer par la fermeture des moules pendant la mesure ; en effet, chez deux lots sur quatre dans ce cas, la VO_2 est inférieure à la valeur témoin. La réaction de fermeture, qui est très variable dans sa durée pour le cas du Zn, tend néanmoins à augmenter nettement si l'on raisonne sur la moyenne des réactions, surtout à des concentrations relativement élevées telles que 2 ppm Zn (cf II.3.2. où les moules utilisées pour l'enregistrement de l'activité proviennent des mêmes lots que celles du présent essai de 3 semaines). Il est donc normal que des fermetures interviennent pendant les mesures, diminuant ainsi fortement la respiration aérobie. C'est là aussi un autre aspect de la toxicité du Zn sur la respiration, à savoir l'inhibition de la VO_2 par suite de la fermeture des valves.

Les effets conjugués du zinc sur la VO_2 et le TF trouvent certainement leur traduction au niveau de la croissance et de la maintenance de l'animal. Une illustration très nette de cet effet a été établie par Belanger *et al.* (1986) chez le bivalve d'eau douce *Corbicula sp.* Ces auteurs ont montré qu'à partir de 0,05 ppm Zn, la croissance des animaux est réduite par rapport aux témoins, l'effet étant perceptible dès le 20^{ème} jour d'exposition. Les animaux exposés montrent également une augmentation de la teneur en eau des tissus, ce qui indique, selon les auteurs, une dégradation tissulaire et un dérèglement de l'osmorégulation. Ce dernier effet rejoindrait la suggestion formulée précédemment à propos du mécanisme d'action du Zn sur la VO_2 . Le métal pourrait interférer sur les systèmes osmorégulateurs qui sont énergie-dépendants.

IV.3. EFFETS DU CUIVRE SUR LA VO₂ DE DREISSENA

La présente étude tend à élucider les effets respiratoires d'une courte exposition (6 h et 24 h) à des concentrations variées dont la plus forte (500 ppb Cu) constitue le seuil de mortalité à 24 h en présence de cuivre (cf ch. I.5.).

La suite de la démarche s'intéresse aux effets respiratoires de concentrations plus faibles (25, 50 et 100 ppb) après une exposition d'une semaine.

IV.3.1. Expositions de 6 et 24 h

IV.3.1.1. Protocole expérimental

Sur trois lots de moules, la VO₂ est mesurée avant (témoins) et après 6 h et 24 h d'exposition à 50, 250 et 500 ppb Cu. A chaque stade de l'expérience, 6 mesures (répétitions) par concentration sont effectuées.

IV.3.1.2. Résultats (Annexe IX)

Les résultats (Figure 43) montrent que la VO₂ reste inchangée après 6 h et 24 h d'exposition à 50 ppb Cu. Par contre, on constate qu'elle est réduite après l'exposition à 250 et 500 ppb. Cependant, les effets de 250 ppb Cu ne sont pas statistiquement significatifs au seuil d'erreur de 5%. La VO₂ à cette concentration est affecté d'un fort coefficient de variation (= 75% pour la valeur à 6 h et 58% à 24 h).

La concentration de 500 ppb Cu provoque en moyenne 45% (6 h) et 51% (24 h) de réduction de la VO₂.

Un cas de mortalité a été enregistré après 24 h parmi les 12 moules exposées à 500 ppb Cu.

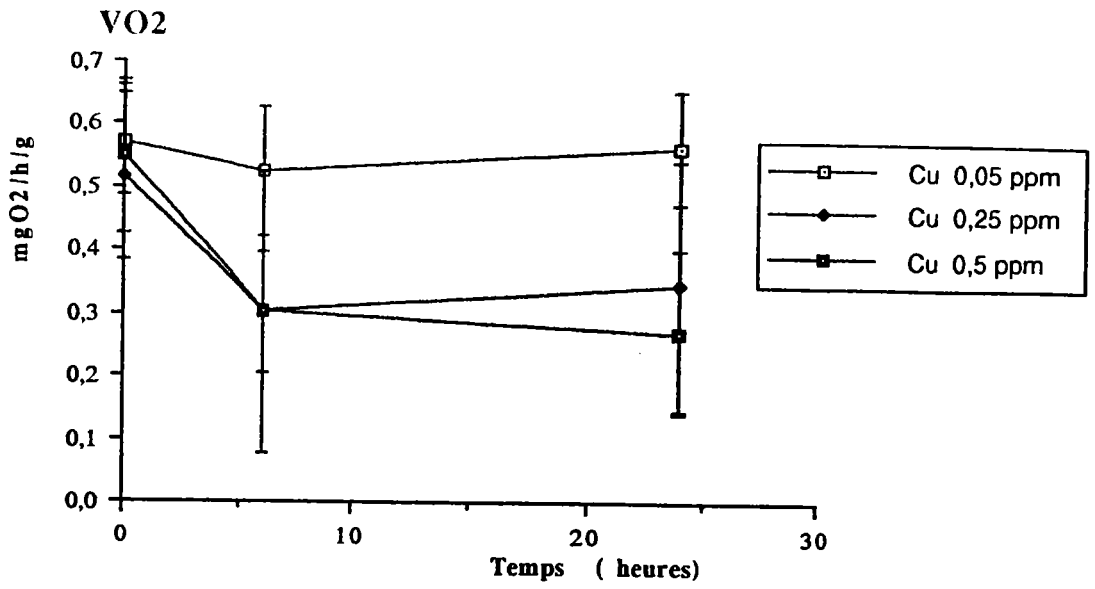


Fig. 43 : VO2 après 6h et 24h d'exposition au Cu.

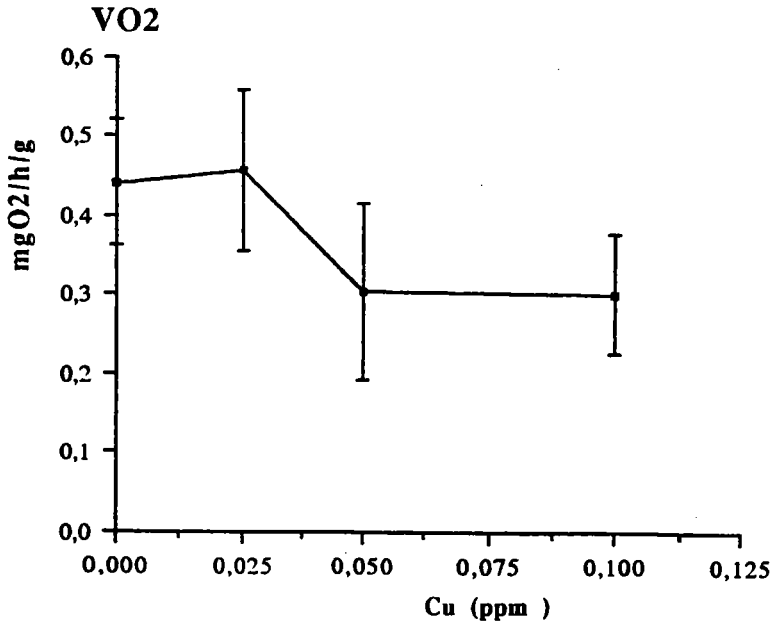


Fig.44 : Consommation d'oxygène après l'exposition d'une semaine au Cu

IV.3.2. Exposition d'une semaine

IV.3.2.1. Protocole expérimental

La VO₂ témoin (avant exposition) est mesurée sur 4 lots de moules. Trois sont alors exposés respectivement à 25, 50 et 100 ppb Cu, le quatrième sert de témoin. Les mesures respirométriques ont lieu après 1 semaine d'exposition.

IV.3.2.2. Résultats (Annexe X)

Les résultats (Figure 44) montrent que les lots exposés à 25 ppb n'ont pas subi de modification significative de leur VO₂. Les lots exposés à 50 et 100 ppb ont par contre vu leurs VO₂ réduites d'un taux quasi identique (48% et 49% respectivement). Signalons que pour 100 ppb Cu, un cas de mortalité (sur les dix moules exposées) a été enregistré.

IV.3.3. Discussion

Les résultats des deux essais montrent que la toxicité du cuivre sur la respiration de *Dreissena* s'exerce par une réduction de la VO₂. L'effet est détecté dès les premières heures à partir de la concentration de 250 ppb.

Pour l'exposition d'une semaine, les résultats indiquent que le seuil de toxicité se situe probablement entre 25 et 50 ppb. On remarque que dans les deux essais, l'effet maximum enregistré ne dépasse pas 50% de réduction de la VO₂, même avec les concentrations qui se sont révélées être des seuils de toxicité létale pour les durées d'exposition respectives. Notons que l'effet constaté dans l'essai d'une semaine ne progresse pas lorsqu'on passe de 50 à 100 ppb.

La plupart des données bibliographiques concernant les effets du Cu sur la respiration des bivalves traitent d'expositions de courtes durées, entre 1 h et 48 h. Scott et Major (1972) rapportent que l'exposition immédiate (2 h) de *Mytilus* à 500 et 1000 ppb Cu provoque respectivement 33 et 70% de réduction de la VO₂ ; les auteurs observent cependant une reprise de la VO₂ normale à la quatrième heure d'exposition. Delhay et Cornet (1975) trouvent également une réduction de la VO₂ chez cette même espèce après quelques heures d'exposition à 250 et 500 ppb (70% de réduction). Cet effet s'atténue après 24 h (30 et 40% de réduction, respectivement). Sathyanathan *et al.* (1988) ont également noté chez *Villorita cyprinoides* une faible diminution de la VO₂ (32%) après 48 h d'exposition à 600 ppb Cu. D'après ces données et nos propres résultats (pour 6 h et 24 h), il sem-

ble que l'action du Cu sur la VO_2 requiert de fortes concentrations et qu'elle est plus efficace au début de l'exposition que 24 h plus tard.

Le fait remarquable est que la toxicité du cuivre vis-à-vis de la respiration est faible par rapport à sa toxicité envers la filtration (cf ch. III.4.). Ceci montre bien que l'inhibition de la filtration ne s'accompagne pas systématiquement d'une diminution de la VO_2 .

L'action du Cu pendant les premières heures est certainement le résultat de la fermeture et des fortes réductions du TF aux concentrations considérées (250 ppb et plus). Manley (1983) a montré que 200 ppb Cu réduisent la VO_2 de 58% chez l'animal intact mais seulement de 33% chez l'animal dont les adducteurs postérieurs ont été sectionnés (pour éviter la fermeture). L'auteur a conclu que l'effet est surtout dû à la fermeture. L'auteur n'explique pas la réduction de VO_2 qui subsiste après section des muscles adducteurs mais il est vraisemblable qu'elle soit due à la réduction du TF, même chez l'animal ouvert, grâce au contrôle de l'ouverture du siphon exhalant (cf ch. II.4.). Il est peu probable qu'au début de l'exposition, il y ait un effet direct sur les mécanismes cellulaires de la respiration (Brown et Newell, 1972).

En revanche, il peut en être autrement pour l'effet constaté après une semaine. En effet, une réduction significative est exercée en présence de 50 ppb alors que d'après les résultats de l'effet sur la filtration (ch. III.4.), le TF ne serait réduit que d'environ 50% à cette concentration. Un TF à 50% de sa valeur optimum n'est vraisemblablement pas limitant, dans les conditions normales, pour la VO_2 . Il est donc probable que l'effet soit lié à une action inhibitrice du métal accumulé au niveau des mécanismes cellulaires de la respiration ; il serait en fait le reflet métabolique de l'ensemble des atteintes histopathologiques élucidées par d'autres auteurs (Sunila, 1981 ; Manley, 1983).

Les résultats concernant l'exposition de 24 h à 500 ppb et d'une semaine à 100 ppb montrent que les animaux qui sont en état de morbidité respirent encore à 50% de leur consommation normale d' O_2 . Ceci indique, contrairement à ce qui est généralement admis, que la mortalité liée au cuivre n'est pas due à une asphyxie de l'animal mais plutôt à l'ensemble des atteintes physiologiques subies. Testard (1991) a d'ailleurs montré que *Dreissena* peut très bien survivre à une forte hypoxie pendant une semaine.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la respiration aérobie par la mesure de la VO_2 . Il est cependant probable que pendant les périodes de fermeture, une respiration anaérobie ait lieu pour compenser le déficit en oxygène. Les données de Akberali et Black (1981) suggèrent cette voie avec, d'après les auteurs, un rôle essentiel joué par le calcium comme tampon des produits finaux. Les auteurs notent cependant que l'animal est vite obligé de s'ouvrir pour évacuer ces produits ainsi que les produits d'excrétion.

IV.4. EFFETS DU MERCURE SUR LA VO₂ DE DREISSENA

Les effets respiratoires du mercure sont recherchés, comme pour le Cu, au cours d'expositions de 6 h, 24 h et une semaine ; les protocoles expérimentaux sont similaires à ceux pratiqués pour le cuivre.

IV.4.1. Expositions de 6 h et 24 h

Les concentrations testées sont 50, 100, 150 et 200 ppb Hg²⁺. Les résultats (Figure 45) montrent que l'action du Hg sur la consommation d'oxygène se manifeste par une nette réduction de celle-ci par rapport à la VO₂ témoin. La comparaison des valeurs avant et après l'exposition révèle que cette action est significative pour toutes les concentrations à 6 h comme à 24 h (Annexe XI).

. 6 h d'exposition : on observe globalement que l'effet s'intensifie avec les concentrations croissantes. A la concentration de 150 ppb, 2 lots de moules sur les 6 en expérience étaient complètement fermés pendant la mesure (aucune consommation d'O₂), ce qui a contribué à l'effet de réduction très fort constaté à cette concentration. Les pourcentages de réduction sont en moyenne de 37%, 47%, 87% et 65% respectivement pour 50, 100, 150 et 200 ppb Hg.

. 24 h d'exposition : les effets ne changent que légèrement par rapport à ceux constatés à la sixième heure sauf pour 150 ppb dont l'effet est plus modéré. La plus forte réduction est constatée en présence de 200 ppb (65%).

IV.4.2. Exposition d'une semaine

Les concentrations testées sont : 30, 60, 120, 240 ppb Hg²⁺. La figure 46 montre l'évolution de la VO₂ en fonction des concentrations en métal, la valeur témoin est la moyenne des mesures témoins des 20 lots avant l'exposition (Annexe XII).

La comparaison des VO₂ avant et après exposition pour chaque concentration montre que 30 ppb Hg induisent une réduction non significative de 15% de la VO₂. Les réductions dues aux autres

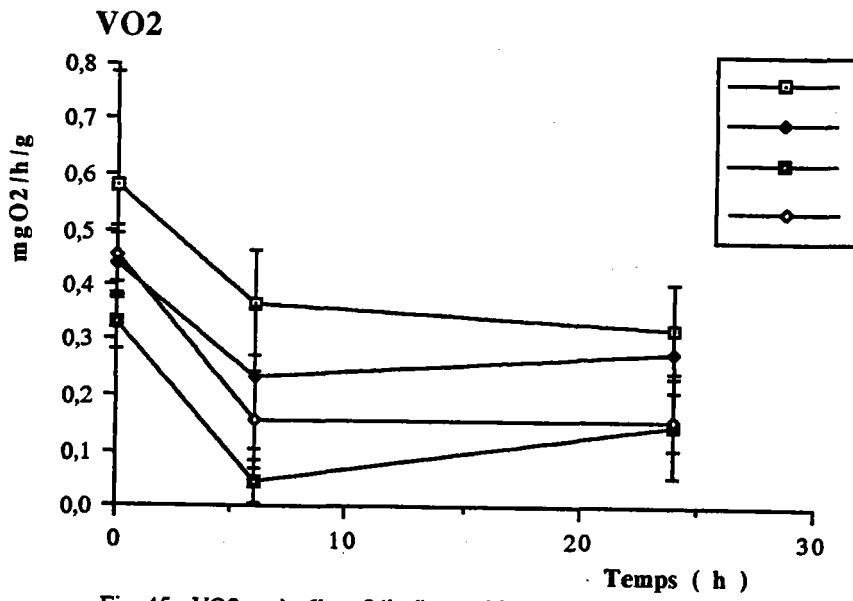


Fig. 45 : VO₂ après 6h et 24h d'exposition au mercure.

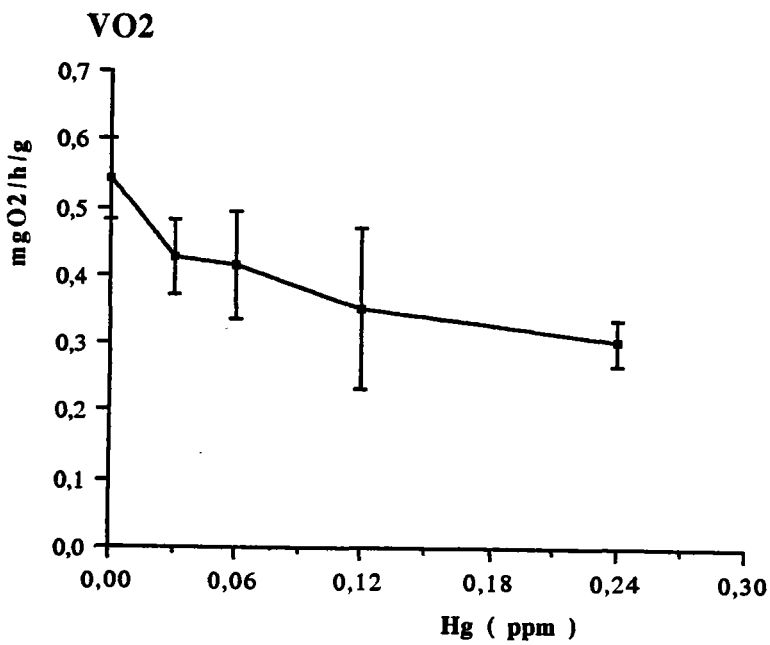


Fig. 46 : Consommation d'oxygène après une semaine d'exposition au

IV.5. EFFETS DU CADMIUM SUR LA VO₂ DE DREISSENA

Les effets respiratoires du Cd ont été recherchés pour une exposition de court terme, 24 h et 48 h. Les concentrations testées sont 0,2 ; 0,5 et 1,2 ppm.

La figure 47 (Annexe XIII) montre l'évolution de la VO₂ en fonction du temps d'exposition au Cd. Les résultats montrent que ce métal induit globalement de faibles réductions de la VO₂ sans que cela suive une relation concentration-effet claire. Ainsi, les réductions de VO₂ sont en moyenne les suivantes : 14% (24 h) et 22% (48 h) avec 0,2 ppm ; 22% (24 h) et 36% (48 h) pour 0,5 ppm et seulement 10% (24 h) et 5% (48 h) pour 1,2 ppm. L'analyse des résultats montre que seuls les effets de 0,2 et 0,5 ppm après 48 h sont significatifs.

Ces résultats montrent que les effets respiratoires à court terme du Cd, aux concentrations testées, ne sont pas importants. Cet état de fait se conçoit bien si l'on prend en compte les résultats enregistrés pour le TF (cf III.6.2. ; 16%, 32% et 68% de réduction avec respectivement 0,2 ; 0,4 et 0,8 ppm Cd). Il est vraisemblable qu'avec 1,2 ppm Cd le TF résiduel ne soit pas limitant pour la VO₂. Les effets constatés avec 0,2 et 0,5 ppm après 48 h résulteraient de fermetures durant les mesures.

La faible toxicité à court terme du Cd sur la VO₂ a été également noté chez *Perna viridis* par Mohan *et al.* (1986a). D'après leurs résultats, des concentrations entre 0,02 et 1 ppm ont peu d'influence sur la VO₂ au cours des dix premières heures d'exposition (20% de réduction avec 1 ppm). Un effet important (35% de réduction) est enregistré avec 1,5 ppm.

Les effets à moyen terme du Cd sur la VO₂ seront discutés dans le cadre d'un essai d'évaluation des effets sur le bilan énergétique de *Dreissena* (ch. V.).

IV.6. EFFETS DU PLOMB SUR LA VO₂ DE DREISSENA

Ces effets ont été étudiés au cours de différentes expositions : 6 h, 24 h, 96 h et 2 semaines.

IV.6.1. Expositions de 6 h et 24 h

Dans cet essai, nous avons choisi de tester des concentrations capables de déclencher une réaction comportementale rapide et nette. Les concentrations de 2 et 4 ppm ont été retenues.

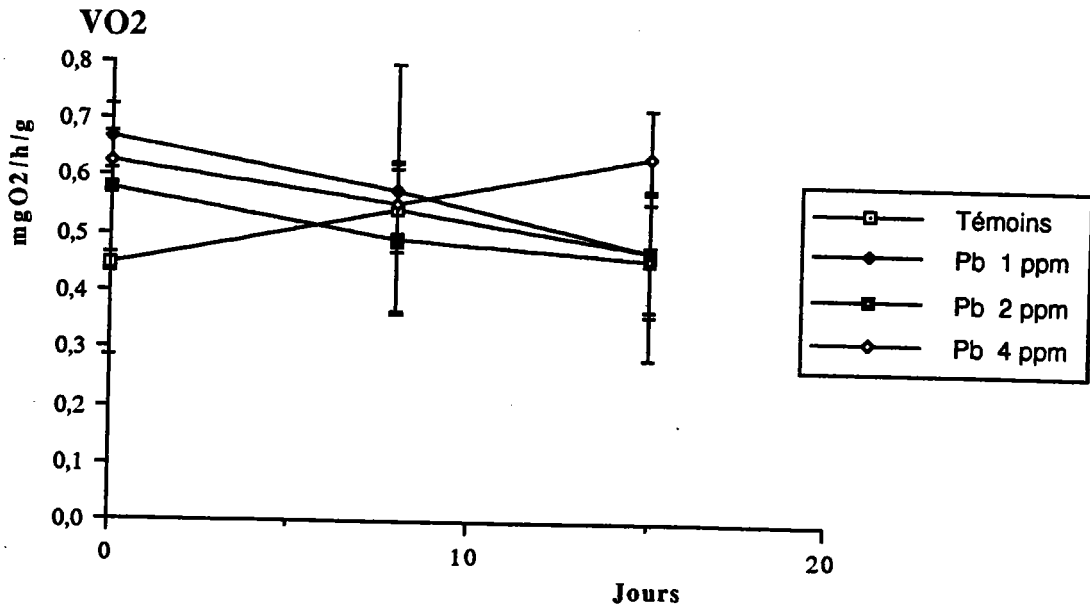


Fig. 49 : Evolution de la VO2 en fonction de la durée d'exposition.

Tableau 54 : VO₂ de *Dreissena* (moyenne ± SD) avant et après exposition de 6 et 24 h au plomb.

[Pb]	VO ₂ (mgO ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹) exposition de 6 h		VO ₂ (mgO ₂ .h ⁻¹ .g ⁻¹) exposition de 24 h	
	Avant	Après	Avant	Après
2 ppm	0,298 ± 0,044	0,244 ± 0,080	0,363 ± 0,092	0,174 ± 0,147
4 ppm	0,346 ± 0,071	0,365 ± 0,066	0,350 ± 0,060	0,315 ± 0,059

Les résultats présentés dans le tableau 54 montrent qu'il y a une tendance à la réduction de la VO₂ sous l'effet du Pb, mais on note que l'effet est irrégulier. L'analyse statistique révèle que seul l'effet de 2 ppm après 24 h est significatif.

IV.6.2. Exposition de 96 h

La figure 48 montre l'évolution de la VO₂ en fonction du temps en présence de 2 ppm Pb. On constate une légère diminution de la VO₂ après 96 h mais l'analyse de variance montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la VO₂ témoin et les VO₂ aux différents temps d'exposition. L'effet enregistré après 24 h dans l'essai précédent n'est pas retrouvé ici (Annexe XIV).

IV.6.3. Exposition de deux semaines

Les concentrations testées sont 1, 2 et 4 ppm Pb. Les mesures respirométriques ont lieu après 1 et 2 semaines (Annexe XV).

La figure 49 montre l'évolution de la VO₂ en fonction de la concentration en métal pour les différents temps d'exposition. Les résultats révèlent qu'il n'y a pas d'effet du Pb aux concentrations testées sur la VO₂ après une semaine. Les résultats concernant la deuxième semaine d'exposition vont dans le même sens. Il faut souligner que dans certaines situations d'exposition, on note des coefficients de variation élevés, ce qui indique que la réponse n'est pas homogène.

IV.6.4. Discussion

Les résultats présentés ici indiquent que les effets respiratoires du plomb chez *Dreissena* se manifestent pendant les premières heures par des diminutions légères de la consommation d'oxygène. Pour des durées plus longues, on ne décèle pas d'effet clair même au bout de deux semaines d'exposition. Il semble donc que le Pb, aux concentrations testées, n'agit pas de manière tangible sur la VO₂ de *Dreissena*. L'effet observé aux premières heures est certainement le résultat du comportement de test qui se manifeste en réaction à l'exposition (ch. II.7.). Mathew et Menon (1983) ont noté chez *Meretrix casta* une réduction de la VO₂ pendant les premières heures pour des concentrations entre 0,001 et 0,01 ppm Pb et, paradoxalement, les auteurs n'observent aucun effet entre 0,025 et 2,5 ppm. L'absence d'effets lors d'expositions prolongées contraste avec les résultats trouvés dans les essais de filtration pour les mêmes concentrations (48 h avec entre 50 et 80% de réduction du TF, et une semaine avec entre 45 et 75% de réduction, ch. III.7.). Des suivis du comportement par la sonde anémométrique sur des moules du présent essai sur la VO₂ ont d'ailleurs montré que la filtration était très perturbée après 1 et 2 semaines d'essai (non illustrées). Cette discordance s'explique, comme pour le Cd, par la non dépendance systématique de la VO₂ envers le TF ; il paraît évident que les TF réduits du fait de l'exposition au métal ne sont pas limitants pour une extraction normale de l'O₂ par la moule. Dans cette vision de la réponse respiratoire, un effet direct du Pb sur les mécanismes de respiration tissulaire paraît exclu à court terme comme à moyen terme. Dans une exposition de trois semaines au Pb (0,3 à 1,5 ppm) dans des conditions similaires aux nôtres, Benyahia *et al.* (1988) n'ont pas décelé d'effets histopathologiques notables chez *Dreissena*, ce qui suggère une grande efficacité des mécanismes de détoxification vis-à-vis de ce métal. Cette efficacité viendrait de la rapidité particulière de cette détoxification puisque chez les bivalves le Pb, à la différence des autres métaux, semble être pris directement en charge par les structures lysosomales, sans transiter par des métallothionéines (George et Viarengo, 1985). On peut donc estimer que le niveau du métabolisme respiratoire général ne se trouve pas altéré dans ce type d'exposition.

IV.7. DISCUSSION GENERALE DES EFFETS DES METAUX SUR LA CONSOMMATION D'OXYGENE DE DREISSENA

Cette étude a révélé que l'action des métaux sur la consommation d'O₂ de *Dreissena* dépend du métal considéré. Nous avons montré que le zinc a une effet stimulateur sur la VO₂ tandis que le cuivre et le mercure la réduisent. Le plomb et le cadmium paraissent provoquer une diminution de la VO₂ lors d'expositions de court terme, mais cette action est faible et ne se confirme pas (pour le Pb) dans une exposition plus prolongée.

Il est ainsi difficile de classer de manière simple les métaux selon leur toxicité, comme nous l'avons fait pour l'effet vis-à-vis de la filtration. Le statut du zinc poserait manifestement un problème dans cette classification.

Cette étude a également révélé la complexité des phénomènes qui jouent dans l'expression de la toxicité sur la VO_2 chez *Dreissena* et plus largement chez les bivalves.

On peut résumer les différents cas dans leur complexité comme suit :

La réaction comportementale vis-à-vis du métal se manifeste soit par des fermetures et, dans ce premier cas, l'action du métal est indirectement inhibitrice pour la consommation d' O_2 , soit par un état de semi-ouverture avec comme conséquence une réduction du TF. Dans ce deuxième cas, l'action du métal dépend de l'ampleur de cet effet sur la filtration en relation avec une donnée physiologique de l'espèce qui est le seuil de TF au-delà duquel la VO_2 est indépendante du niveau de filtration (SI). Si le TF est réduit en deçà de ce seuil, l'effet sur la consommation d' O_2 sera inhibiteur et peut être aggravé dans le cas d'une inhibition (véritable) de la respiration tissulaire (due à une action spécifique du métal ou à un affaiblissement métabolique général, comme c'est probablement le cas du cuivre après une semaine d'exposition). L'effet peut aussi être nul ou même une stimulation, dans le cas où la toxicité au niveau tissulaire est une augmentation de la capacité de fixation d' O_2 (comme c'est le cas avec le Zn) ; dans ce cas, c'est l'ampleur de cette action tissulaire qui détermine l'action apparente (hors fermeture).

Dans le cas où le TF est réduit mais demeure au-dessus du seuil SI, la VO_2 sera normale s'il n'y a pas d'effet significatif du métal au niveau tissulaire (comme c'est probablement le cas du Pb dans l'exposition d'une et deux semaines). Elle peut aussi être réduite (ou augmentée) si le métal a une action tissulaire inhibitrice (ou stimulatrice) significative.

Ces différentes situations révèlent le caractère particulier de l'action des métaux sur la VO_2 de *Dreissena* et expliquent la grande variabilité des résultats dans certains cas.

Il est à noter que la bibliographie récente ne fait pas appel à cette considération intégrée des effets respiratoires. Celle-ci permet par exemple d'interpréter les résultats de Micallef et Tyler (1990), qui ne notent aucun effet sur la VO_2 tandis que le TF est réduit de 86% (50 ppb Hg) ; ces résultats ont été considérés par les auteurs comme inconciliables.

Il est clair que la particularité de la respiration des bivalves est due essentiellement à la nature diffusive de la prise d' O_2 (absence de pigment respiratoire) et à l'existence d'une activité valvaire qui fait que la consommation d' O_2 peut être continue ou s'arrêter selon les conditions environnementales. Ceci justifie pourquoi nous nous sommes limités, dans les discussions, à la comparaison avec les données bibliographiques relatives aux seuls bivalves.

CHAPITRE V :
INTEGRATION DES EFFETS PHYSIOLOGIQUES
DU CADMIUM ET DU CUIVRE CHEZ *DREISSENA* :
EFFETS SUR LE POTENTIEL ENERGETIQUE
DE CROISSANCE (PEC)

V.1. INTRODUCTION

Dans les deux chapitres précédents, les effets des différents métaux ont été considérés séparément, sur le TF (niveau d'alimentation), et sur la VO_2 (niveau métabolique). Dans ce contexte, la discussion de ces effets ne pouvait que suggérer les répercussions de tels effets sur la capacité de l'individu et de la population à se maintenir en bonne condition et à assurer la reproduction. Le but de la présente étude est d'intégrer les effets physiologiques, subis dans le cadre d'une exposition chronique au cuivre et au cadmium, afin d'évaluer le statut énergétique des animaux exposés. L'approche bioénergétique permet de tirer des conclusions sur l'action effective de l'exposition sur la capacité de maintenance et de croissance (Widdows, 1985).

V.2. CONDITIONS DE L'ESSAI

L'objet de l'expérience étant l'évaluation des effets d'une exposition chronique au Cu et au Cd sur le bilan énergétique de *Dreissena*, l'exposition doit simuler au mieux les conditions en situation naturelle, notamment une exposition à circuit ouvert et la présence de nourriture. Pour ces raisons, nous avons utilisé un système à renouvellement continu. Le dispositif est décrit dans la 2^{ème} partie, chap II.2.2.3.

La durée de l'exposition est de 28 jours. Le milieu d'essai est constitué par de l'eau de conduite déchlorée.

V.2.1. Choix des concentrations métalliques

* Pour le cuivre

Les dosages préliminaires dans l'eau de conduite déchlorée ont montré que les teneurs en Cu oscillent autour de 4,5 ppb ($4,5 \pm 1,5$ ppb). Ce niveau est proche de la valeur référence (absence de pollution) utilisée dans les grilles de qualité des eaux de rivière par les Agences de Bassin (5 ppb Cu, Landragin, 1987).

Dans un souci de simuler des situations de contamination vraisemblables dans l'environnement, nous avons choisi d'utiliser des concentrations en Cu dont la plus forte ne dépasse pas 50 ppb. Ainsi, les flux de métal ont été calculés pour obtenir dans les bacs expérimentaux les concentrations finales de 12, 24 et 48 ppb Cu, ces valeurs incluant le niveau de base dans le milieu d'essai. Cependant, les dosages quotidiens du Cu dans les bacs expérimentaux (échantillonnage sur 24 heures) ont montré que les concentrations effectives subissaient des fluctuations dont les plus fortes ont eu lieu pendant les 6 premiers jours. Le tableau 55 donne les concentrations moyennes à différents stades de l'expérience.

Tableau 55 : Concentrations effectives du Cu dans le milieu d'exposition (moyennes \pm SD d'échantillons de 24 h).

Concentration envisagée ($\mu\text{g Cu/l}$)	Concentrations effectives ($\mu\text{g Cu/l}$)		
	1er - 14e jour	6e - 27e jour	1er - 27e jour
T	$4,6 \pm 1,6$	-	$4,5 \pm 1,5$
12	$7,8 \pm 1,9$	$9,0 \pm 1,4$	$8,4 \pm 1,7$
24	$19,3 \pm 4,9$	$21,4 \pm 2,4$	$20,2 \pm 3,7$
48	$46,6 \pm 7$	$50,1 \pm 3,3$	$48,3 \pm 5,9$

Compte tenu de la valeur de base dans le bac témoin, l'apport moyen supplémentaire en Cu dans les bacs d'exposition est en moyenne de 4, 16 et 44 ppb. Ce sont donc ces valeurs qui seront considérées dans l'interprétation des effets observés puisque les mesures physiologiques (VO_2 , TF) correspondant au bac sans apport supplémentaire (4,5 ppb Cu) sont prises comme valeurs de référence (Témoin).

* Pour le cadmium

Les concentrations choisies sont : 5, 15 et 45 ppb Cd ; la concentration dans l'eau de conduite déchlorée est de 0,2-0,3 ppb ,ce qui correspond à la valeur de référence utilisée dans les grilles de qualité pour les eaux de rivière (Landragin, 1987). Le tableau 56 présente les concentrations effectives du Cd dans le milieu d'exposition.

Tableau 56 : Concentrations effectives du Cd dans le milieu d'exposition (moyennes \pm SD d'échantillons de 24 h).

Concentration envisagée ($\mu\text{g Cd/l}$)	Concentrations effectives ($\mu\text{g Cd/l}$)		
	1er - 14e jour	6e - 27e jour	1er - 27e jour
T	0,30 \pm 0,10	-	0,28 \pm 0,11
5	5,9 \pm 0,6	5,7 \pm 0,6	5,7 \pm 0,6
15	16,1 \pm 2,7	16,6 \pm 1,6	16,3 \pm 2,2
45	43,6 \pm 5,6	43,6 \pm 4,3	43,6 \pm 4,3

V.2.2. Choix de la ration alimentaire

La quantité et la qualité de la nourriture particulière en milieu naturel varient avec la saison et les conditions trophiques dans le même milieu, et diffèrent d'un milieu à l'autre. Pour la rivière Moselle, la teneur en phytoplancton est variable selon les sites étudiés (apports d'affluents) et la saison. Si l'on prend comme exemple la station de Wadrineau (Sud de la ville de Metz), les données de Wille (1987) montrent que la densité algale varie de 2500 cellules/ml à 32500 cellules/ml entre le printemps et l'été avec, pendant la majorité du temps, des densités algales en dessous de 20000 cellules/ml.

Compte tenu de ces données, nous avons choisi une nourriture de 8800 cellules/ml de *Chlamydomonas variabilis* en moyenne ; cette concentration est dans la gamme considérée comme favorable à *Dreissena* et à d'autres bivalves (Poulsen *et al.*, 1982 ; Kryger et Riisgard, 1988 ; Sprung et Rose, 1988).

V.2.3. Température

L'expérience a lieu en hiver (Février 1990). La température moyenne de l'eau de la Moselle est de 5,5°C. La température de 13°C ± 1°C a été choisie pour cet essai (au lieu de 20°C) afin de limiter l'écart avec les conditions naturelles. Walz (1978) a montré que 13°C est dans la gamme des températures favorables du point de vue bioénergétique. Le choix de cette température nous permet également d'utiliser l'eau de conduite déchlorée sans ajustement préalable de la température.

V.3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

V.3.1. Préparation des moules

Les moules destinées aux mesures physiologiques sont réparties en 14 lots de 8 moules sur des portoirs en PVC de 10 x 10 cm et sont acclimatées pendant 6 jours à la température de 13°C en présence d'une nourriture de *Chlamydomonas variabilis*. Au septième jour, elles sont introduites dans les bacs expérimentaux à raison de deux lots par concentration de Cu et de Cd (12 lots au total). Les deux lots restants constituant les témoins communs aux deux métaux.

V.3.2. Mesures physiologiques

Au 28^{ème} jour, l'ensemble des lots exposés est prélevé pour subir les mesures physiologiques (TF, VO₂ et TE). Des enregistrements de quelques heures de l'activité de filtration sont effectués au moyen de la sonde anémométrique, afin de contrôler l'état comportemental des moules exposées. Ces enregistrements concernent des moules dont l'exposition a été prolongée à 33-35 jours (toutes les concentrations du Cu et 2 moules exposées à 45 ppb Cd).

V.3.2.1. Mesure du TF

La concentration algale utilisée dans la mesure est de $5,17 \cdot 10^4$ ($\pm 0,57 \cdot 10^4$) cellules de *Chlamydomonas/ml*.

La détermination des concentrations en particules se fait par mesure de la fluorescence. La sensibilité de cette technique ne permet pas d'effectuer avec une bonne précision la mesure à la concentration de 8800 cellules/ml, qui est la ration alimentaire utilisée dans l'essai. Cependant, les

travaux de Walz (1978) et de Dorgelo et Smeenk (1978) mettent en évidence que le TF de *Dreissena* ne montre pas de variation significative pour la gamme de concentration de 9000-81000 cell./ml. Sprung et Rose ont trouvé une diminution du TF entre 10000 et 50000 cellules, mais leurs résultats sont fondés sur des mesures sans répétitions. D'autre part, ces auteurs ainsi que Walz (1978) rapportent qu'il n'y a pas de formation de pseudo-fèces jusqu'à 85000 cellules/ml, ce qui indique que la filtration n'est pas perturbée par un excès de particules.

V.3.2.2. Mesure du taux d'excrétion ammoniacale (TE)

Après la mesure du TF, le TE est évalué à 13°C selon le protocole énoncé dans la 2^{ème} partie, chap II.3.4.3.

V.3.2.3. Mesure de la VO₂

Au 14^{ème} jour et au 28^{ème} jour d'exposition, une évaluation de la VO₂ est effectuée sur des moules prélevées de chaque bac expérimental.

La VO₂ est mesurée à 13°C sur des moules (2 moules par répétition, 4 répétitions par concentration) prélevées sur les lots ayant servi aux mesures précédentes. La mesure concerne les mêmes moules au 14^{ème} et au 28^{ème} jour.

V.3.3. Détermination de l'efficacité d'assimilation

Le rapport poids sec sans cendre/poids sec (PSSC/PS) est évalué dans la nourriture algale (F) et dans les fèces (E) selon le protocole suivant (Widdows, 1985) :

- Pour la nourriture algale : 6 échantillons d'environ 30 ml de la suspension algale sont filtrés sur des filtres en fibres de verre (Whatman GF/C ; 4,7 cm) préalablement rincés, passés au four à 450°C pendant 2 heures, et pesés. Les filtres sont ensuite rincés à l'eau distillée pour éliminer les sels et mis à l'étuve à 105°C pendant 24 heures. Ils sont alors pesés pour déterminer le PS puis mis au four à moufle à 450°C. Le PSSC est alors obtenu par la différence (PS-PC).

Le paramètre F est la moyenne des rapports PSSC/PS des 6 échantillons.

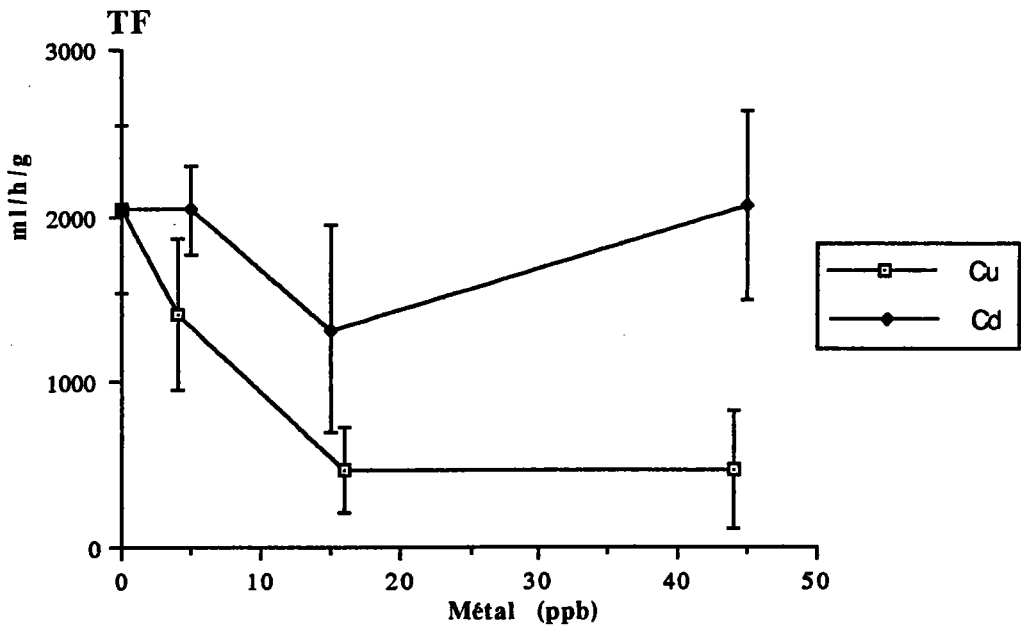


Fig. 50 : TF en fonction des concentrations métalliques après 28 jours d'exposition au Cu et au Cd.

- Pour les fèces : A cause de la faible production de fèces par chaque lot de 8 moules, un facteur E commun a été déterminé ; pour ce faire, 2 groupes de 25 moules sont prélevés au hasard à la fin des mesures physiologiques et incubés séparément pendant 24 heures dans 2 l d'eau de conduite déchlorée et filtrée sur filtre de 0,45 µm de diamètre de pore. Après cette incubation, les milieux filtrés sur 2 filtres de fibre de verre, après rinçage à l'eau distillée, subissent les mêmes opérations que précédemment. Le facteur commun E est la moyenne des 2 rapports PSSC/PS relatifs aux deux groupes de moules.

L'efficacité d'assimilation (e) est obtenue par le rapport de Conover :

$$e = \frac{F - E}{(1 - E) F}$$

V.4. RESULTATS DES MESURES PHYSIOLOGIQUES

Aucune mortalité n'a été observée jusqu'au 14^{ème} jour. Entre le 14^{ème} et le 28^{ème} jour, sur l'ensemble de l'essai, un seul cas de mortalité a été enregistré parmi les 16 moules exposées à 44 ppb Cu.

V.4.1. Taux de filtration

- Effet du Cd (Annexe XVI)

Les résultats (Fig 50) montrent que les lots exposés à 5 et 45 ppb Cd ont des TF équivalents à celui des témoins ; les lots exposés à 15 ppb présentent un TF moyen inférieur, mais cette valeur est affectée d'un coefficient de variation élevé. En fait, seule une mesure sur les deux effectuées s'est révélée faible à cette concentration par rapport aux témoins. La tendance générale ne permet pas d'attribuer cela à l'effet du métal.

On peut donc conclure qu'une concentration de 45 ppb Cd est une concentration sans effet pour le TF dans une exposition chronique, du moins jusqu'à un mois.

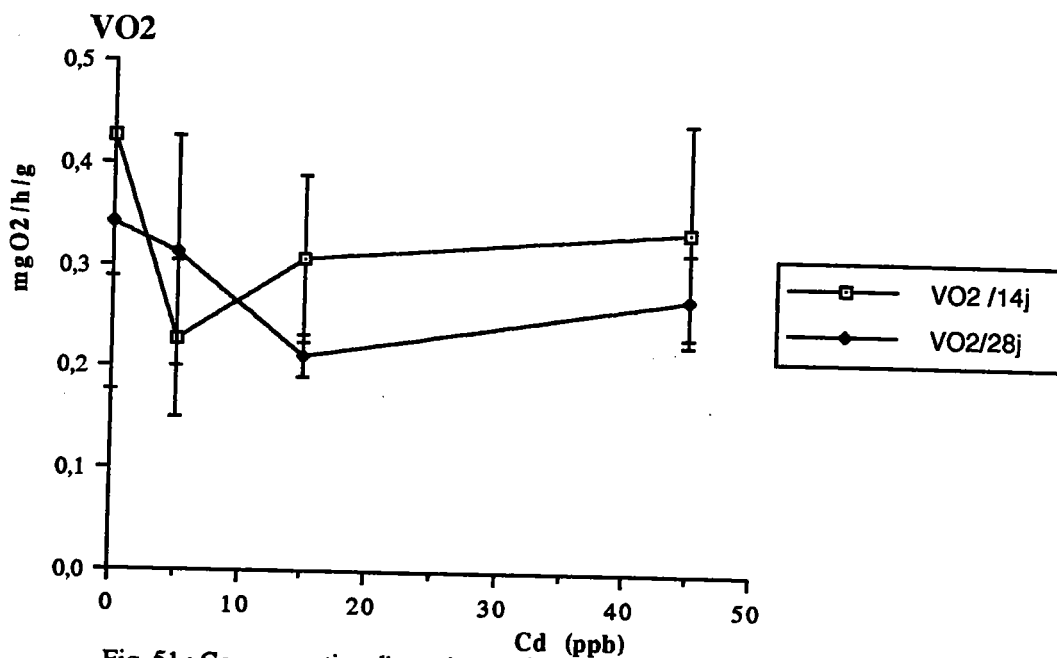


Fig. 51 : Consommation d'oxygène en fonction de la concentration en Cd après 14 et 28 jours d'exposition.

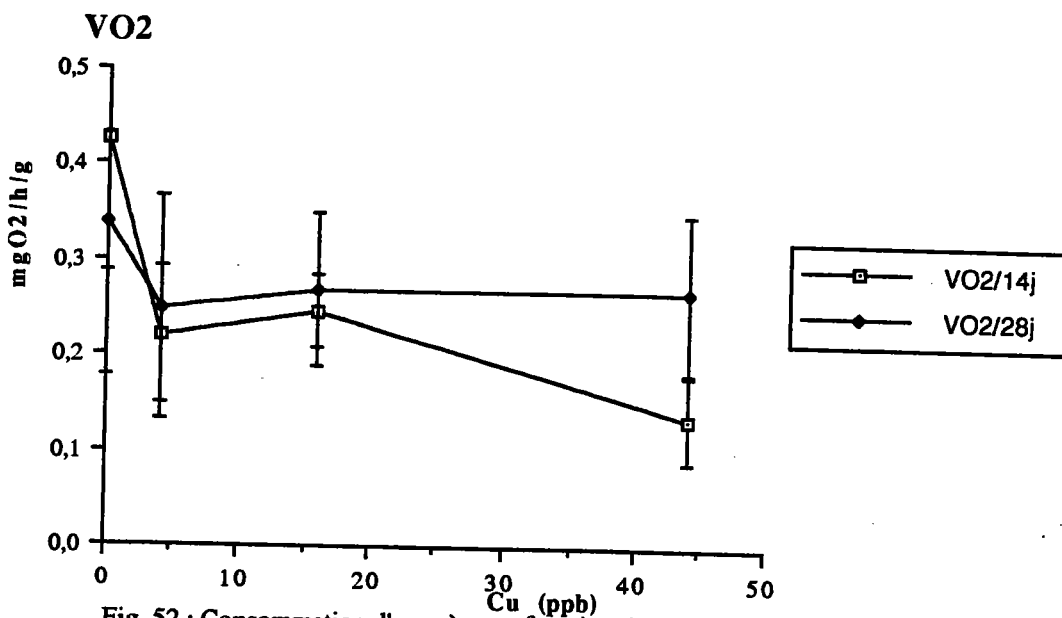


Fig. 52 : Consommation d'oxygène en fonction des concentrations en Cu après 14 et 28 jours d'exposition.

Les enregistrements de l'activité de filtration au 32^{ème} jour d'exposition à 45 ppb Cd montrent que celle-ci est normale la plupart du temps, avec cependant des périodes de comportement perturbé (discontinu) plus longues que celles qui ont lieu chez les témoins. Il pourrait s'agir de perturbations légères et intermittentes de la filtration à ce stade de l'exposition.

L'absence d'effets significatifs du Cd jusqu'à 45 ppb sur le TF permet d'interpréter la nature linéaire et concentration-dépendante de la cinétique d'accumulation observée dans cette étude (Mouabad et Mersch, sous presse). L'animal intégrerait le métal proportionnellement à sa concentration du fait que l'interaction avec le milieu (filtration) n'est pas altérée par la présence du métal.

- Effet du Cu (Fig 50, Annexe XVII)

Par rapport aux témoins, les moules mises en présence de 4 ppb Cu montrent une légère réduction du TF. Par contre, des réductions importantes sont constatées en présence de 16 et 44 ppb (77% de réduction en moyenne). Ces résultats concordent avec ceux obtenus sur 1 semaine (cf chap III.4.). Le seuil de toxicité chronique peut être situé entre 4 et 16 ppb Cu.

Les enregistrements de l'activité de filtration après 32-35 jours d'exposition (non illustrés) montrent que le comportement des moules en présence de 4 ppb est équivalent à celui du témoin. Les moules exposées à 16 et 44 ppb montrent par contre une activité perturbée dans la majorité du temps. Il est cependant intéressant de noter que des phases d'activité normale subsistent, même en présence de 44 ppb Cu.

V.4.2. Consommation d'oxygène

- Effets du Cd (fig 51, Annexe XVIII)

Les résultats des mesures effectuées au 14^{ème} et au 28^{ème} jour d'exposition montrent qu'en présence du Cd, les VO₂ sont légèrement inférieures à celles des témoins respectifs, mais cet effet n'est pas statistiquement significatif sauf pour les lots exposés à 5 ppb Cd au 14^{ème} jour. La tendance générale des résultats ne permet toutefois pas d'attribuer cette différence à un effet du métal.

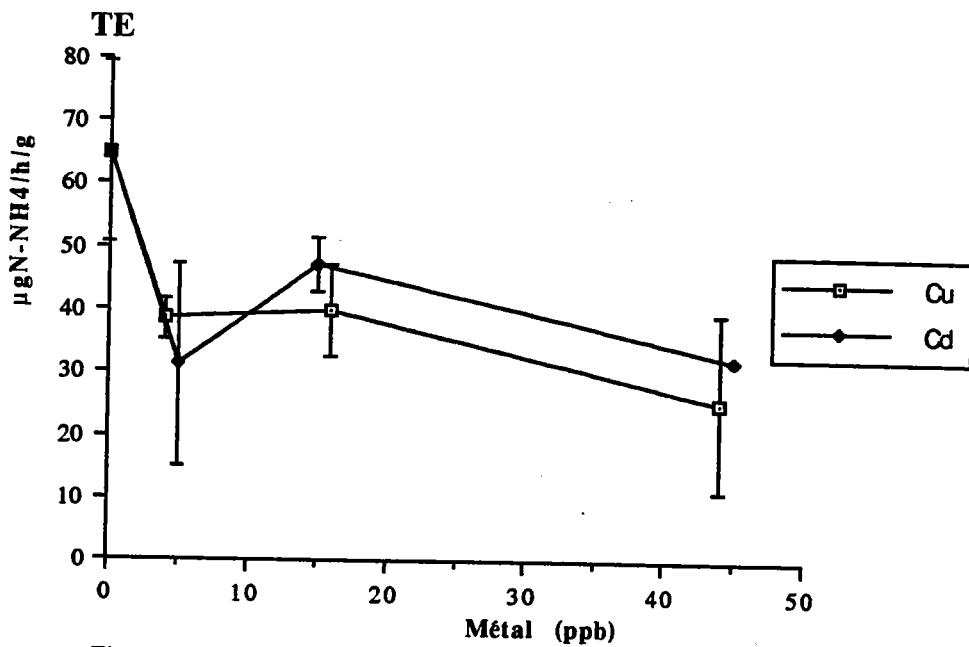


Fig. 53 : TE en fonction des concentrations métalliques après 28 jours d'exposition au Cu et au Cd.

- Effets du Cu (fig 52, Annexe XVIII)

Les mesures du 14^{ème} jour montrent des effets de réduction de la VO₂ significatifs pour toutes les concentrations par rapport aux témoins. La plus forte réduction est observée en présence de 44 ppb Cu. Le fait que la toxicité se manifeste à ce stade, même en présence de la concentration de 4 ppb alors que la filtration n'est pas modifiée, indiquerait peut-être un mécanisme de toxicité au niveau enzymatique qui s'opèrerait par suite de l'accumulation progressive du métal.

Cependant, au 28^{ème} jour, bien que les niveaux de VO₂ soient légèrement inférieurs à ceux des témoins, la différence n'est pas significative. Cette atténuation de l'effet est remarquable chez les lots exposés à 44 ppb. Si l'on admet que l'effet observé au 14^{ème} jour est dû à une toxicité au niveau enzymatique, l'atténuation de l'effet correspondrait alors à une phase de neutralisation du métal grâce à une meilleure détoxification.

V.4.3. Taux d'excrétion

Les résultats (fig 53, Annexe XIX) montrent que le TE est diminué lors de l'exposition, aussi bien au Cd qu'au Cu, sans que l'on puisse déceler une nette relation concentration-effet.

V.5. LES BILANS ENERGETIQUES

V.5.1. Les paramètres de l'énergie assimilée

- Le contenu calorifique de la nourriture algale (CE)

Nous ne disposons pas de la valeur calorifique de l'espèce algale utilisée, *Chlamydomonas variabilis* ; aussi, nous nous référerons dans nos calculs à la valeur calorifique d'une espèce voisine : *Chlamydomonas reinhardi* qui est de 5,289 cal/mg PS, ce qui équivaut à 22,11 J/mg PS (Cummins et Wuycheck, 1971). Ces auteurs donnent d'ailleurs cette valeur comme la valeur calorifique générale pour les Chlamydomonaceae.

La ration alimentaire offerte aux moules durant l'essai est de $8,8 \cdot 10^3$ cellules/ml donc $8,8 \cdot 10^6$ cellules/l. C'est donc par rapport à cette ration que le calcul de la nourriture consommée est effectué (cf V.3.2.1.). Nous avons déterminé le poids sec moyen d'une algue à $6,13 \cdot 10^{-8}$ mg ; la ration alimentaire est donc de 0,5394 mg/l, ce qui équivaut en contenu énergétique à un CE : $0,5394 \times 22,11 = 11,927$ J/l.

- L'efficacité d'assimilation (e)

* Le paramètre F = PSSC/PS algues : la moyenne de 6 mesures effectuées est de 0,904 ± 0,030.

* Le paramètre E = PSSC/PS fèces : La moyenne de 2 mesures effectuées est de 0,755 ± 0,046.

L'efficacité d'assimilation moyenne est donc :

$$e = \frac{0,904 - 0,755}{(1 - 0,755) 0,904} = 0,673$$

V.5.2. Le potentiel énergétique de croissance

Le calcul du P.E.C. est fait sur la base des valeurs moyennes des mesures physiologiques (Tableau 57).

Tableau 57 : Calculs énergétiques chez les lots de *Dreissena* exposés au Cd et au Cu pendant 28 jours.

Lots de moules	C = TF x CE	A = C x e	R = VO ₂ * x 20,33	U = TE x 0,0249	PEC = A - (R+U)
	énergie consommée (J/h/g)	énergie assimilée (J/h/g)	énergie respirée (J/h/g)	énergie excrétée (J/h/g)	potentiel énergétique de croissance (J/h/g)
Témoins	24,40	16,42	4,84	1,622	9,96
5 ppb Cd	24,31	16,36	4,45	0,779	11,09
15 ppb Cd	15,74	10,59	3,01	1,181	6,40
45 ppb Cd	24,52	16,50	3,84	0,802	11,86
4 ppb Cu	16,86	11,35	3,56	0,963	6,83
16 ppb Cu	5,57	3,75	3,82	0,993	-1,06
44 ppb Cu	5,59	3,76	3,80	0,633	-0,673

* La VO₂ est convertie en ml O₂.h⁻¹.g⁻¹, sachant que dans les conditions normales de température et de pression 1 mg O₂ = 0,7 ml O₂.

Le bilan énergétique des témoins représente un P.E.C. positif de 9,96 J.h⁻¹.g⁻¹ disponible à l'animal pour sa croissance somatique et gamétogénétique.

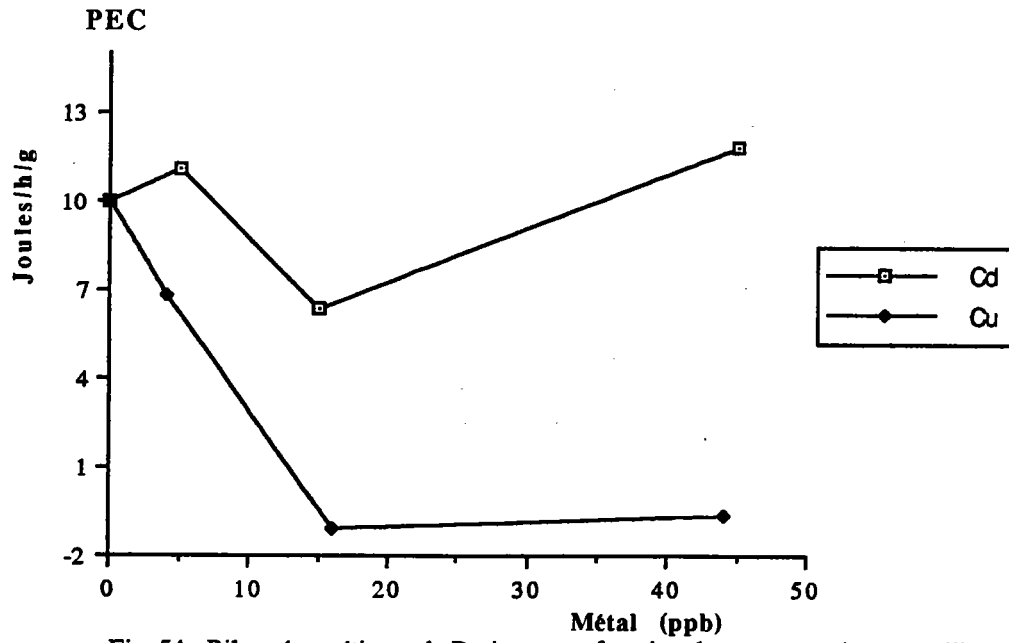


Fig. 54 : Bilans énergétiques de Dreissena en fonction des concentrations métalliques après 28 jours d'exposition.

- Effet du Cd (fig 54)

Au regard de l'ensemble des résultats concernant le Cd, on peut conclure qu'il n'y a pas d'effet négatif sur le P.E.C. pour les concentrations testées. On constate qu'il y a plutôt une légère augmentation pour les lots en présence de 5 et 45 ppb Cd ; ceci est dû au fait que l'énergie assimilée ne subit pas d'effet alors que l'énergie respirée et l'énergie excrétée sont diminuées. Le résultat en présence d'une concentration de 15 ppb montre une diminution du P.E.C. qui n'est pas confirmée à 45 ppb.

- Effet du Cu (fig 54)

Contrairement au Cd, les résultats concernant le Cu montrent un effet négatif de l'exposition sur le bilan énergétique de *Dreissena*. La diminution du P.E.C. se manifeste dès la concentration de 4 ppb Cu et devient très marquée à 16 et 44 ppb. A ces concentrations, les P.E.C. sont de valeurs proches et légèrement négatives.

V.6. DISCUSSION

Les résultats de l'essai font apparaître la différence de toxicité physiologique entre les deux métaux, testés dans les mêmes conditions.

Le Cadmium se révèle, pour les niveaux de concentration testés, sans effet négatif sur le P.E.C. de *Dreissena*. La valeur du P.E.C. pour la concentration de 15 ppb est inférieure à celle du témoin. On ne peut cependant pas l'attribuer à un effet du métal puisqu'une concentration supérieure ne produit aucun effet. En fait, la mesure de filtration est effectuée sur deux répétitions dont l'une a révélé une réduction du TF qui n'a pu être expliquée. Le coefficient de variation lié à cette mesure est d'ailleurs élevé (47%) et le calcul du P.E.C., fait à partir des valeurs moyennes, n'en tient pas compte.

Une étude similaire à la présente a été réalisée par Poulsen *et al.* (1982) chez *Mytilus edulis*. Les concentrations testées étaient 10 et 100 ppb Cd. Les auteurs ont constaté qu'aucune des concentrations n'affecte le P.E.C. après 17 jours d'exposition. Au niveau des paramètres du P.E.C. il n'y a pas d'effet, ni sur le TF, ni sur l'assimilation de nourriture, ni sur la VO_2 . Les auteurs n'ont pas évalué le TE.

Une élévation du P.E.C. dans le cas d'une exposition aux métaux ne signifie pas nécessairement une meilleure croissance corporelle au sens strict. En effet, le métal qui s'accumule selon une cinétique linéaire est détoxifié selon des mécanismes consommateurs d'énergie, notamment la synthèse des structures lysosomales de séquestration (granules) et les ligands cytosoliques (Herwig *et al.*, 1989). Ces mécanismes constituent certainement une voie de déviation de l'énergie assimilée par rapport à sa destination essentielle qui est la croissance. Cette déviation pourrait être accentuée par une accélération de la gamétogenèse. Gould *et al.* (1985) ont mis en évidence un tel effet chez *Placopecten magellanicus* après une exposition de 7 semaines à 20 ppb Cd. Les animaux exposés sont matures précocement, ce qui est considéré par les auteurs comme étant une dérivation de l'énergie de croissance. C'est en définitive une action indirecte sur la croissance par la stimulation de la maturation des gamètes.

Contrairement au Cd, l'exposition chronique au Cu affecte sensiblement le bilan énergétique de *Dreissena*. Le seuil de cette toxicité peut être situé entre 4 et 16 ppb Cu.

Les valeurs du P.E.C., légèrement négatives en présence de 16 et 44 ppb, indiquent que les animaux exposés n'arrivent plus à assurer leurs besoins énergétiques de maintenance et, par conséquent, la mobilisation des réserves énergétiques corporelles est nécessaire. L'impact physiologique est évidemment grave compte tenu des nécessités de détoxification qu'impose à l'animal la pénétration du métal. Il y a là un double aspect de la toxicité physiologique du Cu vis-à-vis de *Dreissena* (et des autres bivalves) : un aspect de réduction du potentiel énergétique de croissance qui compromet la survie de l'animal et un aspect de déviation des capacités énergétiques pour les besoins de la détoxification.

Nous ne disposons pas de données bibliographiques relatives à l'effet du Cu sur le P.E.C. chez d'autres bivalves, mais le seuil de toxicité chronique trouvé ici est proche de ceux établis en utilisant d'autres critères de croissance. Par exemple Redpath (1985), dans une étude sur *Mytilus* utilisant la mesure de la croissance de la coquille par diffraction laser, a montré que 4,6 ppb de Cu réduit significativement la croissance en 10 jours d'exposition. Elle est complètement arrêtée en présence de 15,7 ppb de Cu. La CE50-10 jours déterminée par l'auteur est de 6 ppb. Dans une exposition de 20 jours, l'auteur a observé un net effet de réduction de croissance à partir de 3,3 ppb. Stromgren (1986), dans une étude également sur *Mytilus edulis*, a pu mettre en évidence une réduction de la croissance de 21 et 47% après 7 jours d'exposition, respectivement à 3 et 6 ppb Cu. Gould *et al.* (1985, 1988), étudiant la croissance gamétogénétique chez *Placopecten magellanicus*, ont montré que l'exposition, en période hivernale à 20 ppb Cu (7-8 semaines), inhibe fortement la production et la maturation des gamètes et réduit le poids des gonades par rapport aux témoins. Un effet similaire a été mis en évidence chez *Mytilus edulis* en présence de 50 ppb Cu par Myint et Tyler (1982).

En milieu naturel, la température et les conditions trophiques subissent des variations saisonnières importantes et, de ce fait, le P.E.C. est variable tout au long de l'année (Widdows, 1985). Il est donc évident que les résultats du présent essai concernent seulement les conditions constantes ayant été appliquées. Néanmoins, comme ces conditions ont été jugées favorables (P.E.C. positif chez les témoins), on peut estimer que l'essai visualise bien ce qui se passerait réellement en cas d'exposition chronique *in situ*.

Tableau 58 : Evolution de la mortalité pendant l'exposition au Lutensol (répétition n° 1) (10 moules/lot).

Temps d'exposition	[Lut] ppm	2	2,6	3,2	3,8
24 h		0	0	0	1
48 h		0	1	5	4
72 h		1	4	3	2
96 h		2	0	1	1
Total		3	5	9	8

Tableau 59 : Evolution de la mortalité pendant l'exposition au Lutensol (répétition n° 2) (10 moules/lot).

Temps d'exposition	[Lut] ppm	2	2,6	3,2	3,8
24 h		0	0	0	2
48 h		0	0	2	4
72 h		1	3	2	2
96 h		2	1	3	1
Total		3	4	7	9

Tableau 60 : Valeur de la CL50-96h du Lutensol chez Dreissena (moyenne des deux répétitions).

CL50-96h (ppm)	Droite de régression de la mortalité
2,52	$Y1 = 5,28 \pm 5,92 (\log c - 0,44)$ $Y2 = 5,17 \pm 6,29 (\log c - 0,44)$

4ème PARTIE

**EXTENSION A D'AUTRES MICROPOLLUANTS ET DISCUSSION
DE L'UTILITE ECOTOXICOLOGIQUE DE *DREISSENA***

CHAPITRE I : EVALUATION DE L'UTILITE ECOTOXICOLOGIQUE DES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE *DREISSENA*

I.1. INTRODUCTION

La nécessité de méthodes d'évaluation de la toxicité à moyen et long terme est actuellement largement admise. Parmi les groupes utilisés, les bivalves constituent un matériel de choix (OECD, 1987 ; Bayne *et al.*, 1985, 1988). Il nous est donc apparu intéressant, étant donnés les résultats acquis, de discuter l'apport que peut représenter en ce domaine les fonctions physiologiques de *Dreissena*. Cependant, afin d'appuyer cette discussion sur des données générales, il était nécessaire d'étendre nos essais à des substances autres que les métaux ; dans cet objectif, deux molécules organiques et un effluent industriel ont été testés.

I.2. EFFETS PHYSIOLOGIQUES DE DEUX MICROPOLLUANTS ORGANIQUES ET D'UN EFFLUENT INDUSTRIEL SUR *DREISSENA*

I.2.1. Effets d'un agent de surface non ionique

La molécule testée est du type alcool éthoxylé. Le produit est un gel pur (actif à 100%) appelé Lutensol*. Les solutions mères (1 g/l et 10 g/l) sont préparées dans de l'eau distillée.

I.2.1.1. Toxicité létale

I.2.1.1.1. Conditions expérimentales

La difficulté de maintenir le Lutensol en solution dans l'eau de conduite déchlorée (formation d'un précipité léger et de mousse) nous a amenés à travailler avec une eau synthétique pur dure (25-30 mg CaCO₃/l) réalisée à partir d'eau de conduite et d'eau déminéralisée. Les moules sont acclimatées à ce milieu pendant 5 jours.

Un essai préliminaire a montré que 100% de mortalité sont obtenus avec 4 ppm ; l'essai définitif a été mené aux concentrations suivantes : 2 ; 2,6 ; 3,2 ; 3,8 ppm.

* Produit expérimental fourni par la société PROCTER & GAMBLE, E.T.C., Belgique.

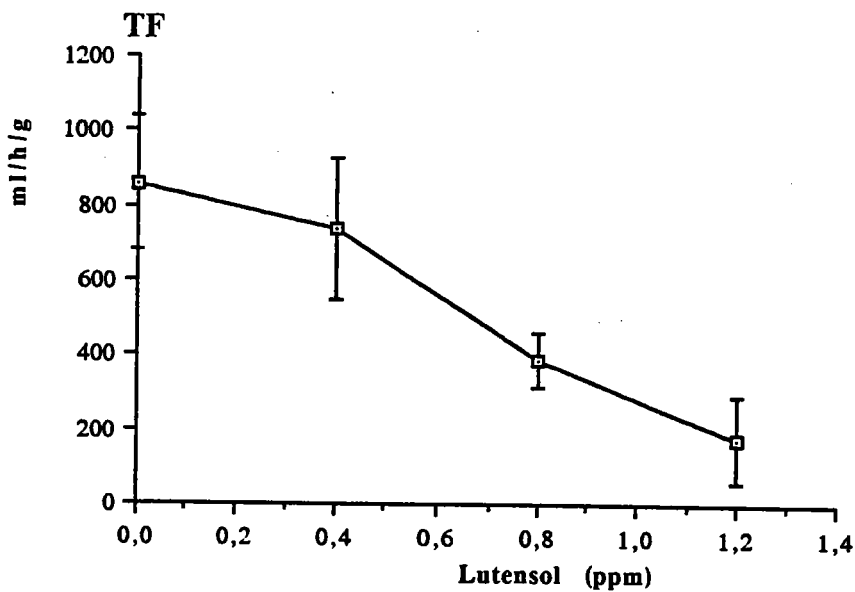


Fig. 55 : TF après 48 heures d'exposition au Lutensol.

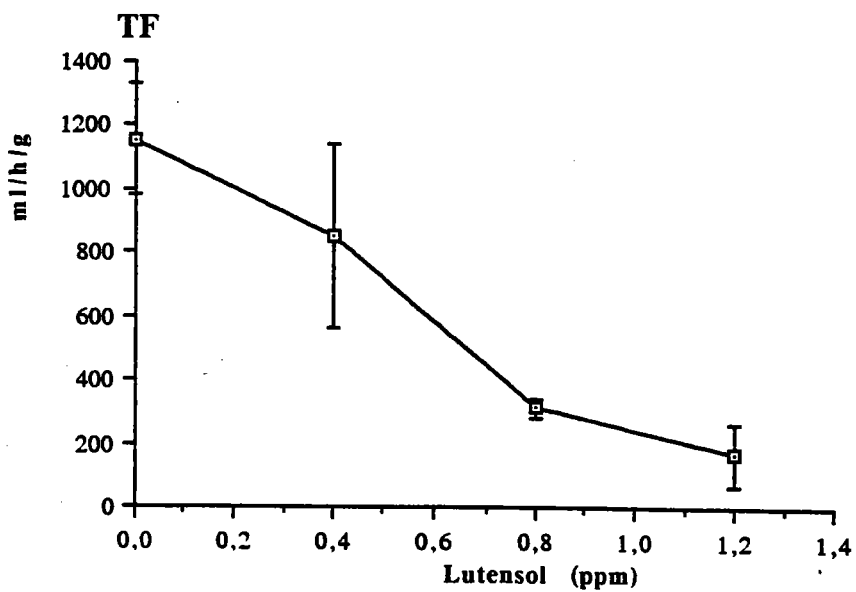


Fig. 56 : TF après 8 jours d'exposition au Lutensol.

I.2.1.1.2. Résultats

Le seuil de toxicité létale en 24 h se situe entre 3,2 et 3,8 ppm de Lutensol (Tableaux 58 et 59). Pour l'ensemble de l'essai (96 h), ce seuil est inférieur à 2 ppm ; la CL50-96h est en moyenne de 2,52 ppm. Cette valeur se situe dans la gamme de CL50-48 (2 à 5 ppm) pour la daphnée *Daphnia magna* et le poisson zèbre *Brachydanio rerio* (essai dans de l'eau de conduite, De Henau, Comm. pers.).

I.2.1.2. Effets sur le TF

Les concentrations testées sont : 0,4 ; 0,8 et 1,2 ppm.

- Effets après 48 h d'exposition (fig. 55, Annexe XX) : on constate des réductions du TF de 14%, 55% et 79%, respectivement en présence de 0,4, 0,8 et 1,2 ppm de Lutensol. Cependant, l'effet de 0,4 ppm n'est pas statistiquement significatif. La CE50-48 calculée à partir des valeurs moyennes est de 0,747 ppm.

- Effets après 1 semaine d'exposition (fig. 56, Annexe XX) : les réductions constatées sont plus importantes qu'à 48 h (26%, 73% et 85% respectivement en présence de 0,4, 0,8 et 1,2 ppm de Lutensol). La CE50-8j est de 0,584 ppm.

I.2.1.3. Effets sur la VO₂

Les résultats concernant une exposition d'une semaine (fig. 57, Annexe XXI) montrent que les concentrations de 0,8 et 1,2 ppm provoquent l'élévation de la VO₂. Cependant, l'effet n'est pas statistiquement significatif ($\alpha = 0,05$).

I.2.2. Effet d'un organochloré : le Lindane

Le produit testé est l'isomère γ du 1, 2, 3, 4, 5, 6-Hexachlorocyclohexane (à 97%, Aldrich chimie) communément appelé Lindane. C'est un insecticide puissant et de toxicité aiguë moyenne pour beaucoup d'organismes non cibles ; sa rémanence est importante dans les biotopes aquatiques (Thybaud, 1990).

La solution mère est préparée dans l'acétone (1 mg/ml d'acétone).

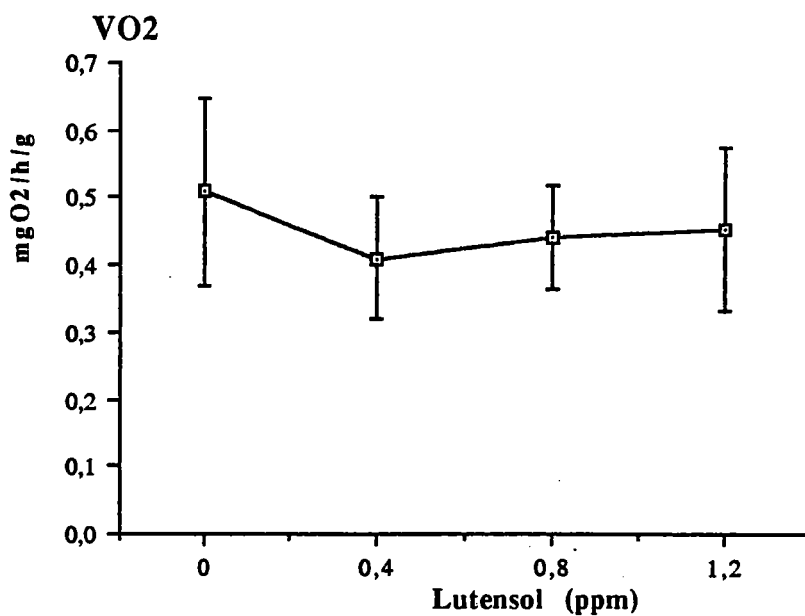


Fig. 57 : VO2 après une semaine d'exposition au Lutensol.

I.2.2.1. Toxicité létale

Un essai préliminaire avec des concentrations variant de 0,1 à 1 ppm n'a montré aucune mortalité en 96 h. Un essai supplémentaire a été entrepris à titre indicatif en présence de 4 et 10 ppm.

Le tableau 61 montre que la valeur approchée de la CL50-96h serait de 10 ppm.

Tableau 61 : Toxicité létale du Lindane chez *Dreissena* (10 moules par concentration).

Lindane	4 ppm	10 ppm
Temps		
24 h	0	0
48 h	0	1
72 h	0	1
96 h	4	3
Total	4	5

I.2.2.2. Effets sur le TF

Les concentrations testées sont 50, 100 et 200 ppb.

Les résultats des mesures après 48 h d'exposition (fig. 58, Annexe XXII) ne montrent aucun effet significatif en présence des concentrations testées, même si les niveaux de TF sont légèrement plus élevés que chez les témoins.

Après une semaine d'exposition (fig. 59), seule la concentration de 200 ppb de Lindane provoque une légère réduction du TF. D'autre part, et étant donné qu'un effet de stimulation de la filtration est peu vraisemblable, les différences constatées entre les niveaux de filtration des témoins et ceux des lots exposés à 50 et 100 ppb (d'ailleurs non significatives) n'ont pu être expliquées. Peut-être s'agit-il d'une mauvaise condition des témoins.

Considérant l'ensemble de l'essai, on peut estimer que le TF de *Dreissena* ne montre pas une bonne sensibilité vis-à-vis du Lindane, la concentration capable d'exercer un effet après 1 semaine d'exposition (200 ppb) étant élevée par rapport aux niveaux susceptibles d'être présents dans les écosystèmes aquatiques.

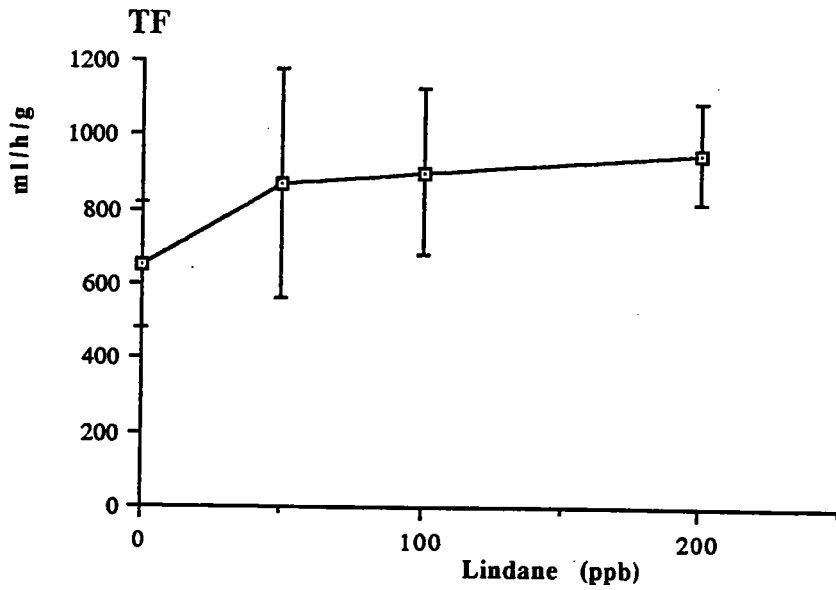


Fig. 58 : TF après 48 heures d'exposition au lindane.

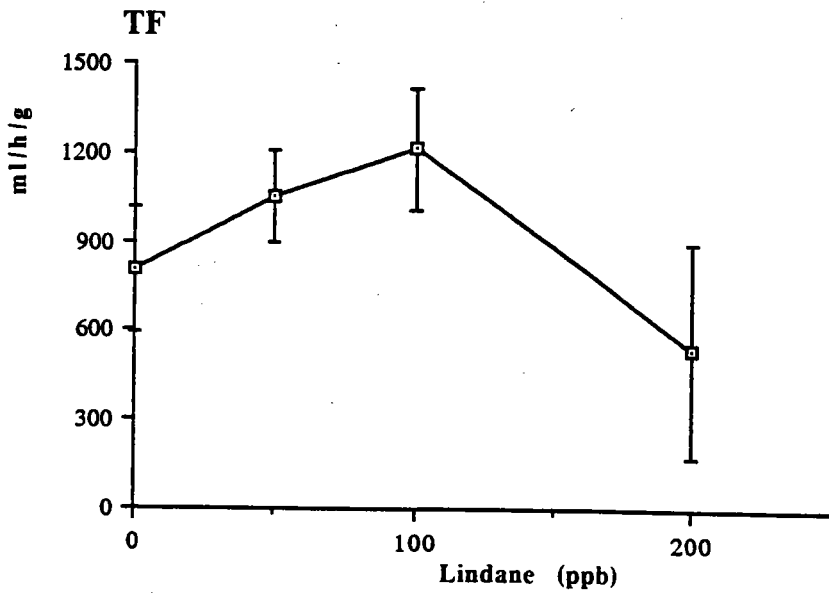


Fig. 59 : TF après une semaine d'exposition au lindane.

I.2.3. Cas d'un effluent industriel

I.2.3.1. Prélèvement et stockage

L'effluent testé provient du rejet d'une usine de traitement de déchets industriels aqueux (région de Metz). Le traitement consiste en un procédé physico-chimique de neutralisation à pH basique suivi d'une compaction sur filtre-presse et d'un stockage des boues ; le filtrat subit un traitement en station d'épuration avant d'être rejeté dans la Moselle. L'effluent est prélevé dans l'égout de l'usine avant la confluence avec des eaux usées urbaines et avant rejet en rivière. Deux prélèvements à 15 jours d'intervalle ont été effectués.

L'effluent est prélevé à l'aide d'une bouteille à clapets et mis dans des flacons en Téflon de 10 l. Au laboratoire, l'effluent est stocké à 4°C pendant 24 heures pour la décantation des matières en suspension. Des échantillons sont ensuite prélevés et acidifiés (5% à l'acide nitrique) en vue des dosages des métaux (Tableau 62).

Tableau 62 : Teneurs en métaux dans les échantillons de l'effluent industriel.

Métal	1er prélèvement (mg/l)	2e prélèvement (mg/l)
Cd	0,163	0,048
Cr	0,750	0,510
Cu	1,31	0,23
Fe	< 0,2	5,8
Mn	0,7	0,9
Pb	0,070	0,250
Zn	3,4	6,8
Ni	0,82	1,38
Hg	< 0,0001	< 0,0001

Nota : Du fait de l'origine des déchets traités, l'analyse ne porte que sur les métaux.

I.2.3.2. Déroulement des essais

Le premier prélèvement a servi à déterminer grossièrement le seuil de toxicité létale. Le deuxième prélèvement est destiné aux études de toxicité létale et physiologique. Pour ces deux études une exposition unique d'une semaine a été entreprise aux taux de dilution suivants : 25% ; 12,5% ;

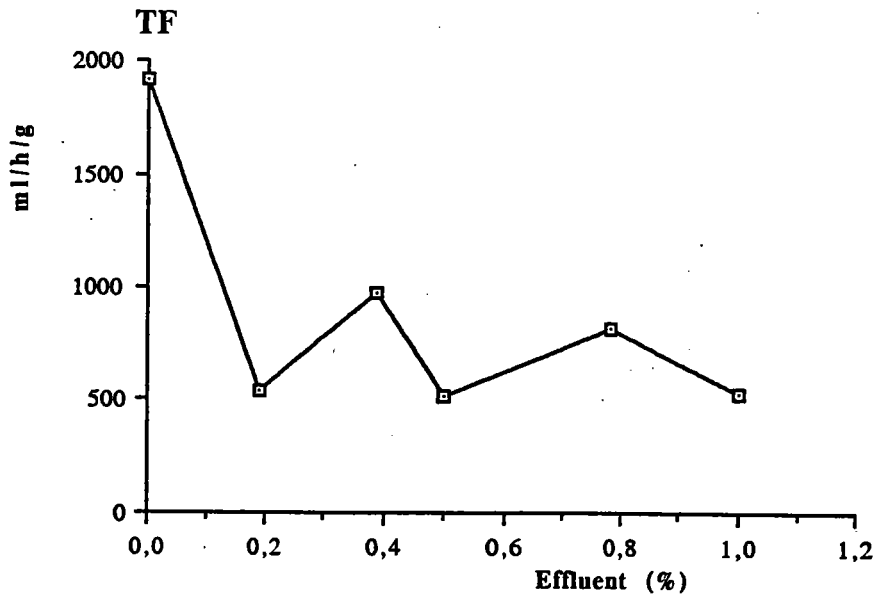


Fig. 60 : TF en fonction des taux de dilution de l'effluent industriel.

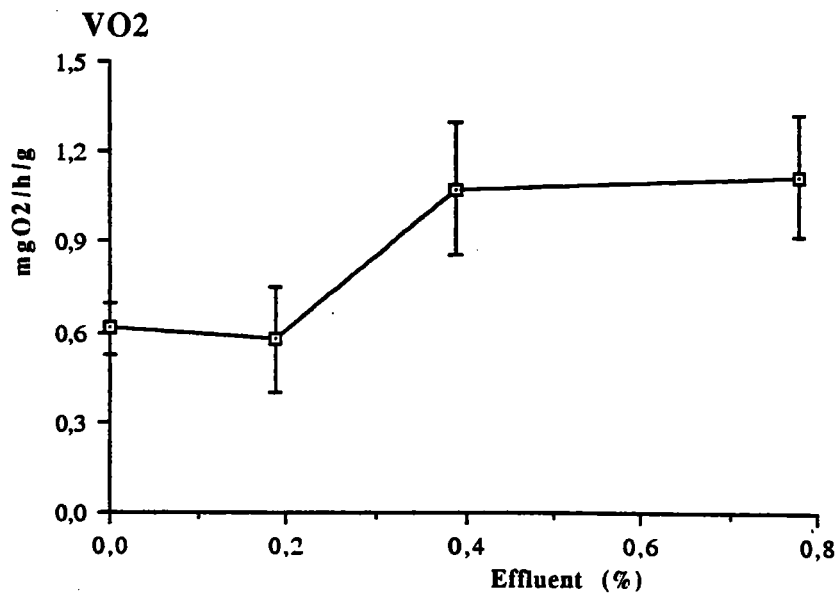


Fig. 61 : VO2 en fonction des taux de dilution de l'effluent industriel.

6,25% ; 3,15% ; 1% ; 0,78% ; 0,5% ; 0,39% ; 0,25% et 0,19%. Un seul changement de milieu a été effectué après 48 h d'exposition.

Au 7ème jour d'exposition, les lots n'ayant montré aucune mortalité sont utilisés pour les mesures physiologiques.

I.2.3.3. Effets létaux

Tableau 63 : Mortalité en présence de l'effluent industriel (2ème prélèvement ; 10 moules par taux de dilution).

Temps d'exposition	Taux de dilution	1,56%	3,12%	6,25%	12,5%	25%
	24 h		0	0	0	0
48 h		0	0	7	10	2
72 h		0	1	1		8
96 h		0	0	2		
120 h		0	7			
144 h		0	1			
168 h		0	0			
Total		0	9	10	10	10

Les résultats (Tableau 63) montrent que le seuil de toxicité létale pour l'ensemble de l'essai se situe entre 1,56% et 3,12% d'effluent ; la CL50-1 semaine se situe également entre ces deux valeurs. La composition en métaux présentée dans le tableau 62 ne peut expliquer entièrement la forte toxicité de l'effluent, il est vraisemblable qu'elle soit également due à d'autres substances non analysées dans l'échantillon.

I.2.3.4. Effets sur le TF

Les résultats (fig. 60, Annexe XXIII) montrent que le TF subit d'importantes réductions chez tous les lots exposés. Par rapport à la valeur témoin, ces réductions vont de 50% (en présence de 0,39% d'effluent) à 72% (en présence de 1% d'effluent). Les résultats indiquent que la toxicité vis-à-vis de l'activité de filtration s'exprime pour des taux de dilution largement inférieurs aux valeurs

létales : ainsi, la plus faible dilution qui s'est révélée efficace (0,19%) est environ 10 fois inférieure au seuil de toxicité létale (1,56% - 3,12%).

I.2.3.5. Effets sur la VO₂

Les mesures de VO₂ sont effectuées sur les lots exposés à des taux de 0,19% ; 0,39% et 0,78% d'effluent.

Les résultats (fig. 61, Annexe XXIV) montrent une nette augmentation de la VO₂ en présence de 0,39% et 0,78% d'effluent (respectivement 76% et 84% d'augmentation en moyenne).

I.2.3.6. Discussion

Les résultats de cet essai montrent que les effets physiologiques de l'effluent se manifestent pour des taux de dilution largement inférieurs au seuil de toxicité létale. Il faut noter que la plus faible dilution testée (0,19%) affecte le TF mais pas la VO₂, ce qui indique que l'activité de filtration est plus sensible à l'action de l'effluent que la VO₂. Notons également que du point de vue du bilan énergétique de l'animal, l'action de l'effluent qui se manifeste par une augmentation de la VO₂ aggrave l'effet manifesté par la réduction du TF. Un effet similaire a été discuté à propos de l'action du Zn sur la VO₂ (cf 3^{ème} Partie, chap. IV.2.4.).

I.3. DISCUSSION GENERALE DE L'UTILITE ECOTOXICOLOGIQUE DES FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DE *DREISSENA*

I.3.1. Choix de la fonction de filtration (TF) comme critère de toxicité sub létale à moyen et long terme

a - sensibilité du TF à la présence de toxiques

Les données du chapitre III de la 3^{ème} partie montrent que l'activité de filtration de *Dreissena* présente une sensibilité remarquable aux métaux testés. Les résultats du présent chapitre confirment cette sensibilité et indiquent le caractère général de l'altération de l'activité de filtration en présence de toxique.

Etant donné que l'effet sur le TF est une conséquence des effets comportementaux, on peut estimer que l'activité de filtration serait en principe sensible à toute substance qui interférerait sur les mécanismes neuromusculaires qui régissent la réponse comportementale.

b - pertinence du critère TF

La sensibilité de la filtration de *Dreissena* vis-à-vis des micropolluants et des effluents complexes justifie son utilité comme critère physiologique dans le cadre de l'évaluation de la toxicité sublétales à moyen et long terme. Cette utilité a été suggérée par Abel (1976) qui a avancé plusieurs arguments dans ce sens et notamment :

- La possibilité de déterminer une relation concentration-effet.
- La simplicité par rapport à d'autres méthodes physiologiques (utilisant les poissons par exemple).
- La signification écologique.

C'est ce dernier argument qui constitue l'élément le plus important qui justifie la démarche. En effet, le rôle vital de la filtration pour l'alimentation et le métabolisme (respiration) fait que toute altération de celle-ci peut entraîner des effets néfastes sur la capacité de maintenance, la croissance et l'effort de reproduction tant au niveau de l'individu qu'à celui de la population. L'étude de la toxicité vis-à-vis du TF équivaut donc à une anticipation intégrée de ces effets.

Lors de la comparaison de nos résultats avec ceux trouvés pour d'autres espèces (3^{ème} Partie, chap. III), il est apparu que *Dreissena* se situait parmi les espèces les plus sensibles à l'action sublétales des métaux. Ceci lui confère une place de choix parmi les bivalves d'eau douce comme matériel biologique dans les études d'écotoxicité. Il existe cependant de nombreux essais physiologiques utilisant des espèces appartenant à des groupes taxonomiques divers et il est important de pouvoir comparer leur sensibilité à celle du critère TF chez *Dreissena*. On peut tenter cette comparaison avec les essais les plus avancés dans ce domaine, à savoir les essais sur la croissance et la reproduction des poissons (OECD, 1987). Le tableau 64, tiré de la revue bibliographique de Woltering (1984), présente les données disponibles concernant les micropolluants testés dans la présente étude.

Compte tenu du fait que ces données sont issues d'essais chroniques (30 jours au minimum), on peut établir que la sensibilité exprimée par le critère de variation du TF est proche ou légèrement inférieure (selon les métaux) à celle des critères croissance et reproduction des poissons, excepté pour le Lindane. Cette comparaison reste cependant à confirmer par des essais chroniques chez *Dreissena*. Les mesures effectuées dans le cadre de l'étude des effets bioénergétiques du Cu et du Cd (4 semaines, 3^{ème} Partie, chap. V.3.1.) permettent une comparaison partielle ; le TF montre une sensibilité meilleure pour le Cu mais moindre pour le Cd.

Tableau 64 : Données sur la sensibilité des essais chroniques utilisant la croissance (C) et la reproduction (R) des poissons (durée des essais : 30 jours à un cycle biologique), d'après la revue de Woltering (1984).

Substance testée	Espèce	Critère de toxicité	Seuil de toxicité (ppb)	Références *
Cu	<i>Pimephales promelas</i>	R	18	Mount (1969)
		R	33	Mount (1968)
		R	118	Brungs (1976)
Zn	<i>Pimephales promelas</i>	R	180	Brungs (1969)
	<i>Jordanella floridae</i>	C	51	Spehar (1976)
	<i>Poecilia reticulata</i>	R	173	Pierson (1981)
Cd	<i>Jordanella floridae</i>	R	8	Spehar (1976)
	<i>Poecilia reticulata</i>	C	80	Eaton (1974)
	<i>Brachydanio rerio</i>	R	10	Bresch (1982)
Hg	<i>Pimephales promelas</i>	C,R	0,26	Snarski (1982)
Pb	<i>Salmo trutta</i>	C	84	Holcombe (1976)
	<i>Jordanella floridae</i>	R	62	Mc Kim (1977)
Lindane	<i>Salmo trutta</i>	C	17	Macek et al. (1976)

* Toutes les références in Woltering (1984).

c - éléments de commodité expérimentale de la mesure du TF

Les essais de toxicité chronique en laboratoire posent souvent le problème d'approvisionnement et de maintenance du matériel biologique. La moule *Dreissena* répond bien à ces critères ; elle est très répandue en Europe et actuellement en pleine expansion dans le continent nord-américain. Sa récolte en grand nombre est facile grâce à son abondance et à un accès direct au bord des rivières et des lacs. Sa maintenance ne pose pas de difficulté majeure si une nourriture algale adéquate est assurée.

L'exposition aux toxiques est relativement simple de conception, elle peut être réalisée dans un système fermé à renouvellement ou un système à flux continu ; ce dernier simule au mieux la situation naturelle mais exige de grandes quantités de nourriture algale et de solution toxique.

La mesure du TF est aisée et ne demande pas d'équipement très spécialisé ; un compteur de particules (Coulter Counter) l'allègerait et augmenterait sa précision.

d - variabilité de la mesure du TF

La quantification de la filtration manque encore de standardisation ; nous avons précédemment évoqué l'importance des conditions de mesure et notamment la concentration en particules (3^{ème} Partie, chap. III.2.3.). Un protocole normalisé est nécessaire afin de minimiser la variabilité de la mesure. La variabilité inhérente à la fonction elle-même (variabilité naturelle) est inévitable. La détection de l'effet serait d'autant plus efficace que le nombre de répétitions est élevé. Nos essais auraient probablement rendu compte d'une sensibilité meilleure avec plus de répétitions.

En conclusion, les données acquises montrent que le TF de *Dreissena* peut constituer un critère utile dans le cadre de l'évaluation de la toxicité chronique de substances chimiques solubles dans l'eau et les effluents (urbains ou industriels).

I.3.2. Intérêt du paramètre "consommation d'O₂"

La consommation d'oxygène est une mesure qui reflète globalement le niveau général du métabolisme ; il constitue pour cette raison un paramètre intéressant pour l'évaluation des effets biologiques des polluants. Mathews et Menon (1983) et Mohan *et al.* (1986a) ont suggéré que la VO₂ des bivalves est un indice précieux de la toxicité sublétales.

Au regard des résultats obtenus lors de l'étude des effets des métaux sur la VO₂ de *Dreissena* (3^{ème} partie, chap. IV), il apparaît clairement que la fonction respiratoire montre une faible réponse à l'exposition. La VO₂ s'est avérée très peu sensible à l'action du Cd et du Pb et la sensibilité vis-à-vis du Cu et du Hg est inférieure à celle de la filtration (3^{ème} Partie, chap. III) ; seule la réponse au Zn (stimulation) est à un niveau de sensibilité comparable. Les résultats des essais du présent chapitre sont contrastés : insensibilité au Lutensol et au Lindane mais réponse à l'effluent industriel. Ils confirment la sensibilité moindre de la VO₂ par rapport au TF. L'origine de cette absence de sensibilité a été discutée dans le chapitre IV de la 3^{ème} partie.

La variabilité naturelle et élevée de la consommation d'O₂ est un facteur sans doute prépondérant qui contribue à masquer la réponse. Il apparaît ainsi que, malgré sa pertinence écologique évidente, la fonction respiratoire de *Dreissena*, exprimée par la VO₂, n'offre pas un indice capable de rendre compte de manière sensible de la toxicité sublétales. Les suggestions des auteurs (Mohan *et*

al., 1986a) ont été faites sur la base de réponses à court terme (au Cd et au Hg) ; or ces réponses sont surtout le résultat indirecte de la forte réponse comportementale au début de l'exposition.

I.3.3. Intérêt du calcul du potentiel énergétique de croissance (P.E.C.)

Ce critère d'évaluation de la toxicité possède une signification écologique certaine puisque son objet est l'évaluation de l'énergie disponible pour l'animal pour sa croissance et sa reproduction. Cette pertinence est supérieure à celle des critères traditionnels de la croissance et de la production de gamètes en ce sens que le P.E.C. constitue la réunion de ces deux critères (Sindermann, 1988). C'est pour cette raison que l'approche bioénergétique est de plus en plus adoptée dans les études d'écotoxicité (Widdows *et al.*, 1981 ; Johns et Miller, 1982 ; Poulsen *et al.*, 1982 ; Gilfillan *et al.*, 1985 ; Stickle *et al.*, 1985 ; Foe et Knight, 1987 ; Widdows et Johnson, 1988 ; Naylor *et al.*, 1989). Parmi les aspects favorables, on peut retenir la sensibilité et la commodité expérimentale.

a - sensibilité

Au regard des résultats du P.E.C. lors de l'essai en présence du Cuivre et du Cadmium (chap. V), l'analyse quantitative des composantes de l'équation énergétique montre que l'énergie assimilée est le facteur le plus important. Ce sont ses variations qui pondèrent pour la majeure partie l'effet sur le bilan énergétique. La mesure du TF, à partir de laquelle cette énergie est calculée, est donc déterminante dans la méthode. En conséquence, la discussion de la sensibilité de l'approche bioénergétique chez *Dreissena* reviendrait essentiellement à discuter de la sensibilité de la filtration (cf chap. I.3.1.).

Le fait que le P.E.C. intègre, en plus du TF, la consommation d'oxygène peut lui conférer une meilleure sensibilité. En effet, quand l'action toxique se manifeste par une élévation de la VO_2 (comme c'est le cas avec le Zn et l'effluent industriel testé), l'effet de réduction du P.E.C. due à l'inhibition du TF se trouve aggravé puisque l'équivalent énergétique de la VO_2 est une donnée négative (ou dépense) dans l'équation énergétique.

b - éléments de commodité expérimentale

Tous les éléments discutés dans le chap. I.3.1. sont valables ici également. Cependant, les mesures de VO_2 et du taux d'excrétion sont des contraintes supplémentaires.

La mesure de la VO_2 exige un équipement adéquat mais est très aisée et rapide (3^{ème} Partie, chap. IV).

L'énergie excrétée participe pour une faible part au bilan énergétique. Les résultats (Tableau 57) montrent qu'elle se situe entre 0,6 et 1,6 $J.h^{-1}.g^{-1}$ et que ses variations n'affectent pas sensiblement le P.E.C. De plus, elle subit peu de variations saisonnières ; des valeurs entre 0,7 et 1,1 $J.h^{-1}.g^{-1}$ ont été trouvées dans un essai en automne (résultats non présentés). La suppression de cette mesure, afin d'alléger le protocole d'expérience, paraît donc raisonnable ; on pourrait admettre alors une valeur moyenne de 1 $J.h^{-1}.g^{-1}$. Cette suppression a d'ailleurs été pratiquée par d'autres auteurs (Poulsen *et al.*, 1982 ; Gilfillan *et al.*, 1985 ; Naylor, 1988). Elle pourrait être remplacée par une augmentation du nombre de répétitions pour la mesure du TF, ce qui améliorerait la précision de l'essai.

L'étude des bilans énergétiques de *Dreissena* peut revêtir une importance particulière dans le cadre d'une approche intégrée de la toxicité sublétales qui s'intéresserait aux aspects de bioaccumulation de micropolluants en même temps qu'à leurs effets physiologiques et autres (biochimiques, histologiques, etc.). Une telle approche est actuellement vivement suggérée par différents auteurs. Bayne *et al.* (1985, 1988) ont proposé comme espèce d'essai pour le milieu marin la moule *Mytilus edulis*. Cette proposition vaut aussi bien pour les études de laboratoire que pour les études de surveillance *in situ*. Dans ce dernier cas, il s'agit de mesurer le P.E.C. en même temps que la charge corporelle en micropolluants sur des animaux fraîchement ramenés des sites étudiés ; ceci afin d'établir les corrélations éventuelles entre les deux données et comparer avec le P.E.C. en milieu non pollué (Gilfillan *et al.*, 1985 ; Stickle *et al.*, 1985 ; Widdows et Johnson, 1988).

La moule *Dreissena* a été proposée en Europe comme l'équivalent de *Mytilus* en milieu d'eau douce pour la surveillance de la pollution (Bias et Karbe, 1985 ; Légize et Crochard, 1987 ; Herwig *et al.*, 1989) ; la méthode bioénergétique constituerait un complément d'une utilité certaine pour une approche intégrée des effets biologiques des micropolluants.

CHAPITRE II :

UTILISATION DE LA REPONSE COMPORTEMENTALE DE *DREISSENA* COMME OUTIL BIOLOGIQUE DE VISUALISATION DE LA TOXICITE

II.1. INTRODUCTION

La pollution de plus en plus grave des eaux de surface a stimulé le développement de méthodes d'essais biologiques pour le contrôle de la qualité des eaux et la prévision des nuisances des produits chimiques et des effluents vis-à-vis de l'environnement.

Un nombre important d'essais de visualisation rapide (screening) de la toxicité est actuellement disponible. Les critères sont très divers (toxicité létale, atteintes physiologiques, biochimiques, comportementales, etc.). Les qualités exigées dans ces bioessais concernent essentiellement la sensibilité, la simplicité, la signification écologique, le degré de normalisation et le coût qui doit être modéré (Cairns et Pratt, 1989).

Parmi les critères de toxicité, les réponses comportementales offrent une perspective unique en toxicologie, celle qui relie les conséquences biochimiques de la pollution aux conséquences écologiques (Little, 1990). Ainsi, des réponses anormales, prises dans un contexte écologique, peuvent fournir une indication sensible et rapide sur les niveaux sublétaux des micropolluants (Sindermann, 1988). La pertinence écologique réside dans le fait que le comportement intègre beaucoup de processus cellulaires et est essentiel à la viabilité de l'organisme.

Les essais basés sur des critères comportementaux sont nombreux et concernent aussi bien les poissons que des invertébrés. Les essais sur poissons portent essentiellement sur la réponse respiratoire (rythme operculaire), le réflexe de la toux et le comportement d'évitement (nage), et certains ont fait l'objet de mise au point de système automatique d'alarme pour les eaux de surface (Morgan, 1977 ; Slooff, 1979 ; Gruber *et al.*, 1980).

Concernant les mollusques bivalves, plusieurs auteurs ont remarqué le changement de l'activité valvaire (comportement de test, fermetures) face à des conditions défavorables et notamment en présence de toxiques. L'existence de faibles seuils de toxicité pour le comportement valvaire a incité certains auteurs à préconiser son utilisation pour la détection de la pollution et plus généralement pour l'étude de la toxicité (Slooff *et al.*, 1983 ; Jenner *et al.*, 1989 ; Kramer *et al.*, 1989 ; Salanki et Balogh, 1989).

La base physiologique de ces méthodes d'essai réside dans le fait qu'en condition normale, l'animal a ses valves ouvertes pour la filtration (prise de nourriture et respiration) ; la fermeture des valves en réponse à un stress environnemental correspond à un arrêt de la filtration et, par conséquent, à l'arrêt de l'alimentation et à la réduction de la respiration aérobie. Les conséquences physiologiques et métaboliques constituent des manifestations de la toxicité.

La pertinence du critère de la réponse valvaire est à l'origine de son adoption parmi les méthodes biologiques utiles pour la détection de la toxicité des effluents (sous-groupe III du Comité Environnement de l'OCDE, OECD, 1984).

II.2. DEFINITION D'UNE METHODE D'ESSAI POUR LA VISUALISATION DE LA TOXICITE BASEE SUR LA REponse COMPORTEMENTALE DE *DREISSENA*

II.2.1. Principe

Le fait que le comportement de filtration, défini ici par le mode de filtration (activité du siphon et activité valvaire), soit sensible à la présence de substances toxiques, et plus généralement à des conditions défavorables de l'environnement, offre la possibilité de l'utilisation de ce critère comme base d'un bioessai pour la visualisation de la toxicité en milieu d'eau douce. On peut en définir le principe comme suit : Dans des conditions de qualité du milieu satisfaisantes et en absence de tout stress environnemental (physique ou chimique), la moule *Dreissena* se présente avec une coquille ouverte la plupart du temps pour la filtration (prise de la nourriture) et la respiration (Kramer *et al.*, 1989 et la présente étude, 3^{ème} Partie, chap. II.2.). Le processus de filtration (pompage, filtration branchiale et expulsion via le siphon exhalant) se fait selon un mode continu avec, de temps en temps, des interruptions instantanées régies par des contractions du siphon exhalant (cf 3^{ème} Partie, chap. II.2.). En présence d'une substance toxique pour la filtration, l'animal réagit par une modification de l'activité de pompage qui devient intermittente (activité de stress), avec l'apparition de périodes de fermeture prolongées et/ou fréquentes selon le toxique et sa concentration. L'objectif de l'essai est de visualiser cette réponse par l'enregistrement directe et continu du mode d'écoulement des courants exhalants. La technique anémométrique permet un tel suivi et présente l'avantage d'intégrer également les fermetures valvaires. L'essai permet de détecter la présence de la toxicité et les concentrations seuils correspondantes. Il renseigne également sur les concentrations sans effets. La fiabilité de la technique anémométrique est sans équivoque ; le signal enregistré permet de distinguer facilement les différents types d'activité ; l'interprétation des différents événements enregistrés est très aisée (écoulement continu, écoulement intermittent, adductions des valves, fermetures des valves).

II.2.2. Intérêt de l'étude du mode de filtration par rapport à l'étude des mouvements valvaires

Les données bibliographiques et l'étude comportementale (3^{ème} Partie, chap. II) montrent que la fermeture valvaire est une des composantes de la réaction comportementale chez les bivalves mais qu'elle n'est pas toujours systématique, notamment pour les faibles concentrations. Par contre, la modification du mode de filtration est systématique dès que le seuil de toxicité est atteint. L'avantage par rapport à la méthode valvaire est que l'on peut détecter un effet toxique dès que le pompage devient intermittent (modification de l'activité du siphon), même sans amorce de fermeture.

Des mouvements valvaires fréquents accompagnent généralement l'activité de stress ; pour cette raison, Jenner *et al.* (1989) ont suggéré que le critère de détection soit l'augmentation de l'activité valvaire. Cependant, l'anémométrie permet une visualisation directe qui fournit la preuve de l'altération de la filtration.

II.2.3. Domaines d'application de l'étude du mode de filtration

La méthode est un essai de laboratoire applicable à la visualisation de la toxicité dans les cas suivants :

- les molécules (ou mélanges de molécules) totalement ou partiellement solubles dans l'eau dans les conditions normales
- les eaux de surfaces polluées
- les effluents d'origine industrielle ou urbaine
- les extraits de déchets solides.

Elle peut servir, à l'inverse, à suivre l'efficacité des processus d'épuration (détoxification) des effluents dans les stations de traitement des eaux usées. Dans ce cas, on cherchera les phases de traitement à partir desquelles la toxicité disparaît.

II.2.4. Matériel et procédure

II.2.4.1. Matériel

Le principe de l'anémométrie à film chaud a été décrit dans la 2^{ème} partie, chap. II.3.1. et II.3.2.

Il est nécessaire de disposer de plusieurs unités anémométriques si l'on désire mener plusieurs expositions en parallèle (6 par exemple).

II.2.4.2. Le réactif biologique

Un élevage de *Dreissena* en laboratoire s'avère coûteux et peu efficace en ce qui concerne la croissance (Dorgelo et Smeenk, 1988). Il est donc préférable d'utiliser des organismes prélevés dans la nature et acclimatés.

* Prélèvement

Une bonne condition physiologique des organismes d'essai est essentielle pour garantir la fiabilité de la méthode. Aussi, il est indispensable que le lieu de prélèvement soit le plus exempt possible de toute contamination.

* Acclimatation et maintenance

L'acclimatation doit être effectuée avec une attention particulière en ce qui concerne la température. Les variations brutales de celle-ci ont une influence négative sur la filtration (Jorgensen *et al.*, 1990). L'acclimatation peut être faite en une à deux semaines avec une variation quotidienne de la température ne dépassant pas 2°C. Afin de minimiser l'écart de température que doivent subir les organismes en acclimatation, l'essai peut être pratiqué à une température différente selon la saison.

Le milieu d'acclimatation et de maintenance peut être l'eau du site du prélèvement si elle constitue également le milieu d'essai ou l'eau de conduite déchlorée par passage sur charbon actif. Un milieu à flux continu est idéal pour une bonne maintenance, mais un milieu à renouvellement périodique (24 h ou 48 h selon le rapport biomasse/volume) est tout aussi adéquat. Un apport de nourriture algale est nécessaire pendant l'acclimatation. On peut utiliser des cultures monospécifiques (*Chlorella sp*, Kryger et Riisgard, 1988 ; *Chlamydomonas sp*, Sprung et Rose, 1988 ; Dorgelo et Smeenk, 1988 ; ou autres) ou encore un mélange d'espèces (Ten Winkel et Davis, 1982). Une nourriture de 10000-12000 cellules/ml est recommandée (Kryger et Riisgard, 1988).

Enfin, un contrôle journalier des organismes est nécessaire afin d'éliminer les individus morts et ceux qui ne se seraient pas fixés en trois jours (mauvaise condition).

II.2.4.3. Durée de l'essai

Dans un objectif de rapidité et compte tenu des données du chapitre II concernant les délais d'apparition de l'activité de stress en présence des faibles concentrations en métaux, la durée propo-

sée pour l'essai est de 10 heures au minimum. On peut évidemment opter pour une durée supérieure selon la convenance (12 h ou 24 h par exemple).

II.2.4.4. Mode opératoire

* Enregistrement témoin - validité

Les animaux à tester sont choisis parmi ceux à valves ouvertes et mis dans le milieu d'essai quelques heures avant le début de celui-ci. Un enregistrement témoin de 4 à 6 heures permet de contrôler leur bonne condition. Une moule est validée pour l'essai si cet enregistrement correspond à une activité de filtration continue.

* Procédure de l'essai

Des expositions rapides (30 mn) permettent de déterminer les seuils d'apparition immédiate de l'activité de stress.

L'essai définitif est effectué à des concentrations (ou taux de dilution) inférieures à ces seuils afin d'approcher le seuil de toxicité absolu pour la durée d'essai de 10 h.

Six répétitions par concentration (ou taux de dilution) au minimum sont jugées nécessaires.

Une moule ne peut servir qu'une seule fois dans l'essai.

II.2.4.5. Analyse des données

Les enregistrements sont analysés selon la procédure décrite dans le chapitre II.1. On détermine :

- la durée totale de l'activité normale
- la durée totale de l'activité de stress (AS)
- la durée totale des fermetures
- le nombre de fermetures
- et le délai d'apparition de l'AS.

II.2.4.6. Critères d'appréciation de la toxicité

Lorsque toute activité normale disparaît, l'interprétation des résultats ne pose pas de problème. Que l'enregistrement soit constitué d'activité de stress, de fermetures ou des deux à la fois, la substance testée est déclarée toxique à la concentration en présence.

Pour les niveaux de concentration proches des seuils de toxicité, la réponse peut apparaître après un délai de latence pendant lequel l'activité demeure normale (continue). L'interprétation des résultats est dans ce cas délicate. La décision est prise en les comparant à l'activité chez des témoins. Dans ce cas et afin d'éliminer le risque d'une fausse interprétation des données, nous proposons que le résultat d'un enregistrement soit considéré positif (toxicité détectée) dans les cas suivants :

- la durée totale de l'activité de stress (AS) est supérieure à 1 h si aucune fermeture n'intervient (1 h 6 mn est le temps moyen d'AS chez les témoins pour un cycle de 24 h) ;
- la durée totale des fermetures est supérieure à 3 h et demie environ (3 h 18 mn est le temps moyen de fermeture chez les témoins pour un cycle de 24 h) et même si l'AS ne dépasse pas 1 h ;
- les durées totales des fermetures et de l'AS sont supérieures respectivement à 3,5 h et 1 h.

En considérant l'ensemble de six répétitions, la concentration (ou le taux de dilution de l'effluent) est considérée comme toxique si au moins 5 des 6 résultats se révèlent positifs.

Le produit testé est en conséquence considéré comme comportant potentiellement une toxicité sublétales au seuil de concentration (dilution) en présence.

II.2.5. Limites de détection de l'essai comportemental pour quelques substances toxiques

Afin d'évaluer la sensibilité de l'essai proposé, nous avons tenté d'approcher les concentrations seuils détectables par un essai de 10 h (selon les critères précédemment définis) pour cinq métaux (Zn, Cu, Hg, Cd et Pb), le Lindane, le Lutensol et un échantillon d'effluent industriel (cf 3^{ème} Partie, chap. VI.2.3.).

Le tableau 65 résume les résultats de cette étude ; les résultats détaillés sont présentés en annexe (Annexe XXV). On constate que les niveaux détectables sont très largement inférieurs aux seuils de toxicité létale.

Tableau 65 : Limites de détection de l'essai comportemental de *Dreissena* pour quelques substances toxiques.

Substance testée	Limite de détection	Nombre de répétitions	Répétitions positives
Cu	15 µg/l	6	6
Hg	10 µg/l	6	6
Cd	100 µg/l	6	6
Zn	200µg/l	6	6
Pb	400 µg/l	6	5
Lutensol (1)	100 µg/l	6	5
Lindane	100 µg/l	6	5
Effluent (2)	0,50%	3	3

- (1) Essai dans les mêmes conditions que celui présenté au chap. VI.2.1. de la 3^{ème} partie.
 (2) Du fait que l'échantillon n'est utilisable que pour une durée limitée (5 jours), seules trois répétitions ont été effectuées.

En ce qui concerne l'effluent industriel, la durée limitée d'utilisation de l'échantillon n'a pas permis de tester des taux de dilution inférieurs à 0,5%, mais compte tenu des résultats enregistrés (Annexe XXVH), on peut estimer que la limite de détection est inférieure à cette valeur. Un essai de toxicité létale réalisé en parallèle révèle qu'une dilution de 3,12% est sans effet léthal en 96 heures ; la CL50-96h se situe entre 3,12% et 6,25%, ce dernier taux de dilution ayant provoqué 60% de mortalité.

II.2.6. Comparaison de la sensibilité du mode de filtration par rapport à l'activité valvaire

Slooff *et al.* (1983) ont établi les limites de détection du système basé sur la réponse valvaire de *Dreissena* pour quelques métaux et des molécules organiques. Jenner *et al.* (1989) ont affiné ces limites pour le Cu et le Cd en considérant la réponse valvaire dès que la fréquence des mouvements valvaires augmente (comportement de test). Kramer *et al.* (1989) ont repris le même système en

améliorant le traitement informatique des données ; ils ont ensuite établi des estimations des limites de détection absolues pour certaines substances. Le tableau 66 récapitule les données de ces auteurs pour la comparaison avec nos résultats.

Tableau 66 : Données bibliographiques sur les limites de détection de la réponse valvaire de *Dreissena* vis-à-vis de quelques substances toxiques.

Produit testé	Concentration limite détectable (µg/l) selon		
	Slooff et al (1983) (1)	Jenner et al (1989) (2)	Kramer et al (1989) (3)
Cu	18	10	10
Cd	200	150	100
Zn	-	-	500
Pb	-	-	500
Lindane	110	-	-
Sélénium	-	-	< 100
Tributylétain	-	6	< 10
Hypochlorite	-	37	< 10
Cyanure	< 400	-	-
Pentachlorophénol	< 140	-	-
Hexachlorobutadiène	< 150	-	-

(1) Réponses basées sur la fermeture des valves.

(2) Résultats établis sur la base de l'augmentation de l'activité d'adduction valvaire.

(3) Estimations d'après le calcul de la réponse minimale enregistrée dans un essai de 24 h.

En comparant les données présentées dans les tableaux 65 et 66, on constate que l'essai proposé montre une sensibilité égale ou meilleure sauf pour le Cu (limite de détection de 15 ppb contre 10 ppb pour Jenner *et al.*, 1989 et Kramer *et al.*, 1989). En fait, dans notre essai, une réponse partielle a été obtenue en présence de 10 ppb mais elle n'a pas été validée car ne répondant pas exactement aux critères définis.

II.2.7. Comparaison avec d'autres essais de visualisation de la toxicité : l'essai bactérien Microtox et l'activité respiratoire du poisson

L'essai bactérien Microtox est largement utilisé dans la visualisation de la toxicité des effluents (Elnabarawy *et al.*, 1988). Le critère contrôlé est l'inhibition de la luminescence de la bactérie marine *Photobacterium phosphoreum*.

Le système de l'activité respiratoire du poisson est un essai dont le critère contrôlé est l'effet sur le rythme des mouvements operculaires ; ceux-ci étant pris comme indicateurs de l'activité respiratoire (Morgan, 1977), ces deux essais (non normalisés) ont été choisis pour la comparaison avec l'essai comportemental sur *Dreissena* parce qu'ils sont très étudiés et sont jugés comme ayant une fiabilité acceptable pour la détection de la toxicité (OECD, 1984).

Tableau 67 : Données comparatives des sensibilités des essais : Microtox, rythme operculaire du poisson et comportement de filtration de *Dreissena*.

Métal	Microtox, CE50-30mn (1) (µg/l)	Seuil de la réponse (2) operculaire de <i>Micropterus salmoïdes</i> (µg/l)	Seuil de la réponse comportementale de <i>Dreissena</i> (µg/l)
Cu	< 250	50	≤ 15
Hg	29	10	≤ 10
Cd	-	100	≤ 100
Pb	5400	1000	≤ 400
Zn	680	-	≤ 200

(1) CE50-30mn : concentration qui en 30 mn réduit de 50% la luminescence de *Photobacterium phosphoreum* ; d'après Elnabarawy *et al.* (1988).

(2) Seuils de réponse dans un essai de 24 h, d'après Morgan (1977).

Le tableau 67 montre que la sensibilité de la réponse comportementale de *Dreissena* est supérieure à celle de l'essai Microtox pour tous les métaux testés ; elle est en revanche comparable à celle de la réponse operculaire de *Micropterus* pour le Hg et le Cd et légèrement supérieure pour le Cu et le Pb.

En tenant compte des résultats concernant d'autres espèces de poisson (Morgan, 1977 ; Slooff, 1979), on peut estimer que les sensibilités des deux essais sont similaires pour les métaux.

Utilisant la réponse operculaire de *Salmo gairdneri*, Slooff (1979) rapporte un seuil de 40 ppb vis-à-vis du Lindane ; ce niveau de sensibilité est supérieur à celui montré par la réponse comportementale de *Dreissena* pour cette molécule.

II.2.8. Discussion générale

Le présent chapitre montre que l'étude directe de la réponse du comportement de filtration de *Dreissena* au stress offre une méthode d'essai fiable, sensible et pertinente pour la détection de la toxicité. Des essais supplémentaires sur d'autres catégories de molécules (PCB, hydrocarbures, organophosphorés, etc.) sont nécessaires afin de valider largement la méthode dans l'évaluation du risque de nuisance. On peut d'ores et déjà élargir le champ de sensibilité en reprenant les données concernant d'autres molécules chimiques telles que celles rapportées par Slooff *et al.* (1983) et Kramer *et al.* (1989) pour la réponse valvaire. En effet, la sensibilité de la réponse du mode de filtration ne peut être qu'équivalente ou supérieure (cf chap. II.3.6.) aux données de ces auteurs (Tableau 66).

Ces données confirment la bonne sensibilité de la méthode proposée. Il faut noter que le protocole d'essai énoncé dans ce chapitre ne peut constituer un cadre rigide pour la méthode ; c'est en fait une proposition préliminaire réunissant les conditions jugées nécessaires pour une bonne fiabilité de la méthode. Il faut insister à cet égard sur l'importance de la période d'acclimatation et de maintenance pour la fiabilité de l'essai ; cette opération doit donc être menée avec une attention particulière afin de garantir une bonne condition physiologique des animaux à tester.

La méthode est évidemment susceptible d'améliorations ou de modifications selon l'objectif recherché.

Une adaptation de la méthode en vue d'une utilisation en semi-continu *in situ* (système de contrôle et d'alarme) est envisageable. Une telle adaptation nécessite la mise en place d'un système d'intégration, de stockage et de traitement des données.

SYNTHESE ET PERSPECTIVES

Le présent travail constitue une contribution aux études de plus en plus nombreuses concernant l'utilisation de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* comme bioindicateur de la pollution métallique et de la pollution en général.

Le premier objectif était l'étude de la toxicité physiologique pouvant accompagner le processus d'accumulation des métaux (Zn, Cu, Hg, Cd et Pb) lors d'expositions à des concentrations sublétales. Pour cela, nous avons étudié les effets sur des fonctions essentielles dans la physiologie des bivalves, à savoir le comportement de filtration, le taux de filtration (prise de nourriture) et le taux de consommation d'oxygène (respiration). Nous avons également entrepris un essai d'intégration de ces effets par l'approche bioénergétique pour le Cd et le Cu.

Partant des résultats acquis pour les métaux, nous avons élargi les essais à des micropolluants organiques bien identifiés et à un effluent industriel complexe dans l'objectif d'évaluer la sensibilité relative de chaque fonction étudiée puis de discuter son utilité potentielle en tant qu'indicatrice de la toxicité sublétales en général.

L'étude de toxicité létale en 96 heures (CL50-96h), entreprise pour apprécier les niveaux de concentrations sublétales à utiliser, a montré que seuls le Cu et le Hg ont des effets létaux à court terme chez *Dreissena*. Les CL50-96h sont de 191 ppb pour le Cu et 420 ppb pour le Hg (en automne). La sensibilité à l'effet létales ne dépend pas de la saison dans le cas du Cu tandis qu'elle semble légèrement plus faible pour le Hg au printemps (CL50-96 h = 450 ppb). Le Cd exerce une toxicité létale très faible à court terme (CL50-96 > 14 ppm Cd). Le Zn n'exerce aucun effet létales aux concentrations testées (jusqu'à 10 ppm).

Ces différences entre métaux indiquent l'existence de mécanismes de toxicité différents.

L'étude des effets sur le mode de filtration montre que les métaux exercent une toxicité comportementale importante à des niveaux de concentrations largement inférieurs aux seuils de toxicité létale. Tandis que la filtration des témoins s'effectue en mode continu avec des interruptions très brèves (quelques secondes) et occasionnelles, l'animal exposé détecte rapidement le métal et, en conséquence, modifie radicalement son mode de filtration ; en présence de concentrations aux seuils de toxicité, celui-ci devient intermittent (discontinu) avec une alternance de périodes d'activité (de quelques secondes à 2,5 mn) et de périodes de pause (de quelques secondes à plusieurs minutes). Ce mode de filtration discontinu est régi par des contractions intermittentes du siphon exhalant. En présence de concentrations plus élevées, la filtration devient faible et très discontinue, les périodes de pompage actif sont brèves et entrecoupées de longues périodes d'arrêt (plusieurs minutes) pen-

dant lesquelles le siphon exhalant est fermé. Les périodes de fermeture totale des valves sont plus fréquentes et la durée totale de ces fermetures augmente avec les concentrations croissantes en métal.

Les plus faibles concentrations testées sont les suivantes : 20 ppb pour le Cu et le Hg, 150 ppb pour le Cd, 250 ppb pour le Zn et 500 ppb Pb ; elles se sont toutes révélées toxiques lors d'expositions de 24 h. En tenant compte des poids molaires entre les métaux, on peut les classer selon l'ordre de toxicité décroissante suivant :

Hg > Cu >> Cd > Pb > Zn.

L'extension des essais à des substances organiques (un agent de surface non ionique : le Lu-tensol et un organochloré : le Lindane) et à un effluent industriel révèle une réponse comportementale du même type que celle observée en présence de métaux, ce qui montre qu'il s'agit d'une réaction générale au stress toxique.

Considérant d'une part l'importance de l'activité de filtration pour la prise de nourriture et la respiration, et d'autre part le caractère général de la réponse comportementale au stress d'origine toxique, nous proposons l'utilisation de cette réponse comme outil de visualisation (screening) de la toxicité en milieu d'eau douce. Une durée d'essai de 10 h a été jugée suffisante pour rendre compte rapidement du risque toxique. Les concentrations limites détectables ont été déterminées pour les substances déjà testées (Tableau 65). La comparaison de la sensibilité de l'essai à celle d'autres essais de visualisation trouvés dans la bibliographie (réponse operculaire du poisson et test microtox, Tableau 67) montre que le critère comportemental de *Dreissena* possède une sensibilité équivalente ou supérieure selon la substance considérée. Une étude comparative avec d'autres essais de screening serait intéressante à mener afin de mieux apprécier l'apport de la méthode en terme d'évaluation de la toxicité sublétales.

Des essais supplémentaires avec d'autres types de micropolluants (PCB, Hydrocarbures, etc...) sont nécessaires afin de mieux valider la méthode proposée. Cependant, les données de Kramer *et al.* (1989) et Jenner *et al.* (1989) permettent déjà de conclure à une plus large sensibilité. Elle est également susceptible d'améliorations ou de modifications selon l'objectif recherché. Une adaptation en vue d'une utilisation en semi-continu *in situ* (système de contrôle) est envisageable. Elle nécessiterait la mise en place d'un système d'intégration, de stockage et de traitement des données.

Les effets des métaux sur le taux de filtration ont été étudiés pour des expositions de 48 h et une semaine (essai prolongé à deux semaines pour le Zn). Les niveaux toxiques pour le TF se sont révélés, comme dans l'étude comportementale, nettement inférieurs aux seuils de toxicité létale. Les CE50-48h et CE50-8jours (Tableau 49) montrent que les métaux se classent dans le même ordre de toxicité que dans l'étude comportementale, compte tenu des poids molaires.

Les observations visuelles directes et les données bibliographiques montrent que la réduction du TF est essentiellement due à l'altération du comportement normal sous l'action du métal. L'extension des essais à d'autres substances (Lutensol, Lindane et effluent) a permis de constater le caractère général de la réduction du TF comme conséquence du stress d'origine toxique. Nous avons ensuite comparé la sensibilité de la mesure du TF en tant que modèle potentiel d'étude de la toxicité sublétales chronique à celle de deux critères très utilisés dans ce domaine, à savoir la croissance et la reproduction des poissons. L'étude comparative montre que la mesure du TF présente une sensibilité équivalente ou légèrement inférieure selon les substances. Cependant, sa commodité expérimentale confère à la mesure du TF un avantage certain pour des études de routine en laboratoire.

Les effets à court et moyen terme sur la consommation d'oxygène de *Dreissena* (VO_2) dépendent du métal considéré. L'exposition au Zn (de quelques heures à 3 semaines) provoque une élévation de la VO_2 . Les résultats suggèrent que le mécanisme d'action est lié à la phase de franchissement de la barrière membranaire.

Le Cu et le Hg (expositions de quelques heures à 1 semaine) réduisent significativement la VO_2 . Les réductions dues au Pb et au Cd sont nettement plus faibles et ne s'exercent qu'à court terme.

Mis à part le Zn qui agit à des seuils relativement bas (250 ppb en 24 h), les seuils de toxicité des autres métaux sont nettement supérieurs à ceux constatés pour les effets vis-à-vis du comportement et du TF. Une non dépendance systématique entre l'effet sur la filtration et l'effet sur la respiration a été ainsi relevée. La discussion de cet aspect de la toxicité montre la complexité des phénomènes qui entrent en jeu dans l'expression de l'action sur la VO_2 .

L'extension des essais à d'autres substances a montré que, comme avec les métaux, la VO_2 est relativement peu sensible sauf dans le cas d'une élévation (cas de l'effluent industriel). Pour cette raison, la VO_2 n'a pas été jugée comme étant un bon outil d'évaluation de la toxicité physiologique.

L'intégration des effets physiologiques en terme de bilan énergétique (Widdows, 1985) a été entreprise pour le Cd et le Cu à des concentrations suffisamment faibles pour se rapprocher des situations réelles de pollution chronique dans l'environnement. Les résultats indiquent que le Cd (jusqu'à 45 ppb) n'affecte pas négativement le potentiel énergétique de croissance (P.E.C., Scope for growth) après 4 semaines d'exposition. Une légère augmentation a plutôt été constatée ; elle est due au fait que le TF n'est pas affecté tandis que la VO_2 est légèrement réduite.

Contrairement au Cd, le Cu réduit sensiblement le P.E.C. Cette toxicité est surtout due à l'effet de réduction du TF. Pour cette raison, la sensibilité de la méthode bioénergétique dépend

essentiellement de celle du critère TF. Elle peut cependant être supérieure dans le cas où l'action sur la VO₂ est une élévation (cas du Zn et de l'effluent testé) ; en effet, la VO₂ est une donnée négative dans l'équation énergétique et son élévation implique une diminution du P.E.C. qui s'ajoute à celle due à l'effet sur le TF.

L'étude du P.E.C. chez *Dreissena* ouvre une perspective intéressante dans le domaine de l'évaluation de la toxicité chronique en milieu d'eau douce. La sensibilité et la commodité expérimentale permettent d'envisager une utilisation de routine en laboratoire. De plus, les méthodes mises au point pour *Mytilus* peuvent parfaitement s'appliquer à *Dreissena* pour une utilisation *in situ* (Bayne *et al.*, 1985).

A cet égard, *Dreissena* est vraisemblablement le bivalve d'eau douce le plus approprié pour l'étude intégrée des effets biologiques de la pollution (Bioaccumulation, Biochimie, Histopathologie et Physiologie). Les études concernant la bioaccumulation, l'histopathologie et la physiologie sont très concluantes (Karbe *et al.*, 1975 ; Léglize et Crochard, 1987 ; Benyahia *et al.*, 1988 ; Maarouf, 1988 ; Herwig *et al.*, 1989 ; Kramer *et al.*, 1989 ; et le présent travail). Aussi, une approche plus intégrée de ces effets nous paraît vivement recommandable.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- ABDULLAH, A.M., & IRELAND, M.P., 1986. Seasonal studies on cadmium concentration and toxicity oxygen consumption digestive gland glycogen and lipid in dog whelks collected at Aberystwyth, Wales. *Mar. Poll. Bull.*, 17, 562-566.
- ABEL, P.D., 1976. Effect of some pollutants on the filtration rate of *Mytilus*. *Mar. Poll. Bull.*, 7, 228-231.
- AFNOR (Association Française de Normalisation), 1990. Recueil de normes françaises des eaux, méthodes d'essais. 4^e ed. AFNOR, Paris, 730 p.
- AHSANULLAH, M., 1976. Acute toxicity of cadmium and zinc to seven invertebrate species from Western port, Victoria. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.*, 27, 187-196.
- AKBERALI, H.B., 1978. Behaviour of *Scrobicularia plana* (DA COSTA) in water of various salinities. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 45, 1-9.
- AKBERALI, H.B., & BLACK, J.E., 1981. Behavioural responses of the bivalve *Scrobicularia plana* (DA COSTA) subjected to short-term copper (Cu II) concentrations. *Mar. Environ. Res.*, 4, 97-107.
- AKBERALI, H.B., WONG, T.M., & TRUEMAN, E.R., 1981. Behavioural and siphonal tissue responses of *Scrobicularia plana* (Bivalvia) to zinc. *Mar. Environ. Res.*, 5, 251-264.
- ALI, R.M., 1970. The influence of suspension density and temperature on the filtration rate of *Hiatella arctica*. *Mar. Biol.*, 6, 291-302.
- AMIARD-TRIQUET, C., BERTHET, B., METAYER, C., & AMIARD, J.C., 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. II. Experimental study. *Mar. Biol.*, 92, 7-13.
- AMOUREUX, J.M., 1976. Ethologie et filtration de *Macra glauca* (BORN). *Vie Milieu*, 26, 21-30.
- AMOUREUX, J.M., 1982. Ethologie, filtration, nutrition, bilan énergétique de *Venus verrucosa* LINNE (Bivalves). Th. Etat : Sci. : Univ. Paris VI : 98 p + annexes.
- AMOUREUX, J.M., REVAULT D'ALLONES, M., & ROUAULT, C., 1975. Sur la mesure directe du débit de filtration chez les mollusques lamelibranches. *Vie Milieu*, 25, 339-346.
- BABU, G.R., & RAO, P.V., 1985. Effect of copper sulphate on respiration, electron transport and redox potential in the digestive gland of the snail host, *Lymnaea luteola*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 396-402.
- BALLANTINE, D., & MORTON, J.E., 1956. Filtering, feeding, and digestion in the lamellibranch *Lasaea rubra*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 35, 241-274.
- BAYNE, B.L., 1971. Oxygen consumption by three species of lamellibranch mollusc in declining ambient oxygen tension. *Comp. Biochem. Physiol.*, 40, 955-970.
- BAYNE, B.L., BROWN, D.A., BURNS, K., DIXON, D.R., IVANOVICI, A., LIVINGSTONE, D.R., LOWE, D.M., MOORE, M.N., STEBBING, A.R.D., & WIDDOWS, J., 1985. The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Publishers. New York, 384 p.
- BAYNE, B.L., CLARKE, K.R., & GRAY, J.S., (eds), 1988. Biological effects of pollutants. Results of a practical workshop. MEPS Special. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46, 278 p.
- BAYNE, B.L., & SCULLARD, C., 1977. Rates of nitrogen excretion by species of *Mytilus* (Bivalvia : Mollusca). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 57, 355-369.
- BAYNE, B.L. & THOMPSON, R.J., 1970. Some physiological consequences of keeping *Mytilus edulis* in the laboratory. *Helgolander wiss. Meeresunters*, 20, 526-552.
- BAYNE, B.L., THOMPSON, R.J., & WIDDOWS, J., 1976. Physiology : I. In "Marine mussels : their ecology and physiology". BAYNE, B.L. (ed), Cambridge University Press, Cambridge, 121-207.
- BELANGER, S.E., FARRIS, J.L., CHERRY, D.S., & CAIRNS, Jr., J., 1986. Growth of asiatic clam (*Corbicula sp.*) during and after long-term zinc exposure in field-located and laboratory artificial streams. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 15, 427-434.
- BENFIELD, E.F., & BUIKEMA, A.L., Jr., 1980. Synthesis of nirsellaneous invertebrate toxicity tests. In "Aquatic invertebrate bioassays" ASTM STP 715. BUIKEMA, A.L., Jr., & CAIRNS, J., Jr. (eds). ASTM, Philadelphia, 174-187.

- BENYAHIA, M., CROCHARD, C., & PIHAN, J.C., 1988. Toxicité, bioaccumulation et relargage du plomb chez *Dreissena polymorpha*. Effets de l'EDTA et des phosphates. *Haliotis*, 18, 239-249.
- BIAS, R., & KARBE, L., 1985. Bioaccumulation and partitioning of cadmium with the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* PALLAS. *Int. Rev. Ges. Hydrobiol.*, 70, 113-125.
- BOOTH, C.E., & MANGUM, C.P., 1979. Oxygen uptake and transport in the lamellibranch mollusc *Modiolus desnissus*. *Physiol. Zool.*, 51, 17-32.
- BREITTMAYER, J. Ph., FLATAU, G.N., & ISURGER, N., 1981. Influences comparées de la taille, de la saison, et de la dose sur la toxicité du mercure et du cadmium vis-à-vis de la moule *Mytilus edulis*. In "Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique. Acute aquatic ecotoxicological tests". INSERM, 106, 407-413.
- BROWN, B.E., 1982. The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues. *Biol. Rev.*, 57, 621-667.
- BROWN, B.E., & NEWELL, R.C., 1972. The effect of copper and zinc on the metabolism of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 16, 108-118.
- BROWN, V.M., 1981. The analysis and interpretation of acute toxicity test data. In "Les Colloques de l'INSERM : Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique". INSERM, 106, 475-484.
- BUIKEMA, A.L., Jr., CAIRNS, J., Jr., & SULLIVAN, G.W., 1974. Evaluation of *Philodia acuticornus* (Rotifera) as a bioassay organism for heavy metals. *Water Resour. Bull.*, 10, 648-661.
- CAIRNS, Jr., J., & PRATT, J.R., 1989. The scientific basis of bioassays. *Hydrobiol.*, 188-189, 5-20.
- CALABRESE, A., MACINNES, J.R., NELSON, D.A., & MILLER, J.E., 1977b. Survival and growth of bivalve larvae under heavy-metal stress. *Mar. Biol.*, 41, 179-184.
- CALABRESE, A., & NELSON, D.A., 1974. Inhibition of embryonic Development of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, by heavy metals. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 11, 92-97.
- CALABRESE, A., THURBERG, F.P., & GOULD, E., 1977a. Effects of cadmium, mercury and silver on marine animals. *Mar. Fish. Rev.*, 39, 5-11.
- 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., 1988. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanisms of *Crassostrea virginica* : total differential cells counts. *J. Invertebr. Pathol.*, 51, 207-214.
- COCKCROFT, A.C., 1990. Nitrogen excretion by the surf zone bivalves *Donax serra* and *D. sordidus*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 60, 57-65.
- COOMBS, T.L., & GEORGE, S.G., 1978. Mechanisms of immobilization and detoxication of metals in marine organisms. In : "Physiology and Behaviour of Marine Organisms". Mc LUSKY, D.S., & BERRY, A.J. (eds). Pergamon Press, Oxford, 179-189.
- COSSON, R.P., 1987. Influence des pratiques agricoles sur la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds : approche écotoxicologique. *Th. Etat : Sci. : Univ. Paris 11*, 275 p.
- COUCH, J.A., 1977. Ultrastructural study of lesions in gills of a marine shrimp exposed to cadmium. *J. Invertebr. Pathol.*, 29, 267-288.
- COUGHLAN, J., 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Mar. Biol.*, 2, 356-358.
- COUGHLAN, J., & ANSELL, A.D., 1964. A direct method for determining the pumping rate of siphonate bivalves. *J. Cons., Cons. Int. Explor. Mer*, 29, 205-213.
- CRISP, D.J., 1971. Energy flow measurements. In : "Methods for the study of marine benthos". HOLMES, N.A., & Mc INTYRE, A.D. (eds). Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 197-279.
- CUMMINS, K.W., & WUYCHECK, J.C., 1971. Caloric equivalents for investigations in ecological energetics. *Mitt. Int. Verein Limnol.*, 18, 158 p.
- CURTIS, M.W., COPELAND, T.L., & WARD, C.H., 1979. Acute toxicity of 12 industrial chemicals to freshwater and saltwater organisms. *Water Res.*, 13, 137-141.
- DAVENPORT, J., 1977. A study of the effects of copper applied continuously and discontinuously to specimens of *Mytilus edulis* (L.) exposed to steady and fluctuating salinity levels. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 57, 63-74.
- DAVENPORT, J., & MANLEY, A., 1978. The detection of heightened sea-water copper concentrations by the mussel : *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 58, 843-850.

- DAVENPORT, J., & REDPATH, K.J., 1984. Copper and the mussel *Mytilus edulis* L. In : "Toxins, Drugs and Pollutants in Marine Animals". BOLIS, L., ZADUNAISKY, J., & GILLES, R. (eds). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 176-189.
- DAVENPORT, J., & WOOLMINGTON, A.D., 1982. A new method of monitoring ventilatory activity of mussels and its use in a study of the ventilatory pattern of *Mytilus edulis* (L.). J. Exp. Biol. Ecol., 62, 55-67.
- DAVIDS, C., 1964. The influence of suspensions of microorganisms of different concentrations on the pumping and retention of food by the mussel (*Mytilus edulis* L.). Neth. J. Sea Res., 2, 233-249.
- DELHAYE, W., & CORNET, D., 1975. Contribution to the study of the effect of copper on *Mytilus edulis* during reproductive period. Comp. Bioch. Physiol., 50, 511-518.
- DEPLEDGE, M.H., 1984. Enhanced copper toxicity resulting from environmental stress factor synergies. Comp. Biochem. Physiol., 87, 15-19.
- DISA, 1981. L'anémométrie thermique et l'anémométrie Doppler à Laser (CTA + LDA). DISA-ELEKTRONIK, Publ. N° 1207F, Copenhagen, 28 p.
- DOHERTY, F.G., CHERRY, D.S., & CAIRNS, Jr., J., 1987. Valve closure responses of the asiatic clam *Corbicula fluminea* exposed to cadmium and zinc. Hydrobiol., 153, 159-167.
- DORGELO, J., & SMEENK, J.W., 1988. Contribution to the ecophysiology of *Dreissena polymorpha* (PALLAS) (Mollusca : Bivalvia) : Growth, filtration rate and respiration. Verh. Int. Verein. Limnol., 23, 2202-2208.
- DORN, P., 1976. The feeding behavior of *Mytilus edulis* in the presence of methylmercury acetate. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 15, 714-719.
- DRAL, A.D.G., 1968. On the feeding of mussels (*Mytilus edulis*) in concentrated food suspension. Neth. J. Zool., 18, 440-441.
- D'SILVA, C., & KUREISHY, T.W., 1978. Experimental studies on the accumulation of the copper and zinc in the green mussel. Mar. Poll. Bull., 9, 187-190.
- EARNSHAW, M.J., WILSON S., AKBERALI, H.B., BUTLER, R.D., & MARRIOTT, K.R.M., 1986. The action of heavy metals on the gametes of the marine mussel *Mytilus edulis* (L.) III. The effect of applied copper and zinc on sperm and intracellular metal localisation. Mar. Environ. Res., 20, 261-278.
- EBERSVEILLER, N., 1988. Etude quantitative du taux de filtration de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Influence des métaux (zinc et cuivre). Mémoire de DEA de Toxicologie, Université de Metz, 67 p.
- ELDON, J., PEKKARINEN, M., & KRISTOFFERSSON, R., 1980. Effect of low concentrations of heavy metals on the bivalve *Macoma balthica*. Ann. Zool. Fennici, 17, 233-242.
- ELNABARAWY, M.T., ROBINEAU, R.R., & BEACH, S.A., 1988. Comparison of three rapid toxicity test procedures : Microtox, Polytox, and activated sludge respiration inhibition. Toxic. Assess., 3, 361-370.
- ENGEL, D.W., & BROUWER, M., 1984. Trace metal-binding proteins in marine molluscs and crustaceans. Mar. Environ. Res., 13, 177-194.
- FAMME, P., 1980. Effect of shell valve closure by the mussel *Mytilus edulis* L. on the rate of oxygen consumption in declining oxygen tension. Comp. Biochem. Physiol., 67, 167-170.
- FAMME, P., 1981. Haemolymph circulation as a respiratory parameter in the mussel, *Mytilus edulis* L. Comp. Biochem. Physiol., 69, 243-247.
- FAMME, P., & KOFOED, L.H., 1980. The ventilatory current and ctenidial function related to oxygen uptake in declining oxygen tension by the mussel *Mytilus edulis* L. Comp. biochem. Physiol., 66, 161-171.
- FAMME, P., RIISGARD, H.U., & JORGENSEN, C.B., 1986. On direct measurement of pumping rates in the mussel *Mytilus edulis*. Mar. Biol., 92, 323-327.
- FARRINGTON, J.W., GOLDBERG, E.D., REISEBROUGH, R.W., MARTIN, J.H., & BOWEN, Y.T., 1983. US 'Mussel watch' 1967-1978 : An overview of trace metal, DDT, PCB, hydrocarbon and Artificial radionuclide data. Environ. Sci. Technol., 17, 490-496.
- FARRIS, J.L., BELANGER, S.E., CHERRY, D.S., & CAIRNS, Jr., J., 1989. Cellulolytic activity as a novel approach to assess long-term zinc stress to *Corbicula*. Water Res., 23, 1275-1283.
- FERARD, J.F., 1987. Aspects de la toxicité et de la biosorption du cadmium chez l'algue *Chlorella vulgaris*. Th. Etat : Sci. : Univ. de Metz, 222 p.

- FIALA-MEDIONI, A., 1978. Filter-feeding ethology of benthic invertebrate (*Ascidians*). III. Recording of water current *in situ*. Rate and rhythm of pumping. *Mar. Biol.*, 45, 185-190.
- FINGER, S.E., LITTLE, E.F., HENRY, M.G., FAIRCHILD, J.F., & BOYLE, T.P., 1985. Comparison of laboratory and field assessment of fluorene - Part I : Effects of fluorene on the survival, growth, reproduction and behavior of aquatic organisms in laboratory tests. In : "Validation and predictability of laboratory methods for assessing the fate and effects of contaminants in aquatic ecosystems", BOYLE, T.P. (ed), (ASTM STP 865), ASTM, Philadelphia, 120-133.
- FISCHER, H., 1988. *Mytilus edulis* as a quantitative indicator of dissolved cadmium. Final study and synthesis. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 48, 163-174.
- FOE, G., & KNIGHT, A., 1987. Assessment of the biological impact of point source discharges employing asiatic clams. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, 39-51.
- FORSTNER, U., 1987. Sediment-associated contaminants - an overview of scientific bases for developing remedial optim. *Hydrobiol.*, 149, 221-246.
- FORSTNER, U., & PROSI, F., 1979. Heavy metal pollution in freshwater ecosystems. In : "Biological aspects of freshwater pollution". RAVERA, O. (eds), Pergamon Press, Oxford, 129-161.
- FORSTNER, U., & WITTMANN, G.T.W., 1981. Metal pollution in the aquatic environment. Springer-Verlag, Berlin, 486 p.
- FOSTER-SMITH, R.L., 1975. The effect of concentration of suspension on the filtration rates and pseudofaecal production for *Mytilus edulis* L., *Cerastoderma edule* (L.) and *Venerupis pul-lastra* (Montagu). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 17, 1-22.
- FOSTER-SMITH, R.L., 1976. Some mechanisms for the control of pumping activity in bivalves. *Mar. Behav. Physiol.*, 4, 41-60.
- FOULQUIER, L., & BAUDIN-JAULENT, Y., 1981. Toxicité du cadmium et du zinc sur les daphnies. In : "Les tests de toxicité aiguë en milieu aquatique. Acute aquatic ecotoxicological tests". INSERM, 106, 327-335.
- FRANC, A., 1960. Classe des bivalves. In : "Traité de Zoologie, Anatomie, Systématique, Biologie". GRASSE, P.P. (ed), Masson, Paris, 1845-2164.
- FRANKENNE, F., NOEL-LAMBOT, F., & DISTECHE, A., 1980. Isolation and characterization of metallothioneins from cadmium-loaded mussel *Mytilus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 66, 179-182.
- 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., 1982. Subcellular accumulation and detoxification of metals in aquatic animals. In : "Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity". VERNBERG, W.B. (ed), Academic Press, New York, 3-52.
- GEORGE, S.G., CAREPENE, E., COOMS, T.L., OVERNELL, J., & YOUNGSON, A., 1979. Characterisation of cadmium-binding proteins from mussels, *Mytilus edulis* (L.), exposed to cadmium. *Biochim. et Biophys.*, 580, 225-233.
- GEORGE, S.G., & PIRIE, B.J.S., 1979. The occurrence of cadmium in subcellular particles in the kidney of marine mussel, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. The use of electron microprobe analysis. *Biochim. et Biophys. Acta*, 580, 234-244.
- GEORGE, S.G., & PIRIE, B.J.S., 1980. Metabolism of zinc in the common mussel, *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 60, 575-590.
- GEORGE, S.G., PIRIE, B.J.S., CHEYNE, A.R., COOMBS, T.L., & GRANT, P.T., 1978. Detoxification 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., & VIARENGO, A., 1985. A model for heavy metal homeostasis and detoxication in mussel. In : "Marine pollution and physiology. Recent advances". VERNBERG, F.J., THURBERG, F.P., CALABRESE, A., & VERNBERG, W.B. (eds). University of South Carolina Press, Columbia, 125-143.
- GHIRETTI, F., 1966. Respiration. In : "Physiology of mollusca". Vol. II. WILBUR, K.M., & YONGE, C.M. (eds). Academic Press, New York, 175-233.
- GIAMBERINI, L., 1987. Bioaccumulation de microparticules métalliques par la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Mémoire de DEA de Toxicologie. Univ. de Metz. 53 p + annexes.
- GIESY, J.P., & GRANEY, R.L., 1989. Recent developments in and inter comparisons of acute and chronic bioassays and bioindicators. *Hydrobiol.*, 188/189, 21-60.

- GIESY, J.P., LEVERSEE, G.J., & WILLIAMS, D.R., 1977. Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae). *Water Res.*, **11**, 1013-1020.
- GILFILLAN, E.S., PAGE, D.S., VALLAS, D., GONZALEZ, L., PENDERGAST, E., FOSTER, J.C., & HANSON, S.A., 1985. Relation 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". VERNBERG, F.J., THURBERG, F.P., CALABRESE, A., & VERNBERG, W.B. (eds). University of South Carolina Press, Columbia, 107-124.
- GIRAUD, A.S., WEBSTER, L.K., FABRIS, J.G., COLLETT, L.C., & YEOMANS, N.D., 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., BOWEN, V.T., FARRINGTON, J.W., HARVEY, G., MARTIN, J.H., PARKER, P.L., RISEBROUGH, R.W., ROBERTSON, W., SCHNEIDER, E., & GAMBLE, E., 1978. The mussel watch. *Envir. Conserv.*, **5**, 101-125.
- GOULD, E., GRAIG, R.A., RUSANOWSKY, D., & MARKS, B.C., 1985. Metal-exposed sea scallops, *Placopecten magellanicus* (Gmelin) : a comparison of the effects and uptake of cadmium and copper. In : "Marine Pollution and Physiology : recent advances". VERNBERG, F.J., CALABRESE, A., THURBERG, F.P., & VERNBERG, W.B. (eds). University of South Carolina Press, Columbia, 157-186.
- GOULD, E., THOMPSON, R.J., BUCKLEY, L.J., RUSANOWSKY, D., & SENNEFELDER, G.R., 1988. Uptake and effects of copper and cadmium in the gonad of the scallop *Placopecten magellanicus* : concurrent metal exposure. *Mar. Biol.*, **97**, 217-223.
- GRACE, A.L., & GAINES, L.F., Jr., 1987. The effects of copper on the heart rate and filtration of *Mytilus edulis*. *Mar. Poll. Bull.*, **18**, 87-91.
- GREEN, Jr., F.A., ANDERSON, J.W., PETROCELLI, S.R., PRESLEY, B.J., & SIMS, R., 1976. Effect of mercury on the survival, respiration and growth of postlarval white shrimp, *Penaeus setiferus*. *Mar. Biol.*, **37**, 75-81.
- GRUBER, D., DICKSON, K.L., HENDRICKS, A.C., & MILLER, W.R. III, 1980. An automated biological monitoring facility for rapidly and continuously assessing industrial effluents. *Aquatic Toxicology*, ASTM STP 707. EATON, J.G., PARRISH, D.R., & HENDRICKS, A.C. (eds). ASTM, Philadelphia, pp 164-176.
- GUTKNECKT, J., 1981. Inorganic mercury (Hg⁺⁺) transport through lipid bilayer membranes. *J. Membr. Biol.*, **6**, 61-66.
- HALE, J.M., 1983. Factors influencing the stability of polarographic oxygen sensors. In : "Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological applications". GNAIGER, E., & FORSTNER, H. (eds). Springer-Verlag, Heidelberg, 3-17.
- HAMBURGER, K., & DALL, P.C., 1990. The respiration of common benthic invertebrate species from the shallow littoral zone of lake Esrom, Denmark. *Hydrobiol.*, **199**, 117-130.
- HAMBURGER, K., MOHLENBERG, F., RANDLOV, A. & RIISGARD, H.U., 1983. Size, oxygen consumption and growth in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **75**, 303-306.
- HARRISON, F.L., & LAM, J.R., 1985. Partitioning of copper among copper-binding proteins in the mussel *Mytilus edulis* exposed to soluble copper. *Mar. Biol. Res.*, **16**, 151-163.
- HEBERT, P.N.D., MUNCASTER, B.W., & MACKIE, G.L., 1989. Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas) : a new mollusc in the great lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **46**, 1587-1591.
- HEMELRAAD, J., HOLWERDA, D.A., & ZANDEE, D.I., 1986. Cadmium kinetics in freshwater clams. I. The pattern of cadmium accumulation in *Anodonta cygnea*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**, 1-7.
- HERWIG, H.J., BRANDS, F., KRUITWAGEN, E., & ZANDEE, D.I., 1989. Bioaccumulation and histochemical localisation of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. *Aquat. Toxicol.*, **15**, 269-286.
- HIETANEN, B., SUNILA, I., & KRISTOFFERSSON, R., 1988. Toxic effects of zinc on the common mussel *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water. I. Physiological and histopathological studies. *Ann. Zool. Fennici*, **25**, 341-347.
- HILDRETH, D.I., 1976. The influence of water flow rate on pumping rate in *Mytilus edulis* using a refined direct measurement apparatus. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **56**, 311-319.

- HIS, E., 1982. Un appareil permettant d'étudier le taux de pompage des lamellibranches dans le milieu naturel. *Malacol.*, 22, 667-672.
- HOLWERDA, D.A., DEKNECHT, J.A., HEMELRAAD, J., & VEENHOF, P.R., 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., HEMELRAAD, J., VEENHOF, P.R., & ZANDEE, D.I., 1988. Cadmium accumulation and depuration in *Anodonta anatina* exposed to cadmium chloride or cadmium-EDTA Complex. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 40, 373-380.
- HORNBAACH, D.J., WAY, C.M., WISSING, T.E., & BURKY, A.J., 1984. Effects of particle concentration and season on the filtration rates of the freshwater clam *Sphaerium striatinum* (Bivalvia : Pisiidae). *Hydrobiol.*, 108, 83-96.
- HOWELL, R., GRANT, A.M., & MACCOY, N.E.J., 1984. Effect of treatment with reserpine on the change in filtration rate of *Mytilus edulis* subjected to dissolved copper. *Mar. Poll. Bull.*, 15, 436-439.
- HUNT, J.W., & ANDERSON, B.S., 1989. Sublethal effects of zinc and municipal effluents on larvae of the red abalone *Haliotis rufescens*. *Mar. Biol.*, 101, 545-552.
- HUNTER, J.B., 1978. The role of the toxicity test in water pollution control. *Water Pollut. Control*, 384-394.
- JEANJEAN, A., 1989. Evaluation de la capacité bioindicatrice de *Dreissena polymorpha* vis-à-vis des PCB et pesticides organochlorés. Mémoire de DEA de Toxicologie, Univ. de Metz.
- JENNER, H.A., NOPPERT, F., & SIKKING, T., 1989. A new system for the detection of valve-movement response of bivalves. *Kema Scientific and Technical Reports*, 7, 91-98.
- JOHANSSON, C., CAIN, D.J., & LAM, S.N., 1986. Variability in the fractionation of Cu, Ag, and Zn among cytosolic proteins in the bivalve *Macoma balthica*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 28, 87-97.
- JOHNS, D.M., & MILLER, D.C., 1982. The use of bioenergetics to investigate the mechanisms of pollutant toxicity in crustacean larvae. In : "Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity". VERNBERG, W.B., CALABRESE, A., THURBERG, F.P., & VERNBERG, F.J. (eds). Academic Press, N.Y., 261-288.
- JORGENSEN, C.B., 1975. On gill function in the mussel, *Mytilus edulis* L. *Ophelia*, 13, 187-232.
- JORGENSEN, C.B., 1976. Comparative study on the function of gill in suspension feeding bivalves, with special reference to the effects of serotonin. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 151, 331-343.
- JORGENSEN, C.B., 1981. A hydromechanical principle for particle retention in *Mytilus edulis* and other ciliary suspension feeders. *Mar. Biol.*, 61, 277-282.
- JORGENSEN, C.B., & GOLDBERG, E.D., 1953. Particle filtration in some ascidians and lamellibranchs. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 105, 477-489.
- JORGENSEN, C.B., KIORBOE, T., MOHLENBERG, F., & RIISGARD, H.U., 1984. Ciliary and mucus-net filter feeding, with special reference to fluid mechanical characteristics. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 15, 283-292.
- JORGENSEN, C.B., LARSEN, P.S., & RIISGARD, H.U., 1988. The mussel pump : properties and modelling. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 45, 205-216.
- JORGENSEN, C.B., MOHLENBERG, F., & STEN-KNUDSEN, O., 1986. Nature of relation between ventilation and oxygen consumption in filter feeders. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 29, 73-88.
- KAITALA, S., 1988. Multiple toxicity and accumulation of heavy metals in two bivalve mollusc species. *Water Sci. Technol.*, 20, 23,32.
- KARBE, L., ANTONACOPOULOS, N., & SCHNIER, C., 1975. The influence of water quality on accumulation of heavy metals in aquatic organisms. *Verh. Int. Verein. Limnol.*, 19, 2094-2101.
- KRAMER, K.J.M., JENNER, H., & DEZWART, D., 1989. The valve movement response of mussels : a tool in biological monitoring. *Hydrobiol.*, 188/189, 433, 443.
- KRYGER, J., & RIISGARD, H.U., 1988. Filtration rate capacities in 6 species of european freshwater bivalves. *Oecol.*, 77, 34-38.
- KUPPUSAMY, V.N., & RAMALINGAM, K., 1982. Water transport in *Lyrodus pedicellatus* quaterfages, a wood boring terevid mollusc. *Mater org.*, 17, 215-223.
- LANDRAGIN, G., 1987. Etude de la qualité des eaux superficielles dans le bassin de l'Orne. Annexe A. Agence de l'Eau Rhin-Meuse, 57 Rozérieulles, 21 p.

- LEGLIZE, L., 1981. Mise au point bibliographique sur la biologie et l'écologie de *Dreissena polymorpha*. Rapport de contrat EDF, HE 318137, 56 p.
- LEGLIZE, L., & CROCHARD, C., 1987. Vérification expérimentale du choix de *Dreissena polymorpha* PALLAS (Lamellibranche) comme bioindicateur de contamination métallique. *Naturaliste Can.*, 114, 315-323.
- LEGLIZE, L., & NOURISSON, M., 1983. Les micropolluants dans les divers compartiments de l'écosystème des eaux douces : Utilisation des niveaux de contamination comme indicateurs de qualité. Les invertébrés. In : "L'Eau, la Recherche, l'Environnement". Coll. Recherche-Environnement, 22, Ministère de l'Environnement, Paris, 55-60.
- LITTLE, E.E., 1990. Behavioral toxicology : stimulating challenges for a growing discipline. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9, 1-2.
- LUOMA, S.N., 1989. Can we determine the biological availability of Sediment-bound trace elements ? *Hydrobiol.*, 176/177, 379-396.
- MAAROUF, A., 1988. Etude expérimentale de la bioaccumulation et du relargage du zinc chez *Dreissena polymorpha*. Th. doct., Univ. de Metz, 188 p + annexes.
- MAAROUF, A., MOUABAD, A., & PIHAN, J.C., 1987. Bioaccumulation et relargage du zinc par la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Effet de l'EDTA. *Haliotis*, 18, 251-259.
- MacINNES, J.R., & CALABRESE, A., 1978. Response of embryos of the american oyster, *Crassostrea virginica*, to heavy metals at different temperatures. In : "Physiology and behaviour of marine organisms". Mc LUSKY, D.S., & BERRY, A.J. (eds). Pergamon Press, Oxford, 195-202.
- MACIOROWSKI, H.D., & CLARKE, R. Mc V., 1980. Advantages and disadvantages of using invertebrates in toxicity testing. In : "Aquatic Invertebrate Bioassays". ASTM STP 715. BUIKEMA, A.L., & CAIRNS, J., Jr. (eds). ASTM, Philadelphia, 36-47.
- MALINS, D.C., 1989. The use of environmental assays for impact assessment. *Hydrobiol.*, 188/189, 87-91.
- MALTBY, L., & CALOW, P., 1989. The application of bioassays in the resolution of environmental problems ; past, present and future. *Hydrobiol.*, 188/189, 65-76.
- MANGUM, C.P., & POLITES, G., 1980. Oxygen uptake and transport in the prosobranch Mollusc *Busycon canaliculatum*. I. Gas exchange and the response to hypoxia. *Biol. Bull.*, 158, 77-90.
- MANGUM, C.P., & VAN WINKLE, W., 1973. Response of aquatic invertebrates to declining oxygen conditions. *Am. Zool.*, 13, 529-541.
- MANLEY, A.R., 1983. The effects of copper on the behaviour, respiration, filtration and ventilation activity of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 63, 205-222.
- MARSHALL, A.T., & TALBOT, V., 1979. Accumulation of cadmium and lead in the gills of *Mytilus edulis* : X-ray microanalysis and chemical analysis. *Chem. Biol. Interactions*, 27, 111-123.
- MARTIN, J.M., PILTZ, F.M., & REISH, D.J., 1975. Studies on the *Mytilus edulis* community in Alamitos Bay, California. V. The effects of heavy metals on byssal thread production. *Veliger*, 18, 183-188.
- MARTIN, T.R., & HOLDICH, D.M., 1986. The acute lethal toxicity of heavy metals to peracarid crustaceans (with particular reference to freshwater Asellids and Gammarids). *Water Res.*, 20, 1137-1147.
- MASON, A.Z., JENKINS, K.D., & SULLIVAN, P.A., 1988. Mecanisms of trace metal accumulation in the polychaete *Neanthes arenaceodentata*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 68, 61-80.
- MATHEW, R., & MENON, N.R., 1983. Oxygen consumption in tropical bivalves *Perna viridis* et *Meretrix casta* exposed to heavy metals. *Ind. J. Mar. Sci.*, 12, 57-59.
- MATTHEWS, S., LUCAS, M.I., STENTON-DOZEY, J.M.E., & BROWN, A.C., 1989. Clearance and yield of bacterioplankton and particulates for two suspension-feeding in faunal bivalves, *Donax serra* Röding and *Macra lilacea* Lam. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 125, 219-234.
- McCAMMON, H.M., 1965. Filtering currents in brachiopods measured with a thermistor flowmeter. *Ocean Sci. Ocean. Eng.*, 2, 772-779.
- McMAHON, R.F., 1979. Response to temperature and hypoxia in the oxygen consumption of the introduced asiatic freshwater clam *Corbicula fluminea* (Müller). *Comp. Biochem. Physiol.*, 63, 383-388.

- MERSCH, J., 1989. Utilisation de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* comme bioindicateur de pollution métallique. Etude *in situ*. Mémoire de DEA de Toxicologie, Univ. de Metz, 56 p.
- MEYER, W., HARISCH, G., & SAGREDOS, A.N., 1986. Biochemical and histochemical aspects of lead exposure in Dragonfly larvae (Odonata : Anisoptera). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 11, 308-319.
- MICALLEF, S., & TYLER, P.A., 1987. Preliminary observations of the interactions of mercury and selenium in *Mytilus edulis*. *Mar. Poll. Bull.*, 18, 180-185.
- MICALLEF, S., & TYLER, P.A., 1990. Effect of mercury and selenium on the gill function of *Mytilus edulis*. *Mar. Poll. Bull.*, 21, 288-2092.
- MIZRAHI, L., & ACHITUV, Y., 1989. Effect of heavy metals ions on enzyme activity in the mediterranean mussel, *Donax trunculus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 42, 854-859.
- MOHAN, C.V., GUPTA, T.R.C., SHETTY, H.P.C., & MENON, N.R., 1986a. Combined toxicity of mercury and cadmium to the tropical green mussel *Perna viridis*. *Dis. Aquat. Org.*, 2, 65-72.
- MOHAN, C.V., MENON, N.R., & GUPTA, T.R.C., 1986b. Filtration in some tropical intertidal bivalves exposed to mercury and cadmium mixture. *Fish. Technol.*, 23, 204-210.
- MOHLENBERG, F., & RIISGARD, H.U., 1979. Filtration rate using a new indirect technique, in thirteen species of suspension-feeding bivalves. *Mar. Biol.*, 54, 143-147.
- MOORE, H.J., 1971. The structure of the latero-frontal cirri on the gills of certain lamellibranch molluscs and their role in suspension feeding. *Mar. Biol.*, 11, 23-27.
- MOORE, J.W., & RAMAMOORTHY, S., 1983. Heavy metals in natural waters. Applied monitoring and impact assessment. Springer-Verlag, New York, 268 p.
- MORGAN, W.S.G., 1977. Biomonitoring with fish : an aid to industrial effluent and surface water quality control. *Prog. Water Technol.*, 9, 703-711.
- MORRISON, G.M.P., & REVITT, D.M., 1987. Assessment of metal species bioavailability and geochemical mobility in polluted waters. *Environ. Technol. Lett.*, 8, 361-372.
- MORTON, B., 1969a. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. I. General anatomy and morphology. *Proc. Malacol. Soc. Lond.*, 38, 301-320.
- MORTON, B., 1969b. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. II. Correlation of the rhythms of adductor activity, feeding, digestion and excretion. *Proc. Malacol. Soc. Lond.*, 38, 401-414.
- MORTON, B., 1971. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. V. Some aspects of filter-feeding and the effect of microorganisms upon the rate of filtration. *Proc. Malacol. Soc. Lond.*, 39, 289-299.
- MORTON, B., 1983. Feeding and digestion in Bivalvia. In : "The Mollusca. Vol. 5. Physiology, Part 2". SALEUDDIN, A.S.M., & WILBUR, K.M. (eds). Academic Press, New York, 65-147.
- MOUABAD, A., & MERSCH, J., 1991 (sous presse). Bioaccumulation et toxicité physiologique du Cu et du Cd chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Implications sur l'utilisation en biomonitoring. Proc. III CILEF, IFAF (ed), VERSOIX.
- MOUVET, C., 1984. Métaux lourds et mousses aquatiques. Spéciation physico-chimique, bioaccumulation et toxicité. Th. doct., Univ. de Liège (Belgique), 157 p.
- MUGEL, M., & FERARD, J.F., 1978. Elaboration d'un modèle de chaîne trophique dulçaquicole et application à une étude écotoxicologique du cadmium. Th. 3^e cycle, Univ. de Metz, 344 p.
- MYINT, U.M., & TYLER, P.A., 1982. Effects of temperature, nutritive and metal stressors on the reproductive biology of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 67, 209-223.
- NAYLOR, C., MALTBY, L., & CALOW, P., 1989. Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiol.*, 188/189, 517-523.
- NELSON, D.A., CALABRESE, A., NELSON, B.A., McINNES, J.R., & WENZLOFF, D.R., 1976. Biological effects of heavy metals on juvenile bay scallops, *Argopecten irradians*, in short-term exposures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 16, 275-282.
- NELSON, A., & DONKIN, P., 1985. Processes of bioaccumulation : The importance of chemical speciation. *Mar. Poll. Bull.*, 16, 164-169.
- NEUHOFF, H.G., & THEEDE, H., 1984. Long-term effects of low copper concentrations at normal and reduced oxygen tensions. *Limnol.*, 15, 513-521.

- NEWELL, R.I.E., & BAYNE, B.L., 1980. Seasonal changes in the physiology, reproduction condition and carbohydrate content of the cockle *Cardium (Cerastoderma) edule* (Bivalvia : Cardiidae). *Mar. Biol.*, **56**, 11-19.
- NEWELL, R.C., JOHNSON, L.G., & KOFOED, L.H., 1977. Adjustment of the components of energy balance in response to temperature change in *Ostrea edulis*. *Oecol.*, **30**, 97-110.
- NOURISSON, M., & PIHAN, J.C., 1985. Répartition et passage de polluants métalliques dans divers compartiments inertes et vivants d'un cours d'eau. 1ère Partie : estimation du degré de pollution métallique de l'eau, des matières en suspension et des sédiments de l'Orne, effluent de la Moselle. Rapport de contrat, Ministère de l'Environnement, Convention n° 81370. Laboratoire d'Ecologie, Univ. de Metz, 53 p + annexes.
- OECD, 1984. Proceeding of the international workshop on biological testing of effluents (and related receiving waters). USEPA and Environment Canada (eds), 367 p.
- OECD, 1987. Summary of considerations in the report from the OECD Expert Group on Ecotoxicology. In : "OECD Guidelines for testing of chemical. Section 2 : Effects on biotic systems". OECD, Paris.
- OWEN, G., 1974. Feeding and digestion in the bivalvia. *Adv. Comp. Physiol. Biochem.*, **5**, 1-35.
- PAPARO, A., & FINCH, C.E., 1972. Catecholamine localization, content, and metabolism in the gill of two lamellibranch molluscs. *Comp. Gen. Pharmac.*, **3**, 303-309.
- PARACHE, A., 1985. Contribution à l'étude de la croissance de *Mytilus edulis* var. *galloprovincialis* LMK. Influence des conditions de milieu. Th. doct., Univ. d'Aix-Marseille II, 239 p + annexes.
- PAVICIC, J., 1980. Interaction of Cd and Zn in relation to oxygen consumption in early stages of marine bivalve molluscs. V Journées Etud. Pollutions, Cagliari, C.I.E.S.M, 627-634.
- PELLETIER, E., 1988. Acute toxicity of some methylmercury complexes to *Mytilus edulis* and lack of selenium protection. *Mar. Poll. Bull.*, **19**, 213-219.
- PHILLIPS, D.J.H., 1976. 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.
- PICKWELL, G.V., & STEINERT, S.A., 1984. Serum biochemical and cellular responses to experimental cupric ion challenge in mussels. *Mar. Environ. Res.*, **14**, 245-265.
- POULSEN, E., RIISGARD, H.U., & MOHLENBERG, F., 1982. Accumulation of cadmium and bioenergetics in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **68**, 25-29.
- QUETIN, L.B., & MICKEL, T.J., 1983. Sealed respirometers for small invertebrates. In : "Polarographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Applications". GNAIGER, E., & FORSTNER, H. (eds). Springer-Verlag, Berlin, 185-189.
- RAVERA, O., 1977. Effects of heavy metals (cadmium, copper, chromium and lead) on a freshwater snail : *Biomphalaria glabrata* Say (Gastropoda, Prosobranchia). *Malacol.*, **16**, 231-236.
- RAVERA, O., 1984. A comparative study to identify the most convenient biotests for a given situation and decision. In : "Proceedings of the international workshop on biological testing of effluents (and related receiving waters)". OCDE, USEPA and Env. Canada (eds), Duluth, Minn., 41-59.
- RAVERA, O., CARTISANO, A. DE BERNARDI, R., & GUZZI, L., 1973. Effects of chelating agents (EDTA and SNTA) on the incorporation of radionuclides by freshwater filter feeding organisms (copepod and lamellibranch). *Atti. 5° Coll. int. oceanogr. med. Messina*, 437-448.
- READ, K.R.H., 1962. Respiration of the bivalved molluscs *Mytilus edulis* L. and *Brachiodontes demissus plicatulus* LAMARCK as a function of size and temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, **7**, 89-101.
- REDPATH, K.J., 1985. Growth inhibition and recovery in mussels (*Mytilus edulis*) exposed to low copper concentrations. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **65**, 421-431.
- REEDERS, H.H., DE VAATE, B.A., & SLIM, F.J., 1989. The filtration rate of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) in three dutch lakes with reference to biological quality management. *Freshw. Biol.*, **22**, 133-141.
- REISH, D.J., MARTIN, J.M., PILTZ, F.M., & WORD, J.Q., 1976. The effect of heavy metals on laboratory populations of two polychaetes with comparisons to the water quality conditions and standards in southern California marine waters. *Water Res.*, **10**, 299-302.
- RIISGARD, H.U., 1988. Efficiency of particle retention and filtration rate in 6 species of northeast american bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **45**, 217-223.

- RIISGARD, H.U., BJORNSTAD, E., & MOHLENBERG, F., 1987. Accumulation of cadmium in the mussel *Mytilus edulis* : kinetics and importance of uptake via food and sea water. *Mar. Biol.*, **96**, 349-353.
- RIISGARD, H.U., RANDLOV, A., & KRISTENSEN, P.S., 1980. Rates of water processing, oxygen consumption and efficiency of particle retention in veligers and young post-metamorphic *Mytilus edulis*. *Ophelia*, **19**, 37-47.
- ROBINSON, W.E., MORSE, M.P., PENNEY, B.A., KAKAREKA, J.P., & MEYHOFER, E.U., 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". VERNBERG, F.J., THURBERG, F.P., CALABRESE, A., & VERNBERG, W.B. (eds). Univ. of South Carolina Press, Columbia, 83-106.
- RODGERS, J.H., Jr., CHERRY, D.S., GRANEY, R.L., DICKSON, K.L., & CAIRNS, J., Jr., 1980. Comparison of heavy metal interactions in acute and artificial stream bioassay techniques for the asiatic clam (*Corbicula fluminea*). In : "Aquatic Toxicology", ASTM STP 707. EATON, J.G., PARRISH, P.R., & HENDRICKS, A.C. (eds). ASTM, Philadelphia, 266-280.
- RODIER, J., 1984. L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduelles, eau de mer. 7^e éd. Dunod, Paris, 1365 p.
- ROESIJADI, G., 1981. The significance of low molecular weight, metallothionein-like proteins in marine invertebrates : current status. *Mar. Environ. Res.*, **4**, 167-179.
- SALANKI, J., 1964. Contribution to the problem of daily rhythms in the activity of the freshwater mussel. *Ann. Biol. Tihany*, **31**, 109-116.
- SALANKI, J., & BALOGH, K.V., 1989. Physiological background for using freshwater mussels in monitoring copper and lead pollution. *Hydrobiol.*, **188/189**, 445-454.
- SALANKI, J., & LUKACSOVICS, F., 1967. Filtration and O₂ consumption related to the periodic activity of freshwater mussel (*Anodonta cygnea* L.). *Ann. Biol. Tihany*, **34**, 85-98.
- SALIBA, L.J., & VELLA, M.G., 1977. Effects of mercury on the behaviour and oxygen consumption of *Monodonta articulata*. *Mar. Biol.*, **43**, 277-282.
- SAMANT, S., & AGARWAL, R.A., 1978. Effects of some environmental factors on survival and activity of freshwater bivalve *Lamellidens corrianus*. *Ind. J. Exp. Biol.*, **16**, 26-28.
- SANDERS, B.M., 1988. The role of stress proteins response in physiological adaptation of marine molluscs. *Mar. Environ. Res.*, **24**, 207-210.
- SARTORY, D.P., & LLOYD, B.J., 1976. The toxic effects of selected heavy metals on unadapted populations of *Vorticella convallaria* var. *similis*. *Water Res.*, **10**, 1123-1127.
- SATHYANATHAN, B., MURALEEDHARAN NAIR, S., CHACKO, J., & NAMBISAN, P.N.K., 1988. Sublethal effects of copper and mercury on some biochemical constituents of the estuarine clam *Villorita cyprinoides* var. *cochinensis* (Hanley). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**, 510-516.
- SCHULTE, E.H., 1975. Influence of algal concentration and temperature on the filtration rate of *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **30**, 331-341.
- SCHULZ-BALDES, M., 1974. Lead uptake from sea water and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **25**, 177-193.
- SCHULZ-BALDES, M., 1978. Lead transport in the common mussel *Mytilus edulis*. In : "Physiology and Behaviour of Marine Organisms". Mc LUSKY, D.S., & BERRY, A.J. (eds). Pergamon Press, Oxford, 211-219.
- SCOTT, D.M., & MAJOR, C.W., 1972. The effects of copper (II) on survival, respiration and heart rate in the common blue mussel, *Mytilus edulis*. *Biol. Bull.*, **143**, 679-688.
- SEED, R., 1976. Ecologie. In : "Marine mussels : their ecology and physiology". BAYNE, B.L. (ed). Cambridge University Press, Cambridge, 13-66.
- SHAFEE, M.S., 1982. Variations saisonnières de la consommation d'oxygène chez le pétoncle noir *Chlamyvaria* L. de Lanveoc (rade de Brest). *Oceanol. acta*, **5**, 189-197.
- SHUMWAY, S.E., CUCCI, T.L., NEWELL, R.C., & YENTSCH, C.M., 1985. Particle selection, ingestion and absorption in filter-feeding bivalves. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **91**, 77-92.
- SIMKISS, K., 1983. Lipid solubility of heavy metals in saline solutions. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, **63**, 1-7.
- SIMKISS, K., & MASON, A.Z., 1983. Metal ions : Metabolic and toxic effects. In : "The Mollusca. Volume 2 : Environmental Biochemistry and Physiology". HOCHACHKA, P.W. (ed). Academic Press, New York, 102-156.

- SIMKISS, K., TAYLOR, M., & MASON, A.Z., 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Mar. Biol. Lett.*, **3**, 187-201.
- SINDERMANN, C.J., 1979. Beyond the LC50 : An opinion about research activities and needs concerning physiological effects of pollutants in the environment. In : "Marine pollution : Functional responses". VERNBERG, W.B., THURBERG, F.P., CALABRESE, A., & VERNBERG, F.J. (eds). Academic Press, New York, 437-450.
- SINDERMANN, C.J., 1988. Biological indicators and biological effects of estuarine/coastal pollution. *Water Resour. Bull.*, **24**, 931-939.
- SLOOFF, W., 1979. Detection limits of a biological monitoring system based on fish respiration. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **23**, 517-523.
- SLOOFF, W., 1983. Benthic macroinvertebrates and water quality assessment : some toxicological considerations. *Aquat. Toxicol.*, **4**, 73-82.
- SLOOFF, W., DE ZWART, D., & MARQUENIE, J.M., 1983. Detection limits of a biological monitoring system for chemical water pollution based on mussel activity. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **30**, 400-405.
- SMITH, J.R., 1985. Copper exposure and ciliary function in gill tissue of *Mytilus californianus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 556-563.
- SNELL, T.W., & PERSOONE, G., 1989a. Acute toxicity using rotifers. I : A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. *Aquat. Toxicol.*, **14**, 65-80.
- SNELL, T.W., & PERSOONE, G., 1989b. Acute toxicity bioassays using rotifers. II : A freshwater test with *Brachionus rubens*. *Aquat. Toxicol.*, **14**, 81-92.
- SPRUNG, M., 1989. Field and laboratory observations of *Dreissena polymorpha* larvae : abundance, growth, mortality and food demands. *Arch. Hydrobiol.*, **115**, 537-561.
- SPRUNG, M., ROSE, U., 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecol.*, **77**, 526-532.
- STANCZYKOWSKA, A., LAWACZ, W., & MATTICE, J., 1975. Use of field measurements of consumption and assimilation in evaluating of the role of *Dreissena polymorpha* Pall. in a lake ecosystem. *Pol. Arch. Hydrobiol.*, **22**, 509-520.
- STEBBING, A.R.D., & POMROY, A.J., 1978. A sublethal technique for assessing the effects of contaminants using *Hydra littoralis*. *Water Res.*, **12**, 631-635.
- STICKLE, Jr., W.B., RICE, S.D., VILLARS, C., & METCALF, W., 1985. Bioenergetics and survival of the marine mussel, *Mytilus edulis* L., during long-term exposure to the water-soluble fraction of cook inlet crude oil. In : "Marine Pollution and Physiology : recent advances". VERNBERG, F.J., THURBERG, F.R., CALABRESE, A., & VERNBERG, W.B. (eds). University of South Carolina Press, Columbia, 427-446.
- STIRLING, E.A., 1975. Some effects of pollutants on the behaviour of the bivalve *Tellina tenuis*. *Mar. Poll. Bull.*, **6**, 122-124.
- STROMGREN, T., 1986. The combined effect of copper and hydrocarbons on the length growth of *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, **19**, 251-258.
- SUNDA, W.G., ENGEL, D.W., & THUOTTE, R.M., 1978. Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp *Palaemonetes pugio* : importance of free cadmium ion. *Environ. Sci. Technol.*, **12**, 409-413.
- SUNILA, I., 1981. Toxicity of copper and cadmium to *Mytilus edulis* L. (Bivalvia) in brackish water. *Ann. Zool. Fennici*, **18**, 213-223.
- SUNILA, I., 1986. Chronic histopathological effects of short-term copper and chromium exposure on the gill of the mussel, *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **47**, 125-142.
- TAN, W.H., & LIM, L.H., 1984. The tolerance to and uptake of lead in the green mussel, *Perna viridis* L. *Aquac.*, **42**, 317-332.
- TEN WINKEL, E.H., & DAVIDS, C., 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca, Bivalvia). *Freshw. Biol.*, **35**, 383-394.
- TESSIER, A., & CAMPBELL, P.G.C., 1987. Partitioning of trace metals in sediments : relationships with availability. *Hydrobiol.*, **149**, 43-52.
- 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. Réponse à la désoxygénation de l'eau. Th. Etat : Sci. : Univ. PARIS VI, 358 p.
- THOMPSON, R.J., & BAYNE, B.L., 1972. Active metabolism associated with feeding in the mussel *Mytilus edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **8**, 191-212.

- THURBERG, F.P., CALABRESE, A., & DAWSON, M.A., 1974. Effects of silver on oxygen consumption of bivalves at various salinities. In : "Pollution and physiology of marine organisms". VERNBERG, F.J., & VERNBERG, W.B. (eds). Academic Press, New York, 67-78.
- THURBERG, F.P., DAWSON, M.A., & COLLIER, R.S., 1973. Effects of copper and cadmium on osmoregulation and oxygen consumption in two species of estuarine crabs. *Mar. Biol.*, 23, 171-175.
- THYBAUD, E., 1990. Ecotoxicologie du lindane et de la deltaméthrine en milieu aquatique. *Rev. Sci. Eau*, 3, 195-209.
- 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 biochimiques. Th. Doct., Univ. de Metz, 230 p.
- TUFFERY, G., 1978. Recherches sur la bucéphalose à *Bucephalus polymorphus* (Baer, 1827). Th. 3^e cycle, Univ. Paris VI, 137 p.
- VAHL, O., 1972. Particle retention and relation between water transport and oxygen uptake in *Chlamys opercularis* (Bivalvia). *Ophelia*, 10, 67-74.
- VAHL, O., 1973. Pumping and oxygen consumption rates of *Mytilus edulis* L. of different sizes. *Ophelia*, 12, 45-52.
- VIARENGO, A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Poll. Bull.*, 16, 153-158.
- VIARENGO, A., MOORE, M.N., MANCINELLI, G., MAZZUCOTELLI, A., PIPE, R.K., & FARRAR, S.V., 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., PALMERO, S., ZANICCHI, G., CAPELLI, R., VAISSIERE, R., & ORUNESU, M., 1985. Role of metallothioneins in Cu and Cd accumulation and elimination in the gill and digestive gland cells of *Mytilus galloprovincialis* Lam. *Mar. Environ. Res.*, 16, 23-36.
- WALDICHUK, M., 1974. Some biological concerns in heavy metals pollution. In : "Pollution and physiology of marine organisms". VERNBERG, F.J., & VERNBERG, W.B. (eds). Academic Press, New York, 1-57.
- WALLET, M., 1984. La bucéphalose larvaire à *Bucephalus polymorphus* BAER, 1827 (Trematoda ; Digenea). Biologie de la cercaire et aspects épidémiologiques dans le Sud-Est de la France. Th. 3^e cycle, U.S.T.L., Montpellier, 188 p.
- WALNE, P.R., 1972. The influence of current speed, body size and water temperature on the filtration rate of five species of bivalves. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 52, 345-374.
- 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.
- WARD, T.J., 1982. Effect of cadmium on particle clearance by the Sydney Rock oyster, *Saccostrea commercialis* (I. & R.). *Aust. J. Mar. Freshw. Res.*, 33, 711-715.
- WARNICK, S.L., & BELL, H.L., 1969. The acute toxicity of some heavy metals to different species of aquatic insects. *J. Water Poll. Control Fed.*, 41, 280-284.
- WATLING, H., 1981. The effects of metals on mollusc filtering rates. *Trans. Roy. Soc. S. Afr.*, 44, 441-451.
- WATLING, H., & WATLING, R.J., 1982. Comparative effects of metals on the filtering rate of the brown mussel *Perna perna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 29, 651-657.
- WIDDOWS, J., 1978. Combined effects of body size, food concentration and season on the physiology of *Mytilus edulis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 58, 109-124.
- WIDDOWS, J., 1985. Physiological measurements. In : "The effects of stress and pollution on marine animals". BAYNE *et al.* (eds). Praeger, New York, 3-45.
- WIDDOWS, J., & BAYNE, B.L., 1971. Temperature acclimation of *Mytilus edulis* with reference to its energy budget. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 51, 827-843.
- WIDDOWS, J., BAKKE, T., BAYNE, B.L., DONKIN, P., LIVINGSTONE, D.R., LOWE, D.M., MOORE, M.N., EVANS, S.V., & MOORE, S.L., 1982. Response of *Mytilus edulis* L. on exposure to the water accommodated fraction of North Sea oil. *Mar. Biol.*, 67, 15-31.
- WIDDOWS, J., FIETH, P., & WORRALL, C.M., 1979. Relationships between Seston, Available Food and Feeding activity in the common Mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 50, 195-207.
- WIDDOWS, J., & JOHNSON, D., 1988. Physiological energetics of *Mytilus edulis* : Scope for Growth. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46, 113-121.

- WILLE, E., 1987. Etude des populations phytoplanctoniques du secteur Seille-Moselle. Mémoire de DESE, FUL, Arlon (Belgique), 87 p.
- WILLIAMS, J.B., 1984. Respiratory changes in the euryhaline clam, *Mulinia lateralis* (Say), over a range of 0° and salinity combination. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 81, 269-280.
- WILLIAMS, R.J.P., 1981. Physico-chemical aspects of inorganic element transfer through membranes. Phil. Trans. R. Soc. Lond., 294, 57-74.
- WILSON, J.H., 1983. Retention efficiency and pumping rate of *Ostrea edulis* in suspensions of *isochrysis galbana*. Mar. Ecol. Prog. Ser., 12, 51-58.
- WILSON, J.H., & SEED, R., 1974. Laboratory experiments on pumping and filtration in *Mytilus edulis* using suspension of colloidal graphite. Ir. Fish. Invert., 14, 1-20.
- WOLFE, D.A., 1970. Zinc Enzymes in *Crassostrea virginica*. J. Fish. Res. Board Can., 27, 59-69.
- WOLTERING, D.M., 1984. The growth response in fish chronic and early life stage toxicity tests : a critical review. Aquat. Toxicol., 5, 1-21.
- WOYNAROVICH, E., 1961. The oxygen consumption of the *Dreissena polymorpha* (Lamellibranchiata) at different temperatures. Ann. Biol. Tihany, 28, 211-216.
- WRIGHT, R.T., COFFIN, R.B., ERSING, C.P., & PEARSON, D., 1982. Field and laboratory measurements of bivalve filtration of natural marine bacterioplankton. Limnol. Oceanogr., 27, 91-98.
- YEVICH, C.A., & YEVICH, P.P., 1985. Histopathological effects of cadmium and copper on the sea scallop *Placopecten magellanicus*. In : "Marine Pollution and Physiology : Recent advances". VERNBERG, F.J., THURBERG, F.P., CALABRESE, A., & VERNBERG, W.B. (eds). University of South Carolina Press, Columbia, 187-198.
- ZAMUDA, C.D., & SUNDA, W.G., 1982. Bioavailability of dissolved copper to the american oyster *Crassostrea virginica*. I. Importance of chemical speciation. Mar. Biol., 66, 77-82.

ANNEXES

ANNEXE I

COMPOSITION ET PREPARATION DU MILIEU DE CULTURE DES CHLORELLES (LEFEVRE-CZARDA)

1. Composition

La culture de *Chlorella vulgaris* se fait en milieu liquide LEFEVRE-CZARDA modifié par l'incorporation d'oligo-éléments d'après MUGEL et FERARD (1978). Le milieu est préparé à partir d'une solution de base concentrée et de deux solutions d'oligo-éléments dont les compositions sont indiquées ci-dessous.

Préparation d'une solution de base concentrée :

- Nitrate de calcium	2,0 g
- Nitrate de potassium	5,0 g
- Sulfate de magnésium	1,5 g
- Phosphate dipotassique	2,0 g
- Eau distillée q.s.p.	1 l

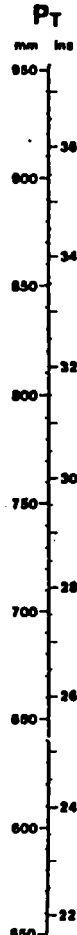
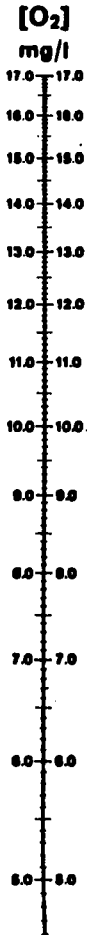
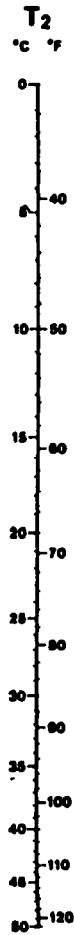
Préparation d'une solution d'oligo-éléments I :

- Sulfate de cuivre	0,03 g
- Hepta-molibdate d'ammonium	0,06 g
- Sulfate de zinc	0,06 g
- Chlorure de cobalt	0,06 g
- Nitrate de manganèse	0,06 g
- Acide citrique	0,06 g
- Acide borique	0,06 g
- Eau distillée q.s.p.	1 l

Préparation d'une solution d'oligo-éléments II :

- Citrate de fer	10,625 g
- Sulfate de fer	0,625 g
- Perchlorure de fer	0,625 g
- Eau distillée q.s.p.	1 l

solubilité de l'oxygène (air saturé en vapeur d'eau) — cas de l'eau douce



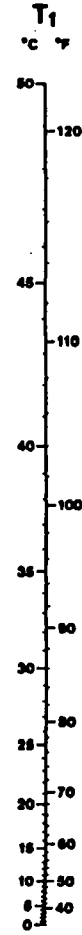
Mode d'emploi

- 1 Mesurer la température de l'eau
- 2 Mesurer la pression atmosphérique
- 3 Tracer une droite joignant la température de l'eau sur l'échelle T₁ et la pression sur l'échelle P_T. Lire sur l'échelle P_A la pression partielle (air sec)
- 4 Tracer une droite joignant P_A et la température lue sur l'échelle T₂. Lire sur l'échelle O₂ la concentration en oxygène dissous (mg/l).

Exemple

Température de l'eau : 20°
Pression : 750 mm Hg
P_A : 732 mm Hg
[O₂] : 9,0 mg/l.

(Reproduit avec l'autorisation
d'ORBISPHERE CORPORATION
Genève, Suisse.)



ANNEXE III

MÉTHODE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE AU BLEU D'INDOPHÉNOL

1. OBJET ET DOMAINE D'APPLICATION

La présente partie a pour objet la description d'une méthode de dosage de l'azote ammoniacal dans les eaux par mesure spectrophotométrique au bleu d'indophénol.

Elle est applicable aux teneurs en azote ammoniacal, exprimées en NH_4 , supérieures à 2 $\mu\text{g/l}$.

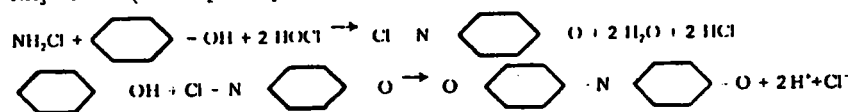
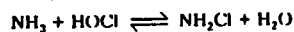
Elle ne présente pas d'interférences en présence des éléments majeurs des eaux douces naturelles et des eaux de mer.

Elle n'est pas applicable en présence de sulfures si leur concentration exprimée en S^{2-} est supérieure à 2 mg/l , ni, en règle générale, en présence de fortes teneurs en réducteurs.

Elle n'est également pas applicable aux eaux troubles ou colorées (sauf si une dilution est possible et supprime ce trouble ou cette coloration).

2. PRINCIPE

Formation, en milieu alcalin ($10,4 < \text{pH} < 11,5$) d'un composé type indophénol par réaction des ions ammonium avec du phénol et de l'hypochlorite, en présence de nitroprussiate comme catalyseur.



Mesure spectrophotométrique, à une longueur d'onde voisine de 630 nm, de la coloration obtenue.

3. RÉACTIFS

Au cours de l'analyse n'utiliser que de l'eau récemment déminéralisée sur résine cationique forte ou de l'eau de pureté équivalente dont la teneur en azote ammoniacal est négligeable.

3.1 Solution alcaline, complexante et chlorée

Dissoudre dans environ 800 ml d'eau, 20 g d'hydroxyde de sodium en pastilles et 380 g de citrate trisodique ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$). Porter à ébullition et maintenir une ébullition douce pendant 20 min.

Refroidir, ajouter 4 g de sel de sodium de l'acide dichloroisocyanurique ($\text{C}_3\text{NaCl}_2\text{N}_3\text{O}_3$) et amener le volume à 1 000 ml. Conserver cette solution à une température de 4 °C environ.

3.2 Solution de phénol et de nitroprussiate

Dissoudre dans de l'eau 35 g de phénol et 0,4 g de nitroprussiate de sodium $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}] \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, et amener le volume à 1 000 ml.

Conserver cette solution dans un flacon en verre brun et à une température de 4 °C environ. Ne jamais la placer à la lumière directe du soleil. La manipuler en lumière atténuée.

3.3 Azote ammoniacal, solutions étalons

3.3.1 Solution mère à 100 mg de NH_4 par litre :

Dissoudre 297 mg de chlorure d'ammonium dans l'eau et amener à 1 000 ml en fiole jaugée.

3.3.2 Solution étalon à 10 mg de NH_4 par litre. Diluer au dixième au moment de l'emploi la solution 3.3.1.

3.3.3 Solution étalon à 1 mg de NH_4 par litre. Diluer au dixième au moment de l'emploi la solution 3.3.2.

4. APPAREILLAGE

Matériel courant de laboratoire.

Spectrophotomètre (longueur d'onde : 630 nm).

La verrerie utilisée pour la préparation des réactifs et pour effectuer le dosage ne doit pas servir à d'autres dosages, ni entrer en contact avec de l'ammoniaque (vapeur ou liquide) ou des sels d'ammonium en forte concentration. Lorsqu'un nouveau matériel est utilisé, il est bon d'effectuer deux fois la réaction à blanc dans les fioles jaugées ou les tubes où sera développée la coloration.

Entre les analyses conserver les fioles ou les tubes bouchés, remplis d'eau et à l'obscurité.

5. ÉCHANTILLON

Les échantillons destinés au laboratoire d'analyse doivent, aussitôt que possible après leur prélèvement, être refroidis à une température voisine de 5 °C.

L'analyse doit être effectuée aussitôt que possible après le prélèvement.

6. MODE OPÉRATOIRE

6.1 PRISE D'ESSAI

Si la teneur de l'échantillon en NH_4 est inférieure à 1 mg/l , prélever une prise d'essai de 20 ml.

Si la teneur de l'échantillon en NH_4 est supérieure à 1 mg/l , prélever un volume plus petit et ajuster à 20 ml avec de l'eau.

6.2 COURBE D'ÉTALONNAGES

Introduire dans une série de fioles jaugées de 100 ml, les volumes de solution étalon (3.3.2 ou 3.3.3) indiqués dans le tableau ci-après, en choisissant entre les deux possibilités prévues suivant les teneurs à doser :

GAMME I POUR DES MESURES EN CUVES DE 50 mm		GAMME II POUR DES MESURES EN CUVES DE 10 mm	
Volume de solution 3.3.3 ml	correspondant à une teneur de : $\mu\text{g NH}_4/\text{l}$	Volume de solution 3.3.3 ml	correspondant à une teneur de : $\text{mg NH}_4/\text{l}$
1	10	1	0,1
2	20	2	0,2
5	50	4	0,4
10	100	6	0,6
15	150	8	0,8
20	200	10	1,0

Compléter au volume avec de l'eau et homogénéiser.

Prélever 20 ml de chacune des solutions obtenues et les introduire dans une série de 6 tubes à essai. Introduire également 20 ml d'eau dans un 7^{ème} tube à essai (terme zéro).

Ajouter dans l'ordre et sans attendre entre chaque ajout :

- 1,0 ml de la solution de phénol et nitroprussiate (3.2); agiter.
- 1,0 ml de la solution alcaline (3.1).

Agiter et placer à l'obscurité pendant au moins 6 h.

Effectuer les mesures spectrophotométriques, au maximum de la courbe d'absorption (longueur d'onde généralement voisine de 630 nm) après avoir réglé l'appareil au zéro d'absorbance par rapport au terme zéro.

6.3 DOSAGE

Introduire la prise d'essai (6.1) dans un tube à essai. Ajouter dans l'ordre et sans attendre entre chaque ajout :

- 1,0 ml de la solution de phénol et nitroprussiate (3.2); agiter.
- 1,0 ml de la solution alcaline (3.1).

Agiter et placer à l'obscurité pendant au moins 6 h.

Effectuer la mesure spectrophotométrique, au maximum de la courbe d'absorption (longueur d'onde généralement voisine de 630 nm) après avoir réglé l'appareil au zéro d'absorbance par rapport à l'essai témoin.

6.4 ESSAI TÉMOIN

Effectuer parallèlement au dosage un essai témoin : si l'échantillon est analysé sans dilution, confectionner ce témoin à partir des réactifs seuls et n'introduire les 20 ml d'eau remplaçant la prise d'essai qu'après le temps d'attente de 6 h à l'obscurité. Si l'échantillon est analysé après dilution, confectionner ce témoin en remplaçant la prise d'essai par 20 ml d'eau.

7. EXPRESSION DES RÉSULTATS

Déduire de la courbe d'étalonnage la teneur en azote ammoniacal de l'échantillon et l'exprimer en milligrammes de NH_4 par litre.

ANNEXE IV

TF (moyennes de 3 répétitions \pm SD, en ml.h-1.g-1) des lots de Dreissènes exposés au Zn

Temps d'exposition	[Zn] ppm	0	0,5	1	2
48 heures		926 \pm 64	967 \pm 64	509 \pm 44	209 \pm 44
1 semaine		1262 \pm 76	838 \pm 412	495 \pm 104	196 \pm 114
2 semaines		1253 \pm 37	746 \pm 256	265 \pm 161	127 \pm 69

ANNEXE V

TF (moyennes de 3 répétitions \pm SD, en ml.h-1.g-1) des lots de Dreissènes exposés au Cu

Temps d'exposition	[Cu] ppb	0	20	40	80
48 heures		827 \pm 54	675 \pm 113	160 \pm 97	211 \pm 141
1 semaine		631 \pm 108	292 \pm 172	197 \pm 135	213 \pm 121

ANNEXE VI

TF (moyennes de 3 répétitions \pm SD, en ml.h-1.g-1) des lots de Dreissènes exposés au Hg

Temps d'exposition	[Hg] ppb	0	50	100	200
	48 heures	889 \pm 206	497 \pm 38	161 \pm 94	240 \pm 114
1 semaine	903 \pm 147	177 \pm 95	91 \pm 10,6	85 \pm 9,5	

ANNEXE VII

TF (moyennes de 3 répétitions \pm SD, en ml.h-1.g-1) des lots de Dreissènes exposés au Cd

Temps d'exposition	[Cd] ppm	0	0,2	0,4	0,8
	48 heures	1170 \pm 230	983 \pm 53	795 \pm 175	380 \pm 215
1 semaine	634 \pm 111	392 \pm 129	259 \pm 109	220 \pm 99	

ANNEXE VIII

TF (moyennes de 3 répétitions \pm SD, en ml.h-1.g-1) des lots de Dreissènes exposés au Pb

Temps d'exposition	[Pb] ppm	0	1	2	4
	48 heures		1147 \pm 65	667 \pm 35	287 \pm 176
1 semaine		846 \pm 153	380 \pm 61	219 \pm 82	332 \pm 97

ANNEXE IX

Valeurs de la VO₂ (moyennes de 6 répétitions ± SD, en mgO₂.h-1.g-1) avant et après l'exposition de 6 h et 24 h au Cu

[Cu] ppb	Durée d'exposition	0 (avant l'exposition)	6 h	24 h
50		0,573 ± 0,087	0,526 ± 0,103	0,565 ± 0,090
250		0,516 ± 0,133	0,301 ± 0,226	0,345 ± 0,199
500		0,549 ± 0,121	0,302 ± 0,096	0,27 ± 0,130

ANNEXE X

Valeurs de la VO₂ (moyennes de 5 répétitions ± SD, en mgO₂.h-1.g-1) après 1 semaine d'exposition au Cu

[Cu] ppm	0	25	50	100
VO ₂ après 1 semaine d'exposition	0,438 ± 0,070	0,4579 ± 0,101	0,304 ± 0,111	0,303 ± 0,075

ANNEXE XI

Valeurs de la VO₂ (moyennes de 6 répétitions ± SD, en mgO₂.h-1.g-1) avant et après l'exposition de 6 h et 24 h au Hg

[Hg] ppb	Durée d'exposition	0 (avant l'exposition)	6 h	24 h
50		0,581 ± 0,205	0,368 ± 0,097	0,321 ± 0,086
100		0,438 ± 0,057	0,232 ± 0,131	0,279 ± 0,126
150		0,335 ± 0,052	0,043 ± 0,040	0,148 ± 0,095
200		0,455 ± 0,051	0,157 ± 0,087	0,156 ± 0,055

ANNEXE XII

Valeurs de la VO₂ (moyennes de 5 répétitions ± SD, en mgO₂.h-1.g-1) après 1 semaine d'exposition au Hg

[Hg] ppb	0	30	60	120	240
VO ₂ après 1 semaine d'exposition	0,521 ± 0,107	0,427 ± 0,054	0,415 ± 0,080	0,352 ± 0,120	0,304 ± 0,034

ANNEXE XIII

Valeurs de la VO₂ (moyennes de 6 répétitions \pm SD, en mgO₂.h-1.g-1) avant et après l'exposition de 24 h et 48 h au Cd

[Cd] ppm	Durée d'exposition	0 (avant l'exposition)	24 h	48 h
0,2		0,439 \pm 0,071	0,378 \pm 0,04	0,343 \pm 0,119
0,5		0,453 \pm 0,091	0,352 \pm 0,082	0,292 \pm 0,067
1,2		0,392 \pm 0,041	0,354 \pm 0,037	0,374 \pm 0,034

ANNEXE XIV

Valeurs de la VO₂ (moyennes de 5 répétitions \pm SD, en mgO₂.h-1.g-1) avant et après l'exposition de 96 h au Pb

	Durée d'exposition	0 (avant l'exposition)	6 h	24 h	96 h
2 ppm Pb		0,389 \pm 0,043	0,405 \pm 0,086	0,374 \pm 0,063	0,337 \pm 0,059

ANNEXE XV

Valeurs de la VO₂ (moyennes de 4 répétitions ± SD, en mgO₂.h⁻¹.g⁻¹)
durant l'exposition de 2 semaines au Pb

[Pb] ppm	Durée d'exposition	0 (avant l'exposition)	1 semaine	2 semaines
1		0,669 ± 0,202	0,58 ± 0,218	0,475 ± 0,103
2		0,579 ± 0,146	0,492 ± 0,124	0,463 ± 0,176
4		0,624 ± 0,053	0,554 ± 0,076	0,641 ± 0,083

ANNEXE XVI

TF (moyennes de 2 mesures ± SD, en ml.h⁻¹.g⁻¹)
après 28 jours d'exposition au Cd

[Cd] ppb	0	5	15	45
TF après 28 jours d'exposition	2046 ± 505	2038 ± 267	1320 ± 624	2056 ± 569

ANNEXE XVII

**TF (moyennes de 2 mesures \pm SD, en ml.h-1.g-1)
après 28 jours d'exposition au Cu**

[Cu] ppb	0	4	16	44
TF après 28 jours d'exposition	2046 \pm 505	1414 \pm 457	467 \pm 257	469 \pm 356

ANNEXE XVIII

**VO2 (moyennes de 4 répétitions \pm SD, en mgO2.h-1.g-1)
après 14 et 28 jours d'exposition au Cd et au Cu**

Durée d'exposition	Cd (ppb)				Cu (ppb)		
	0	5	15	45	4	16	44
14 jours	0,427 \pm 0,139	0,228 \pm 0,077	0,307 \pm 0,082	0,337 \pm 0,104	0,221 \pm 0,072	0,247 \pm 0,037	0,135 \pm 0,045
28 jours	0,340 \pm 0,163	0,313 \pm 0,112	0,211 \pm 0,022	0,270 \pm 0,044	0,250 \pm 0,117	0,269 \pm 0,080	0,267 \pm 0,082

ANNEXE XIX

TE (moyennes de 2 mesures \pm SD, en $\mu\text{gN-NH}_4\text{.h}^{-1}\text{.g}^{-1}$)

après 28 jours d'exposition au Cd et au Cu

	Témoins	Cd (ppb)			Cu (ppb)		
		5	15	45	4	16	44
TE après 28 jours d'exposition	65,1 \pm 14,4	31,3 \pm 16,1	47,4 \pm 4,3	32,2 \pm 0,1	38,7 \pm 3,2	39,9 \pm 7,4	25,4 \pm 14,1

ANNEXE XX

TF (moyennes de 3 répétitions \pm SD, en $\text{ml.h}^{-1}\text{.g}^{-1}$)

des lots de Dreissènes exposés au Lutensol

Temps d'exposition	Lutensol ppm	0	0,4	0,8	1,2
	48 heures		858 \pm 180	736 \pm 191	387 \pm 74
1 semaine		1156 \pm 177	854 \pm 288	314 \pm 27	169 \pm 98

ANNEXE XXI

**VO₂ (moyennes de 5 répétitions ± SD, en mgO₂.h-1.g-1)
après 1 semaine d'exposition au Lutensol**

[Lutensol] ppm	0	0,4	0,8	1,2
VO ₂ après 1 semaine d'exposition	0,302 ± 0,103	0,307 ± 0,028	0,3979 ± 0,115	0,408 ± 0,115

ANNEXE XXII

**TF (moyennes de 3 répétitions ± SD, en ml.h-1.g-1)
après 48 h et 1 semaine d'exposition au Lindane**

Lindane ppb	0	50	100	200
48 heures	653 ± 168	870 ± 306	902 ± 220	954 ± 137
1 semaine	808 ± 210	1051 ± 154	1214 ± 207	537 ± 360

ANNEXE XXIII

TF (en ml.h-1.g-1) après 1 semaine d'exposition à l'effluent industriel

Taux de dilution de l'effluent	0	0,19%	0,39%	0,50%	0,78%	1%
TF	1920	539	972	518	822	527

ANNEXE XXIV

VO2 (moyennes de 4 répétitions \pm SD, en mgO2.h-1.g-1) après 1 semaine d'exposition à l'effluent industriel

Taux de dilution	0	0,19%	0,39%	0,78%
VO2	0,61 $\pm 0,086$	0,574 $\pm 0,177$	1,077 $\pm 0,223$	1,124 $\pm 0,202$

ANNEXE XXV A : Détail des réponses du comportement de filtration lors des essais des limites de détection vis-à-vis du Cu (15 ppb)

Type d'activité	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Activité normale	0,8	5,5	4,1	3,2	0	7,4
Activité de stress (AS)	3,2	0,5	1,3	1,2	5,2	2,6
Durée de fermeture	6	4	4,6	5,6	4,1	0
Nombre de fermetures	1	1	2	2	1	0
Délai à l'AS	0,8	5,3	0	2,2	0	4,4

ANNEXE XXV B : Détail des réponses du comportement de filtration lors des essais des limites de détection vis-à-vis du Hg (10 ppb)

Type d'activité	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Activité normale	2,7	0	0	0,3	0	0
Activité de stress (AS)	2,9	3,8	6,4	1,2	4,2	3,7
Durée de fermeture	4,4	6,2	3,6	8,5	5,8	6,3
Nombre de fermetures	1	2	1	1	2	3
Délai à l'AS	0,1	0	0	0	0	0

ANNEXE XXV C : Détail des réponses du comportement de filtration lors des essais des limites de détection vis-à-vis du Cd (100 ppb)

Type d'activité	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Activité normale	2,6	2,8	8,3	1,6	8,4	0
Activité de stress (AS)	1,1	3,1	1,7	2,4	1,6	8,6
Durée de fermeture	6,3	4,1	0	6	0	1,4
Nombre de fermetures	2	2	0	3	0	1
Délai à l'AS	2,6	1,6	0	1,6	5,8	0

ANNEXE XXV D : Détail des réponses du comportement de filtration lors des essais des limites de détection vis-à-vis du Zn (200 ppb)

Type d'activité	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Activité normale	2,5	4,6	2,1	2,3	6,7	2,5
Activité de stress (AS)	1,6	1,7	2,7	2	1,8	2,9
Durée de fermeture	5,9	2,9	5,2	5,7	1,5	4,6
Nombre de fermetures	1	1	1	1	1	2
Délai à l'AS	0,6	1	0,6	2,3	2,9	2,5

ANNEXE XXV E : Détail des réponses du comportement de filtration lors des essais des limites de détection vis-à-vis du Pb (400 ppb)

Type d'activité	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Activité normale	4,4	0,8	1,6	2	10	5,1
Activité de stress (AS)	1,8	1,8	1,9	4,9	0	1,2
Durée de fermeture	3,8	7,7	6,5	3,1	0	3,7
Nombre de fermetures	3	2	3	2	0	1
Délai à l'AS	1,7	0,2	1,5	1,2	-	5,2

ANNEXE XXV F : Détail des réponses du comportement de filtration lors des essais des limites de détection vis-à-vis du Lutensol (100 ppb)

Type d'activité	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Activité normale	6,6	0	0	9,2	7,6	3,8
Activité de stress (AS)	1,6	7,1	5,9	0,2	2,4	3,6
Durée de fermeture	1,8	2,9	4,1	0,6	0	2,6
Nombre de fermetures	1	1	2	1	0	1
Délai à l'AS	6,6	0	0	3	7	1

ANNEXE XXV G : Détail des réponses du comportement de filtration lors des essais des limites de détection vis-à-vis du Lindane (100 ppb)

Type d'activité	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Activité normale	2,2	4,2	0,7	0,2	10	1,3
Activité de stress (AS)	3	5,8	3,3	5	0	4,4
Durée de fermeture	4,8	0	6	4,8	0	4,3
Nombre de fermetures	2	0	2	1	0	4
Délai à l'AS	1,5	4,2	0,7	0,1	-	1,3

ANNEXE XXV H : Détail des réponses du comportement de filtration lors des essais des limites de détection vis-à-vis de l'effluent industriel (0,5%)

Type d'activité	M1	M2	M3
Activité normale	2,6	0,4	0
Activité de stress (AS)	6	9,6	10
Durée de fermeture	1,4	0	0
Nombre de fermetures	1	0	0
Délai à l'AS	2,6	0,4	0

BEHAVIOURAL AND PHYSIOLOGICAL TOXICITY (FILTRATION, RESPIRATION) OF HEAVY METALS (Cu, Zn, Hg, Cd, Pb) IN THE FRESHWATER MUSSEL *DREISSENA POLYMORPHA* PALLAS.

Proposal of a test procedure for the screening of toxicity using the behavioural response of *Dreissena*.

ABSTRACT :

The study deals with the effects of sublethal concentrations of heavy metals (Cu, Zn, Hg, Cd, Pb) on the pumping behaviour and physiological functions (filtration rate, oxygen consumption) of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. A preliminary study, carried out to screen the letal effects, showed that the LC 50-96h is 0.191 mg/l for Cu, 0.420 mg/l for Hg and above 14 mg/l for Cd. Zn has no letal effect in a 96 h exposure.

In a 24 h exposure, sublethal concentrations of metals induce deep changes in the pumping activity of *Dreissena*. Pumping flow becomes intermittente and valve closure in enhanced. The effects are concentration dependent. Metals can be classified in a decreasing order of toxicity as following : Hg, Cu, Cd, Pb, Zn. In view of its good sensitivity, the behavioural response of *Dreissena* is proposed as a tool for the screening of toxicity in freshwaters. The detection limits set for metals are (in mg/l) : 0.010 for Hg, 0.015 for Cu, 0.100 for Cd, 0.200 for Zn and 0.400 for Pb.

In exposures of 48 h and 1 week, metals significantly reduce the filtration rate of *Dreissena*. Order of toxicity is the same as for behaviour. The oxygen consumption study showed that it is increased by Zn and reduced by Cu and Hg. No effect was obtained with Cd and Pb. Integration of the physiological effects was undertaken for Cd (0.005 to 0.045 mg/l) and Cu (0.004 to 0.044 mg/l) in a 4 weeks exposure. Results show that the Scope for Growth in not impaired by Cd whereas Cu reduces it.

The usefulness of the studied physiological functions as criteria for the chronic toxicity testing is discussed.

MOTS-CLES : Toxicity, heavy metals, *Dreissena*, respiration, filtration, Biotest, freshwater

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ (U.F.R. ScIFA)

Nom : MOUABAD

Date de soutenance

Prénom : Abdelfattah

5 Juin 1991

TITRE : TOXICITE COMPORTEMENTALE ET PHYSIOLOGIQUE (FILTRATION, RESPIRATION) DES METAUX LOURDS (Cu, Zn, Hg, Cd et Pb) CHEZ LA MOULE D'EAU DOUCE *DREISSENA POLYMORPHA PALLAS*.

Proposition d'un protocole d'essai pour l'évaluation de la toxicité par la réponse comportementale de *Dreissena*.

RESUME :

Cette étude traite de la toxicité comportementale et physiologique des métaux lourds (Zn, Cu, Hg, Cd et Pb) chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Une étude préliminaire sur la toxicité létale a montré que la CL 50-96h est de 0.191 mg/l pour le Cu, 0.420 mg/l pour le Hg et supérieure à 14 mg/l pour le Cd. Le Zn (jusqu'à 10 mg/l) n'exerce pas d'effet létal en 96 h.

L'étude des effets comportementaux lors d'expositions de 24 h montre que des concentrations **sublétales** en métaux provoquent de profondes modifications de l'activité de filtration. Alors qu'il est continu chez le témoin, le mode de filtration de l'animal exposé devient intermittent avec une augmentation des durées de fermeture valvaire. Les métaux peuvent être classés selon l'ordre de toxicité décroissante suivant : Hg, Cu, Cd, Pb, Zn. Considérant sa bonne sensibilité, la réponse comportementale de *Dreissena* est proposée comme critère pour l'évaluation de la toxicité. Un protocole d'essai est présenté ; ses limites de détection pour les métaux sont (en mg/l) : 0.010 pour le Hg, 0.015 pour le Cu, 0.100 pour le Cd, 0.200 pour le Zn et 0.400 pour le Pb.

Lors d'expositions de 48 h et 1 semaine, les effets des métaux sur le taux de filtration se manifestent par des réductions de celui-ci en fonction des concentrations. Ces effets ont lieu dans le même ordre de toxicité que pour le comportement. La consommation d'oxygène est augmentée par le Zn et réduite par le Cu et le Hg, le Cd et le Pb n'ayant pas d'effet significatif.

Un essai d'intégration des effets physiologiques a été réalisé pour le Cd (de 0.005 à 0.045 mg/l) et le Cu (de 0.004 à 0.044 mg/l) lors d'une exposition de 4 semaines. Les résultats montrent que le Cd n'affecte pas le potentiel énergétique de croissance tandis que le Cu le réduit.

L'utilité des fonctions physiologiques en tant que critères d'étude de la toxicité chronique est discutée.

MOTS-CLES : Toxicité, métaux lourds, *Dreissena*, respiration, filtration, Biotest, eaux douces.

LABORATOIRE DE RECHERCHE : Laboratoire d'Ecologie de l'Université de Metz

DIRECTEUR DE RECHERCHE : Pr. Jean-Claude Pihan

RAPPORTEURS : Dr K.J.M. KRAMER, Pr J.C. MORETEAU et Dr P. TESTARD
EXAMINATEUR : P. LAMBERT