

UNIVERSITE SAAD DAHLAB DE BLIDA

Faculté des Sciences de l'Ingenieur

Département de Chimie Industrielle

MEMOIRE DE MAGISTER

Spécialité : Environnement

TESTS DE TOXICITE CHRONIQUE SUR *Daphnia magna* ET ESSAIS DE
L'UTILISATION DE SES REJETS D'AMMONIAQUE COMME REVELATEURS DE
LA TOXICITE DE Cd, Cu et Ni PRESENTS DANS L'EAU

Par

Elias BOULHABEL

devant le jury composé de :

A. AOUABED	Maître de conférences, U.de Blida	Président
M. RAHALI	Maître de conférences, E.N.S Kouba	Examineur
F. HANNANE	Professeur, U. de Blida	Examineur
M. BENCHABANE	Chargé de cours, U.de Blida	Examineur
S. MEGATELI	Chargé de cours, U.de Blida	Invité
S. SEMSARI	Maître de conférences, U.de Blida	Rapporteur

Blida, Decembre 2005

RESUME

Ce travail qui porte sur les tests de toxicité chronique sur *Daphnia magna* et essais de l'utilisation de ses rejets d'ammoniaque comme révélateurs de la toxicité de Cd, Cu et Ni, a deux principaux objectifs qui sont, d'une part la mise au point d'une méthodologie expérimentale du test de toxicité chronique (21 jours) à l'aide d'une souche algérienne de *Daphnia magna*, incluant ainsi la mise au point d'une méthodologie d'élevage dans des conditions artificielles, et l'évaluation des effets toxiques à long terme des cations métalliques du Cd, Cu et Ni sur la survie et la reproduction de *Daphnia magna*. La méthodologie s'est révélée globalement satisfaisante, les CL50 21 jours déterminées sont de respectivement $0,37 \mu\text{g Cd.L}^{-1}$, $10,95 \mu\text{g Cu.L}^{-1}$ et $90,70 \mu\text{g Ni.L}^{-1}$.

D'autre part a été examinée la possibilité d'utiliser le rejet de N-NH₄ par *Daphnia magna* comme indicateur de la toxicité de Cd, Cu et Ni, l'ensemble des résultats (tests aigus 48h et tests à long terme 21 jours) ont révélé une augmentation de l'excrétion de N-NH₄ avec les concentrations métalliques ce qui permet d'envisager le rejet de N-NH₄ comme indicateur de toxicité.

ملخص

هذا العمل له هدفان رئيسيان. الهدف الأول هو وضع و ضبط طريقة مخبرية لدراسة الآثار السامة لمختلف الملوثات على المدى الطويل (21 يوما) و ذلك باستعمال فصيلة جزائرية من القشريات المائية من نوع *دافنيا ماغنا* بما في ذلك وضع طريقة لإجاز تربية هذه القشريات على مستوى المخبر، و كذا تقييم الآثار السامة على المدى الطويل لشوارد الكاديوم، النحاس و النيكل على حياة و تكاثر *دافنيا ماغنا*. الطريقة المتبعة كانت مجدية و التراكيز السامة ل 50% في 21 يوما كانت $0,37$ ميكرو غرام كاديوم في التز $10,95$ ميكرو غرام نحاس في التز $90,70$ ميكرو غرام نيكل في التز

الهدف الثاني هو دراسة إمكانية استعمال عامل طرح الأمونيوم من طرف *دافنيا ماغنا* كدليل على التعرض لمواد سامة و بالتالي على تلوث المحيط. و قد بينت النتائج أن تعرض *دافنيا ماغنا* الى الشوارد السامة يؤدي الى زيادة في طرح الأمونيوم مما يسمح استعمال هذا الأخير كمؤشر للتسمم.

REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Madame S.SEMSARI Maitre de Conférences au niveau du Département de Chimie Industrielle de la Faculté des sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida. Quelle trouve ici l'expression de ma vive gratitude, pour m'avoir proposé un thème très intéressant pour mon mémoire, ainsi que pour les orientations et le soutien constant qu'elle n'a cessé de m'apporter dans le cadre de ce travail, tout en me faisant bénéficier de son expérience et de sa compétence technique très enrichissante.

J'exprime mes vifs remerciements à Monsieur A. AOUABED Maitre de Conférences au niveau du Département de Chimie Industrielle de la Faculté des sciences de l'ingénieur de l'Université Saad Dahlab de Blida, en me faisant l'honneur de presider le jury de ma soutenance.

Je tiens à remercier particulièrement Monsieur F.HANNANE Professeur, à l'Université Saad Dahlab de Blida, Monsieur M.RAHALI Maitre de Conférences à l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Monsieur M.BENCHABANE Chargé de cours au Département des Sciences Agronomiques de l'Université Saad Dahlab de Blida, pour avoir accepté de faire partie du jury de ma soutenance.

Je remercie très vivement Monsieur S.MEGATELI Chargé de cours au Département des Sciences Agronomiques de l'Université Saad Dahlab de Blida, pour m'avoir honoré de sa présence.

En fin, que tous ceux ou celles qui m'ont apporté leur soutien et leur amitié tout au long de ce travail, trouvent ici l'expression de mes remerciements les plus sincères.

TABLE DES MATIERES

RESUME	1
REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	3
LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX	5
INTRODUCTION	8
1. TOXICOLOGIE ET ECOTOXICOLOGIE	10
1.1 La toxicologie	10
1.1.1. Définition de la toxicologie	10
1.1.2. Historique	10
1.1.3. Définition d'un toxique	11
1.1.4. Modes de pénétration des toxiques dans l'organisme	11
1.1.5. Manifestation de la toxicité	11
1.1.6. Les types d'action	12
1.1.7. Facteurs influençant la réponse de l'organisme	13
1.1.8. Métabolisme des substances toxiques	14
1.1.9. Interactions entre agents toxiques	16
1.2. L'Ecotoxicologie	16
1.2.1. Définition de l'ecotoxicologie	16
1.2.2. Les intérêts de l'ecotoxicologie	17
1.2.3. Définition d'un biomarqueur	18
1.2.4. Mise en œuvre des tests biologiques ou bioessais	19
1.2.5. Inconvénients des tests biologiques	19
1.2.6. Effets de certains paramètres physico-chimiques des milieux aquatiques sur le phénomène d'intoxication	20
1.2.7. Principaux paramètres influençant les tests ecotoxicologiques utilisant <i>Daphnia magna</i>	21
1.2.8. Application des bio-essais pour la détermination de la qualité biologique des eaux douces	22
1.2.9. Principaux tests de toxicité	23
2. LES METAUX LOURDS ET LEURS IMPACTS SUR L'ENVIRONNEMENT	26
2.1. Propriétés et utilisations du cadmium, cuivre et nickel	26
2.2. Classification des métaux	27
2.3. Action des métaux lourds sur les organismes vivants	28
2.4. Effets du cadmium, cuivre et nickel sur le corps humain	28
2.5. Effets des métaux lourds sur les milieux aquatiques	30

3. DAPHNIA MAGNA (BIOLOGIE, EXCRETION)	34
3.1. Positionnement de <i>Daphnia magna</i> dans le règne animal	34
3.2. Biologie de <i>Daphnia magna</i>	38
3.3. Métabolisme des daphnies	42
4. MATERIEL ET METHODE	52
4.1. Introduction	52
4.2. Matériel et méthode	52
4.3. Test de toxicité chronique	62
4.4. Analyse statistique	64
5. RESULTATS EXPERIMENTAUX	72
5.1. Résultats expérimentaux	72
5.2. Tests de toxicité à long terme	79
5.3. Résultats et discussions	80
CONCLUSION	101
APPENDICES	105
REFERENCES	139

LISTE DES ILLUSTRATIONS GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 3.1	Organisation générale d'un cladocère	37
Figure 3.2	Appendices (pattes) thoraciques de la 2 ^{ème} à la 5 ^{ème} paire	40
Figure 3.3	Cycle reproductif de <i>Daphnia magna</i>	40
Figure 3.4	Male et femelle portant dans l'ephippie deux œufs fécondés	43
Figure 3.5	Ephippium de <i>Daphnia</i>	43
Figure 3.6	Droites exprimant la relation entre la quantité d'azote ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids sec/heure) en fonction du poids sec par individu déterminées par plusieurs auteurs, pour différentes espèces de zooplancton	48
Figure 4.1	Aspect des cellules de la microalgue <i>Scenedesmus sp</i> observées au microscope	55
Figure 4.2	<i>Daphnia magna</i> Straus. Femelle parthénogénétique	55
Figure 4.3	Culture des microalgues au premier et 3 ^{ème} jour	58
Figure 4.4	culture des microalgues au 8 ^{ème} jour	58
Figure 4.5	Tubes à essais préparés pour le test de toxicité aigue	60
Figure 4.6	Dispositif expérimental du test de toxicité aigue	60
Figure 4.7	Cristallisoirs utilisés pour l'élevage des daphnies	65
Figure 4.8	Dispositif expérimental du test de toxicité à long terme	65
Figure 5.1	Quantité d'azote ammoniacal rejetée par daphnie en 48 heures en fonction des différentes concentrations de dichromate de potassium (test de toxicité aigue)	76
Figure 5.2	Quantité d'azote ammoniacal rejetée par daphnie en 48 heures en fonction des différentes concentrations de cadmium (test de toxicité aigue)	77
Figure 5.3	Quantité d'azote ammoniacal rejetée par daphnie en 48 heures en fonction des différentes concentrations de cuivre (test de toxicité aigue)	77
Figure 5.4	Quantité d'azote ammoniacal rejetée par daphnie en 48 heures en fonction des différentes concentrations de nickel (test de toxicité aigue)	78

Figure 5.5	Pourcentage de survie après 21 jours cas du cadmium	80
Figure 5.6	Pourcentage de survie après 21 jours cas du cuivre	81
Figure 5.7	Pourcentage de survie après 21 jours cas du nickel	81
Figure 5.8	jp1 pour les daphnies exposées aux différentes concentrations de cadmium	85
Figure 5.9	jp1 pour les daphnies exposées aux différentes concentrations de cuivre	85
Figure 5.10	jp1 pour les daphnies exposées aux différentes concentrations de nickel	86
Figure 5.11	Evolutions des concentrations moyennes en $N-NH_4^+$ excrétées aux temps 02,07,12 et 21 jours (cas du cadmium)	97
Figure 5.12	Evolutions des concentrations moyennes en $N-NH_4^+$ excrétées aux temps 02,07,12 et 21 jours (cas du cuivre)	98
Figure 5.13	Evolutions des concentrations moyennes en $N-NH_4^+$ excrétées aux temps 02,07,12 et 21 jours (cas du nickel)	99
Tableau 3.1	Quantité d'azote ammoniacal rejetée par animal et par jour pour les invertébrés aquatiques selon plusieurs auteurs	48
Tableau 5.1	Determinations des CI50 48h	72
Tableau 5.2	Evaluations des CI50 48h par différents auteurs	73
Tableau 5.3	Les conditions d'élevage de <i>Daphnia magna</i> proposées par les différents organismes	79
Tableau 5.4	NOEC et LOEC du paramètre survie pour les différents métaux testés	82
Tableau 5.5	CL50 21j obtenue pour les différents métaux testés	82
Tableau 5.6	NOEC et LOEC pour les différents métaux testés par rapport au jp1	86
Tableau 5.7	Nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours (test cadmium)	88
Tableau 5.8	Nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours (test cuivre)	88
Tableau 5.9	Nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours (test nickel)	89
Tableau 5.10	NOEC et LOEC pour les différents métaux testés par rapport au n.d.p	89

Tableau 5.11	Tableau comparatif : effet de Cd, Cu et Ni sur le n.d.p	90
Tableau 5.12	Taux intrinsèque de croissance de la population au 21 ^{ème} jour (test cadmium)	92
Tableau 5.13	Taux intrinsèque de croissance de la population au 21 ^{ème} jour (test cuivre)	92
Tableau 5.14	Taux intrinsèque de croissance de la population au 21 ^{ème} jour (test nickel)	92
tableau 5.15	Valeurs des concentrations moyennes en N-NH ₄ ⁺ en fonction des quantités de cadmium ajoutées	95
tableau 5.16	Valeurs des concentrations moyennes en N-NH ₄ ⁺ en fonction des quantités de cuivre ajoutées	95
tableau 5.17	Valeurs des concentrations moyennes en N-NH ₄ ⁺ en fonction des quantités de nickel ajoutées	96

INTRODUCTION

La pollution des écosystèmes aquatiques est un problème qui se pose à l'échelle mondiale en raison de l'accroissement démographique important ainsi que du développement économique et technologique.

Pour l'évaluation de la qualité de l'eau, notamment celle des effluents rejetés dans le milieu naturel, il existe en plus des méthodes d'analyse physico-chimiques (DBO, DCO, O₂ dissous,.....etc) des méthodes biologiques dont l'utilisation prend de l'ampleur en raison de leurs multiples avantages [1]. Ces méthodes biologiques englobent les tests ecotoxicologiques, ceux-ci utilisent comme substrat biologique ou réactif biologique des espèces animales et/ou végétales appartenant à divers maillons des chaînes trophiques. Ces réactifs biologiques peuvent être des algues, des bactéries, des invertébrés ou encore des poissons. Ces tests présentent l'avantage d'être plus économiques que les analyses physico-chimiques, surtout lorsqu'il s'agit d'assurer la surveillance de la qualité de l'eau d'un écosystème dans le temps. Cet avantage a fait que ces tests sont de plus en plus utilisés ce qui a conduit à la mise au point de protocoles standardisés telle que l'application routinière des tests de toxicité aiguë.

Les tests de toxicité chronique ou à long terme permettent de connaître les effets provoqués suite à une exposition à long terme à des concentrations sublétales de substances toxiques.

La standardisation du protocole du test prolongé bien que prise en charge par plusieurs organismes internationaux tels que l'association française de normalisation (AFNOR) l'organisation pour la coopération et le développement économique (OCDE) et l'international standard organisation (ISO) demeure en voie de modification.

La nécessité de standardisation des protocoles s'explique par le fait que plusieurs paramètres physiques, chimiques et biologiques tels que les conditions d'élevage de l'espèce à tester comme la qualité du milieu d'élevage, la qualité de la nourriture utilisée pour les réactifs biologique, la température, ...etc, peuvent influencer sur la toxicité d'une substance ainsi que sur la sensibilité des paramètres biologiques considérés.

Les paramètres classiques pris en considération dans les tests écotoxicologiques de toxicité chronique sont les effets du toxique sur la survie et la reproduction néanmoins des indicateurs biochimiques ou indicateurs moléculaires peuvent également être utilisés pour l'évaluation de cette toxicité.

En effet avant l'apparition des effets toxiques graves tels que la mort des organismes ou les troubles de la reproduction, des perturbations de certains métabolismes peuvent se manifester par l'excrétion de substances spécifiques [2].

Les métaux lourds font partie des polluants les plus toxiques qui peuvent contaminer les écosystèmes aquatiques. Ces produits sont rejetés dans la nature par une grande variété d'industries telles que la métallurgie, les diverses industries chimiques, les tanneries mégisseries, les usines de fabrications de batteries et de piles électriques....etc.

Certains métaux lourds présentent la capacité de s'accumuler dans les organismes vivants tout au long de la chaîne trophique (bactéries et microalgues, invertébrés et poissons) et peuvent ainsi provoquer la contamination de l'homme [3], [4], [5], [6], [7].

Pour cette étude nous sommes proposés à entreprendre les travaux suivants :

- 1- Essais de culture du réactif biologique *Daphnia magna* en utilisant une composition des milieux de cultures en vue d'une optimisation de la reproduction de ce crustacé.
- 2- Essais de toxicité aiguë (test 48 h) à l'aide de *Daphnia magna* pour des milieux contenant Cd^{++} , Cu^{++} , Ni^{++} et $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.
- 3- Essais de toxicité chronique (test 21 jours) en examinant les effets de Cd^{++} , Cu^{++} et Ni^{++} sur la survie et la reproduction de *Daphnia magna*.
- 4- L'étude de la possibilité d'utiliser les rejets d'azote ammoniacal comme indicateur de la pollution des écosystèmes aquatiques ainsi que comme paramètre biochimique indicateur des effets sublétaux des cations métalliques : Cd^{++} , Cu^{++} et Ni^{++} . Cette dernière étape est envisagée dans le cas des tests aigus de durées 48 heures et des tests chroniques de durées maximales 21 jours.

CHAPITRE 1

TOXICOLOGIE ET ECOTOXICOLOGIE

1.1. La toxicologie

1.1.1. Définition de la toxicologie

LAUWERYS (1992) définit la toxicologie comme étant la science qui traite les poisons. D'après RAMADE (1979) cette science a pour objet d'étudier les modes d'action des poisons tant sur le plan analytique qu'au point de vue physiologique et biochimique. Selon ce même auteur la partie la plus authentique de cette science, consiste à l'étude des mécanismes d'action des toxiques à l'échelle, moléculaire, cellulaire et à celles des organismes tout entiers.

D'après le rapport N°9 de l'académie des sciences (1998) la toxicologie s'intéresse aux effets néfastes que peuvent avoir les composés d'origine chimique ou biologique sur les êtres vivants. D'après CHAVERON (1999) la toxicologie s'intéresse à tout altéragène (substance ou facteur présentant une altération de l'environnement), constituant un risque pour la santé de l'homme, et permet de connaître et de prévenir les effets des substances synthétiques ou naturelles auxquelles l'homme est exposé.

1.1.2. Historique

Toxicologie provient du terme grec « Toxicon » qui signifie « arc », l'utilisation des flèches empoisonnées représente probablement une des premières applications intentionnelles d'une substance toxique [10].

Bien que les effets de certains poisons aient été connus des grecs et romains dans l'antiquité et que leurs emplois à des fins criminelles aient été poursuivis au cours du moyen âge et de la renaissance, l'étude scientifique des substances toxiques ne débuta qu'au 19^{ème} siècle. A cette époque a débuté l'intérêt au développement de tests spécifiques afin de détecter et doser les poisons et leur application en médecine légale [8], [12]. Cependant ce n'est qu'au cours de ces dernières décennies et surtout grâce au développement de la biochimie et de la physiologie que la toxicologie s'est orientée vers la connaissance du métabolisme et des mécanismes d'action des toxiques [8].

1.1.3. Définition d'un toxique

Une substance est dite toxique lorsque sa présence à une concentration donnée dans le milieu considéré ou bien son absorption à une dose donnée, entraîne chez les organismes vivants des perturbations des fonctions métaboliques ou physiologiques susceptibles d'aboutir à la mort [13].

En réalité toute substance est un toxique potentiel mais elle n'acquiert ce rôle que lorsqu'elle dépasse dans un milieu une concentration donnée (seuil) ou est absorbée chez un organisme au delà d'une dose seuil [14].

Selon ANGELIER (2001) un toxique est une substance qui provoque des altérations des fonctions de l'organisme au niveau moléculaire, cellulaire ou de l'organisme tout entier.

1.1.4. Modes de pénétration des toxiques dans l'organisme

Il existe trois voies d'absorption

a. La voie respiratoire : celle ci représente le mode prépondérant de contamination par les polluants atmosphériques [16], [11], [17], [15].

b. La voie transtégumentaire : Le tégument ou le tissu qui constitue l'enveloppe du corps peut permettre le passage des toxiques d'un milieu contaminé aux organismes de ce milieu [16], [11], [17], [15].

c. La voie trophique : Elle englobe l'absorption digestive par les animaux ou racinaire chez les plantes [16], [11], [17], [15].

Chez les organismes aquatiques on ne peut séparer les voies de pénétration tégumentaires de celles par ingestion car elles se produisent simultanément [16], [11], [17], [15].

1.1.5. Manifestation de la toxicité

Pour une même substance toxique les êtres vivants peuvent présenter des troubles physiologiques variés selon les quantités absorbées et la durée de l'exposition [18], [19].

1.1.5.1. La toxicité aiguë

La toxicité aiguë peut se définir comme celle qui provoque la mort ou de très graves troubles physiologiques après un court délai, suite à l'absorption en une fois ou en plusieurs répétitions d'une certaine dose d'un composé nocif [9], [18], [19], [11], [15].

1.1.5.2. La toxicité sublétales (subaiguë)

Celle-ci diffère de la précédente par le fait qu'une proportion significative de la population peut survivre à l'intoxication bien que tous les individus aient présenté des signes cliniques provoqués par l'absorption du toxique [9], [15]. La toxicité sublétales (subaiguë) est engendrée par les concentrations d'un polluant qui sont à la limite inférieure (juste inférieures) de celles causant une intoxication aiguë [9].

1.1.5.3. La toxicité à long terme

Dans ce cas les effets toxiques sont produits par l'exposition chronique à de très faibles concentrations, parfois même à des doses infimes de substances polluantes dont la répétition d'effets cumulatifs provoque des troubles beaucoup plus insidieux [20], [11]. Les signes d'intoxication se manifestent par accumulation de poison dans l'organisme. A chaque exposition l'évaluation de la quantité éliminée par l'organisme est inférieure à la quantité absorbée par celui-ci. Par conséquent la concentration du toxique dans l'organisme augmente progressivement pour atteindre une concentration susceptible d'engendrer des manifestations toxiques [20], [15]. Les signes d'intoxication se manifestent aussi car les effets engendrés par des expositions répétées au toxique s'additionnent dans l'organisme cible sans que le toxique ne s'accumule dans celui-ci [8], [21], [11].

1.1.6. Les Types d'action [8]

Il existe deux types d'action :

a. Locale : La substance exerce une action toxique à l'endroit de contact exemple : peau, yeux, tractus digestif.

b. Générale ou systémique : L'action du toxique se manifeste au niveau de sites éloignés de l'endroit de contact initial.

1.1.7. Facteurs influençant la réponse de l'organisme

La réponse de l'organisme dépend essentiellement de la quantité de la substance directement active ou de ses métabolites toxiques fixés aux sites d'action [8]. La quantité de toxique fixée aux récepteurs est elle même fonction de l'évolution de la concentration du toxique au voisinage immédiat de ces sites et de son affinité pour ceux-ci [14]. Il existe donc deux types de facteurs qui influencent la réponse de l'organisme et qui sont :

1.1.7.1. Facteurs toxicodynamiques [14]

Les facteurs toxicodynamiques influencent la réponse de l'organisme en interférant avec la fixation du toxique sur ses sites d'action ou avec ses répercussions. Ces facteurs concernent :

- L'affinité des récepteurs (enzymes, macromolécules,.....) pour les molécules exogènes.
- La compétition entre substances étrangères pour le même site d'action.

1.1.7. 2. Facteurs toxicocinétiques [14], [17]

Les facteurs toxicocinétiques influencent la concentration du toxique au voisinage des molécules cibles et ainsi la quantité du toxique qui s'y fixe.

Les facteurs toxicocinétiques peuvent arbitrairement être groupés en trois catégories :

- Les facteurs biologiques (facteurs endogènes).
- Les facteurs d'environnement (facteurs exogènes).
- Les caractéristiques physico-chimiques de la substance.

a. Les facteurs biologiques

Quatre principaux facteurs biologiques influencent la concentration du toxique actif au niveau des récepteurs, ces facteurs qui constituent le phénomène de biotransformation sont l'absorption, la distribution, la transformation et l'excrétion [21], [11].

b. Les facteurs d'environnement

Ce sont les facteurs exogènes qui en modifiant le devenir (absorption, distribution, biotransformation, excrétion) d'une substance dans l'organisme, influencent sa toxicité [22], [21].

c. Les caractéristiques de la substance

La forme physico-chimique sous laquelle une substance entre en contact avec l'organisme peut jouer un rôle déterminant dans la réponse toxique [20], [23], [17].

Par exemple la quantité d'un aérosol solide qui se dépose dans les poumons dépend plus du diamètre aérodynamique des particules que de la concentration atmosphérique totale [8].

1.1.8. Métabolisme des substances toxiques

1.1.8.1. Absorption et excrétion

La voie d'exposition (digestive, tégumentaire,...etc.) exerce une influence déterminante sur la fraction de la dose externe qui pénètre dans la circulation systémique et ainsi atteint l'organe cible. En effet pour une même substance la perméabilité de ces différentes barrières (muqueuse intestinale, peau,.....etc.) peut varier considérablement [21], [16].

Après absorption et distribution une certaine quantité de toxique est éliminée de l'organisme, il s'agit du phénomène d'excrétion. Certains toxiques s'éliminent très peu, ils ont tendance à s'accumuler dans l'organisme. Il existe différentes voies d'excrétion qui sont chez l'homme les voies urinaires et biliaires la sueur, la salive et les sécrétions gastro-intestinales [21], [16].

L'absorption et l'excrétion de substances chimiques requièrent le transfert de ces molécules à travers diverses membranes biologiques. Ce transfert peut être la résultante de plusieurs mécanismes tels que [23] :

- Une filtration à travers des pores de la membrane

Ce mécanisme joue un rôle dans le transfert de petites molécules hydrophiles, telles que l'urée et le méthanol. Ce transfert est fonction du gradient de concentration (passage naturel des molécules du milieu le plus concentré vers le milieu le moins concentré) .

- Une simple diffusion à travers la membrane

La vitesse du transport des molécules toxiques est directement proportionnelle au gradient de concentration, plus la concentration intracellulaire d'une molécule toxique est faible par rapport au milieu environnant plus la vitesse de passage de cette molécule à l'intérieur de la cellule sera grande. Ce processus est limité aux molécules de faible poids moléculaire.

- Une diffusion facilitée

Comme pour la simple diffusion, la diffusion facilitée ne peut se réaliser à l'encontre d'un gradient de concentration mais elle fait intervenir des protéines. Ce processus de transport est donc spécifique pour les seules substances qui peuvent se fixer aux protéines porteuses.

- Un transport actif

Ce procédé fait également intervenir des substances porteuses mais contrairement à la diffusion facilitée le corps chimique peut être transporté à l'encontre d'un gradient de concentration, c'est à dire malgré que la concentration intracellulaire du corps chimique est supérieure à celle de ce corps dans le milieu environnant. Ce processus nécessite donc une source d'énergie et il peut également être saturé.

1.1.8.2. Distribution

Entre le moment où elle est absorbée et le moment où elle est excrétée, une substance chimique peut se distribuer dans divers tissus de l'organisme et subir de nombreuses transformations métaboliques. Certaines substances peuvent se stocker préférentiellement dans certains tissus qui ne constituent pas nécessairement le site d'action principal. Les pesticides organochlorés très liposolubles se concentrent dans le tissu adipeux [21], [16].

1.1.8.3. Transformations métaboliques

Dans l'organisme la majorité des substances étrangères subissent des transformations métaboliques, ces transformations peuvent avoir trois types de conséquences :

a. Favoriser l'excrétion du corps chimique:

La plupart des transformations métaboliques tendent à rendre le corps chimique étranger plus polaire (contenant des charges électriques de signes contraires) et favorisent donc son excrétion (rénale) [24].

b. Formation d'un corps plus toxique:

Une fois absorbée une substance étrangère peut se transformer en un corps plus toxique. WILLIAMS (1963) cite le cas du plomb tétraéthyle (additif des carburants pétroliers) qui est transformé en plomb triéthyle plus toxique.

c. Réduction de la toxicité:

Les transformations métaboliques d'une substance étrangère peuvent donner naissance à un corps moins toxique. Pour ce cas, LAUWERYS (1992) cite les cyanures qui se transforment en thiocyanates moins toxiques.

1.1.9. Interactions entre agents toxiques

Lorsque plusieurs toxiques sont présents dans un milieu leurs actions peuvent simplement s'ajouter se renforcer ou se combattre. Si la toxicité du mélange est supérieure à la somme de toxicité de chaque composant il y' a synergie. Si au contraire la toxicité globale est inférieure il y' a antagonisme [9], [26], [15].

1.2. L'Ecotoxicologie

1.2.1. Définition de l'écotoxicologie

Selon RAMADE (1979), l'écotoxicologie peut être définie comme la science dont l'objet est l'étude des modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine, ainsi que de leurs mécanismes d'action et de leurs effets sur l'ensemble des êtres vivants qui peuplent la biosphère.

Selon ce même auteur, l'écotoxicologie permet d'évaluer l'importance des atteintes subies par les divers écosystèmes à la suite de leur contamination et aussi de prévoir, dans une certaine mesure, les conséquences futures que l'on peut attendre de la libération d'un polluant déterminé.

Selon PAILLER (1993) l'écotoxicologie peut se définir comme la discipline qui étudie les conséquences écologiques de la pollution de l'environnement par les substances toxiques.

La toxicologie aquatique est la partie de l'écotoxicologie qui traite des écosystèmes aquatiques elle a fait l'objet d'un intérêt croissant durant les dernières décennies en raison des problèmes de pollution de l'eau qui existent aussi bien dans les pays industrialisés que dans les pays en voie de développement [28].

1.2.2. Les intérêts de l'écotoxicologie

D'après le rapport de l'académie des sciences (1998) l'écotoxicologie s'intéresse aux effets néfastes que peuvent avoir les composés d'origine chimique ou biologique sur les écosystèmes.

Selon RAMADE (1979), la partie la plus spécifique de l'écotoxicologie consiste à l'étude des modalités par lesquelles les agents polluants perturbent les populations et les communautés.

Selon BAUDO (1987), la détermination de la concentration d'un toxique dans un écosystème donné n'est souvent pas suffisante pour protéger l'environnement. De plus l'extension dans l'espace et dans le temps de programmes de surveillance quantitative des toxiques peut se révéler extrêmement coûteuse. De ce fait les méthodes analytiques écotoxicologiques les plus simples, rapides et fiables sont nécessaires afin de fournir des informations supplémentaires sur les risques potentiels dus à un toxique donné.

Les tests de toxicité ou bioessais représentant l'aspect analytique des études écotoxicologiques, permettent d'établir les relations entre les quantités de toxiques absorbées et les différents effets biologiques sur les organismes des milieux naturels. En effet, l'action des substances toxiques sur les organismes vivants peut se traduire par divers

effets physiologiques dont le plus important est la mort des organismes, mais également des troubles de la reproduction (stérilité, effets tératogènes,...etc.) [9], [15].

A ce titre les tests biologiques peuvent être utilisés afin de mettre en évidence des perturbations biochimiques telle que l'induction de substances spécifiques suite à l'action d'un agent toxique donné qui en général précède la mortalité des organismes ou les troubles de la reproduction [29], [30], [2].

Dans ce contexte ont été élaborées des méthodologies moyennant certains matériels biochimiques pouvant faire l'objet de révélateur d'une toxicité. Ces derniers sont nommés biomarqueurs.

1.2.3. Définition d'un biomarqueur

Un biomarqueur est un composé biochimique qui apparaît de manière précoce suite à l'action d'un toxique (ou d'un stress) sur un organisme vivant, il résulte de l'interaction des molécules toxiques avec une cible moléculaire [2]. L'apparition des biomarqueurs précède les effets importants tels que la mort ou les troubles de la reproduction, et constitue un système d'alarme qui permet de détecter la contamination d'un écosystème [29], [2].

Parmi les biomarqueurs les plus connus, STEGEMAN *et al.*(1992) citent les exemples suivants :

-Les mono-oxygénases à cytochrome P450: Les mono-oxygénases à cytochrome P450 sont une famille de protéines connues pour être induites par des classes de composés spécifiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les poly-chloro-biphényles et les dioxines. Ce mécanisme d'induction des mono-oxygénases compte parmi les plus étudiés des systèmes utilisables pour le contrôle et la surveillance de l'environnement et notamment du milieu aquatique.

-Les métallothionéines: Les métallothionéines sont des protéines de faible poids moléculaire caractérisées par leur grande affinité pour des métaux lourds particuliers tels que le zinc, le cuivre, le cadmium, le mercure et l'argent. L'exposition d'organismes tels que les invertébrés aquatiques à ces métaux lourds provoque la synthèse de métallothionéines qui ont pour rôle de se lier à ces métaux afin de réduire leurs effets cytotoxiques [32], [23], [33], [26], [34], [35], [36], [37].

-Les protéines de stress: Les protéines de stress sont un groupe de protéines induites par un grand nombre de stress physiques et chimiques, les plus connues sont les protéines de choc thermique qui apparaissent en cas de modification brutale de la température, on leur prête un rôle de protection de la cellule contre les agressions externes.

1.2.4. Mise en œuvre des tests biologiques ou bio-essais

Les tests écotoxicologiques ont été mis au point pour l'évaluation de la toxicité des substances chimiques mais ils peuvent également être utilisés pour les effluents et certaines eaux des milieux récepteurs [9]. Ces tests consistent à exposer des organismes vivants (animaux ou végétaux) à des substances chimiques ou à des effluents afin d'évaluer leur toxicité et prévoir leur impact sur l'environnement.

La détermination du potentiel toxique d'une substance, qu'il s'agisse d'effets aigus ou à long terme, consiste à évaluer divers paramètres qui caractérisent son action non pas au niveau de l'individu isolé mais à celui d'une population [9]. En effet la principale conséquence d'une intoxication qui est la mort des organismes contaminés, ne peut s'évaluer que par un taux de mortalité qui n'est pas un caractère individuel mais au contraire relatif à l'ensemble de la population [9]. D'une façon générale trois précautions essentielles doivent être prises dans tout essai de toxicité :

- 1-Rassembler un échantillon aussi homogène que possible de l'espèce testée (organisme test) par sélection d'individus du même sexe, du même âge et de même poids.
- 2-Utiliser une technique d'administration du toxique qui assure une normalisation des conditions expérimentales pendant toute la durée du test.
- 3-Recueillir avec discernement les données numériques des expériences et les analyser avec une méthode statistique appropriée.

1.2.5. Inconvénients des tests biologiques

Les résultats obtenus par l'intermédiaire des bio-essais sont difficilement extensibles au milieu naturel, en effet ces résultats sont obtenus dans des conditions standardisées qui ne dépendent pas des variables physiques du milieu [38], [39], [2], [33], [40], [41].

Une difficulté supplémentaire au point de vue méthodologique et expérimental tient au fait que de nombreux écosystèmes sont aujourd'hui contaminés de façon croissante par une multitude de micropolluants appartenant à des groupes chimiques très variés. De telles conditions s'écartent beaucoup de celles du laboratoire où l'écologiste travaille en règle générale sur des substances pures prises isolément [42], [9], [43], [2], [41]. De plus, même au niveau du laboratoire plusieurs paramètres peuvent influencer sur la toxicité d'une même substance [44].

Pour ces raisons, plusieurs études sont réalisées ou en cours de réalisation afin de simuler au mieux les conditions naturelles dans les expériences de laboratoires.

1.2.6. Effets de certains paramètres physico-chimiques des milieux aquatiques sur le phénomène d'intoxication

L'oxygène dissous

L'oxygène est un facteur écologique essentiel [38]. La diminution de l'oxygène dissous favorise l'intoxication et accélère les mouvements respiratoires [22]. Les rejets polluants sont souvent pauvres en oxygène, toutefois dans le milieu récepteur la diminution de l'oxygène dissout ne se fait pas forcément au niveau du rejet, il y a un retard dû à la dégradation des matières organiques [45].

Le gaz carbonique dissous

Le gaz carbonique dissous a un effet toxique lorsqu'il est présent dans un milieu à de très fortes concentrations.

Il agit sur le rythme respiratoire des organismes vivants dans l'eau comme il peut modifier le pH du milieu [22].

Le potentiel redox

Il représente un des paramètres essentiels des milieux aquatiques, au même titre que la température, le pH et l'oxygène dissous.

Sa mesure permet de caractériser le milieu, de suivre les évolutions de certaines substances et l'activité microbienne [45].

Le pH

Le pH de l'eau peut avoir un effet direct sur les espèces vivantes, en effet de nombreuses espèces aquatiques sont sensibles notamment à la baisse du pH [46], [47], [48], [15].

Dans le cas des solutions métalliques, la diminution du pH augmente le degré de solubilité des sels métalliques ce qui favorise le passage ou la pénétration de ceux-ci dans les membranes cibles [22], [49], [50], [47], [43], [48], [51], [52].

En eau douce, les milieux naturels sont généralement tamponnés à un pH de 7 à 8. Le pH n'a pas une incidence écologique directe forte entre 5 et 9 [45].

La température

Tous les organismes aquatiques sont maintenus normalement vivants à une température bien définie et à laquelle leur dynamisme de développement est à l'état optimal.

Une élévation de température entraîne généralement une augmentation des métabolismes au niveau des organismes aquatiques, ce qui favorise une augmentation de la consommation d'oxygène et la pénétration des toxiques dans l'organisme récepteur [53], [54], [55], [56], [43], [30], [44].

Plus la température de l'eau est élevée plus les besoins en oxygène sont grands, c'est pourquoi qu'un changement de température dans une rivière ou un lac peut altérer tout l'équilibre des espèces [57].

1.2.7. Principaux paramètres influençant les test écotoxicologiques utilisant *Daphnia*

magna :

Pour les tests de toxicité effectués avec *Daphnia magna* (crustacé d'eau douce), les paramètres les plus influents sont la qualité de l'eau ainsi que le système nutritionnel des daphnies [58], [59], [44].

1.2.7.1. Effet de la qualité de l'eau

Plusieurs auteurs (JANA et PAL,1983 ; VAN LEEUWEN *et al.*,1985) affirment que les daphnies sont plus sensibles dans les milieux synthétiques que dans les eaux naturelles. Dans les eaux naturelles certains paramètres tels que la dureté et la teneur en matières organiques peuvent influencer sur la toxicité de certaines substances telle que celle des métaux lourds vis à vis des organismes aquatiques. En effet, des études ont démontré que la toxicité des métaux lourds était inversement proportionnelle à la dureté de l'eau [62], [44], [48], [63] à la teneur de celle-ci en matières organiques [64], [48], [65], [63], [66] à la salinité [67], [68] et à l'alcalinité [69], [70], [71], [51].

1.2.7.2. Qualité de l'alimentation des organismes tests ou réactif biologique

Ce paramètre intervient surtout dans les tests de toxicité à long terme il s'agit essentiellement de la consistance de l'aliment ainsi que de son influence sur l'absorption du toxique par voie digestive. En effet des études menées avec *Daphnia magna* ont démontré que l'utilisation de certains types de nourriture pour les individus soumis à un stress toxique augmentait leur sensibilité par rapport à ceux nourris autrement [72]. D'autre part les aliments peuvent contribuer à l'absorption des toxiques par voie digestive et ce en fonction de leur capacité à fixer les substances toxiques. Les métaux lourds peuvent s'adsorber sur la nourriture constituée de microalgues [66], [7] celles-ci peuvent ainsi contribuer à l'absorption des métaux lourds par voie digestive chez les espèces qui s'en nourrissent notamment les invertébrés tels que *Daphnia magna*. Il est à noter également que la quantité d'ions métalliques adsorbés par cellule alguale est différente d'une espèce à une autre [66]. En conséquence la quantité d'ions métalliques apportée par voie digestive dépend également de l'espèce de microalgues utilisée comme aliment.

1.2.8. Application des bio-essais pour la détermination de la qualité biologique des eaux douces

Dans ce contexte des essais de toxicité ont été mis au point et un certain nombre d'entre eux a fait l'objet d'une normalisation, parmi ceux-ci on citera :

1.2.8.1. L'essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum* (ISO, 1993)

Le principe de l'essai est de cultiver les cellules algales dans un milieu défini contenant une série de concentrations de la substance à expérimenter.

Les solutions d'essai sont incubées pendant une période minimale de 72 heures, pendant laquelle la concentration cellulaire de chacune d'entre elles est mesurée au moins toutes les 24 heures.

L'inhibition est mesurée comme étant la diminution de la croissance ou du taux de croissance par rapport aux cultures témoins réalisées dans des conditions identiques.

1.2.8.2. Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus

(Cladocera, crustacea)- Essai de toxicité aiguë (ISO, 1996)

Le principe de l'essai consiste à déterminer la CI50 c'est à dire la concentration de toxique (effluent ou substance) qui inhibe la locomotion de 50% des individus d'une population de daphnies jeunes en 24, 48, 72 ou 96 heures. La CI50 est utilisée lorsque la mortalité est difficile à apprécier ce qui est le cas notamment chez les invertébrés tels que *Daphnia magna*. Pour un essai de 24 heures est déterminée la CI50-24h c'est à dire la concentration qui inhibe la motricité de 50% des daphnies testées en 24 heures. Il est à noter que *Daphnia magna* est une composante importante du zooplancton des eaux douces [75], [76]. En toxicologie aquatique cette espèce compte parmi les plus sensibles et est considérée comme représentative de l'ensemble des espèces des eaux douces [77], [76], [78].

- La concentration d'immobilisation 50 % (CI50)

La CI50 est un paramètre qui permet d'estimer la toxicité d'une substance dans le milieu aquatique, c'est la concentration qui provoque l'immobilisation de 50 % de la population testée, elle est utilisée pour les organismes dont la mortalité est difficile à apprécier, tels que les invertébrés [9], [45].

1.2.9. Principaux tests de toxicité

1.2.9.1. Les tests de toxicité aiguë

Ces tests permettent d'évaluer la toxicité aiguë des substances, c'est à dire celle qui provoque la mort ou de très graves troubles physiologiques après un court délai d'exposition [45], [15].

On peut citer comme exemple le test daphnie défini par la norme ISO,1996.

1.2.9.2. Les tests de toxicité sublétales

Ces tests permettent d'évaluer la toxicité sublétales d'une substance, c'est à dire celle où une proportion significative de la population peut survivre, bien que tous les individus présentent des signes d'intoxication [9], [15].

Nous citons comme exemple le test d'inhibition de la croissance d'algues unicellulaires exposées à des toxiques pendant 03 à 05 jours [45].

1.2.9.3. Le test de toxicité chronique

La toxicité chronique peut se définir comme celle qui provoque l'altération des organismes vivants suite à leur exposition chronique (à long terme) à des concentrations sublétales de substances polluantes [45], [15]. La toxicité chronique peut se manifester par la mort des organismes [72], [61], [79], et / ou des troubles de la reproduction, qui peuvent se traduire par une réduction du nombre de petits pondus [44], ou par l'apparition de petits non viables [80], ou encore par un blocage total de la reproduction [61].

Les tests prolongés ou tests de toxicité chronique font encore l'objet d'études qui devraient aboutir à une méthodologie plus ou moins standardisée, en effet il n'existe pas actuellement de protocole normalisé pour effectuer des tests de toxicité à long terme.

Pour l'évaluation de la toxicité chronique, on peut citer les principaux paramètres suivants :

a- La concentration létale 21 jours (CL50 21j)

C'est la concentration qui provoque la mortalité de 50% d'une population exposée à une substance toxique durant une période de 21 jours, c'est un paramètre d'évaluation de la toxicité des substances dans le milieu aquatique [9], [45].

b- La NOEC (No Observed Effect Concentration) [81], [78], [82], [40]

C'est la plus forte concentration à laquelle aucun effet toxique n'est observé.

c- La LOEC (Low Observed Effect Concentration) [81], [78], [82], [40]

C'est la plus faible concentration provoquant un effet toxique elle correspond à la concentration qui provoque une différence significatif (en considérant un paramètre biotique ou abiotique) par rapport au témoin.

d- Taux intrinsèque de croissance d'une population (r_m)

Le taux intrinsèque de croissance d'une population (r_m) mesure l'habilité d'une population à s'accroître de façon exponentielle dans un environnement illimité [61], [83], [84], [85], il peut être calculé à partir de la formule suivante :

$$\sum I_x \cdot m_x \cdot e^{-r_m \cdot x} = 1 \quad (1) \quad \text{ou,}$$

x est l'âge de la population.

I_x est la proportion des individus ayant survécu jusqu'à l'âge " x ".

m_x est le nombre de femelles produites par femelle d'âge x durant l'intervalle de temps $x, x+1$.

r_m est le taux intrinsèque de croissance de la population.

Le taux intrinsèque de croissance de la population est un paramètre souvent considéré dans les tests de toxicité à long terme pour le fait qu'il intègre à la fois la survie et la reproduction (début de la reproduction, fréquence de la reproduction, taille des couvées et longévité de la reproduction).

Plusieurs auteurs (VAN LEEUWEN *et al.*,1985 ; MUNZINGER,1990 ; KLUTTGEN et RATTE,1994 ; KNOPS *et al.*,2001) notent que la valeur du " r_m " dépend des premiers jours de la vie et notamment des premières reproductions. VAN LEEUWEN *et al.*,1985 ont démontré que la valeur du " r_m " calculée pour 21 jours de la vie des daphnies est appropriée pour ce temps d'expérience.

Dans le chapitre suivant nous présenterons l'impact des métaux lourds (considérés toxiques) sur l'environnement et les écosystèmes aquatiques en particulier.

CHAPITRE 2

LES METAUX LOURDS ET LEURS IMPACTS SUR L'ENVIRONNEMENT

2.1. Propriétés et utilisations du cadmium, cuivre et nickel

2.1.1. Le Cadmium

Le cadmium et ses sels ont diverses utilisations les principales utilisations du métal sont le cadmiage des métaux (fer, acier, cuivre) ce cadmiage analogue au chromage et au nickelage se réalise soit par trempage, soit par procédé électrolytique, la fabrication de divers alliages, par exemple avec le zinc et le cuivre (câbles électriques), des accumulateurs électriques au cadmium – nickel, de bâtons de soudure, des cellules photoélectriques [86], [8], [87]. Les différents sels de cadmium ont différentes utilisations, nous citerons comme exemple le sulfate qui est utilisé comme catalyseur en analyse, le chlorure qui est utilisé en photographie ainsi que pour la fabrication de jaune de cadmium (colorant), et de lubrifiants, le sulfure est un pigment, il sert à colorer les plastiques, les textiles, le papier le caoutchouc, et les céramiques, le séléniure, est un constituant des semi-conducteurs, des cellules photoélectriques, il rentre dans la fabrication de rouge et d'orange de cadmium.

2.1.2. Le Cuivre

Le cuivre et ses sels ont diverses utilisations parmi les utilisations du métal on cite la fabrication de fils électriques de conduites de gaz de récipients divers industriels et ménagers et la production d'une grande variété d'alliages, par exemple le bronze est un alliage de cuivre et d'étain [88]. Parmi les utilisations des sels de cuivre sont citées le chlorure cuivrique qui est utilisé comme déodorant ou agent de désulfuration ou de purification dans l'industrie pétrolière, le sulfure cuivreux qui est un composant des lubrifiants solides et des peintures lumineuses, le sulfate de cuivre qui est utilisé comme pesticide en agriculture (bouillie bordelaise) [86], [88].

2.1.3. Le Nickel

Parmi les utilisations du métal nous citerons la fabrications de divers alliages, par exemple l'alliage avec le cuivre sert à fabriquer les pièces de monnaie, la préparation

d'aciers spéciaux résistants à la corrosion et à la chaleur [86], [8]. Les sels ont diverses utilisations le sulfate est utilisé comme mordant (fixateur de colorants) en teinturerie et en impression, le chlorure est utilisé pour fabriquer les encres. Le phosphate entre dans la fabrication de pigments pour peintures à l'huile et à l'eau (jaune de nickel) [86], [8].

2.2. Classification des métaux

NIEBOER et RICHARDSON (1980) ont proposé une classification chimique de l'ensemble des métaux cette classification est basée sur les propriétés des ions métalliques par rapport à la définition des acides selon Lewis (acide égal accepteur d'électrons) et cela afin de séparer ces ions en trois classes :

- La classe A.
- La classe B.
- La classe intermédiaire.

2.2.1. Ions métalliques de la classe A

Les ions métalliques de la classe A sont des acides forts ayant une préférence pour les liaisons avec les ligands ayant l'oxygène comme atome donneur, tels que les phosphates, les groupes fonctionnels carbonyles et carboxyliques.

Cette classe comprend notamment les ions considérés comme d'importants éléments nutritifs (ions majeurs), tels que Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} [90].

2.2.2. Ions métalliques de la classe B

Ces métaux se lient facilement avec les groupes fonctionnels suivants :

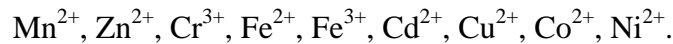
- Sulphydryle (-SH).
- Disulphide (-S-S).
- Thioether (-SR).
- Amine (-NH₂).

Parmi ces ions métalliques on cite : Cu^+ , Ag^+ , Hg^{2+} , et Pb (IV) [36].

2.2.3. Ions de la classe intermédiaire

Les ions métalliques appartenant à cette classe ont un comportement intermédiaire. Nous citons l'exemple des ions de zinc qui se lient au sulfure dans la métallothionéine. Ce sont ces ions incorporés dans les dépôts granulaires de phosphate de calcium qui existent dans les tissus des invertébrés et jouent un rôle dans le processus de détoxification (liaison des métaux de telle sorte qu'ils ne se lient pas ou ils ne sont pas désirés) [36].

Les cations métalliques suivants appartiennent à cette classe



2.3. Action des métaux lourds sur les organismes vivants

2.3.1. Toxicité

Les métaux compris dans les classes B et intermédiaire sont tous potentiellement toxiques [33], [36]. Les ions de la classe B sont plus toxiques que les ions de la classe intermédiaire, eux mêmes plus toxiques que les ions de la classe A [89].

2.3.2. Rôle métabolique

Certains métaux appartenant à la classe B et à la classe intermédiaire sont nécessaires au métabolisme comme le cuivre et le zinc [20], [33]. Néanmoins ces métaux peuvent exercer une action toxique si les doses absorbées par l'organisme sont supérieures aux besoins du métabolisme [90], [20]. Le cuivre et le zinc figurent parmi les métaux les plus toxiques si les concentrations dépassent les quantités nécessaires à la vie [33].

L'effet toxique des métaux appartenant aux classes B et intermédiaire sur les organismes vivants ainsi que le rôle biologique essentiel de certains d'entre eux, est lié à leurs caractéristiques chimiques [36], [7].

Les métaux appartenant à ces deux classes se caractérisent par leur affinité pour les atomes présents dans les groupes fonctionnels des protéines et d'autres molécules [90], [33], [91].

2.4. Effets du cadmium cuivre et nickel sur le corps humain

2.4.1. Effets du Cadmium

HAGUENOER et FURON,1982 et BOUDENE,1989 considèrent qu'à la naissance le nouveau né contient environ 1µg de cadmium, et qu'à l'âge de 50 ans le corps humain

contient 30 mg de cadmium. Ceci démontre que l'organisme humain a un pouvoir de fixation considérable vis à vis de ce métal.

Il existe deux principales voies d'absorption du cadmium par l'organisme humain, voie digestive et voie pulmonaire.

2.4.1.1. Intoxication aiguë

Les effets aigus ont pour origine l'action irritante du cadmium sur la muqueuse nasale, l'arbre respiratoire et le tube digestif [8].

a . Voie digestive

Suite à une intoxication et après un temps de latence allant de 15 à 30 minutes jusqu'à 05 heures apparaissent les signes d'une gastro-entérite caractérisée par des nausées, vomissements sanguinolents, douleurs abdominales, diarrhées. La mort est rare à cause du pouvoir émétisant (vomissements) du cadmium [87].

b. Voie pulmonaire (inhalation)

En cas d'inhalation massive, après une période de latence de quelques heures, le sujet se plaint de nausées, de vertiges et de céphalées associés à une sécheresse de la bouche et à une soif intense ; Après ces signes généraux d'autres troubles plus graves apparaissent, tels que une bronchite, une broncho-pneumonie et parfois un œdème aigu du poumon [86], [93], [87]. Un œdème aigu du poumon peut survenir après exposition de quelques heures aux fumées d'oxyde de cadmium à la concentration de 5 mg Cd/ m³ il est généralement mortel après une exposition à des teneurs atmosphériques supérieures à 5 mg/ m³ inhalées pendant 8 heures, il est à noter que les poussières de cadmium ont une toxicité aiguë inférieure à celle des fumées [93], [86].

2.4.1.2. Intoxication chronique

Le cadmium provoque des lésions rénales [6], [45], [87].

L'inhalation de fumées et poussières de cadmium provoque l'apparition d'un emphysème (affection pulmonaire), ainsi qu'une diminution de l'odorat, l'apparition de rhinite et de Bronchite [93], [86], [87].

2.4.2. Effets du Cuivre

Dans le corps humain le cuivre est un élément qui joue un rôle physiologique important le cuivre est un composant de certains systèmes enzymatiques comme la tyrosinase et la cytochrome-oxydase, cependant si ce métal est en excès dans l'organisme il provoque certaines perturbations du métabolisme [90], [94], [95].

Il existe deux principales voies d'absorption du cuivre dans l'organisme humain, la voie digestive et la voie pulmonaire.

2.4.3. Effets du nickel

Le nickel est un élément essentiel aux métabolismes de l'être humain [90], [20]. En effet, une carence en nickel est associée à un retard de croissance, une diminution du taux d'hémoglobine, et du nombre d'hématies, une moindre absorption du fer, source d'anémie, et une diminution d'activité de la G-6-P déhydrogénase [86].

2.5. Effets des métaux lourds sur les milieux aquatiques

Les métaux lourds sont dangereux pour les écosystèmes aquatiques qu'ils contaminent notamment au travers des ruissellements, et des effluents pollués. Les métaux lourds se retrouvent dans les différents compartiments de ces écosystèmes à savoir les sédiments, l'eau et les organismes vivants. Parmi les métaux les plus dangereux on peut citer le mercure, le cadmium et le plomb [5]. D'une manière générale les métaux lourds peuvent avoir trois types d'effets :

- a- Ils peuvent provoquer la mortalité à partir de certaines concentrations.
- b- Ils peuvent provoquer des effets sublétaux, notamment sur la reproduction des espèces.
- c- Ils peuvent s'accumuler et se concentrer et provoquer la contamination de toute la chaîne trophique.

2.5.1. Effet des métaux lourds sur les algues

Les métaux lourds affectent l'abondance et la diversité du phytoplancton [78]; Les cellules algales peuvent accumuler les métaux lourds par des mécanismes d'adsorption (sur la surface de la cellule) et d'absorption [3], [66], [96].

D'une manière générale les ions métalliques inhibent la croissance des micro-algues [97], [98], cette inhibition peut être due par exemple à l'altération du processus de

photosynthèse [38], [97], [78], ou encore à la perturbation de l'activité enzymatique, certains métaux ayant la capacité de se combiner avec des enzymes, ce qui provoque l'inactivation de ces derniers, qui occasionne d'importants désordres métaboliques, pouvant endommager sévèrement la cellule [26].

2.5.2. Effet des métaux lourds sur les bactéries

Les métaux lourds inhibent l'activité et la croissance de la flore bactérienne ce qui affecte les capacités d'autoépuration des milieux aquatiques [38], [62].

2.5.3. Effets sur les poissons

La mort des poissons exposés aux métaux lourds, peut avoir différentes origines, elle peut être due à l'asphyxie consécutive aux dommages occasionnés au niveau des branchies [99], à la perturbation des mécanismes de régulation ionique [99], [63], à la perturbation de l'activité enzymatique [100] ou encore aux désordres rénaux et hépatiques [99].

L'exposition à long terme des poissons aux métaux lourds peut engendrer des effets sublétaux notamment sur la reproduction, on peut citer comme exemple le cuivre qui provoque la réduction du nombre d'œufs pondus [101], [102], le mercure qui peut occasionner le blocage total des pontes [102], l'argent qui provoque une éclosion précoce des œufs pondus ce qui engendre des alevins sous développés avec une faible longévité [103], et le chrome qui provoque une augmentation significative du taux de mortalité parmi les alevins [104].

D'autres effets sublétaux ont également été mis en évidence, tels que les déformations du squelette (particulièrement la colonne vertébrale) des truites provoquées par le plomb [105].

En plus des effets létaux et sublétaux, les métaux lourds peuvent s'accumuler dans l'organisme des poissons, leur répartition dans les différents organes varie en fonction des métaux et des espèces de poissons. Pour la variation de la répartition des métaux en fonction de l'espèce de poisson nous citons comme exemple le mercure qui se concentre au niveau du rein chez les espèces de poissons d'eau douce *Abramis brama* et *Stizostedion lucioperca* [106], alors qu'il s'accumule dans les muscles chez le Brochet et dans le squelette chez le Thon [5]. Pour la variation de l'accumulation des métaux dans différents

organes pour une même espèce de poisson nous citons l'exemple la Truite arc en ciel chez laquelle le cobalt s'accumule dans la peau, la tête et le muscle, alors que le manganèse s'accumule dans le squelette et le tissu cartilagineux [107].

2.5.4. Effets des métaux lourds sur les invertébrés aquatiques

2.5.4.1. Effets sur la survie, reproduction et croissance

Les métaux lourds sont tous toxiques pour les différentes populations d'invertébrés aquatiques, ils peuvent provoquer leur mortalité [42], [108], [48], affecter leur reproduction par réduction du nombre de jeunes pondus [44], [34], ou en générant des petits non viables [80], et peuvent même complètement bloquer la reproduction [61]. La croissance (estimée par le poids et la taille), peut également être retardée suite à l'exposition aux métaux lourds [61], [44], [80], [109]. D'autre part les métaux lourds peuvent également influencer et modifier certains comportements chez les invertébrés notamment par rapport à la lumière (réaction phototactique), cet effet a été mis en évidence chez *Daphnia magna* et *Daphnia pulex* suite à leur exposition au cuivre [110], [111].

2.5.4.2. Influence des caractéristiques biologiques des invertébrés aquatiques sur l'absorption des métaux lourds

L'absorption des métaux lourds peut varier d'une espèce à une autre en fonction des caractéristiques biologiques [112], [26]. Les Balanes (crustacés, cirripèdes) ont des taux d'absorption de métaux lourds élevés par rapport à ceux des crustacés décapodes [113], [114]. Ceci est dû à leurs caractéristiques biologiques différentes, en effet pour respirer les Balanes font passer d'importants volumes d'eau sur de larges zones de surface perméable, de plus elles se nourrissent de petites particules relativement riches en métaux lourds chez les crustacés décapodes par contre les surfaces perméables se limitent à des régions branchiales spéciales. La majeure partie de la cuticule qui enveloppe le corps étant imperméable, de plus ils se nourrissent de particules organiques plus larges ayant une teneur relativement faible en métaux lourds [36].

2.5.4.3. Influence des caractéristiques biologiques sur l'accumulation des métaux lourds chez les invertébrés aquatiques

L'accumulation des métaux lourds peut varier d'une espèce à une autre et cela en fonction des caractéristiques biologiques [112], [26]. D'une manière générale sont distinguées trois catégories suivantes d'invertébrés:

1-Forts accumulateurs de métaux lourds: Ceux-ci n'excrètent pas les métaux lourds absorbés mais les accumulent jusqu'à atteindre de grandes concentrations corporelles [113].

2-Faibles accumulateurs de métaux lourds : Dans ce cas, ils se caractérisent par une faible excrétion des métaux lourds mais également par une faible absorption de ces métaux ce qui fait que la quantité accumulée est faible [113].

3-Les régulateurs: Ils réussissent à maintenir dans leur corps une concentration constante des métaux lourds et cela en équilibrant les taux d'absorption avec les taux d'excrétion [115], [33].

2. 5.4.4. Effets du cadmium cuivre et nickel sur *Daphnia magna*

Plusieurs études (BIESINGER et CHRISTENSEN,1972; WINNER *et al.*,1977; VAN LEEUWEN *et al.*,1985; KHANGAROT et RAY,1989; MUNZINGER,1990 ; ENSERINK *et al.*,1993 ; FARGASOVA,1994; KLUTTGEN et RATTE,1994 ; SANTOJANNI *et al.*,1995 ; SUEDEL *et al.*,1996 ; SUEDEL *et al.*,1997; GUILHERMINO *et al.*,1999) ont démontré que le cadmium cuivre et nickel avaient des effets toxiques aussi bien aigus qu'a long terme sur *Daphnia magna* ces métaux affectent essentiellement la survie, la longévité et la reproduction.

Conclusion

Notre travail expérimental sur l'incidence chronique de la toxicité métallique de certains cations est réalisé au moyen de daphnies de l'espèce algérienne *Daphnia magna*.

Nous tenons donc à présenter au chapitre III certains paramètres biologiques pouvant montrer :

- Le système de vie de *Daphnia magna*.
- et surtout un état de connaissance sur le système d'excrétion de ce crustacé.

CHAPITRE 3

DAPHNIA MAGNA (BIOLOGIE, EXCRETION)

3.1. Positionnement de *Daphnia magna* dans le règne animal

La classification de *Daphnia magna* dans le règne animal est la suivante [116] :

Embranchement :	Arthropodes.
Sous-embranchement :	Antennates ou Mandibulates.
Classe :	Crustacés.
Sous-classe :	Branchiopodes.
Ordre :	Cladocères.
Famille :	Daphnidae.
Genre :	Daphnia.
Sous-genre :	Ctenodaphnia.
Espèce :	<i>Daphnia magna</i> , Straus 1820.

Nous citons ci-après les bases et les principes de cette classification, à travers cela nous relevons au fur et à mesure, les caractéristiques morphologiques ainsi que quelques caractéristiques biologiques de *Daphnia magna*.

3.1.1. Embranchement des Arthropodes

L'embranchement des arthropodes ou articulés est l'un des plus importants embranchements du règne animal , les caractéristiques essentielles des animaux groupés dans cet embranchement sont selon GINET et ROUX (1986), BAILENGER (1989) :

1-La présence d'un exosquelette rigide, appelé cuticule.

2-La présence d'appendices segmentaires articulés (arthropodes de arthron= articulation, et pous= pied).

3-La spécialisation de ces derniers et simultanément celle des régions du corps qui les portent.

L'embranchement des arthropodes compte trois principaux sous-embranchement à savoir :

- Les Trilobitomorphes (tous fossiles).
- Les Chélicérates.
- Les Mandibulates ou Antennates.

3.1.2. Sous-embranchement des Mandibulates ou Antennates

Les arthropodes appartenant à ce sous-embranchement sont caractérisés essentiellement par [118], [116] :

- 1- La présence d'une paire de mandibules.
- 2- La présence d'une ou de deux paires d'antennes.

Ce sous-embranchement comporte trois principales classes à savoir :

- Les crustacés.
- Les insectes.
- Les myriapodes.

3.1.3. Classe des Crustacés

Les crustacés sont des arthropodes, mandibulates, antennates, cette classe regroupe une grande variété de formes qui possèdent des caractéristiques communes, dont la plus importante est la forme larvaire commune [116].

Les autres caractéristiques des espèces groupées dans cette classe sont :

- La présence d'appendices souvent biramés, c'est à dire formés de deux rames, l'exopodite du côté externe, et l'endopodite du côté interne.
- La présence de deux paires d'antennes.
- Le corps est recouvert d'une cuticule qui peut devenir si dure qu'elle forme une véritable croûte (=crusta), d'où le nom attribué à cette classe.

En raison de la présence de la cuticule les crustacés ainsi que tous les arthropodes ont une croissance discontinue entrecoupée de mues. Par période le crustacé mue rejette sa vieille cuticule. L'accroissement du corps ne peut se faire qu'immédiatement après lorsque la nouvelle cuticule n'est pas encore durcie [116], [57], [119].

La croissance est en général indéfinie et se poursuit pendant toute la vie de l'animal [120].

La classe des crustacés comporte plusieurs sous-classes parmi lesquelles nous citerons :

- Les branchiopodes.
- Les copépodes.
- Les malacostracés.

3.1.4. Ordre des Cladocères

Organisation générale [121].

Les Cladocères (Figure 3.1) sont des animaux de petite taille, leur longueur est de quelques millimètres, elle atteint exceptionnellement 15 mm chez une seule espèce.

Le corps est transparent, translucide ou parfois coloré, la segmentation est indistincte.

Chez la plupart des espèces le thorax et le post-abdomen sont recouverts d'une carapace bivalve dont l'ouverture ventrale et postérieure laisse sortir les appendices thoraciques et le post-abdomen.

La tête qui n'est pas comprise entre les valves est protégée par une capsule céphalique, chez certaines espèces, la capsule céphalique est relativement réduite.

Dans la région médio-dorsale de la capsule céphalique s'ouvrent de minuscules orifices, les pores céphaliques.

L'œil localisé au centre de la tête, est constitué d'un nombre variable de cristallins, entourant une masse compacte pigmentée.

Les antennules sont insérées sur la face ventrale de la tête.

Les antennes bien développées, sont insérées sur les cotés de la tête, parfois sous une expansion en forme de carène, du bord latéral de la capsule céphalique.

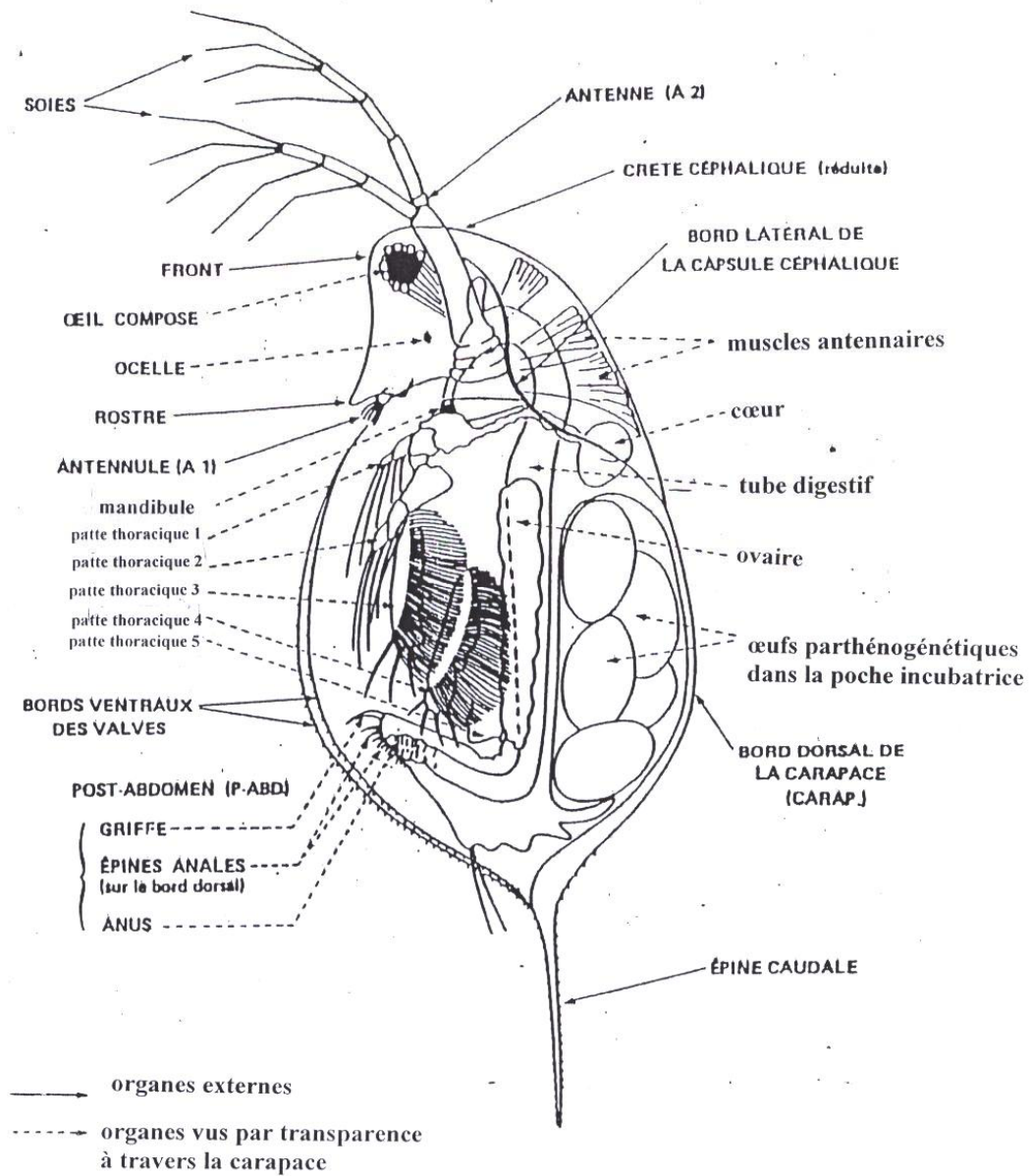


Figure 3.1 : Organisation générale d'un cladocère Femelle parthénogénétique en vue latérale (d'après Claude Amoros, 1984)

On ne distingue généralement pas de véritable abdomen mais un post- abdomen, constitué par l'extrémité du corps très mobile et, le plus souvent repliée ventralement vers l'avant. L'anus s'ouvre sur le bord dorsal du post - abdomen, l'extrémité du post abdomen porte une paire de griffes incurvées.

Le post abdomen sort fréquemment des valves il atteint les pattes thoraciques et nettoie leur appareil filtrant.

En position dorsale existe chez les femelles un espace ,la chambre incubatrice, où sont pondus les œufs et où se développent les embryons lorsqu'il s'agit d'œufs parthénogénétiques.

3.2. Biologie de *Daphnia magna*

3.2.1. Biotopes

Les daphnies (comme tous les cladocères) sont très fréquentes dans tous les types d'eaux douces à l'exception des eaux courantes rapides où elles ne sont présentes que lorsqu'elles sont entraînées par les courants à partir de zones plus calmes [121]. L'espèce *Daphnia magna* peut vivre dans les eaux très chargées en matières organiques et peu oxygénées, elle peut supporter des pollutions organiques telles les mares à canards [121] .

D'après HRBACEK (1987), l'habitat naturel de cette espèce serait les eaux accumulées dans les creux des rochers, fertilisées par les oiseaux qui nichent au dessus (biotopes de dimensions extrêmement réduites) ainsi que les étendues d'eau peu profondes et temporaires des steppes, prairies et toundra.

En Algérie cette espèce a été retrouvée dans les barrages de Boughzoul, Hamiz , Beni Amrane, et dans le lac de Reghaia . Elle a également été retrouvée dans les lacs salés [123].

3.2.2. Locomotion

Le mode de locomotion des daphnies est identique à celui de tous les cladocères planctoniques. En effet la propulsion est assurée par le rabattement vigoureux des antennes biramées vers l'arrière du corps [118], [119]. Comme ces animaux se tiennent généralement la tête dirigée vers le haut, le mouvement de leurs antennes provoque donc

leur remontée. Entre chaque battement d'antennes les animaux ont tendance à redescendre un peu cette progression saccadée leur a valu le nom de «puces d'eau » [124].

3.2.3. Alimentation

A l'instar de la majorité des cladocères, les daphnies sont des organismes filtreurs. Elles possèdent des appendices thoraciques hautement spécialisés pour la collecte des particules alimentaires, algues unicellulaires, bactéries, détritiques organiques fins [54]. D'après LAMPERT (1987). Ces appendices forment l'appareil de filtration le plus développé de tout le groupe des branchiopodes.

Le nombre d'appendices thoraciques est réduit à cinq, ceux ci forment avec la carapace une sorte de pompe aspirante (Figure 3.2).

3.2.4. Reproduction

Les daphnies ainsi que l'ensemble des cladocères sont caractérisées par deux modes de reproduction qui alternent [124]. Lorsque l'environnement leur est favorable, elles se reproduisent par parthénogenèse, c'est à dire que les femelles pondent des œufs qui se développent immédiatement dans la chambre incubatrice et donnent naissance à de jeunes femelles (Figure 3.3) qui, après quelques jours peuvent se reproduire à leur tour suivant le même processus.

Lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables (modification de la température ou de la photopériode, diminution des teneurs en oxygène dissous, raréfaction ou changement de la qualité de la nourriture, surpopulation,...), les œufs parthénogénétiques donnent naissance à des mâles [124].

Les mâles ont une morphologie différente de celle des femelles (Figure 3.4) ils sont plus petits, leurs antennules sont plus grandes, le post- abdomen est aussi modifié [121].

Les femelles qui s'accouplent et qui pondent des œufs fécondés ne diffèrent pas des femelles parthénogénétiques mais lorsque ces œufs sont pondus les parois de la chambre incubatrice s'épaississent et forment une protection particulière appelée éphippie [121], [57]. Contrairement aux œufs parthénogénétiques qui se développent immédiatement dans la chambre incubatrice, les œufs fécondés, appelés aussi œufs de durée ont un développement différé et n'éclosent qu'après le retour de conditions favorables.

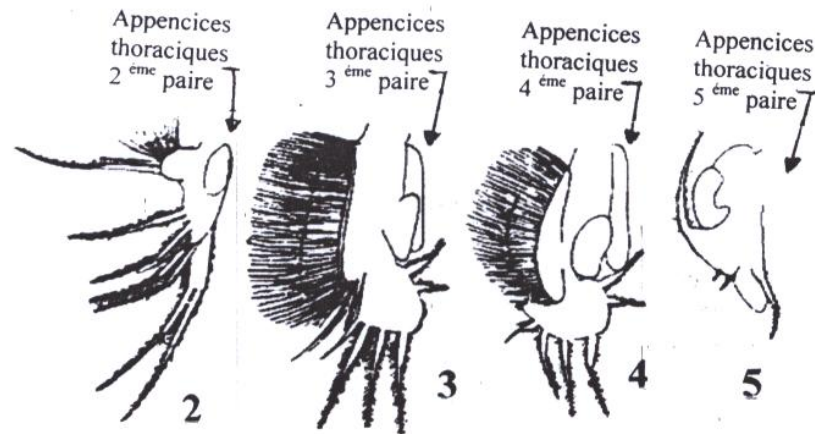


Figure 3.2: Appendices (pattes) thoraciques de la 2^{ème} à la 5^{ème} paire (d'après LAMPERT 1987).

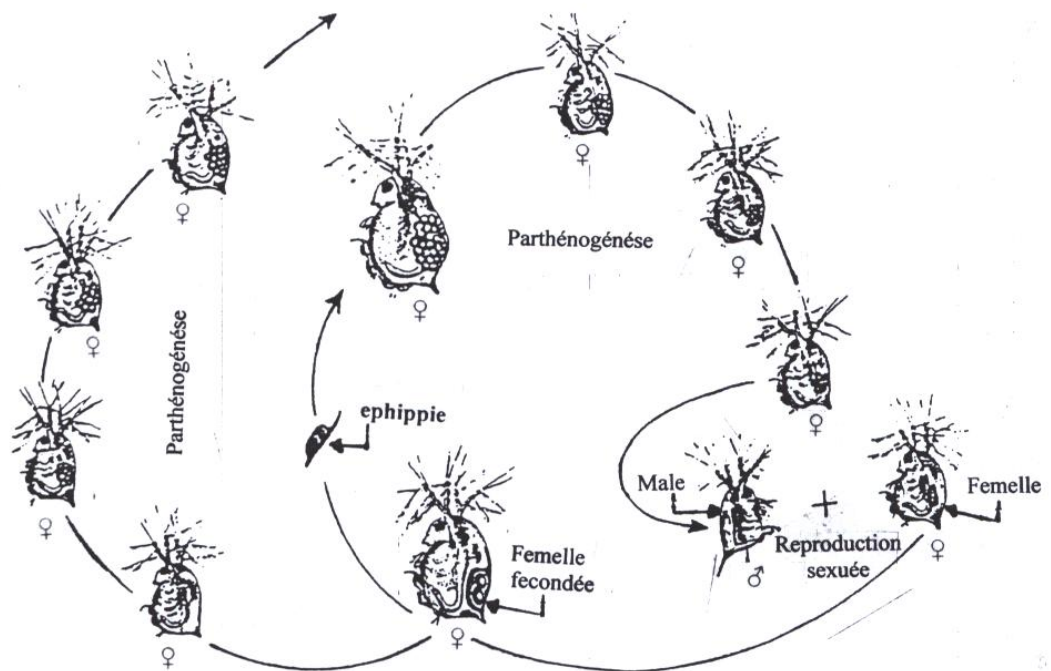


Figure 3.3: Cycle reproductif de *Daphnia magna* (d'après ZAFFAGNINI 1987).

L'ephippie (Figure 3.5) libérée par la mue ou la mort de la mère assure à ces œufs une protection remarquable qui leur permet de résister à l'action de la dessiccation et du gel. Ces œufs fécondés permettent donc non seulement la perpétuation des espèces mais aussi leur très large dissémination. Lorsque les conditions redeviennent propices, les œufs de durée éclosent et donnent naissance à de jeunes femelles qui, après quelques mues se reproduisent par parthénogenèse. Dans ces conditions favorables, les populations s'accroissent très vite et peuvent atteindre plusieurs centaines d'individus par litre d'eau [121].

3.2.5. Effets de la qualité des aliments sur la reproduction

Plusieurs études ont concerné l'effet de l'apport d'aliments sur les diverses fonctions physiologiques des daphnies et notamment la reproduction, ainsi l'interruption de la parthénogenèse et la diminution des populations naturelles peuvent être provoquées par une alimentation inadéquate [127], [72], [128], [129], [130], [131], [132].

La valeur nutritionnelle d'un aliment est le résultat de plusieurs propriétés à savoir l'ingestibilité, l'assimilabilité et la composition biochimique [125].

Bien que le régime alimentaire naturel des daphnies est varié (microalgues, protozoaires, bactéries, détritits), les microalgues en sont les principales composantes car elles constituent l'aliment le plus convenable pour les daphnies [133], [132]. En effet WINNER *et al* (1977) ont utilisé deux types d'aliments (microalgue de l'espèce *Chlamydomonas reinhardi* et un aliment pour poisson) pour nourrir *Daphnia magna* soumise à des tests de toxicité à long terme, ils ont constaté que les individus témoins nourris avec les microalgues avaient une durée de vie et une fréquence de reproduction nettement supérieures à celles des individus témoins nourris avec l'aliment pour poisson. SCAVIA et GARDNER, 1982 affirment que pour *Daphnia magna* le taux d'assimilation des algues est supérieur à celui des détritits. D'autre part LEWIS et MAKI (1981) ont montré qu'une alimentation variée composée d'un mélange d'une microalgue (*Selenastrum*) et d'un aliment pour poisson avait un meilleur impact sur la reproduction (début des pontes et nombre de petits pondus) qu'une alimentation composée uniquement de la microalgue.

Les Caractéristiques qui influencent la valeur nutritionnelle des algues vis à vis des daphnies sont :

la taille et la forme :

L'ingestion des particules alimentaires est déterminée par la taille de ces dernières, les particules ayant une taille relativement grande sont difficiles à transformer elles sont rejetées [125]. BURNS (1968), a établi une formule qui relie la taille (diamètre) maximale d'une particule considérée comme ayant une forme sphérique en fonction de la longueur des daphnies, d'après cette formule il ressort que pour l'espèce *Daphnia magna* la taille maximale d'une particule est de 70 μm pour un individu de 3 mm de long, néanmoins les particules alimentaires n'étant souvent pas sphériques une taille maximale limite est difficile à définir [54]. D'autre part les algues filamenteuses inhibent le processus de filtration il a été observé une réduction de la taille des portées (nbre de jeunes daphnies pondues) avec l'augmentation de la concentration des particules filamenteuses [128].

La taille et la forme des particules alimentaires, affectent le taux d'assimilation (absorption des matières à travers la paroi intestinale) de la même manière qu'elles affectent le taux d'ingestion [54].

3.3. METABOLISME DES DAPHNIES

Divers facteurs peuvent influencer le métabolisme des daphnies, il en existe deux types :

- les facteurs extrinsèques.
- les facteurs intrinsèques.

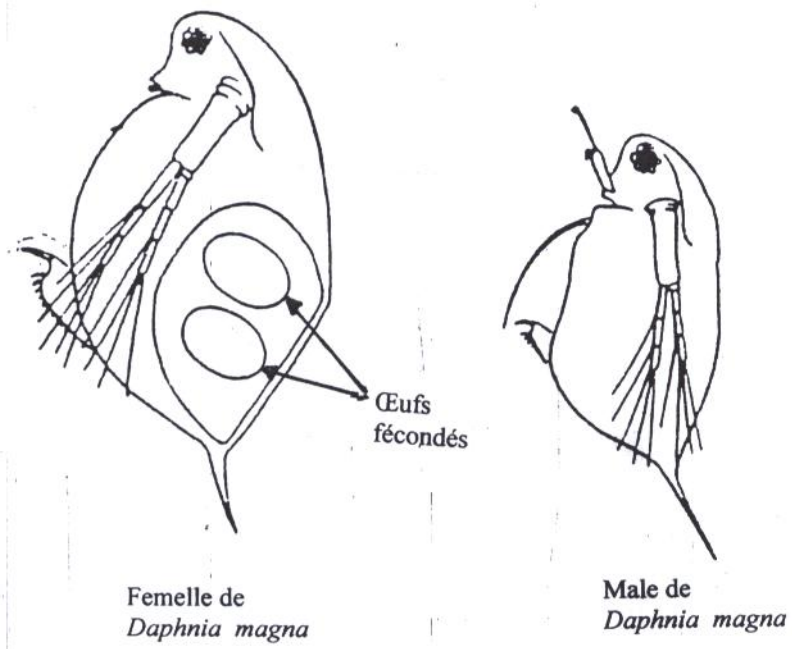


Figure 3.4: Mâle et femelle portant, dans l'éphippie deux œufs fécondés. (d'après Amoros, 1984).

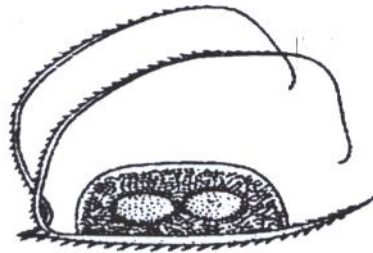


Figure 3.5: Ephippium de *Daphnia* (d'après Beaumont et Cassier, 1983).

3.3.1. Les facteurs extrinsèques

a. La température

Les daphnies sont des organismes eurythermes, c'est à dire qu'elles supportent de grandes variations de température [135], [136].

L'intervalle des températures qui conviennent à la survie des daphnies s'étend de 2 à 35°C [53]. En effet des cultures de *Daphnia magna* et *Daphnia pulex* ont pu être maintenues à des températures constantes comprises dans cet intervalle (2 à 35°C) [137].

L'intervalle de températures entre 15 et 25°C est optimal pour certains processus physiologiques tels que :

- La reproduction qui est plus rapide dans cet intervalle [138].
- La filtration des particules alimentaires dont la vitesse atteint des valeurs maximales [139], [54].
- L'assimilation dont le rythme augmente [140].
- La croissance qui est plus rapide [54].

Néanmoins la respiration est directement proportionnelle à la température sur une grande partie de l'intervalle des températures tolérées par les daphnies [137], [141], [142].

b. La lumière

L'influence de la lumière sur le comportement des daphnies a été examinée par GOSS et BUNTING,1976 et RINGELBERG,1987. En effet, la baisse de l'intensité lumineuse (source lumineuse au dessus du plan d'eau) provoque une remontée des organismes vers la source lumineuse (réaction phototactique positive), tandis que lors d'une augmentation de l'intensité lumineuse les animaux redescendent vers le fond (réaction phototactique négative) [143].

D'autre part des études ont démontré que la lumière influence la vitesse d'ingestion des particules alimentaires, c'est à dire sur le rythme d'alimentation et ceci aussi bien dans le milieu naturel [144] qu'au niveau du laboratoire [145].

c. La Concentration des substances nutritives

La concentration des substances nutritives a une influence sur les différents processus physiologiques des daphnies [54],[135].

Chez les daphnies privées d'alimentation même à court terme, a été observé un ralentissement des flux et des échanges de carbone [146]et de phosphore [147]. La réaction des animaux par rapport à la lumière est également affectée [148].

Plusieurs études (KERSTING,1978 ; BLAZKA *et al.*,1982; LAMPERT,1987) ont démontré que la consommation d'oxygène est directement proportionnelle à la concentration d'aliments. D'autre part il a été démontré que le rythme respiratoire diminuait au fur et a mesure de l'amélioration de la qualité de l'alimentation [149].

3.3.2. Facteurs intrinsèques

a. Différences génétiques

Les propriétés physiologiques des daphnies sont différentes d'une espèce à une autre. Selon LAGERSPETZ (1958) *Daphnia magna* est plus résistante aux sels dissous que *Daphnia pulex* et *Daphnia longispina*. GREEN (1956) cite que la concentration d'hémoglobine est différente d'une espèce à l'autre.

La taille des daphnies peut varier considérablement d'une espèce à l'autre, de ce fait tout caractère affecté par la taille sera différent selon l'espèce [135]. MORAITOU-APOSTOLOPOULOU,1978 affirme également que les caractéristiques génétiques influent sur la résistance des copépodes aux métaux lourds.

b. Adaptation aux conditions d'élevage

Les daphnies s'adaptent aux conditions d'élevage et les processus physiologiques sont caractéristiques de cette adaptation. Les daphnies vivant dans des milieux pauvres en nourriture ont un faible rythme respiratoire par rapport à celles provenant d'un milieu riche en nourriture. Cette différence demeure même quand ces deux souches sont placées dans les mêmes conditions standards et cela étant donné que le changement de rythme respiratoire en fonction des nouvelles conditions nécessite une période assez longue [153].

c. Période de vie

Les caractéristiques physiologiques sont déterminées par la période de la vie à laquelle se trouve l'animal. Plusieurs expériences ont démontré que les rythmes physiologiques des daphnies augmentent en fonction de l'âge et cela avant la première ponte, au delà de cette étape ces rythmes baissent [135]. cet aspect concerne :

- La concentration en hémoglobine, celle-ci atteint son maximum juste avant la première reproduction [151].

- L'absorption de phosphate [154].

- Le rythme respiratoire [155].

D'après PETERS (1987) et MUNZINGER (1990) les périodes de mues augmentent la sensibilité des daphnies. Durant ces périodes, la perméabilité du tégument (enveloppe du corps) augmente ce qui induit une plus grande sensibilité au milieu extérieur. Par conséquent les daphnies qui se retrouvent dans un milieu hypotonique (faiblement concentré en sels) meurent après la mue à cause d'une perte irréversible de sels due à leur plus grande perméabilité [53].

Ce phénomène a également été observé chez les amphipodes par MUSIBONO et DAY ,1999.

3.3.3. Excrétion

Les daphnies ingèrent beaucoup plus de matières qu'elles en incorporent dans les nouveaux tissus. En conséquence un taux important de la matière assimilée est excrété soit parce que c'est un produit inutile issu du métabolisme ou parce qu'une certaine purge est nécessaire [135].

Il n'existe pas d'organe particulier qui assure l'excrétion, celle ci se fait à travers toute la surface du corps [135].

Selon différents auteurs les substances excrétées par les daphnies sont :

- L'adénosine monophosphate [156].

- Le carbone organique [157].

- Le fer [158], [159].

- Le nickel [160].
- L'ammoniaque [161], [162], [142].
- Les acides aminés [162].

-Les Phosphates, ceux ci sont excrétés le plus souvent sous forme d'orthophosphates et constituent la forme principale d'excrétion du phosphore [142].

3.3.4. Excrétion d'ammoniaque

Il est bien connu que les organismes aquatiques sont ammoniotéliques c'est à dire qu'ils excrètent la majeure partie de l'azote sous forme d'ammoniaque [161], [30], [57], [119].

Plusieurs études se sont intéressées au rejet d'azote ammoniacal par le zooplancton et d'autres invertébrés aquatiques (JACOBSEN et COMITA,1976 ; GARDNER et MILLER,1981 ; BLAZKA *et al.*,1982 ; SAIZ et ALCARAZ,1992).

D'après BLAZKA *et al.*(1982), MEDALE *et al* (1995), CHAPRON (1999) et JURD (2000) la majeure partie de l'ammoniaque rejeté provient de la rupture des protéines.

Plusieurs auteurs ont évalué les taux d'azote (N-NH₄ dans la majorité des cas) rejetés par le zooplancton et ont établi sous forme de droites la relation entre la quantité d'azote excrétée (µg) par unité de poids sec (mg) et par heure en fonction du poids sec par individu. Pour *Daphnia magna* le poids frais est compris entre 1 et 4 mg et le poids sec est estimé à 10% du poids frais [162].

Ces droites (Figure 3.6) indiquent que d'une manière générale chez les invertébrés aquatiques la quantité d'azote excrétée par unité de poids sec est inversement proportionnelle au poids sec de l'individu. Le tableau 3.1 rassemble certaines évaluations des quantités d'azote excrétées par le zooplancton.

Tableau 3.1: Quantité d'azote ammoniacal rejetée par animal et par jour pour les invertébrés aquatiques selon plusieurs auteurs.

Auteur	Valeur d'azote ammoniacal rejetée ($\mu\text{g N / animal/jour}$)
Esjmont-Karabin (1984) (zooplancton d'eau Douce).	0,228
Ikeda (1985) (crustacés marins).	1,08
Mullin et al (1975) (zooplancton marin).	1,2
Esjmont-Karabin (1984) (zooplancton marin).	1,68
Conover et Mayzaud (1975) (zooplancton marin).	4,8

Ces estimations ont été faites à partir des droites (Figure 3.6) établies par les différents auteurs en considérant une daphnie de 1 mg de poids frais.

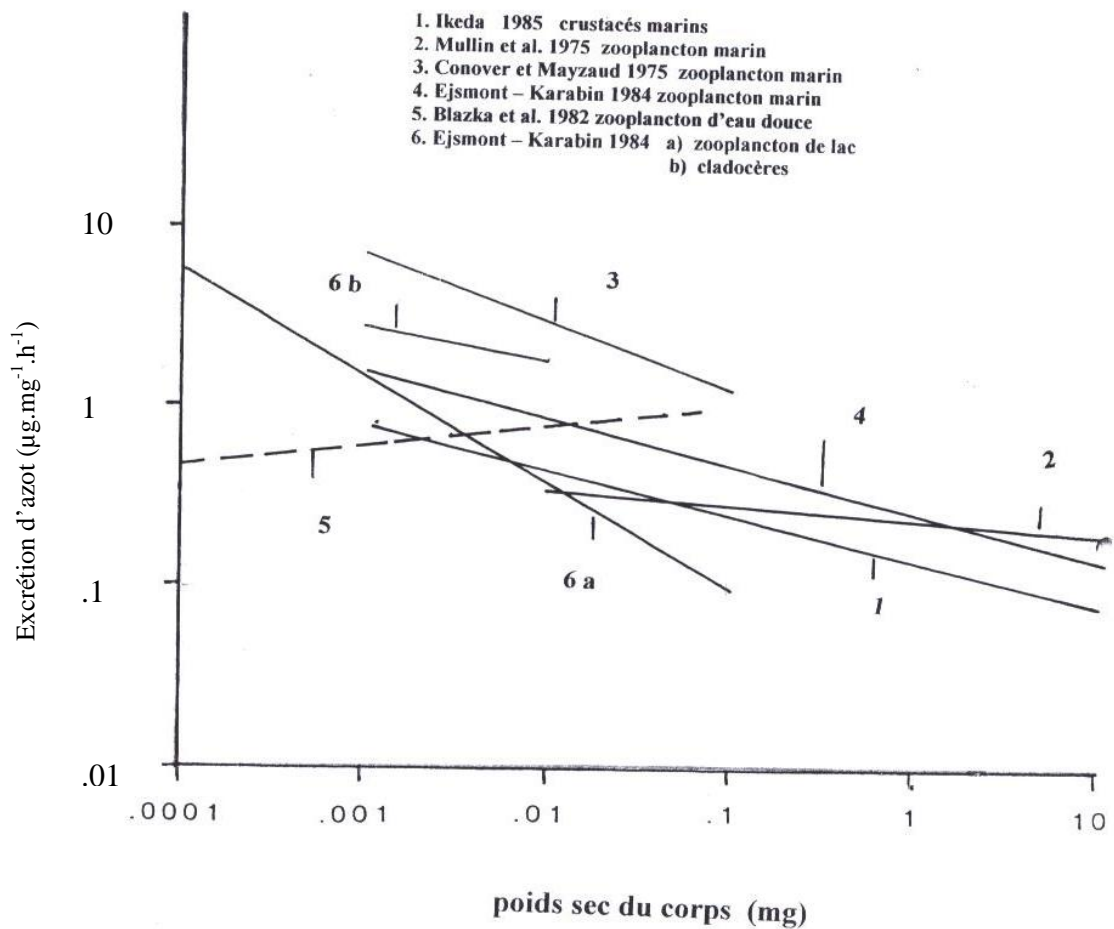


Figure 3.6 : Droites exprimant la relation entre la quantité d'azote ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de poids sec/heure) en fonction du poids sec par individu déterminées par plusieurs auteurs pour différentes espèces de zooplancton.

D'après PETERS (1987), des difficultés techniques contribuent aux larges variations des taux d'excrétion estimés par les différents auteurs, parmi les sources les plus communes d'erreurs sont citées:

1- Les sous estimations induites par :

- L'absorption des matières excrétées par le plancton [164], [165], [166], notamment par le phytoplancton (microalgues) et les algues [133], [167].

- La réabsorption par les organismes vivants sur le zooplancton [168], [169], [170] notamment les bactéries [171].

2- Les surestimations qui peuvent résulter notamment :

- Des lésions (blessures) des animaux [172], [173], [30].

D'autre part pour *Daphnia magna* une étude effectuée par GARDNER et MILLER (1981) a révélé que la quantité d'ammoniaque rejetée a été estimée à 21 ± 2 nmol/mg de poids sec. heure, ce qui correspond (pour une daphnie de 1mg de poids humide) à $0,705 \mu\text{g N}/\text{animal}/\text{jour}$, alors que SCAVIA et GARDNER, 1982 dans une étude similaire ont estimé cette quantité à $2,70 \mu\text{g N}/\text{animal}/\text{jour}$.

Dans une étude sur le rejet d'azote ammoniacal par *Daphnia pulex* JACOBSEN et COMITA (1976) ont estimé la quantité rejetée à $0,20 \mu\text{gN}/\text{animal}/\text{jour}$.

3.3.4.1. Facteurs influençant l'excrétion d'azote

a. La concentration des aliments

Chez le plancton herbivore les taux d'azote excrétés baissent lorsque l'alimentation est abondante et par contre augmentent lorsque l'alimentation est faible [142], [30]. Les daphnies et les calanus (invertébrés herbivores) conservent les protéines pour la croissance et la reproduction lorsque l'alimentation est abondante [153], [174].

JACOBSEN et COMITA (1976) dans une étude sur les rejets d'azote ammoniacal de *Daphnia pulex* du lac « Silver » au Minnesota ont également observé à travers les divers prélèvements d'individus que les taux d'excrétion les plus faibles coïncident avec les périodes de prolifération du phytoplancton (nourriture abondante). Selon ces mêmes auteurs la diminution de l'excrétion d'azote ammoniacal durant les périodes où la nourriture est abondante réside dans le fait que les protéines et les acides aminés sont utilisés comme source d'énergie secondaire.

BLAZKA *et al* (1982) ont constaté que pour le plancton carnivore la situation est inverse, ainsi chez les individus de *Cyclope vicinius* adultes (carnivores) le taux d'excrétion d'azote est bas lorsque l'alimentation est faible et celui-ci augmente avec la concentration des aliments, ils ont également constaté que chez les individus de *Cyclope vicinius* (privés d'alimentation) la concentration d'ammoniaque rejeté augmente en fonction du temps et cela lorsque la température est supérieure à 10°C.

Selon les auteurs ces variations seraient dues au fait que lorsque l'alimentation est faible, les organismes gardent leurs protéines pour la croissance et la reproduction et que chez les animaux privés d'aliments les protéines constituent le seul substrat disponible (à cataboliser). Dans le cas où les organismes sont bien alimentés la quantité de protéines disponible peut suffire à la reproduction et au catabolisme. Dans la même étude il a été constaté qu'à 4°C l'excrétion d'ammoniaque chez *Cyclope vicinius* (privés d'aliments) baisse en fonction du temps. Ceci pourrait être associé à l'utilisation des lipides pour les besoins métaboliques, sauvegardant ainsi les protéines.

b. Excrétion des herbivores et des carnivores dans une chaîne trophique dans un écosystème aquatique

SCAVIA et GARDNER, 1982 affirment que la qualité des aliments influe sur la quantité des produits excrétés notamment l'azote ammoniacal.

BLAZKA (1966b) a noté que l'excrétion d'ammoniaque augmente tout au long de la chaîne trophique. Le taux d'excrétion d'ammoniaque des herbivores est donc plus faible que celui des carnivores.

Ce principe a été confirmé dans l'étude de BLAZKA *et al.* (1982) dans laquelle les organismes herbivores sont représentés par *Daphnia hyalina*, les larves de *Cyclope vicinius* et les rotifères alors que les carnivores étudiés sont les adultes de *Cyclope vicinius*.

c. Influence des substances toxiques sur les rejets d'ammoniaque

Des études réalisées par GARDNER et MILLER, 1981 et KNOPS *et al.*, 2001 ont démontré que les différents toxiques notamment le cadmium et le cuivre n'avaient pas d'effet significatif sur certains métabolismes de *Daphnia magna*, ceci serait le cas de l'excrétion d'ammoniaque [162] et la consommation d'oxygène [37].

Conclusion

Après cet examen bibliographique quant à l'effet de la toxicité métallique sur les rejets d'ammoniaque par *Daphnia magna*, nous présentons au chapitres suivants les résultats :

- des tests de toxicités aiguës, utilisant les rejets N-NH₄ comme paramètre biologique de suivi de la toxicité de Cr⁺⁶, Cd²⁺, Cu²⁺, et Ni²⁺.
- la méthodologie du test prolongé (21 jours) que nous proposons.
- et l'évaluation des rejets d'azote ammoniacal en présence de Cd²⁺, Cu²⁺, et Ni²⁺ au cours d'un test de 21 jours.

CHAPITRE 4

MATERIEL ET METHODE

4.1. Introduction

Les tests de toxicité aiguë permettent d'évaluer la toxicité aiguë d'une substance chimique ou d'un effluent, c'est à dire celle qui provoque la mort ou de très graves troubles physiologiques après un court délai suite à l'absorption d'une dose assez importante d'un composé nocif [176].

La première partie de cette étude consiste à évaluer la toxicité aiguë des cations métalliques du cuivre cadmium et nickel vis à vis du microcrustacé d'eau douce de l'espèce algérienne *Daphnia magna*.

D'autre part les tests de toxicité peuvent également être utilisés afin de mettre en évidence des perturbations biochimiques telles que l'induction de substances spécifiques suite à l'action d'un agent toxique donné qui en général précède les effets importants comme la mort des organismes. Dans ce contexte nous avons étudié la relation entre l'excrétion d'azote ammoniacal par *Daphnia magna* et l'exposition à des concentrations de cuivre cadmium et nickel et cela afin d'examiner la possibilité d'utiliser les rejets d'ammoniaque comme paramètres évaluateurs de la toxicité métalliques.

4.2. Matériel et méthode

4.2.1. Tests de toxicité aiguë

D'une façon générale trois précautions essentielles doivent être prises dans tout essai toxicologique:

a- Rassembler un échantillon aussi homogène que possible de l'espèce testée par sélection d'individus du même sexe du même âge et de même poids. Pour cela nous avons dans notre étude utilisé pour les tests des daphnies provenant d'élevages effectués dans des conditions standards et sélectionnés de telle manière à former un échantillon homogène.

b- Utiliser une technique d'administration du toxique qui assure une normalisation des conditions expérimentales pendant toute la durée du test.

c- Analyser les résultats avec une méthode statistique appropriée.

4.2.2. Elevage des daphnies

L'élevage est effectué dans une chambre de culture qui assure une température fixée à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ et une photopériode de 16 heures d'éclairage et 8 heures d'obscurité. Le milieu d'élevage utilisé est une eau minérale diluée constituée de 80% d'eau minérale Saida et de 20% du milieu de Lefèvre-Czarda (LC) modifié par des oligo-éléments. Ce milieu d'élevage est caractérisé par un pH de 7 à 8 et une dureté de $120 \text{ mg. L}^{-1} \text{ CaCO}_3$.

L'eau minérale Saida a la composition suivante : Na^+ $0,058 \text{ g.L}^{-1}$; K^+ $0,002 \text{ g.L}^{-1}$; Ca^{++} $0,068 \text{ g.L}^{-1}$; Mg^{++} $0,050 \text{ g.L}^{-1}$; Fe^{++} traces ; HCO_3^- $0,376 \text{ g.L}^{-1}$; Cl^- $0,081 \text{ g.L}^{-1}$; SO_4^{--} $0,065 \text{ g. L}^{-1}$; NO_3^- $0,015 \text{ g.L}^{-1}$; Silice $0,009 \text{ g.L}^{-1}$.

Le milieu Lefèvre-Czarda est un milieu de culture utilisé également pour la culture des microalgues, sa préparation nécessite l'utilisation des solutions suivantes:

a. Solutions de base

- Solution 1 : 4g de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ dans 100ml d'eau distillée.
- Solution 2 : 10g de KNO_3 dans 100ml d'eau distillée.
- Solution 3 : 3g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 100ml d'eau distillée.
- Solution 4 : 4g de K_2HPO_4 dans 100ml d'eau distillée.

b. Solutions d'oligo-éléments

- Solution I : dans 01 litre d'eau distillée sont dissous :
 - 30mg de sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).
 - 60mg d'Heptamolybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).
 - 60mg de sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).
 - 60mg de chlorure de cobalt ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).
 - 60mg de nitrate de manganèse $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$.
 - 60mg d'acide citrique ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7, \text{H}_2\text{O}$).

- Solution II : dans 01 litre d'eau distillée sont dissous :

- 1,625g de citrate de fer ($C_6H_5FeO_7,5H_2O$).
- 0,625g de sulfate de fer ($FeSO_4,7H_2O$).
- 0,625g de chlorure de fer ($FeCl_3,6H_2O$).

Ces six solutions sont conservées au réfrigérateur et la préparation du milieu se fait en mélangeant 1 ml de chacune des solutions 1, 2, 3, 4 avec 0,5 ml des solutions I et II. Le volume est complété à 1 litre avec de l'eau distillée. Le pH du milieu ainsi préparé est mesuré puis ajusté à une valeur de $7,1 \pm 0,1$ (à l'aide des solutions 1N d'HCl ou de NaOH).

Les daphnies sont nourries au moyen d'algues vertes unicellulaires de l'espèce « *Scenedesmus sp* » (figure 4.1) à raison de 5×10^5 cell/ind.jour et de solution de levure $20 \mu\text{l}/\text{ind.jour}$. La culture de l'algue verte unicellulaire utilisée comme nourriture a été réalisée au laboratoire selon la méthodologie présentée dans le paragraphe 4.2.3. La solution de levure est préparée en mélangeant 0,5g de levure du boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) à 100ml d'eau distillée, on a utilisé une levure sèche active du commerce (Levure PACKMAYA).

Après agitation pendant quelques minutes celle-ci devrait décanter pendant 15 à 20 minutes. Le surnageant est alors récupéré afin d'être utilisé pour l'alimentation des daphnies.

La souche mère de *Daphnia magna* utilisée (figure 4.2) provient d'un élevage effectué au niveau du laboratoire de contrôle de la qualité de l'eau de l'Agence Nationale des Ressources Hydrauliques (A.N.R.H) d'Alger qui elle est fournie par le Centre des Etudes et Recherches en Pisciculture (CERP) de Bou Ismail et ou de l'ONDPA (Office National du Développement de la Pisciculture et de l'Aquaculture).

4.2.2.1. Méthodologie d'élevage de *Daphnia magna*

Dans un cristalliseur en Pyrex contenant un litre de milieu d'élevage (figure 4.7) sont introduites 40 daphnies (de même âge approximativement) de la souche prélevée au niveau de l'ANRH. Après addition des quantités appropriées d'algues (5 à 10ml) et de levure (1,6ml), les cristalliseurs sont recouverts d'un film transparent et entreposés dans la chambre de culture.

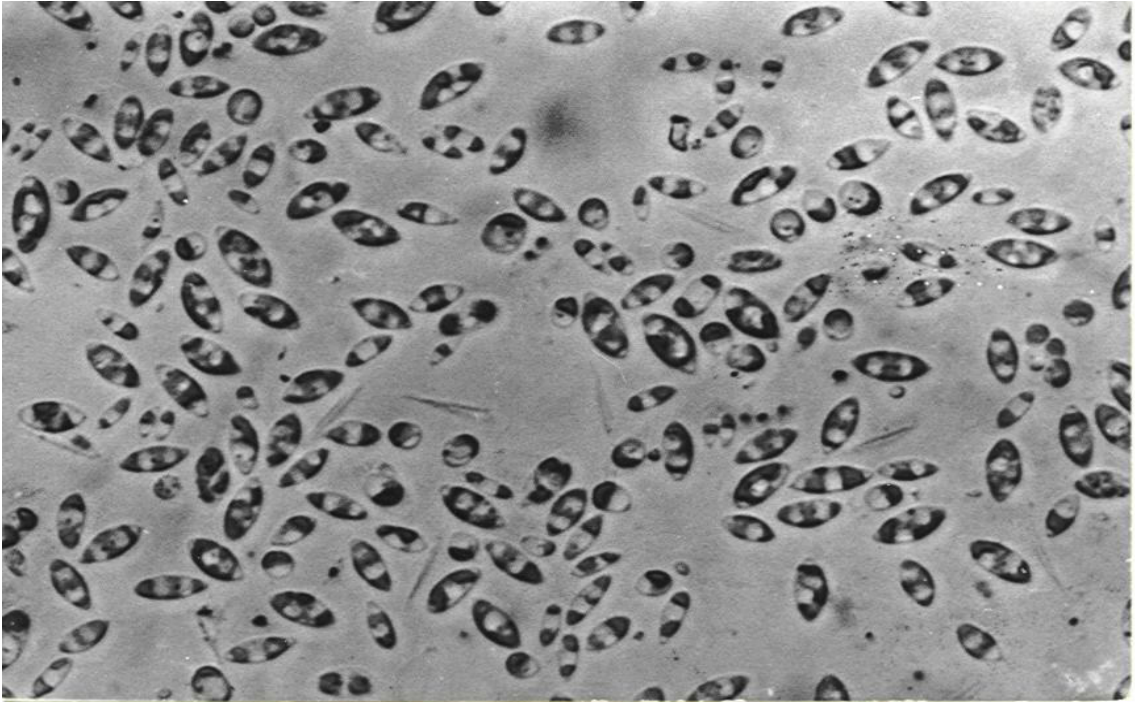


Figure 4.1 : Aspect des cellules de la microalgue «*Scenedesmus sp* » observées au microscope (Grossissement X 100)



Figure 4.2 : *Daphnia magna* Straus. Femelle parthénogenetique (Photo prise à la loupe binoculaire grossissement X 50)

Les changements des milieux de culture sont effectués les samedi, lundi et mercredi. Seules les daphnies de 3^{ème} génération sont utilisées pour les tests de toxicité.

Lors des changements de milieu les daphnies sont récupérées du cristalliseur par aspiration au moyen d'une pipette pasteur puis déposées dans un petit bêcher le volume de milieu contenu dans la pipette pasteur suffit à baigner une à deux daphnies. Les daphnies mortes sont supprimées.

Le cristalliseur est alors vidé, lavé avec de l'eau de robinet et ensuite rincé avec 10 à 20 ml de milieu de culture (fraîchement préparé) puis rempli avec 01 litre de ce milieu. Les daphnies mères sont remises dans le cristalliseur après y avoir ajouté la quantité de nourriture nécessaire (algues + levure) pour deux jours celui-ci est remis dans la chambre de culture.

4.2.3. Culture de l'algue verte unicellulaire

La souche d'algue d'eau douce cultivée appartient à l'espèce « *Scenedesmus sp* » et provient du laboratoire d'Halieutique de l'Institut des Sciences de la Mer et de l'Aménagement du Littoral (ISMAL). Avant son utilisation cette souche a été préalablement filtrée à l'aide d'un papier filtre (porosité 50 microns) afin d'éliminer les éventuelles impuretés.

Afin d'éviter les risques de contamination toute la verrerie utilisée a été nettoyée de la manière suivante :

- lavage avec un détergent en poudre (pour vaisselle).
- rinçage à l'eau de robinet.
- trempage pendant 24 heures dans une solution d'acide diluée.
- rinçage à l'eau de robinet puis à l'eau distillée.

Le milieu de culture utilisé est le milieu de Lefèvre-Czarda modifié par des oligo-éléments (Oligo-LC) qui entre également dans la composition du milieu d'élevage.

La préparation de l'inoculum algal (culture mère) est mise en route en mettant 90ml de milieu de culture (Oligo-LC) dans un erlenmeyer de 250ml.

En vue d'abord de stériliser le milieu de culture l'erlenmeyer est alors placé dans un autoclave à une température de 120°C pendant 20 minutes. Après ensemencement (en zone stérile) avec 10 ml de la souche d'algue l'erlenmeyer est mis sur une table d'agitation à l'intérieur de la chambre de culture (température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, photopériode de 16 heures d'éclairage et 8 heures d'obscurité) et cela pendant 07 jours. Ce temps devrait représenter la durée nécessaire pour une croissance optimale des micro-algues [177].

Les 100ml d'inoculum préparés sont ensuiteensemencés dans 900ml de milieu de culture, contenus dans un ballon à fond plat, muni d'un système de bullage (Figure 4.3).

Pour éviter les risques de contamination le milieu doit être préalablement stérilisé, après refroidissement du milieu (stérile) l'ensemencement doit se faire en zone stérile

Le ballon ensemencé est placé dans la chambre de culture et le système de bullage est actionné. Le bullage sert surtout à maintenir les algues en suspension.

En effet la sédimentation des cellules algales crée des conditions défavorables à leur croissance [177]. Après 07 jours (Figure 4.4), 100ml sont prélevés pour effectuer un nouvel ensemencement. Le ballon de culture est alors entreposé au réfrigérateur pendant 03 jours afin de permettre aux micro-algues de décanter le surnageant est ensuite éliminé et la solution concentrée en algues est récupérée pour son utilisation comme nourriture aux daphnies. Le comptage des cellules d'algues est effectué en utilisant la cellule de Malassez, la méthode de comptage est donnée en appendice « C ».

4.2.4. Conduite des essais

Les daphnies utilisées dans les tests doivent être âgées de moins de 24 heures, et provenir de la 3^{ème} génération au moins de l'élevage parthénogénétique, effectué dans les conditions standards sus citées.



Figure 4.3 : Culture des microalgues

-A droite : Culture agée de 01 jour

-A gauche : Culture agée de 03 jours



Figure 4.4 : Culture des microalgues au 8^{ème} jour

Les tests ont été effectués selon la norme ISO 6341 (1996). Ceux-ci consistent à exposer les daphnies à différentes concentrations des cations métalliques : Cr^{6+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} et Ni^{2+} et à examiner les effets provoqués après 48 heures, sur la survie et le rejet d'azote ammoniacal par *Daphnia magna*. L'effet sur la survie est exprimé par la CI50 48h qui représente la concentration qui immobilise 50% de *Daphnia magna* mises en expérimentation. Les essais sont effectués dans des tubes à essais chaque tube contient 10ml de milieu d'essai composé de l'eau de dilution et d'un volume de la solution mère de toxique correspondant à la concentration testée.

L'eau de dilution est préparée en mélangeant 25 ml des solutions : $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ à $11,76 \text{ g.L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ à $4,93 \text{ g.L}^{-1}$, NaHCO_3 à $2,59 \text{ g.L}^{-1}$ et KCl à $0,23 \text{ g.L}^{-1}$.

A ce mélange est ajoutée de l'eau distillée jusqu'à 1 litre. L'eau de dilution doit être aérée avant son utilisation et le pH ajusté si nécessaire à $7,8 \pm 0,2$, par ajout d'une solution d'hydroxyde de sodium (NaOH) ou d'acide chlorhydrique (HCl) (1N).

L'eau de dilution ainsi obtenue est caractérisée par un $\text{pH} = 7,8 \pm 0,2$ et une dureté de $250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. Pour chaque concentration de métal ainsi que pour le témoin, 25 individus sont échantillonnés et repartis sur 05 tubes à essais à raison de 05 individus par tube (Figure 4.5).

Notons que selon la norme (ISO, 1996) le nombre total de *Daphnia magna* par récipient ne doit pas dépasser 20 et leur densité ne doit pas dépasser 05 individus pour 10ml de solution. Pour chaque série d'essais est prévu un récipient témoin dans lequel sont introduits (dans l'eau de dilution) le même nombre de *Daphnia magna* que dans les solutions d'essai. Les tests sont effectués à une température de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, dans l'obscurité (Figure 4.6). Après 48heures sont effectués les dénombrements des daphnies non inhibées dans chaque tube. Les daphnies incapables de se déplacer après 15 minutes de légère agitation du liquide doivent être considérées comme étant immobilisées même si elles agitent leurs antennes.



Figure 4.5 : Tubes à essais préparés pour le test de toxicité aiguë



Figure 4.6 : Dispositif expérimental du test de toxicité aiguë

- A droite : Cristallisoirs d'élevage des daphnies

-A gauche : Emballage opaque recouvrant les tubes à essais

Pour chaque concentration les pourcentages d'immobilisation sont déterminés par rapport au nombre total de *Daphnia magna* utilisées, puis sont déterminées les CI50 48h à l'aide d'une méthode graphique (Appendice A) en utilisant un diagramme gaussien-logarithmique [178].

Suite à cette étape les solutions des tests sont immédiatement récupérées dans des flacons en plastique (de 100ml) et placées à -20°C pour l'analyse de NH_4^+ . Un test de toxicité au dichromate de potassium ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) est également effectué afin de tester la conformité physiologique de la souche de *Daphnia magna* utilisée (ISO 1996). Pour ce test, La norme ISO (1996) exige que la CI50-24h doit être comprise entre 0,6mg/l et 1,7 mg/l.

Les solutions mères des cations métalliques, sont préparées par dissolution des sels métalliques dans de l'eau distillée. Les sels utilisés sont : $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; $3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$. Les solutions d'essais sont obtenues par dilution des solutions mères dans l'eau de dilution.

Les concentrations du test définitif sont données dans le paragraphe réservé aux résultats.

4.2.5. Dosage de l'azote ammoniacal

Le dosage de l'azote ammoniacal a été effectué au niveau du laboratoire central de contrôle de la qualité de l'eau de l'entreprise de production et de distribution de l'eau potable d'Alger (E.P.E.AL).

La méthode de dosage utilisée est celle décrite dans la norme internationale ISO 7150/1 (1984) la méthodologie détaillée est donnée en appendice « C ».

4.2.6. Analyse statistique des résultats

4.2.6.1. Détermination de la CI50 par la méthode graphique

Les CI50 48h sont déterminées par la méthode probit décrite dans l'ouvrage de FINNEY, 1952. Pour cette méthode les régressions linéaires sont tracées sur un papier gaussien-logarithmique (voir Appendice « A ») .

4.2.6.2. Estimation de la relation entre deux variables [179]

Pour ces tests aigus nous avons eu recours à cette méthode afin de vérifier l'effet des concentrations métalliques croissantes sur la quantité d'azote ammoniacal rejetée. La méthode consiste à calculer le coefficient de corrélation puis à effectuer un test d'existence de relation entre deux variables (table des coefficients de corrélation représentée en Appendice C).

Le coefficient de corrélation est un paramètre qui exprime la relation entre deux variables.

Si on considère deux variables « x » et « y » le coefficient de corrélation est donné par la formule suivante :

$$r = \frac{[\sum x.y - (\sum x).(\sum y) / n]}{\left[\left(\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n} \right) \cdot \left(\sum y^2 - \frac{(\sum y)^2}{n} \right) \right]^{1/2}} \quad (2)$$

ou

n = nombre de valeurs de « x » et « y » considérées.

4.2.6.3. Test d'existence d'une relation entre deux variables :

L'objectif de ce test est de démontrer que la relation entre les deux variables exprimée par le coefficient de corrélation est significative.

On effectue le test d'existence d'une relation entre les deux variables « x » et « y » en calculant d'abord le coefficient de corrélation (r) puis en recherchant dans la table du coefficient de corrélation (appendice C) la valeur de « α » qui correspond à la valeur calculée de « r » et à " n-2 " degrés de liberté (n étant la taille de l'échantillon, c'est à dire le nombre de valeurs de « x » et de « y »).

Si $\alpha > 5 \%$ la relation n'est pas significative ; si $\alpha \leq 5 \%$ la relation est significative est α mesure son degré de signification.

4.3. Test de toxicité chronique

4.3.1. Matériel et méthodes

L'élevage des daphnies est effectué dans les mêmes conditions que celle décrite dans le paragraphe 4.2.2.

Les tests ont été effectués dans une chambre thermostatée ($T=20 \pm 2^{\circ}\text{C}$) avec une photopériode de 16 heures d'éclairage et 8 heures d'obscurité (même enceinte qui sert à la culture des microalgues) parallèlement à chaque test un test témoin est prévu. Pour chaque concentration de métal ainsi que pour le témoin, dix individus sont échantillonnés et placés séparément dans des béciers (10 béciers / concentration), pendant une durée de 21 jours (durée du test). Chaque bécier (figure 4.8) contient 100ml de milieu d'essai composé d'eau minérale diluée (milieu d'élevage) et d'un volume de la solution mère de toxique afin d'obtenir la concentration choisie. Les animaux sont nourris pendant les tests. Le suivi de la toxicité est effectué à l'aide des paramètres survie et reproduction qui sont déterminés tous les deux jours le milieu de test est renouvelé après chaque observation. Les solutions d'essais sont récupérées (après chaque changement du milieu des tests, tous les deux jours) et conservées à $- 20^{\circ}\text{C}$ dans des flacons en plastique en vue du dosage de l'azote ammoniacal.

Les daphnies utilisées pour les tests (réactif biologique) sont des crustacés âgés de moins de 24 heures, provenant de la 3^{ème} génération d'un élevage parthénogénétique effectué au laboratoire dans des conditions bien définies citées ci-dessus (identiques à celles décrits dans le cas du test aigu). Celles-ci doivent être âgées de moins de 24 heures et provenant de mères de même âge (environ 20 jours).

4.4. Analyse statistique

4.4.1. L'estimation

Elle consiste à estimer la valeur d'un paramètre inconnu à partir des valeurs d'un échantillon, cette estimation peut se faire soit en attribuant au paramètre inconnu la valeur la plus raisonnable possible compte tenu des observations, cela peut se faire par le calcul de la moyenne, soit en le situant dans un intervalle ayant de grandes probabilités de recouvrir la valeur inconnue (intervalle de confiance) [180].

4.4.1.1. Moyenne

Un groupe de mesures est souvent caractérisé par sa moyenne arithmétique (ou espérance mathématique), elle est notée \bar{x} et calculée par la formule suivante :

$$\bar{x} = \frac{\left(\sum_{i=1}^n x_i \right)}{n} \quad (3)$$

Où : n est l'effectif de l'échantillon (N^{bre} de valeurs composant l'échantillon).

Après avoir défini la moyenne arithmétique, il importe de préciser de quelle manière les valeurs s'en écartent, pour cela on peut calculer certains paramètres appelés paramètres de dispersion qui sont notamment la variance et l'écart type.

4.4.1.2. La variance

La variance est la moyenne arithmétique des carrés des écarts par rapport à la moyenne, elle est notée "S²" et obtenue par la formule suivante [180] :

$$s^2 = \left(\frac{1}{n} \right) \cdot \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \quad (4)$$

4.4.1.3. L'écart type

L'écart type ou déviation standard est la racine carrée de la variance on peut distinguer l'écart type observé et l'écart type estimé [180].



Figure 4.7 : Cristallisoirs utilisé pour l'élevage des Daphnies



Figure 4.8 : Dispositif expérimental du test de toxicité à long terme

- A droite : cristallisoirs d'élevage des Daphnies
- A gauche : Becher de test

L'écart type observé est donné par la formule suivante:

$$\sigma = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n} \right]^{1/2} \quad (5)$$

L'écart type estimé est donné par la formule suivante:

$$s = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{(n-1)} \right]^{1/2} \quad (6)$$

4.4.1.4. Intervalle de confiance

L'estimation par intervalle de confiance est choisie de telle façon que l'intervalle ait $(1-\alpha)$ probabilités de recouvrir la vraie valeur.

a. Intervalle de confiance d'un pourcentage

L'intervalle de confiance d'un pourcentage peut être établi en appliquant la formule approchée suivante :

$$p_0 \pm |\xi| \cdot \left(\frac{p_0 \cdot q_0}{n} \right)^{1/2} \quad (7)$$

Où :

ξ est la valeur maximale de la variable normale réduite correspondant au risque " α ". d'après la table (Appendice C) pour $\alpha=5\%$ (0,05) $\xi = 1,96$.

" p_0 " et " q_0 " sont respectivement les pourcentage d'un événement et de son contraire par exemple pour la survie si $p_0 = 90\%$ alors $q_0 = 10\%$.

b. Intervalle de confiance d'une moyenne

L'intervalle de confiance d'une espérance mathématique (moyenne) est défini dans le cas des échantillons de petite taille ($n < 30$) par

$$m \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}} \cdot \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (8)$$

avec :

$t_{1-\alpha/2}$: tirée de la table de Student (Appendice C) à "n-1" degrés de liberté (par exemple pour un risque " α " choisi tel que $\alpha=0,05$ on prend $t_{0,975}$).

s: est l'écart type estimé donné par l'équation (6).

n: nombre de valeurs composant l'échantillon (effectif ou taille de l'échantillon).

4.4.2. les tests

Pour l'analyse des données de tests on cherche à dire si au vu des résultats observés sur un ou plusieurs échantillons on peut accepter ou rejeter certaines hypothèses. Ceci est le cas par exemple de la comparaison des moyennes de plusieurs populations [180].

4.4.2.1. Analyse de la variance à un critère de classification (ANOVA)

L'analyse de la variance à un critère de classification ou à un facteur a pour but de comparer les moyennes de plusieurs populations.

Ce test est basé sur la vérification du rapport entre le carré moyen factoriel et le carré moyen résiduel, ce rapport noté F_{obs} est une variable de Snedecor à $v_1 = p-1$ et $v_2 = n-p$ degrés de liberté (table donnée en appendice C). Lorsque $F_{obs} > F_{1-\alpha}$ (valeur donnée par la table pour un risque $\alpha = 0,05$ dans notre cas) alors on peut affirmer avec un risque d'erreur de 5 % ($p < 0,05$) qu'il existe une différence significative entre les échantillons à comparer. Le carré moyen résiduel est fonction des écarts existant entre les valeurs observées et la moyenne de l'échantillon correspondant (pour un même échantillon). L'écart quadratique factoriel est fonction des écarts entre les moyennes des différents échantillons et la moyenne générale.

Le test ANOVA a été appliqué à l'aide du logiciel STAT-ITCF.

4.4.2.2. Les comparaisons multiples des moyennes :

Lorsqu' à l'issue de l'analyse de la variance, on rejette l'hypothèse d'égalité des moyennes, on doit déterminer quelles sont parmi les moyennes considérées celles qui diffèrent significativement.

Pour cela on fait appel à différents tests dits de comparaisons multiples.

Dans notre étude nous avons utilisé plusieurs tests à savoir le test de Newman et Keuls, le test de Dunett, le test de Bon Ferroni et le test de Mann whitney.

Les tests de Newman et Keuls, Dunett et Bon ferroni ont également été appliqués grâce au logiciel STAT-ITCF.

4.4.2.3. Test de Newman et Keuls [180]

Ce test consiste à comparer la valeur de la différence (amplitude) entre les moyennes de deux échantillons (s'il y'a plus de deux échantillons la comparaison se fait pour chaque couple d'échantillons séparément) avec la valeur de la plus petite amplitude significative (ppas) relative à l'ensemble des échantillons considérés. Si cette différence (amplitude) est inférieure à la valeur de la (ppas), alors on peut affirmer il n'y a pas de différence significative entre les deux échantillons avec un seuil d'erreur inférieur à 5% ($p < 0,05$), la valeur de la (ppas) étant calculée en utilisant une constante tirée de la table de Newman et Keuls (Appendice C) pour $\alpha = 0,05$ (seuil d'erreur).

4.4.2.4. Test de Dunett [180]

Le test de Dunett est basé sur le même principe que celui de Newman et Keuls, c'est à dire sur la comparaison des amplitudes observées pour deux ou plusieurs moyennes avec la valeur de la (ppas) qui est calculée avec une constante tirée de la table de Dunett (Appendice C) pour α (seuil d'erreur) = 0,05 ($p < 0,05$).

4.4.2.5. Test de Bon Ferroni [180]

Tout comme les tests de Newman et Keuls, et de Dunett, le test de Bon Ferroni est également basé sur la comparaison des amplitudes observées pour les moyennes des différents échantillons à comparer avec la valeur de la (ppas) calculée avec une constante donnée par la table de Student (Appendice C) pour α (seuil d'erreur) = 0,05 ($p < 0,05$).

4.4.2.6. Test de Mann whitney [181]

Le test de Mann whitney est utilisé afin de comparer deux échantillons (02 groupes de valeurs) ; il est basé sur la somme des rangs obtenus suite au classement (croissant ou décroissant) des valeurs composant les deux échantillons confondus. Ce test abouti au calcul de la valeur d'une variable notée "Z" qui sera comparée à la valeur de cette même variable donnée par une table (Appendice C) pour α (seuil d'erreur) = 0,05. Si $Z_{cal} < Z_{table}$ alors on peut affirmer avec un seuil d'erreur inférieur à 5% ($p < 0,05$) qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux échantillons.

4.4.3. LOEC et NOEC [81], [78], [82], [40]

Ces deux paramètres sont déduits du test de Newman Keuls (qui s'est révélé être le plus sensible de tous les tests utilisés), ils permettent d'estimer le seuil de toxicité pour une substance donnée (ex^{pl}e de détermination donné en Appendice A).

4.4.4. Effets de la durée des tests et des paramètres statistiques sur l'évaluation des seuils de toxicité

Plusieurs auteurs (BIESINGER et CHRISTENSEN 1972, VAN LEEUWEN *et al.*, 1985 ; SUEDEL *et al.*, 1996 ; SUEDEL *et al.*, 1997 ; BARATA *et al.*, 1999 ; ROBINSON, 1999) s'accordent à dire que les seuils de toxicité (NOEC et LOEC) dépendent de la durée des tests, en effet ces auteurs ont constaté que plus la durée des tests était longue plus le seuil de toxicité diminuait ; néanmoins NEBEKER, 1982 affirme que la durée de 21 jours est la plus adéquate pour déterminer les effets à long terme des toxiques sur la survie et la reproduction de *Daphnia magna*.

D'autre part GUILHERMINO *et al.*, (1999) ainsi que SHIEH *et al.*, (2001) estiment que la NOEC et la LOEC ne sont pas de bons indicateurs de la toxicité d'une substance et cela notamment en raison du fait que leurs valeurs dépendent de la gamme de concentrations choisie et surtout de l'espacement de cette gamme c'est à dire les différences entre les concentrations testées. Ces auteurs préfèrent évaluer la toxicité à partir d'une modélisation mathématique (régression linéaire et non linéaire).

4.4.5. Interpolation polynomiale :

Pour déterminer les CL50-21jours des différents métaux testés, nous avons eu recours à l'interpolation polynomiale, cette méthode consiste à utiliser des courbes tracées à l'aide de valeurs (points) obtenues expérimentalement, pour déterminer des valeurs intermédiaires inconnues [184], [185].

Ainsi nous avons en utilisant le logiciel "ORIGIN" tracé à l'aide de points (déterminés par des couples de valeurs obtenues expérimentalement), les courbes (figures 2, 3 et 4 Appendice A) représentatives de la variation du pourcentage de survie après 21 jours, en fonction des différentes concentrations des métaux testés (cadmium, cuivre et nickel), puis nous avons déterminé à partir de ces courbes les valeurs des concentrations métalliques qui occasionnent la mort de 50 % des individus en 21 jours, c'est à dire les CL50-21jours. (la méthode détaillée est donnée en Appendice A).

Le logiciel "ORIGIN" établit les courbes donc l'approximation des polynômes en utilisant le critère des moindres carrés.

4.4.5.1. Principe de l'approximation par un polynôme déterminé par le critère des moindres carrés [186]

Le principe consiste à tracer une courbe continue passant le plus près possible de tous les points relevés. Ainsi dans le cas où nous avons une fonction empirique (expérimentale), déterminée par "N" couples de valeurs "a₁, b₁" ; "a₂, b₂" ; "a_N, b_N" ("a" l'abscisse et "b" l'ordonnée).

La fonction d'approximation sera un polynôme de la forme :

$$Y = C_1 \cdot X^p + C_2 \cdot X^{p-1} + C_3 \cdot X^{p-2} + \dots + C_p \cdot X + C_{p+1} \quad (9)$$

Ce polynôme est déterminé par la condition de passer le plus près possible des "N" points (issus des valeurs expérimentales).

Il faut calculer la distance du polynôme à chaque point, c'est à dire l'erreur commise en chaque point, puis déterminer les coefficients du polynôme en minimisant l'erreur quadratique.

On aura donc aux points "a₁, b₁" ; "a₂, b₂" ;..... "a_N, b_N" les erreurs :

$$\begin{aligned}\xi_1 &= b_1 - \left[C_1 \cdot (a_1)^p + C_2 \cdot (a_1)^{p-1} + C_3 \cdot (a_1)^{p-2} + \dots + C_p \cdot a_1 + C_{p+1} \right] \\ \xi_2 &= b_2 - \left[C_1 \cdot (a_2)^p + C_2 \cdot (a_2)^{p-1} + C_3 \cdot (a_2)^{p-2} + \dots + C_p \cdot a_2 + C_{p+1} \right] \\ \xi_N &= b_N - \left[C_1 \cdot (a_N)^p + C_2 \cdot (a_N)^{p-1} + C_3 \cdot (a_N)^{p-2} + \dots + C_p \cdot a_N + C_{p+1} \right]\end{aligned}\quad (10)$$

l'erreur quadratique sera :

$$E = \sum_{i=1}^N (\xi_i)^2 \quad (11)$$

Les conditions pour que "E" soit minimum seront alors :

$$\frac{\partial E}{\partial C_1} = \frac{\partial E}{\partial C_2} = \frac{\partial E}{\partial C_3} = \dots = \frac{\partial E}{\partial C_{p+1}} = 0 \quad (12)$$

Ce qui s'écrit :

$$\begin{aligned}C_1 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p} + C_2 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p-1} + C_3 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p-2} + \dots + C_p \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{p+1} + C_{p+1} \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^p &= \sum_{i=1}^N b_i \cdot (a_i)^p \\ C_1 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p-1} + C_2 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p-2} + C_3 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p-3} + \dots + C_p \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^p + C_{p+1} \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{p-1} &= \sum_{i=1}^N b_i \cdot (a_i)^{p-1} \\ C_1 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p-2} + C_2 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p-3} + C_3 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{2p-4} + \dots + C_p \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{p-1} + C_{p+1} \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{p-2} &= \sum_{i=1}^N b_i \cdot (a_i)^{p-2} \\ C_1 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^p + C_2 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{p-1} + C_3 \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^{p-2} + \dots + C_p \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^1 + C_{p+1} \cdot \sum_{i=1}^N (a_i)^0 &= \sum_{i=1}^N b_i \cdot (a_i)^0\end{aligned}$$

Les coefficients C₁, C₂, C₃,.....C_N sont les solutions de ce système d'équations linéaires. Ainsi donc si on veut retrouver l'équation du polynôme à partir des valeurs expérimentales (a_N,b_N) il faut poser le système d'équations ci-dessus et le résoudre pour trouver les coefficients (C₁;C₂;.....C_N). un exemple d'application est donné en Appendice A.

CHAPITRE 5

RESULTATS EXPERIMENTAUX

5.1. Résultats expérimentaux

Les tests de toxicité aiguë ont été effectués afin d'évaluer les effets à court terme du cadmium, cuivre, nickel et dichromate de potassium ($K_2Cr_2O_7$ utilisé comme produit de référence dans les tests de toxicité) sur *Daphnia magna* en prenant en considération le paramètre la concentration inhibitrice après 48 heures d'exposition CI_{50} 48h. Les CI_{50} 48h déduites pour les différents métaux sont données dans le tableau 5.1.

Tableau 5.1: Déterminations des CI_{50} 48h

Metal	$K_2Cr_2O_7$	Cd^{++}	Cu^{++}	Ni^{++}
CI_{50} 48h ($mg.L^{-1}$)	0,9	0,09	0,08	2,95

D'après les résultats obtenus nous constatons que les valeurs de la CI_{50} 48h pour le dichromate de potassium, le cadmium, le cuivre et le nickel sont respectivement égales à 0,9 ($mg.L^{-1}$), 0,09 ($mg.L^{-1}$), 0,08 ($mg.L^{-1}$) et 2,95 ($mg.L^{-1}$), de ces résultats nous pouvons dans un premier temps établir une classification des métaux sur la base de la toxicité décroissante, cette classification est telle que $Cu > Cd > K_2Cr_2O_7 > Ni$.

L'ordre de toxicité ($Cu > Cd > Ni$) établi dans notre étude est conforme à celui retrouvé par certains auteurs ayant effectué des tests de toxicité aiguë dans des conditions expérimentales plus ou moins similaires [64], [75], [34], [35]. A titre comparatif nous présentons dans le tableau 5.2 les résultats de différentes études sur la toxicité à court terme de différents cations métalliques et dont les conditions expérimentales sont indiquées dans ce même tableau.

Tableau 5.2: Evaluations des CI50 48h par différents auteurs.

Conditions expérimentales	Auteurs						
	Présente étude	Biesinger et Christensen (1972)	Khangarot et Ray (1989)	Belabed et Kestali (1992)	Taylor <i>et al.</i> (1998)	Suedel <i>et al.</i> (1996)	Suedel <i>et al.</i> (1997)
âge des animaux	<24 heures	<24 heures	<24 heures	<72 heures	<24 heures	<24 heures	<24 heures
Durée du test	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures	48 heures
Température	20 ± 2°C	18 ± 1°C	11,5 à 14,5 °C	20 ± 2°C	20 °C	20 ± 1°C	20 ± 1°C
Eclairage pendant le test	Obscurité	16h/8h	-	Obscurité	16h/8h	16h/8h	16h/8h
Origine de l'eau	Synthétique	Naturelle (eau de lac)	Naturelle (eau de puits)	synthétique	Synthétique	Naturelle	Naturelle
Dureté totale (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	250	45,3	240	250	-	80	80
Aliment utilisé pendant les tests	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	<i>Chlorella vulgaris</i>	Aucun	Aucun
Métal	CI50 48h (mg.L ⁻¹)						
Cd	0,090	0,065	1,88	0,005	0,13	-	0,0264
Cu	0,08	0,009	0,093	0,032	-	0,0113	-
Ni	2,59	0,51	7,59	2	-	-	-

A partir de cet aperçu bibliographique nous notons que les valeurs des CI50 48h retrouvées dans notre étude sont inférieures à celles retrouvées par KHANGAROT et RAY (1989) et par contre supérieures à celles de BIESINGER et CHRISTENSEN (1972) et SUEDEL *et al.*,1996,1997. Nous pensons que ces différences sont certainement liées aux différences dans les conditions expérimentales et en particulier, aux conditions d'élevage (nourriture et éclairage) [58], [60], [187], [59], [108], [188], [189].

Nous remarquons également que la dureté pourrait influencer la toxicité d'une substance dans l'eau ceci est d'ailleurs confirmé par (MULLER 1980) dans une étude comparative de trois protocoles expérimentaux (DIN, ISO et ASTM) de tests de toxicité aigue. Les études de (DAVIES *et al.*,1978 ; CALAMARI *et al.*,1980 ; STENDAHL et SPRAGUE,1982 ; ZAUKE,1982 ; AJMAL et ULLAH KHAN,1984 ; POLPRASERT, 1982 ; WINNER,1985 ; KLUTTGEN et RATTE,1994 ; SUEDEL *et al.*,1997 ; ERICKSON *et al.*,1998) ont démontré que la toxicité des métaux lourds vis à vis des organismes aquatiques est inversement proportionnelle à la dureté de l'eau. Selon ces différents auteurs ce phénomène est du à plusieurs facteurs qui relèvent soit de la chimie soit de la biologie.

Les facteurs chimiques consistent d'une part en la compétition entre les ions des métaux lourds et les ions de calcium et de magnésium pour les sites de liaison sur les biomolécules [56], [190], [110], [63] notamment la compétition entre Cu^{++} et Ca^{++} [110] ou encore entre Cd^{++} et Ca^{++} [56], [63].

D'autre part en plus du phénomène de compétition, les cations métalliques libres qui sont les principaux responsables des effets toxiques sur les organismes aquatiques [44], [65] peuvent subir une complexation par les anions tels que les bicarbonates et les chlorures [62], [34], [68].

Les facteurs biologiques s'expliquent d'une part par le fait que le calcium joue un rôle essentiel dans les phénomènes de perméabilité cellulaire, cet élément a pour effet de diminuer la perméabilité des membranes cellulaires à l'eau et aux électrolytes [99], [50], [45], [48], [63]. La concentration cellulaire en calcium étant proportionnelle à la dureté de l'eau les cellules seront plus riches en calcium et donc plus imperméables aux ions métalliques toxiques dans les eaux ayant une dureté importante.

D'autre part les invertébrés aquatiques notamment ceux peuplant les eaux douces accomplissent un processus d'osmorégulation (régulation de la pression osmotique), lequel consiste en un échange permanent (perte et absorption) de cations tels que le calcium, le sodium et le potassium avec le milieu environnant [135]. L'absorption de ces cations se fait par transport actif à travers des microcanaux qui leurs sont spécifiques ainsi, les cations métalliques toxiques ayant une taille similaire à celle de ces cations vitaux pourront être également absorbés au travers de ces microcanaux par le même processus. Nous citons en exemple les cas du calcium et du cadmium qui ont des tailles similaires de respectivement 114 pm et 109 pm [112], [36]. Il est admis aussi que dans les milieux ayant une dureté élevée, le calcium inhibe l'absorption du cadmium par cette voie et réduit donc son effet toxique [44].

Cependant SUEDEL *et al.*, (1996), (1997) (tableau 5.2) avec des milieux d'essais ayant des duretés égales à 80 mg.L^{-1} CaCO_3 obtiennent des CI_{50} 48h égales à 0,0113 mg Cu.L^{-1} et 0,0264 mg Cd.L^{-1} c'est-à-dire inférieures à celles obtenues dans notre étude.

Cette constatation devrait mettre en évidence une autre cause du phénomène de la variabilité des résultats et qui serait due à la salinité qui impliquerait la complexation et la formation d'éléments tels que CdCl^+ .

En effet des études ont démontré que la toxicité des métaux lourds vis à vis des organismes aquatiques était inversement proportionnelle à la salinité de l'eau en raison de la complexation des cations métalliques par les anions inorganiques notamment par les chlorures [67], [68]. La toxicité est également inversement proportionnelle à l'alcalinité, les cations métalliques pouvant être complexés par les carbonates (CO_3^{2-}) et les bicarbonates (HCO_3^-) [71], [43], [51].

KHANGAROT et RAY (1989) ont utilisé comme milieu d'essai une eau naturelle (eau de puits) ayant une dureté de $240 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ c'est à dire équivalente à celle de notre milieu. La différence entre les résultats dans ce cas exprime une baisse de la toxicité dans l'eau naturelle ce qui est d'ailleurs démontré par VAN LEEUWEN *et al.* (1985) qui trouvent que *Daphnia magna* est plus sensible dans les milieux synthétiques que dans les eaux naturelles, ainsi que par JANA et PAL, 1983 qui ont abouti à la même constatation avec *Daphnia carinata*.

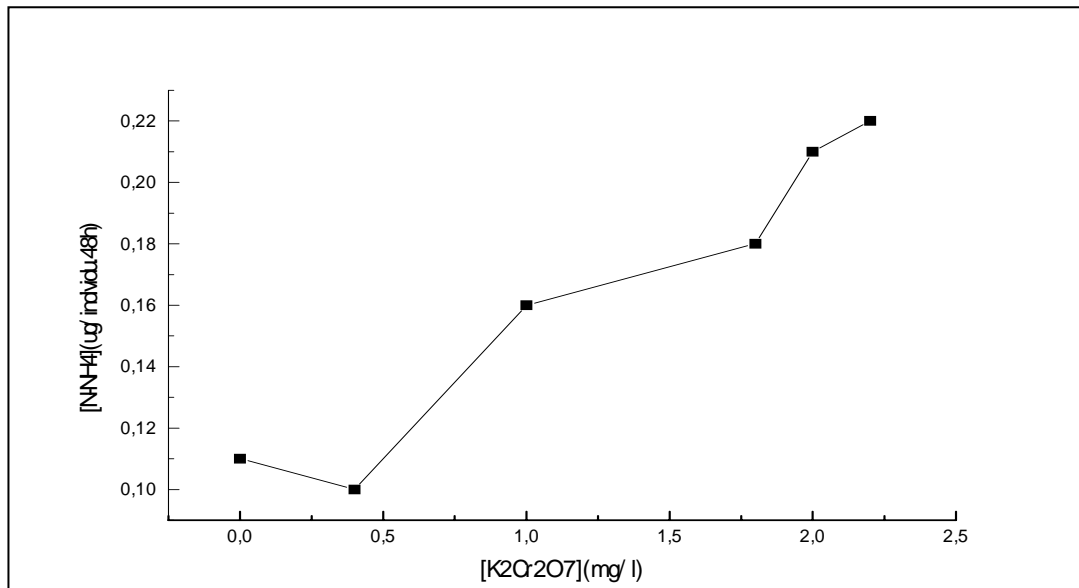
Dans l'étude de BELABED et KESTALI (1992) le cadmium s'est avéré plus toxique que le cuivre alors que les effets du nickel sont très proches de ceux que nous avons obtenus.

Bien que les essais de TAYLOR *et al.* (1998) ont été effectués avec ajout de nourriture, leur CI_{50} 48h relative au cadmium s'est révélée proche de la CI_{50} 48h de nos travaux. Cette constatation n'est pourtant pas en rapport avec les observations d'ERICKSON *et al.* (1998) qui montrent que la présence de matières en suspension dans l'eau réduit la toxicité des métaux lourds vis à vis de *Daphnia magna*.

Les résultats relatifs à l'analyse des excréments de l'azote ammoniacal (tableaux 5 à 8, appendice « B ») sont illustrés par les représentations graphiques (Figures 5.1, 5.2, 5.3, et 5.4).

Le milieu expérimental utilisé (eau de dilution) est totalement exempt d'azote ammoniacal (voir composition de l'eau de dilution paragraphe 4.2.4).

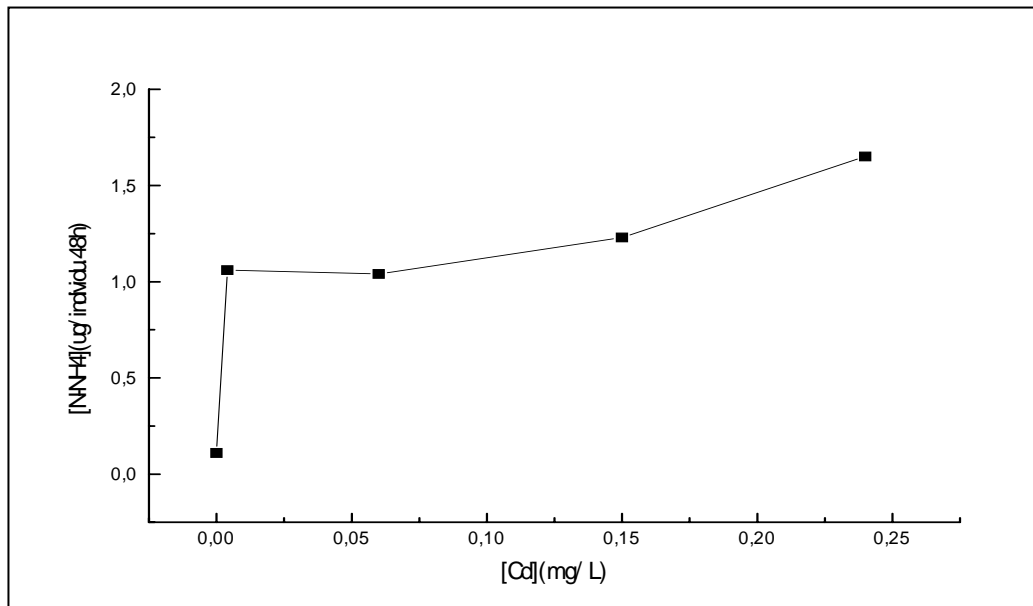
Les graphiques expriment la quantité moyenne d'azote ammoniacal (en μg) rejetée par individu exposé pendant 48 heures aux différentes concentrations de métaux.



$p < 0,01$

Figure 5. 1: Quantité d'azote ammoniacal rejetée par daphnie en 48 heures en fonction des différentes concentrations de dichromate de potassium (test de toxicité aiguë).

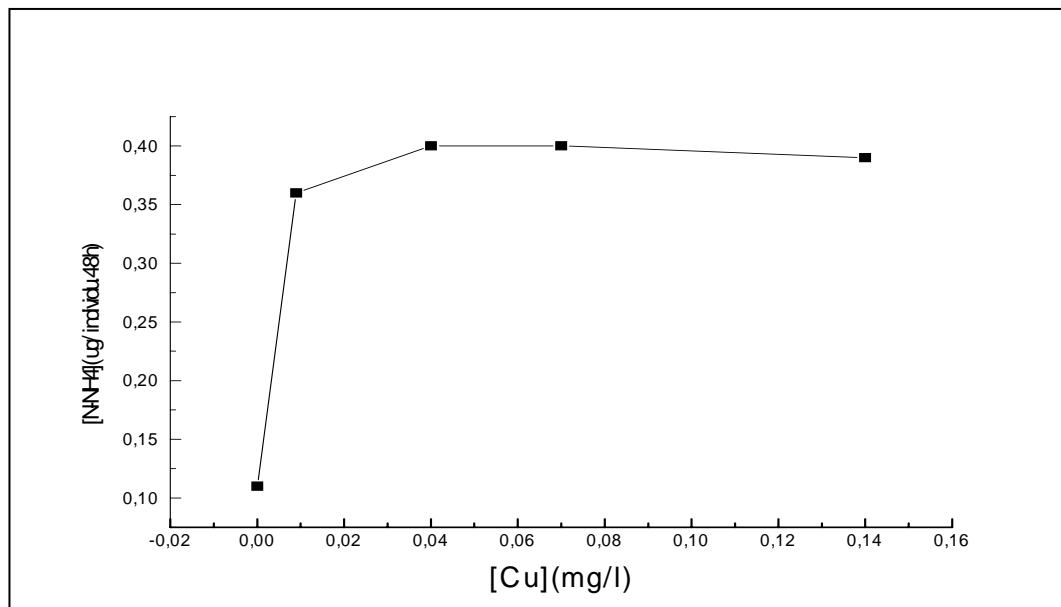
P : probabilité d'erreur $< 0,01$ pour deux réponses significativement différentes.



$p < 0,05$

Figure 5. 2: Quantité d'azote ammoniacal rejetée par daphnie en 48 heures en fonction des différentes concentrations de cadmium (test de toxicité aiguë).

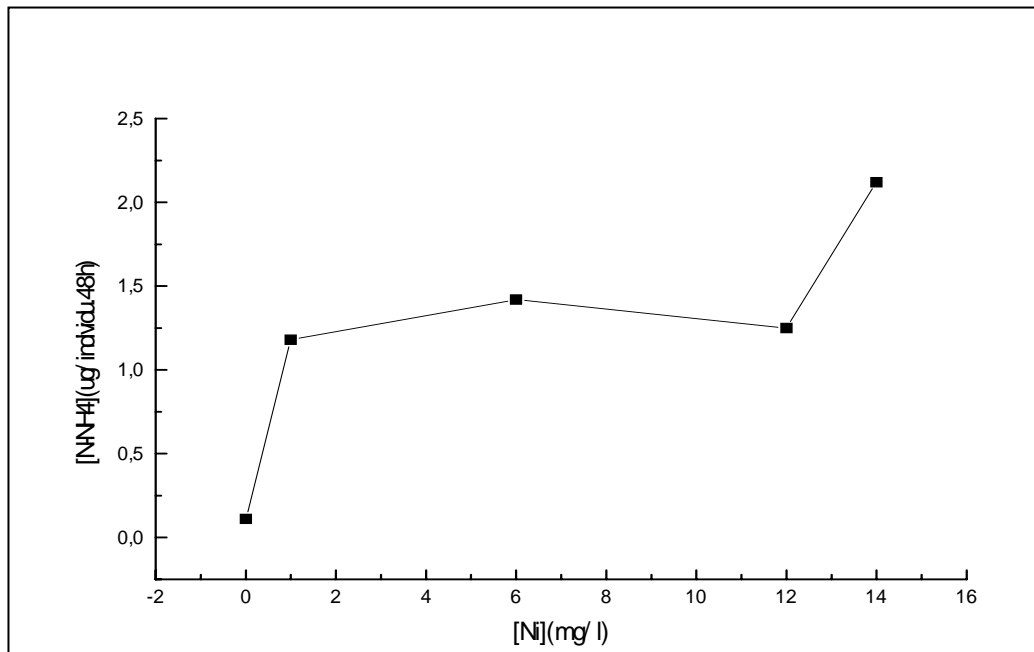
P : probabilité d'erreur $< 0,05$ pour deux réponses significativement différentes.



$p < 0,05$

Figure 5. 3: Quantité d'azote ammoniacal rejetée par daphnies en 48 heures en fonction des différentes concentrations de cuivre (test de toxicité aiguë).

P : probabilité d'erreur $< 0,05$ pour deux réponses significativement différentes.



$p < 0,05$

Figure 5.4: Quantité d'azote ammoniacal rejetée par daphnie en 48 heures en fonction des différentes concentrations de nickel (test de toxicité aiguë).

P : probabilité d'erreur $< 0,05$ pour deux réponses significativement différentes.

De ces représentations graphiques nous observons une augmentation de N-NH_4 excrété pendant 48 heures lorsque les concentrations en cations métalliques augmentent.

L'absence totale de l'azote ammoniacal dans les milieux expérimentaux devrait limiter la présence de N-NH_4 dans les différents milieux d'essais strictement aux excréments des daphnies. Ces résultats de tests de toxicité aiguë semblent être prometteurs pour l'utilisation du rejet d'ammoniac comme révélateur de toxicité.

Suite à ces résultats, nous nous proposons d'entreprendre des essais à long terme à l'aide d'un test prolongé de 21 jours afin d'examiner les excréments de *Daphnia magna* en présence de Cd, Cu et Ni.

5.2. Tests de toxicité à long terme

Les tests de toxicité à long terme permettent d'évaluer les effets toxiques produits par l'exposition chronique à des concentrations sublétales de substances polluantes qui peut provoquer la mort des organismes et/ou des troubles de la reproduction.

Pour le test prolongé de 21 jours, plusieurs propositions concernant les protocoles expérimentaux ont été proposées (l'Association Française de Normalisation AFNOR, Organization for Economic Cooperation and Development OCDE et l'International Standard Organization ISO).

A ce sujet et à titre d'exemple, sont présentées dans le tableau 5.3 les différences dans les modalités de culture des daphnies préconisées par différents organismes.

Tableau 5.3: Les conditions d'élevage de *Daphnia magna* proposées par les différents organismes.

Conditions	Organisme		
	DIN	ISO	ASTM(EPA)
Température	20 ± 2°C	20 ± 2°C	17 ± 1°C
Origine de l'eau	Synthétique	Synthétique	Synthétique
Dureté totale (mg.L ⁻¹ CaCO ₃)	260	250	40

DIN: German standardization organization.

ASTM: American Society of Testing and Materials.

EPA: American Environmental Protection Agency.

En Algérie, une étude écotoxicologique de certaines substances toxiques et certains effluents industriels a été réalisée par SEMSARI, 1992.

L'objectif de cette deuxième partie de notre étude est d'une part l'évaluation des effets à long terme de Cd²⁺, Cu²⁺, Ni²⁺ sur la survie et la reproduction vis-à-vis de *Daphnia magna*.

Pour ce faire, nous proposons une méthodologie (chapitre matériel et méthode) et des conditions opératoires largement inspirées de la revue bibliographique (ISO, 1999, OCDE, 1995).

Dans ce cadre, nous nous proposons de mettre au point à l'aide du modèle expérimental utilisé d'examiner si les rejets d'ammoniaque sont révélateurs de la toxicité des cations métalliques susceptibles de révéler la toxicité sublétales de certains métaux.

5.3. Résultats et Discussions

Les critères biologiques considérés pour cette étude sont : la survie, la reproduction, et l'excrétion d'azote ammoniacal. Les résultats concernant les effets à long terme (test 21 jours) du cadmium du cuivre et du nickel sur ces paramètres sont donnés dans les graphes illustrés par les figures (5.5 à 5.13). Les LOEC et NOEC sont également indiqués sur ces figures et sont donnés dans les tableaux 5.4, 5.6 et 5.10 les CL50 21j sont données dans le tableau 5.5. Les résultats détaillés sont présentés dans les tableaux (9 à 26 en appendice « B »). Nous rappelons que le test bichromate de potassium n'a été utilisé que dans le cas du test aigu, le $K_2Cr_2O_7$ est considéré comme élément de référence pour tester l'homogénéité des daphnies utilisées (ISO,1996).

5.3.1. Survie

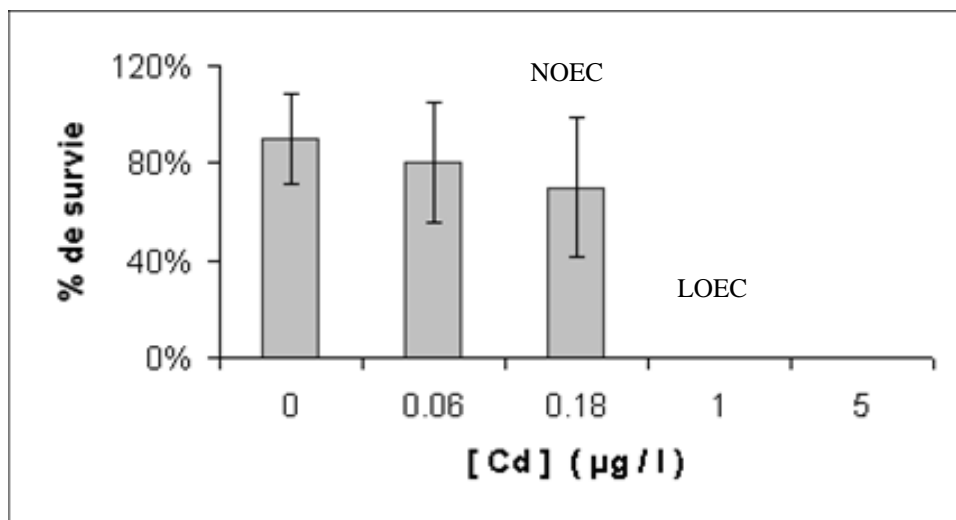


Figure 5.5: Pourcentage de survie après 21 jours cas du cadmium (valeur moyenne avec intervalle de confiance à 95%) avec la NOEC et LOEC.

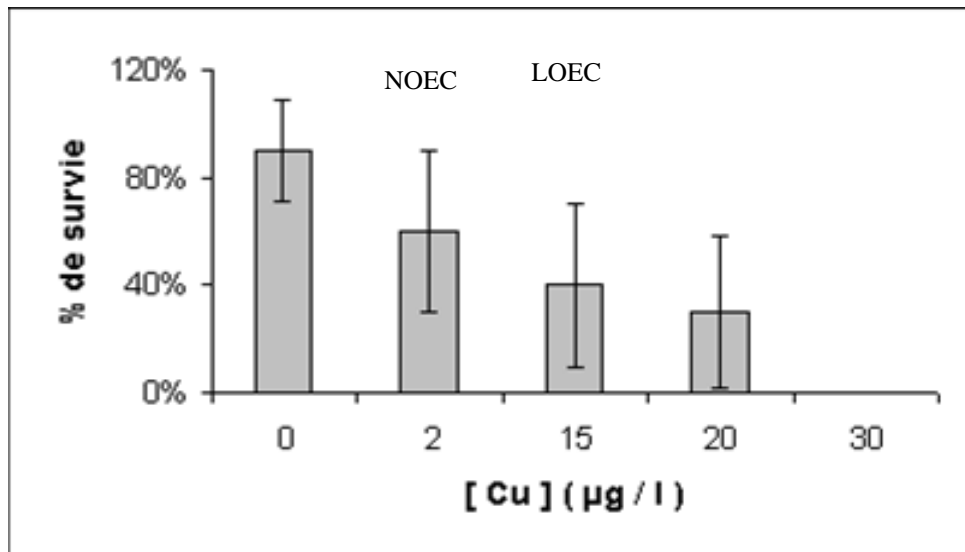


Figure 5.6: Pourcentage de survie après 21 jours cas du cuivre (valeur moyenne avec intervalle de confiance à 95%) avec la NOEC et LOEC.

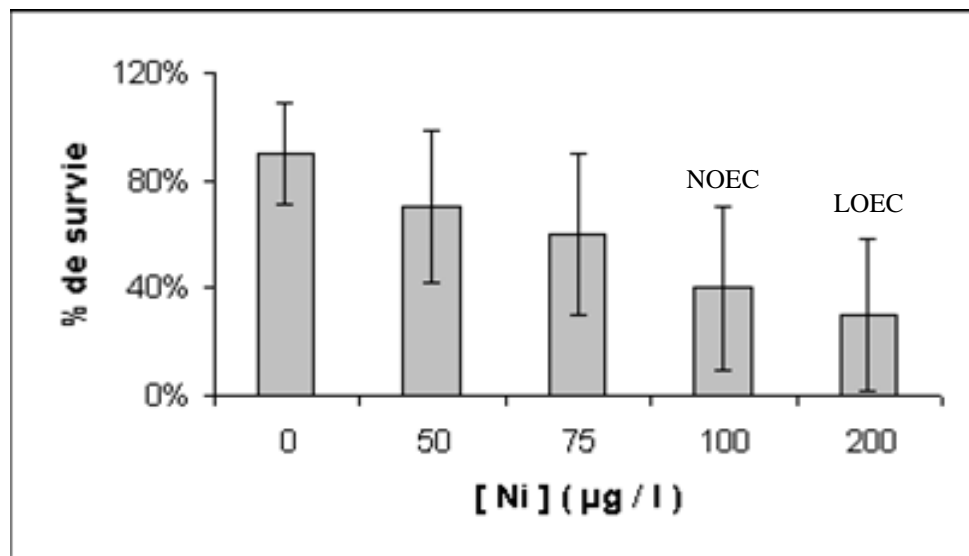


Figure 5.7: Pourcentage de survie après 21 jours cas du nickel (valeur moyenne avec intervalle de confiance à 95%) avec la NOEC et LOEC.

Tableau 5.4: NOEC et LOEC du paramètre survie pour les différents métaux testés.

Cd		Cu		Ni	
NOEC ($\mu\text{g/l}$)	LOEC ($\mu\text{g/l}$)	NOEC ($\mu\text{g/l}$)	LOEC ($\mu\text{g/l}$)	NOEC ($\mu\text{g/l}$)	LOEC ($\mu\text{g/l}$)
0,18	1	2	15	100	200

Tableau 5.5: CL50 21j obtenue pour les différents métaux testés.

Métal	CL50 21j ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
Cd	0,37
Cu	10,95
Ni	90,70

D'après les résultats du test de Bonferroni ; les LOEC ainsi déterminées indiquent des effets significatifs ($p < 0,05$) pour les concentrations métalliques respectives suivantes : $1\mu\text{gCd}^{++}.\text{L}^{-1}$; $15\mu\text{gCu}^{++}.\text{L}^{-1}$; $200\mu\text{gNi}^{++}.\text{L}^{-1}$. Cette constatation nous permet également d'établir un classement de ces métaux par ordre de toxicité décroissante et qui est :

$\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Ni}$.

Par ailleurs, nous notons de la revue bibliographique, des variations inter et intralaboratoires sur les réponses du test 21 jours utilisant *Daphnia magna*. En effet (TAYLOR *et al.*,1998 ; KLEIN,2000 et KNOPS *et al.*,2001) indiquent que ces variabilités sont liées aux types de nourritures qui est fournie aux daphnies pour leur élevage.

Plusieurs auteurs (GIESY *et al.*,1977 ; RAINBOW et DALLINGER,1993 ; COQUERY et WELBOURN, 1995 ; RAINBOW, 1997 ; MUSIBONO et DAY,1999 ; BARATA *et al.*,1999 ; PARKINSON *et al.*,2001) soulignent que la présence de matière organique dans les solutions expérimentales peut être la cause de la complexation des métaux lourds.

VAN LEEUWEN *et al.*,1985 qui ont effectué une étude sur la toxicité à long terme du cadmium vis à vis de *Daphnia magna* dans différents types de milieux d'essais ont obtenu des CL50-21 jours de respectivement $2,2\mu\text{g.L}^{-1}$ avec un milieu d'essai

synthétique et de $14 \mu\text{g.L}^{-1}$ avec une eau de lac grossièrement filtrée ce qui peut confirmer l'effet de la qualité de l'eau sur la toxicité des métaux lourds.

Néanmoins il est à noter que les phénomènes de complexation des cations métalliques par la matière organique ainsi que leur adsorption par les matières en suspension ne sont favorisés que dans le cas des pH neutres ou relativement basiques, les pH faibles (acides) provoquent plutôt la dissolution des cations métalliques [194], [195], [49], [50], [43], [65], [196], [51].

La présence d'algues constitue également un support d'échange de cations métalliques [3], [26], [35], [66], [196], [7]. Il s'agit du phénomène d'adsorption qui est dû à l'existence sur la membrane cellulaire de sites d'échange chargés négativement tels que les groupements amines, phosphoryles sulfhydryles, et carboxyliques, ces sites d'échange permettent la création de liaisons entre les cations métalliques et la surface de la cellule [66], [196], [197].

TAYLOR *et al.*, 1998 affirment que la quantité de cations métalliques absorbée par cellule algale dépend essentiellement de la taille et de la forme de la cellule, ainsi l'espèce d'algues utilisée pour nourrir les individus lors des tests de toxicité influe sur la quantité de cations absorbée par voie digestive.

Néanmoins la quantité de métaux absorbés par cette voie reste moins importante que celle absorbée via les surfaces perméables du corps et ceci notamment chez les crustacés [35]. De plus chez les daphnies les effets toxiques provoqués par les métaux absorbés par l'intermédiaire des algues sont très faibles comparés à ceux engendrés par les cations métalliques libres adsorbés puis absorbés à travers les surfaces perméables du corps [44], [35].

ENSERINK *et al.*, 1993 et SANTOJANNI *et al.*, 1995 ont étudié les effets provoqués à long terme par le cadmium sur la survie de *Daphnia magna* ils ont trouvé des CL₅₀₋₂₁ jours de respectivement $3,3$ à $8,3 \mu\text{g Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$ et $4,5 \mu\text{g Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$ pour des milieux expérimentaux de duretés respectives de $225 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ et $250 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$. Nos résultats (tableau 5.5) ont conduit à une CL_{50 21j} de $0,37 \mu\text{g Cd}^{++}.\text{L}^{-1}$ obtenue pour une dureté des milieux d'essais de $120 \text{ mg.L}^{-1} \text{ CaCO}_3$ ce qui confirme davantage l'effet de la dureté sur la toxicité métallique pour un test de 21 jours.

D'autre part les paramètres physico-chimiques (qualité de l'eau utilisée comme milieu d'essai, alimentation, éclairage, température) ne sont pas les seuls à influencer sur les résultats des tests de toxicité, les caractéristiques génétiques de l'espèce testée doivent également être prises en considération. En effet BARATA *et al.*,1999 ont démontré que la sensibilité des différents clones de *Daphnia magna* par rapport aux métaux lourds n'était pas la même et ce aussi bien dans les tests de toxicité aiguë qu'à long terme. Ces auteurs affirment également que la toxicité du cadmium vis à vis de *Daphnia magna* dépend plus des facteurs génétiques (type de clone utilisé) que des paramètres physico-chimiques, ceci est confirmé par plusieurs auteurs [59], [79], [198], [76], [41]. Ces auteurs recommandent l'utilisation de femelles parthénogénétiques dans les tests de toxicité ce qui devrait éviter les variabilités (des résultats) dues aux caractéristiques génétiques.

MICHELS *et al.*,1999 trouvent que l'utilisation de clones comme organismes tests permet une meilleure standardisation des tests ecotoxicologiques.

5.3.2. Reproduction

L'effet sur la survie ne suffit pas à évaluer entièrement le potentiel toxique d'une substance, aussi plusieurs auteurs (WINNER *et al.*,1977 ; VAN LEEUWEN *et al.*,1985 ; MUNZINGER,1990 ; KLUTTGEN et RATTE,1994 ; SUEDEL *et al.*,1997 ; MARK et SOLBE,1998 ; GUILHERMINO *et al.*,1999 ; KNOPS *et al.*,2001) se sont intéressés à la reproduction en tant que paramètre évaluateur de la toxicité, nous avons considéré en premier lieu le premier jour de ponte que nous notons (jp1).

5.3.2.1. 1er jour de ponte (jp1)

Les résultats décrivant les évolutions du jp1 en fonction de l'accroissement des concentrations métalliques ajoutées sont représentés sur les figures 5.8 à 5.10. Les LOECs et NOECs sont mentionnées dans le tableau 5.6.

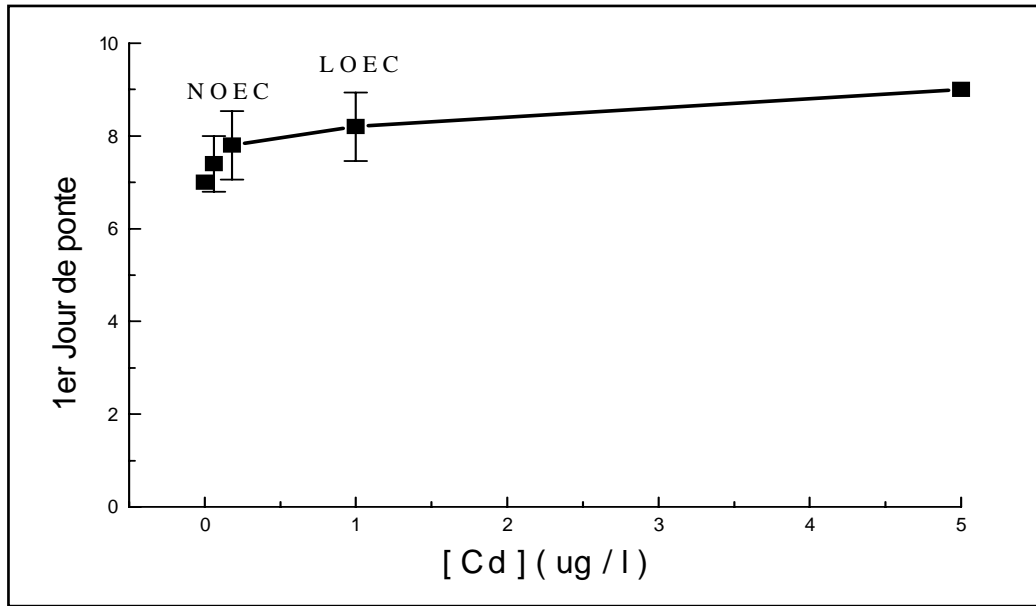


Figure 5.8: jp1 pour les daphnies exposées aux différentes concentrations de cadmium (valeur moyenne avec intervalle de confiance à 95 %).

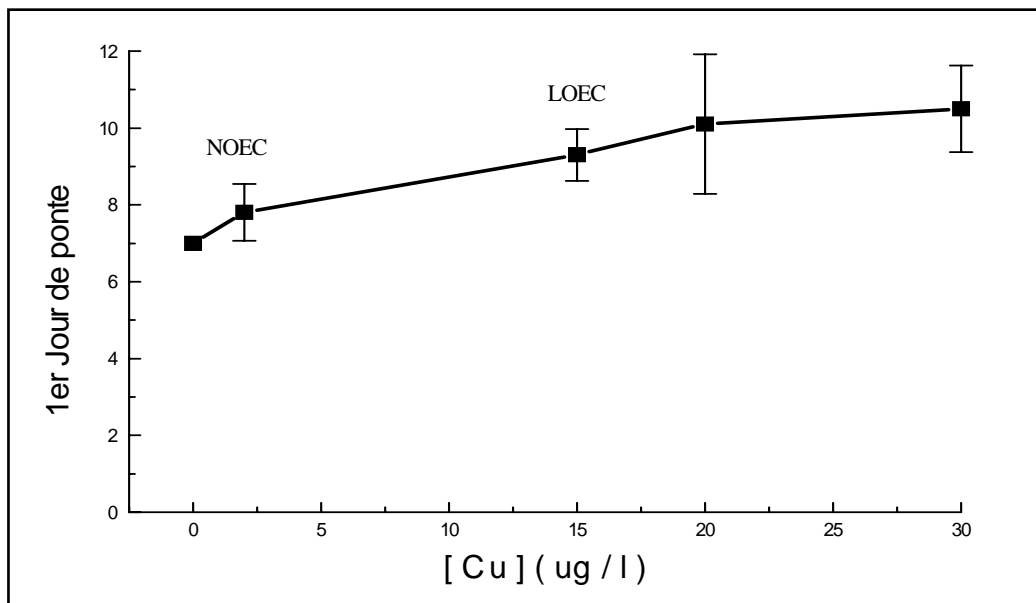


Figure 5.9: jp1 pour les daphnies exposées aux différentes concentrations de cuivre (valeur moyenne avec intervalle de confiance à 95%).

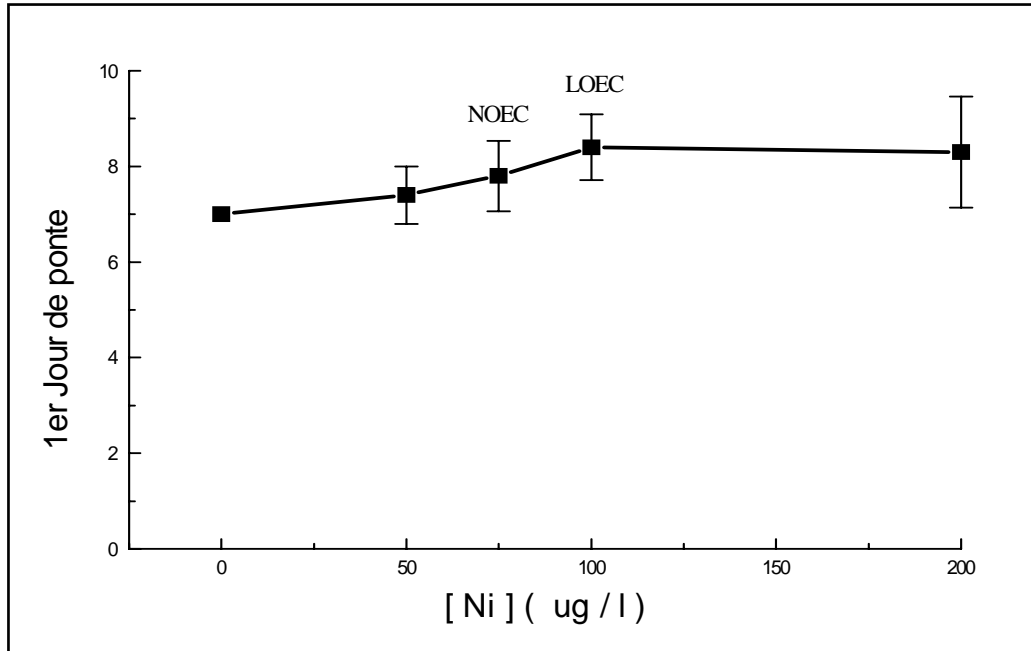


Figure 5.10: jp1 pour les daphnies exposées aux différentes concentrations de nickel (valeur moyenne avec intervalle de confiance à 95%).

Tableau 5.6: NOECs et LOECs pour les différents métaux testés par rapport au jp1.

Cd		Cu		Ni	
NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)	NOEC (µg/l)	LOEC (µg/l)
0,18	1	2	15	75	100

Nous relevons de ces représentations graphiques que le premier jour de ponte pour cette souche algérienne de *Daphnia magna*, en absence de toxicité, est le 7^{ème} jour de survie.

Ces résultats montrent également que la concentration de cadmium qui provoque un retard significatif ($p < 0,05$) sur le jp1 est de $1\mu\text{g.L}^{-1}$. En effet à cette concentration la première ponte est retardée de 1,2 jours par rapport au témoin. Pour le cuivre cette concentration est de $15\mu\text{g.L}^{-1}$ celle-ci cause un retard de 2,3 jours par rapport au témoin. Le nickel retarde significativement ce paramètre biologique de 1,4 jours par rapport au témoin à une concentration de $100\mu\text{g.L}^{-1}$.

Pour le cuivre et le cadmium cet effet est confirmé par des études analogues effectuées par VAN LEEUWEN *et al.*, 1985 et KLUTTGEN et RATTE, 1994.

Dans l'étude de WINNER *et al.*,1977 le retard sur le jp1 a été provoqué par une concentration de $40 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre et a été constaté chez les daphnies nourries avec un aliment pour poisson pendant les tests alors que chez celles nourries avec des microalgues aucun retard par rapport au témoin n'a été constaté. Cette conclusion justifie encore une fois l'effet du type de la nourriture sur les réponses des différentes souches de *Daphnia magna* à la toxicité métallique.

Dans l'étude de VAN LEEUWEN *et al.*,1985, une concentration de $3,2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium provoque un retard du jp1 chez les animaux testés dans le milieu synthétique, alors que chez ceux testés dans l'eau de lac aucun retard n'a été constaté l'ensemble des daphnies ayant été nourries avec des microalgues.

KLUTTGEN et RATTE,1994 ont trouvé que la durée nécessaire à la formation des oeufs dans la poche incubatrice chez les daphnies exposées à une concentration de $5 \mu\text{gCd.L}^{-1}$ était retardée de 1,6 jours par rapport au témoin lorsque les animaux étaient nourris avec une quantité de microalgues de $0,8 \times 10^6$ cellules/jour, alors que lorsque les animaux étaient nourris à raison de 16×10^6 cellules/jour c'est à dire avec une quantité d'aliments supérieure le retard n'était que de 0,59 jours.

Ces résultats confirment donc le fait que la qualité et la quantité des aliments utilisés pour nourrir les individus testés ainsi que la qualité de l'eau utilisée comme milieu d'essai influent sur l'apparition des manifestations toxiques dues aux métaux lourds.

Cet effet des métaux lourds sur le jp1 serait en partie du à un retard de croissance des juvéniles. En effet MUNZINGER,1990 a constaté que le nickel retardait la croissance des juvéniles de *Daphnia magna*, la même constatation a été faite pour le cadmium par KLUTTGEN et RATTE,1994, d'autre part HANAZATO,1998 affirme que les différents stress notamment ceux dus aux toxiques provoquent des retards de croissance chez les juvéniles des daphnies ce qui engendre un retard dans l'apparition des pontes (jp1).

Mis à part les deux paramètres précédents (survie et jp1), nous nous sommes proposé d'examiner un autre paramètre relatif également à la reproduction à savoir le nombre de jeunes daphnies pondues (n.d.p).

5.3.2.2. Nombre de jeunes daphnies pondues après 21 jours (n.d.p)

Les résultats concernant l'effet du cadmium, cuivre et nickel sur la taille de ponte c'est à dire sur le nombre de petits pondus en 21 jours (n.d.p) pour les daphnies exposées aux différentes concentrations de cadmium, cuivre et nickel sont donnés dans les tableaux (5.7 à 5.9).

Tableau 5.7: Nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours (test cadmium).

Concentration de Cadmium ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	n.d.p 21 jours Moyenne \pm écart type
Témoin	80,21 \pm 24,58
0,06	78,8 \pm 24,78
0,18	89,3 \pm 14,18 ^(NOEC)
1	7,5 \pm 1,20 ^(LOEC)
5	7 \pm 1,18

(LOEC) -effet significatif par rapport au témoin (test ANOVA,Newman-Keuls).

Tableau 5.8: Nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours (test cuivre).

Concentration de cuivre ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	n.d.p 21 jours Moyenne \pm écart type
Témoin	80,21 \pm 24,58
2	83,7 \pm 25,1
15	75,7 \pm 14 ^(NOEC)
20	43,1 \pm 21,96 ^(LOEC)
30	9,6 \pm 4,17

(LOEC) -effet significatif par rapport au témoin (test ANOVA,Newman-Keuls).

Tableau 5.9: Nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours (test nickel).

Concentration de Nickel ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	n.d.p 21 jours Moyenne \pm écart type
Témoin	80,21 \pm 24,58
50	86 \pm 26,09
75	72,7 \pm 17,84
100	69,8 \pm 21,88 ^(NOEC)
200	28,8 \pm 20,4 ^(LOEC)

(LOEC) -effet significatif par rapport au témoin (test ANOVA,Newman-Keuls).

Nous présentons les LOECs et NOECs dans le tableau 5.10.

Tableau 5.10: NOECs et LOECs pour les différents métaux testés par rapport au n.d.p

Cd		Cu		Ni	
NOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	NOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	NOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
0,18	1	15	20	100	200

L'ensemble des résultats montrent que le cadmium cuivre et nickel provoquent une baisse significative du n.d.p en 21 jours. Les effet significatifs pour ce paramètre ($p < 0,05$) apparaissent pour $1\mu\text{g Cd}^{++} .\text{L}^{-1}$, $20\mu\text{g Cu}^{++} .\text{L}^{-1}$ et $200\mu\text{g Ni}^{++} .\text{L}^{-1}$.

En tenant compte des valeurs des NOECs et LOECs déterminées pour les 03 critères considérés : Survie, jp1 et n.d.p nous soulignons des différences de sensibilités de ces paramètres, dans les cas du cuivre et du nickel.

L'égalité des NOECs et LOECs relatives au cadmium montre une sensibilité identique de la survie, du 1er jour de ponte et de la taille de ponte au 21 ème jour. La survie et jp1 se sont avérées plus sensibles au cuivre que le n.d.p. Le premier jour de ponte apparaît plus sensible au nickel que la survie et le nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours d'expérimentation.

Par ailleurs, de nombreuses études, telles que celles de WINNER et al.,1977, VAN LEEUWEN et al.,1985, MUNZINGER,1990, ENSERINK et al.,1993 et GUILHERMINO et al., 1999, ont également démontré que le cadmium cuivre et nickel réduisaient le nombre de petits pondus par *Daphnia magna*. A titre comparatif nous regroupons leurs résultats dans le tableau 5.11:

Tableau 5.11: Tableau comparatif : Effet de Cd,Cu et Ni sur le n.d.p

Métal	Presente etude (LOEC) tets 21 jours. ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Van Leeuwen <i>et al.</i> (1985) LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$), test 21 jours		Biesinger et Christensen (1972) , test 21 jours		Winner <i>et al.</i> (1977) (LOEC) pour la baisse de la taille de couvée (nombre de petits par portée)		Guilhermino <i>et al.</i> (1999) Test 21 jours		Munzinger (1990) LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$) Test 21 jours	Enserink <i>et al.</i> (1993) LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$) test 21 jours
		Milieu synthétique	Eau de lac	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$) provoquant la baisse de la reproduction de 50%	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$) provoquant la baisse de la reproduction de 16%	Aliment pour poisson	Algues	LOEC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$) provoquant une baisse de la reproduction de 50%		
Cd	1	1	10	0,7	0,17	-	-	4,8	6,1	-	2,1 à 4,4
Cu	20	-	-	35	22	20	Aucun	-	-	-	-
Ni	200	-	-	95	30	-	-	-	-	120	-

Ces résultats montrent que pour le cadmium la valeur minimale qui provoque une baisse significative ($p < 0,05$) du n.d.p par rapport au témoin obtenue par nos travaux est nettement inférieure à celle trouvée par VAN LEEUWEN et al. (1985) qui ont utilisé une eau de lac comme milieu d'essai, à celle obtenue par GUILHERMINO et al. (1999) dont le milieu était enrichi en matières organiques et ayant une dureté élevée ainsi qu'à celle trouvée par ENSERINK et al. (1993) dont les travaux ont été réalisés avec une eau de lac soigneusement filtrée et ayant une dureté de 225 mg.L⁻¹ CaCO₃ c'est à dire supérieure à celle du milieu d'essai que nous avons considéré. Cette conclusion confirme que la présence de matières organiques diminue les effets toxiques des métaux lourds sur *Daphnia magna*.

Plusieurs auteurs (KLUTTGEN et RATTE,1994 ; TAYLOR et al.,1998 ; KNOPS et al.,2001) ont trouvé que les substances toxiques notamment les métaux lourds ont pour effet de réduire le rythme d'ingestion et d'assimilation des aliments par *Daphnia magna*, ceci a également été constaté chez d'autres organismes aquatiques tels que les poissons [199] et les mollusques [43]. Les daphnies répartissent l'utilisation de l'énergie fournie par l'alimentation entre la croissance et la reproduction [54], [59], [110], [83], [44], [66], [37], [40] et la diminution du rythme auquel les daphnies absorbent les aliments explique que les individus disposent de moins d'énergie pour la reproduction et donc produisent moins de juvéniles.

Les deux paramètres survie et reproduction peuvent être utilisés pour le calcul d'un troisième paramètre qui est le taux intrinsèque de croissance de la population " r_m ", nous nous sommes proposé dans notre étude de considérer l'effet du Cd, Cu et Ni sur l'évolution de ce critère biologique.

5.3.3. Taux intrinsèque de croissance d'une population

Les valeurs du " r_m " obtenues pour les différentes concentrations de cadmium cuivre et nickel sont données dans les tableaux (5.12 à 5.14) (exemple d'application en appendice « A »).

Tableau 5.12 : Taux intrinsèque de croissance de la population au 21^{ème} jour (test cadmium).

Concentration de Cd ($\mu\text{g/l}$)	r_m
Témoin	0,3971
0,06	0,3997
0,18	0,4023
1	0,2494
5	0,2162

0,05) $r = 0,82$ (p

Tableau 5.13 : Taux intrinsèque de croissance de la population au 21^{ème} jour (test cuivre).

Concentration de Cu ($\mu\text{g/l}$)	r_m
Témoin	0,3971
2	0,3938
15	0,3329
20	0,2691
30	0,2171

0,01)< $r = 0,98$ (p

Tableau 5.14: Taux intrinsèque de croissance de la population au 21^{ème} jour (test nickel).

Concentration de Ni ($\mu\text{g/l}$)	r_m
Témoin	0,3971
50	0,4091
75	0,3694
100	0,3413
200	0,3090

0,05).< $r = 0,91$ (p

Les résultats indiquent que l'exposition à long terme de *Daphnia magna* au cuivre et nickel réduit de façon significative la capacité des populations à s'accroître, la valeur du "r_m" étant inversement proportionnelle à la concentration de métal à laquelle les daphnies sont exposées, pour le cadmium bien que la relation ne soit pas significative on constate également que le "r_m" a tendance à baisser en fonction des concentrations métalliques croissantes.

La même observation a été faite par plusieurs auteurs (WINNER *et al.*,1977 ;VAN LEEUWEN *et al.*,1985 ; MUNZINGER,1990 ; ENSERINK *et al.*,1993 ; KLUTTGEN et RATTE,1994 ; KNOPS *et al.*,2001).

ENSERINK *et al.*,1993 ont étudié l'effet de la quantité d'aliments fournie aux mères sur la réaction des juvéniles aux tests de toxicité à long terme et ont trouvé que pour les petits issus des mères nourries avec une faible quantité d'aliments la valeur du " r_m " en 21 jours était de 0,37 ;0,357 et 0,34 pour des concentrations respectives de 0 ;1 et 2 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$ alors que pour les jeunes daphnies issues de mères recevant une ration plus importante ces valeurs sont de 0,397 ;0,39 et 0,36 pour les mêmes concentrations respectives. Leurs résultats expliquent que le niveau nutritionnel n'affecte pas les valeurs du taux intrinsèque.

Contrairement à cette constatation KLUTTGEN et RATTE,1994 dans une étude sur l'effet de la concentration d'aliments sur la toxicité du cadmium vis à vis de *Daphnia magna* ont trouvé que lorsque les daphnies testées étaient alimentées avec une concentration d'aliments de 0,8 x 10⁶ Cellules/daphnie/jour les valeurs du " r_m " sont de 0,166 ;0,111 et 0,113 pour des concentrations respectives de 0 ;1 et 5 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$, alors que pour une quantité d'aliments de 16 x 10⁶ Cellules/daphnie/jour et pour les mêmes concentrations de cadmium les valeurs du " r_m " sont de respectivement 0,363 ;0,302 et 0,242, ce qui démontre la dépendance du type de la nourriture et des évaluations de r_m .

WINNER *et al.*, 1977 ont trouvé que pour des concentrations de 0 ; 80 et 100 $\mu\text{g Cu}^{++}$. L⁻¹ les valeurs du " r_m " sont respectivement 0,37 ;0,29 et 0,02 lorsque les daphnies testées sont nourries avec des microalgues alors que dans le cas où l'aliment pour poisson est utilisé les valeurs du " r_m " sont de 0,36 ;0,21 et 0,12 pour des concentrations respectives de 0 ;60 et 80 $\mu\text{gCu}^{++}.\text{L}^{-1}$.

Plusieurs auteurs (WINNER,1985 ; KLUTTGEN et RATTE,1994 ; TAYLOR *et al* 1998 ; KNOPS *et al.*,2001) ont montré que les algues contaminées par le cadmium et le cuivre réduisent significativement le rythme auquel les daphnies s'alimentent (N^{bre} de cellules consommées/unité de temps). Cet effet demeure même après cessation de l'exposition à des concentrations sublétales de polluants toxiques et serait dû à des dommages causés au tube digestif. KLUTTGEN et RATTE,1994 ;TAYLOR *et al.*,(1998) et KNOPS *et al.*,(2001) ajoutent que la toxicité conduit à une baisse de la quantité d'énergie absorbée ce qui présente un effet inhibiteur sur les principaux paramètres de croissance de la population notamment le taux

intrinsèque. Cette hypothèse peut expliquer la diminution de la valeur de ce paramètre en fonction des concentrations croissantes de cations métalliques.

VAN LEEUWEN *et al.*,(1985) indiquent que le taux intrinsèque atteint sa valeur maximale aux premières reproductions. Par conséquent une meilleure évaluation des effets toxiques sur ce paramètre est conditionnée par l'utilisation dans les tests de toxicité à long terme d'individus ayant été exposés au toxique depuis le stade embryonnaire, c'est à dire d'individus issus de parents eux mêmes exposés au toxique. Néanmoins MUNZINGER,1990 n'a pas obtenu un effet significatif (sur la valeur du taux intrinsèque) de l'exposition des daphnies au nickel depuis le stade embryonnaire.

Les effets des polluants, métalliques en particulier, sur la survie et la reproduction sont généralement précédés par une perturbation du métabolisme des espèces qui peut se traduire par exemple par une excrétion accrue de certaines substances telles que les acides aminés [29], l'ammoniaque et les phosphates [30]. A ce titre nous nous sommes proposé d'étudier l'effet de l'exposition à long terme de *Daphnia magna* aux cations métalliques de cadmium, cuivre et nickel sur l'excrétion d'azote ammoniacal par cette espèce, en vue de proposer les excrétions d'ammoniac comme outil de diagnostic de la toxicité des polluants.

5.3.4. Rejets de N-NH₄

Les résultats relatifs aux effets à long terme du cadmium, cuivre et nickel sur les rejets d'azote ammoniacal sont donnés dans les tableaux 5.15, 5.16 et 5.17. Sur ces tableaux sont données les valeurs moyennes des concentrations en N-NH₄⁺ ± les erreurs standards (± ES) obtenues au début du test (0 à 02 jours) et à la fin du test (19 à 21 jours). Les quantités d'azote N-NH₄⁺ (valeurs moyennes des concentrations ± les erreurs standards) excrétées aux jours 05, 07, 09, 12, 16 et 19 sont présentées à l'appendice B tableaux 24 à 26.

L'analyse des concentrations de N-NH₄⁺ sont réalisées sur les solutions expérimentales récupérées après les changements des milieux d'essais c'est à dire au bout de 02 jours, 05 jours, 07 jours, 09 jours, 12 jours, 16 jours, 19 jours, et 21 jours (les modalités des changements des milieux sont décrites au chapitre matériel et méthode), les quantités de N-NH₄⁺ cumulées n'ont pas été déterminées les déterminations des concentrations en N-NH₄⁺ concernent certaines périodes de temps c'est-à-dire entre 0 et 02 jours, entre 02 et 05 jours, entre 05 et 07 jours, entre 07 et 09 jours, entre 09 et 12 jours, entre 12 et 16 jours, entre 16 et 19 jours, et entre 19 et 21 jours.

Tableau 5.15 : Valeurs des concentrations moyennes en N-NH₄⁺ en fonction des quantités de cadmium ajoutées

[Cd ⁺⁺] (µg.l ⁻¹)	Témoin	0,06	0,18	1	5
pH ₂	7,52	7,45	7,54	7,45	7,50
pH ₂₁	7,52	7,48	7,45	7,79	7,82
[O ₂ dissous] ₂ (mg.l ⁻¹)	5,78	5,49	5,85	5,50	5,68
[O ₂ dissous] ₂₁ (mg.l ⁻¹)	5,78	5,57	5,48	5,95	4,1
[N-NH ₄ ⁺] ₂ (µg.ind ⁻¹ .j ⁻¹)	0,69 ± 0,31	0,85 ^a ± 0,19	0,58 ± 0,16	0,84 ^a ± 0,17	0,7 ± 0,04
[N-NH ₄ ⁺] ₂₁ (µg.ind ⁻¹ .j ⁻¹)	2,33 ± 0,50	2,60 ± 0,57	3,14 ^a ± 0,95	-	-

pH₂ : Valeur du pH mesurée dans le milieu de test lors du 1^{er} changement (entre 0 et 02 jours)

pH₂₁ : Valeur du pH mesurée dans le milieu de test lors du dernier changement (entre 19 et 21 jours)

[O₂ dissous]₂ : Concentration d'oxygène dissous mesurée dans le milieu de test lors du 1^{er} changement (entre 0 et 02 jours)

[O₂ dissous]₂₁:Concentration d'oxygène dissous mesurée dans le milieu à la fin du test (entre 19 et 21 jours)

[N-NH₄⁺]₂ :Quantité de N-NH₄⁺ (valeur moyenne ± écart type) rejetée par individu entre 0 et 02 jours

[N-NH₄⁺]₂₁ :Quantité de N-NH₄⁺ (valeur moyenne ± écart type) rejetée par individu entre 19 et 21 jours

(a): Différence significative (p < 0,05) entre l'essai témoin et les essais de toxicité.

Tableau 5.16 : Valeurs des concentrations moyennes en N-NH₄⁺ en fonction des quantités de cuivre ajoutées

[Cu ⁺⁺] (µg.l ⁻¹)	Témoin	2	15	20	30
pH ₂	7,52	7,37	7,38	7,39	7,39
pH ₂₁	7,52	7,48	7,46	7,48	7,62
[O ₂ dissous] ₂ (mg.l ⁻¹)	5,78	5,21	5,25	5,28	5,28
[O ₂ dissous] ₂₁ (mg.l ⁻¹)	5,78	5,6	5,54	5,56	4,87
[N-NH ₄ ⁺] ₂ (µg.ind ⁻¹ .j ⁻¹)	0,69 ± 0,31	1,60 ^a ± 0,59	1,71 ^a ± 0,87	1,34 ^a ± 0,69	1,46 ^a ± 0,94
[N-NH ₄ ⁺] ₂₁ (µg.ind ⁻¹ .j ⁻¹)	2,33 ± 0,50	2,88 ± 1,32	2,88 ± 0,84	2,65 ± 0,47	-

pH₂ : Valeur du pH mesurée dans le milieu de test lors du 1^{er} changement (entre 0 et 02 jours)

pH₂₁ : Valeur du pH mesurée dans le milieu de test lors du dernier changement (entre 19 et 21 jours)

[O₂ dissous]₂ : Concentration d'oxygène dissous mesurée dans le milieu de test lors du 1^{er} changement (entre 0 et 02 jours)

[O₂ dissous]₂₁:Concentration d'oxygène dissous mesurée dans le milieu à la fin du test (entre 19 et 21 jours)

[N-NH₄⁺]₂ : Quantité de N-NH₄⁺ (valeur moyenne ± écart type) rejetée par individu entre 0 et 02 jours

[N-NH₄⁺]₂₁ :Quantité de N-NH₄⁺ (valeur moyenne ± écart type) rejetée par individu entre 19 et 21 jours

(a): Différence significative (p < 0,05) entre l'essai témoin et les essais de toxicité.

Tableau 5.17 : Valeurs des concentrations moyennes en N-NH₄⁺ en fonction des quantités de nickel ajoutées

[Ni ⁺⁺] (µg.l ⁻¹)	Témoin	50	75	100	200
pH ₂	7,52	7,46	7,46	7,49	7,50
pH ₂₁	7,52	7,36	7,46	7,34	7,42
[O ₂ dissous] ₂ (mg.l ⁻¹)	5,78	5,53	5,52	5,64	5,67
[O ₂ dissous] ₂₁ (mg.l ⁻¹)	5,78	5,16	5,53	5,1	5,4
[N-NH ₄ ⁺] ₂ (µg.ind ⁻¹ . j ⁻¹)	0,69 ± 0,31	0,88 ^a ± 0,31	0,84 ^a ± 0,24	0,86 ^a ± 0,46	0,76 ^a ± 0,32
[N-NH ₄ ⁺] ₂₁ (µg.ind ⁻¹ . j ⁻¹)	2,33 ± 0,50	5,97 ^a ± 1,92	3,44 ^a ± 1,68	6,98 ^a ± 2,98	4,70 ^a ± 2,89

pH₂ : Valeur du pH mesurée dans le milieu de test lors du 1^{er} changement (entre 0 et 02 jours)

pH₂₁ : Valeur du pH mesurée dans le milieu de test lors du dernier changement (entre 19 et 21 jours)

[O₂ dissous]₂ : Concentration d'oxygène dissous mesurée dans le milieu de test lors du 1^{er} changement (entre 0 et 02 jours)

[O₂ dissous]₂₁ : Concentration d'oxygène dissous mesurée dans le milieu à la fin du test (entre 19 et 21 jours)

[N-NH₄⁺]₂ : Quantité de N-NH₄⁺ (valeur moyenne ± écart type) rejetée par individu entre 0 et 02 jours

[N-NH₄⁺]₂₁ : Quantité de N-NH₄⁺ (valeur moyenne ± écart type) rejetée par individu entre 19 et 21 jours

(a): Différence significative (p < 0,05) entre l'essai témoin et les essais de toxicité.

Nous notons en général, à partir de ces déterminations (tableaux 5.15, 5.16 et 5.17) une augmentation des quantités de N-NH₄⁺ entre les jours 0 et 02 à mesure que les concentrations de Cd, Cu et Ni augmentent dans les solutions expérimentales. Cependant, nous observons certaines irrégularités dans cette évolution pour Cd = 0,18 µg.L⁻¹ et Cu = 20 µg.L⁻¹ pour lesquelles la teneur en N-NH₄⁺ baisse légèrement. Il ressort également de ces résultats que les quantités de N-NH₄⁺ déterminées entre les jours 19 et 21 qui correspondent aux concentrations (N-NH₄⁺)₂₁ indiquées dans les tableaux 5.15 à 5.17 un accroissement significatif (p < 0,05) des teneurs d'azote ammoniacal pour les concentrations croissantes de Cd et Ni et que cette augmentation n'apparaît pas significative (p > 0,05) dans le cas du cuivre. Ces conclusions nous permettent donc de conclure que la toxicité croissante de Cd, Cu et Ni affecte le processus d'excrétion de N-NH₄⁺ par *Daphnia magna* en provoquant des rejets d'ammoniaque plus importants que ceux obtenus dans les témoins. Il est clair que ces observations sont insuffisantes pour affirmer que ces rejets de N-NH₄⁺ peuvent constituer un indice d'indication de la toxicité métallique, pour une meilleure compréhension des évolutions de N-NH₄⁺ rejeté par les daphnies, nous nous sommes proposé d'examiner les variations des quantités de N-NH₄⁺ pour les différents temps considérés (entre 0 et 02 jours, 05 et 07 jours, 09 et 12 jours, et 19 et 21 jours). De telles variations sont représentées par les figures 5.11 à 5.13.

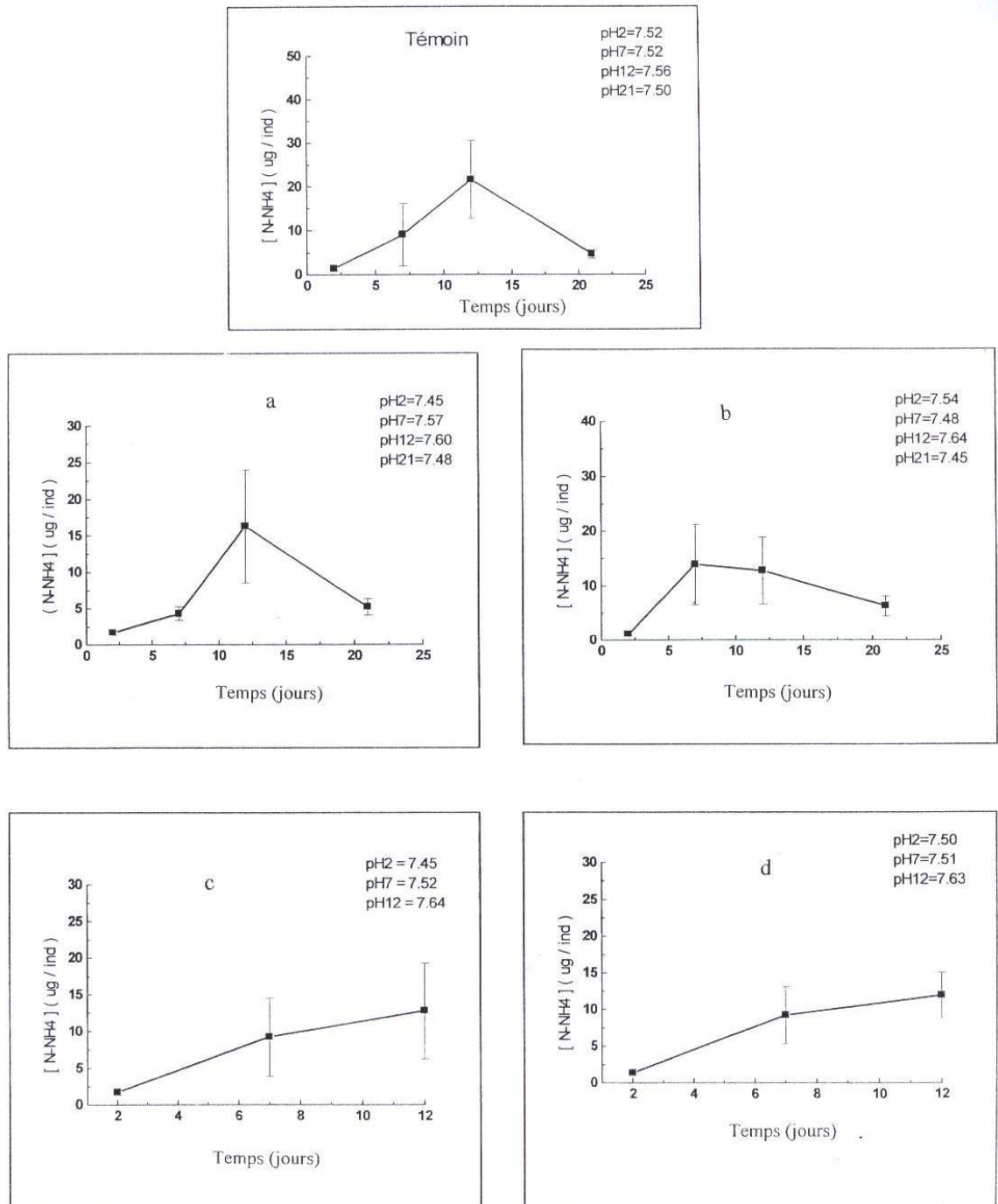


Figure 5.11: Evolutions des concentrations moyennes en N-NH_4^+ excrétées aux temps : 02, 07, 12 et 21 jours (cas du cadmium). Les barres verticales représentent l'écart-type (n=10, nombre de répétitions)

(a) : $[\text{Cd}^{++}] = 0,06 \mu\text{g.L}^{-1}$, (b) : $[\text{Cd}^{++}] = 0,18 \mu\text{g.L}^{-1}$, (c) : $[\text{Cd}^{++}] = 1 \mu\text{g.L}^{-1}$, (d) : $[\text{Cd}^{++}] = 5 \mu\text{g.L}^{-1}$

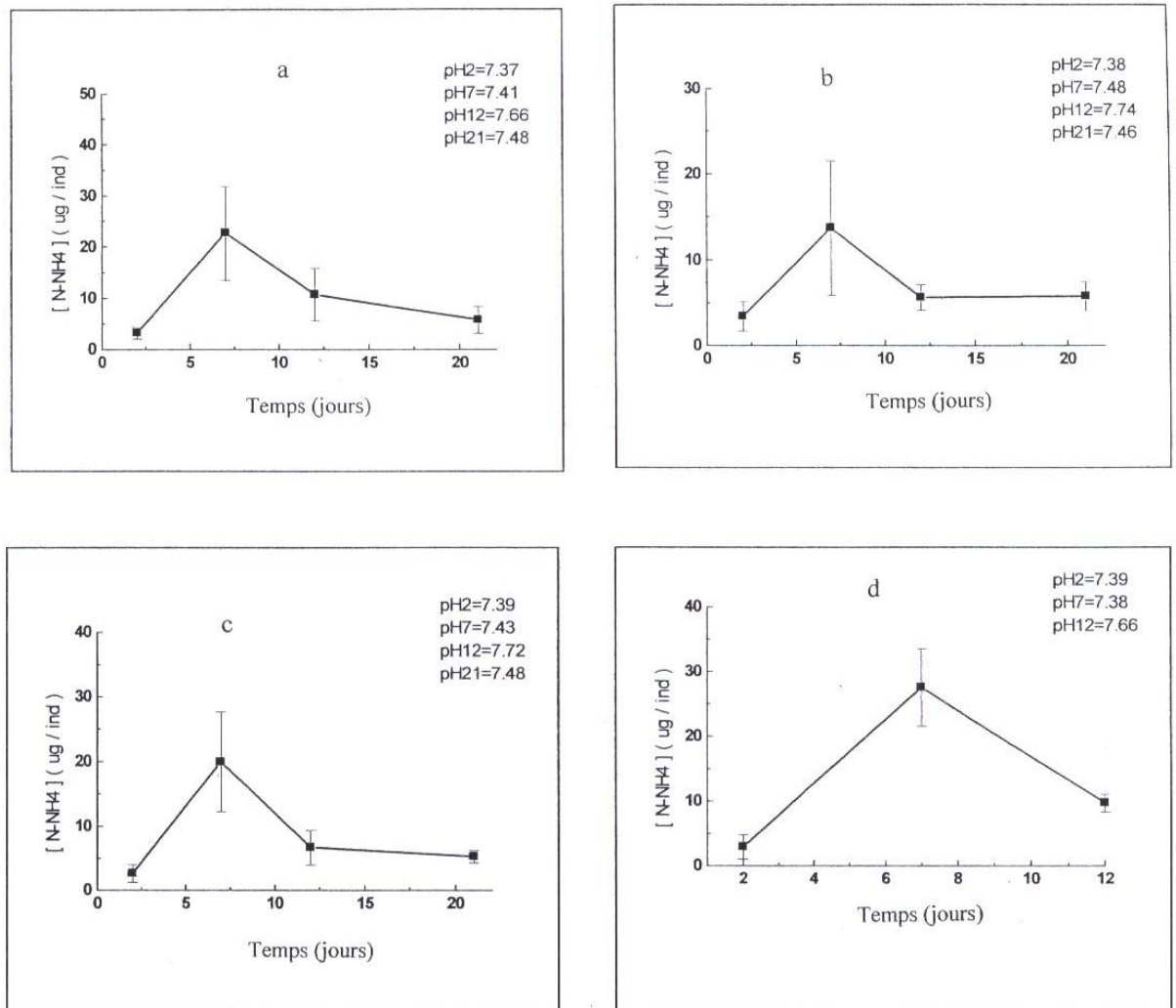


Figure 5.12 : Evolutions des concentrations moyennes en N-NH_4^+ excrétées aux temps : 02, 07, 12 et 21 jours (cas du cuivre). Les barres verticales représentent l'écart-type (n=10, nombre de répétitions).

(a) : $[\text{Cu}^{2+}] = 2 \mu\text{g.L}^{-1}$, (b) : $[\text{Cu}^{2+}] = 15 \mu\text{g.L}^{-1}$, (c) : $[\text{Cu}^{2+}] = 20 \mu\text{g.L}^{-1}$, (d) : $[\text{Cu}^{2+}] = 30 \mu\text{g.L}^{-1}$

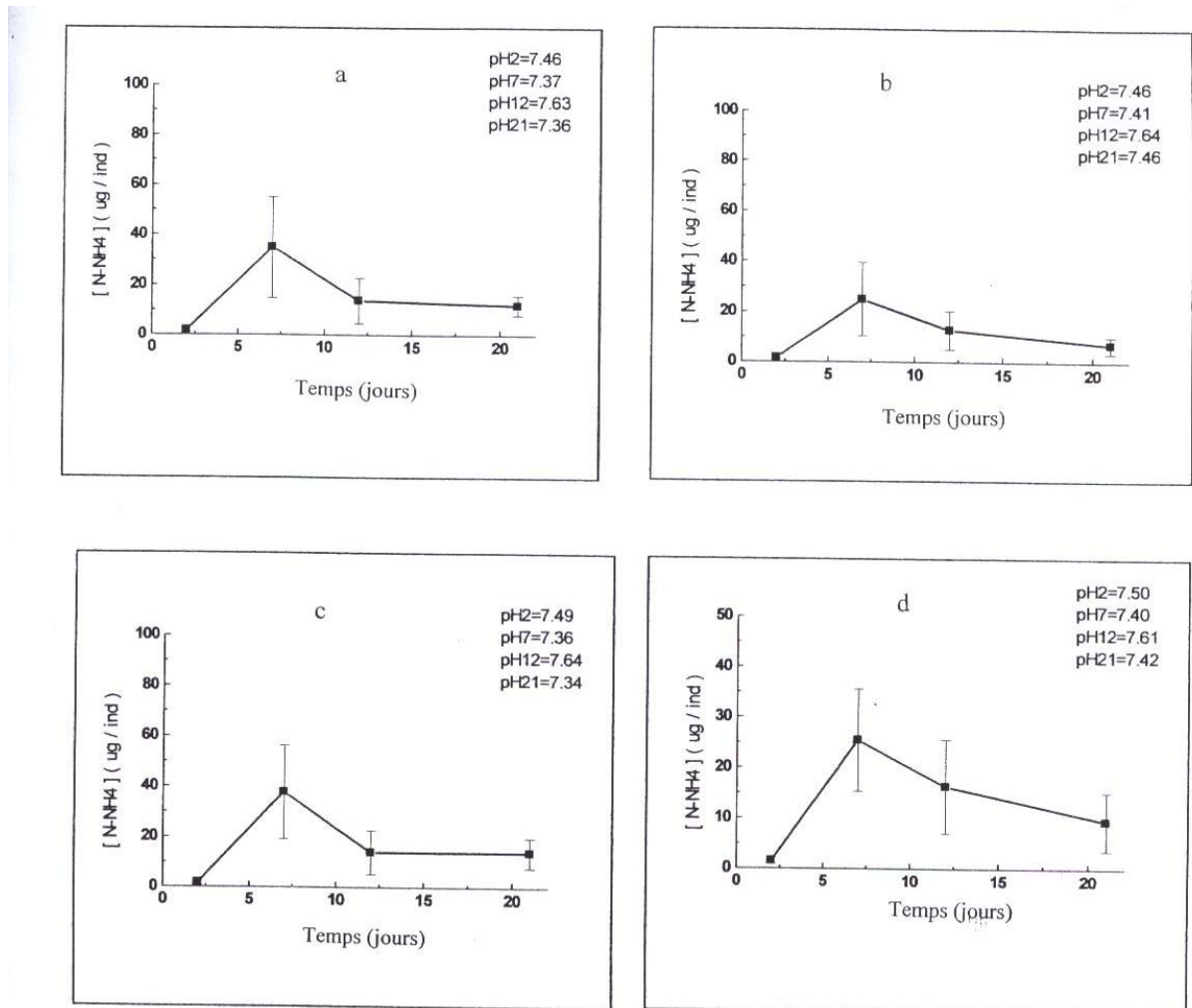


Figure 5.13: Evolutions des concentrations moyennes en N-NH_4^+ excrétées aux temps : 02, 07, 12 et 21 jours (cas du nickel). Les barres verticales représentent l'écart-type (n=10, nombre de répétitions).

(a) : $[\text{Ni}^{2+}] = 50 \mu\text{g.L}^{-1}$, (b) : $[\text{Ni}^{2+}] = 75 \mu\text{g.L}^{-1}$, (c) : $[\text{Ni}^{2+}] = 100 \mu\text{g.L}^{-1}$, (d) : $[\text{Ni}^{2+}] = 200 \mu\text{g.L}^{-1}$

Nous constatons d'après ces évolutions que les quantités moyennes d'azote ammoniacal rejetées par individu en fonction du temps (02, 07, 12 et 21 jours), augmentent, atteignant un maximum puis baissent et ce aussi bien pour les individus témoins que pour les individus exposés aux différentes concentrations de cadmium, cuivre et nickel.

Nous pensons que cette baisse d'excrétion durant le dernier jour de test est due à un ralentissement du métabolisme d'excrétion dans la majorité des cas de tests à l'exception des tests avec $1\mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium et $5\mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium ou les essais sont arrêtés au 12^{ème} jour suite aux mortalités des daphnies.

Ces évolutions confirment bien l'hypothèse de l'inhibition du mécanisme d'excrétion. Nous notons que cette inhibition est en fait corrélée à l'inhibition de la survie et de la reproduction en particulier et qu'un tel résultat peut permettre de proposer l'analyse de N-NH_4^+ dans les milieux de vie de *Daphnia magna* comme un outil de diagnostic de la qualité des eaux contenant des quantités sublétales de métaux lourds. Nous notons le passage de N-NH_4^+ par un maximum dans tous les cas de concentrations métalliques, cette observation pourrait expliquer que ces concentrations sublétales n'affectent pas le processus d'excrétion de N-NH_4^+ aux temps correspondant aux valeurs optimales de N-NH_4^+ rejetées.

CONCLUSION

Les objectifs visés par cette étude sont la mise au point au niveau du laboratoire d'un élevage dans des conditions homogènes du microcrustacé de l'espèce *Daphnia magna* utilisable pour divers tests ecotoxicologiques, la mise au point d'un protocole standard permettant d'effectuer des tests de toxicité à long terme (21 jours) utilisant une souche algérienne de *Daphnia magna*, l'étude des effets toxiques aigus (48 heures) et à long terme (21 jours) des cations métalliques du cadmium cuivre et nickel sur *Daphnia magna* ainsi que l'étude de la possibilité d'utiliser le rejet d'azote ammoniacal par *Daphnia magna* comme paramètre indicateur et évaluateur de la toxicité.

L'ensemble des travaux se décomposent en plusieurs étapes :

Dans un premier temps nous avons procédé, à la culture au niveau du laboratoire de l'algue verte unicellulaire de l'espèce « *Scenedesmus sp* » cette culture a donné des résultats satisfaisants et a permis de disposer en permanence de la nourriture nécessaire à l'élevages des crustacés.

La deuxième étape a consisté à mettre au point au niveau du laboratoire d'un élevage en vue d'un clonage d'une souche algérienne de *Daphnia magna*.

Les résultats ont démontré que la procédure élaborée et suivie est satisfaisante, en effet les élevages ont réussi et prospéré ce qui a permis de disposer de quantités suffisantes des réactifs biologiques que nécessitait la procédure expérimentale (on a noté 127 jeunes daphnies pondues en 21 jours pour l'un des individus témoins).

La troisième étape a fait l'objet de l'évaluation de la toxicité aiguë du cadmium, cuivre, nickel et dichromate de potassium au moyen de tests effectués suivant un protocole standard faisant l'objet de la norme ISO (1996). Ces tests ont démontré que les CI50 48h obtenues pour le cadmium, cuivre, nickel et dichromate de potassium sont respectivement de 0,090 mg.L⁻¹; 0,08 mg.L⁻¹; 2,95 mg.L⁻¹; 0,900 mg.L⁻¹ ce qui nous permet de déduire un ordre de classement de la toxicité décroissante de ces cations métalliques Cu > Cd > K₂Cr₂O₇ > Ni.

Pour le test prolongé (21 j) ont été considérés les critères biologiques suivants : survie, nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours (n.d.p), premier jour de ponte (jp1) et le taux intrinsèque de croissance de la population (r_m).

L'analyse statistique des résultats a permis de mettre en évidence les effets significatifs ou non significatifs de la toxicité métallique causée par Cd, Cu et Ni sur ces paramètres biologiques.

La procédure établie s'est révélée satisfaisante quant à la mise au point d'un mode opératoire qui s'inscrit dans la contribution à l'étude des conditions expérimentales (élevage) les plus appropriées voir les plus optimales pour une bonne reproduction des daphnies.

La survie est affectée par l'exposition à long terme aux différents métaux étudiés, en effet le taux de survie après 21 jours est inversement proportionnel aux concentrations métalliques.

Les CL50-21 jours sont pour respectivement le cadmium, cuivre et nickel de 0,37 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 10,95 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 90,70 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

D'autre part les concentrations minimales provoquant une baisse significative du taux de survie en 21 jours (LOEC) sont respectivement pour le cadmium, cuivre et nickel de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Au vu de ces résultats obtenus par rapport au paramètre survie dans le test de toxicité à long terme nous avons pu déduire une classification des métaux par ordre de toxicité décroissante telle que $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Ni}$.

Le premier jour de ponte pour des concentrations de 5 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cadmium, 30 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cuivre et 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de nickel, est retardé de respectivement 02 jours, 3,5 jours et 1,3 jours par rapport au témoin.

Les plus faibles concentrations provoquant un effet significatif par rapport au témoin (LOEC) sont pour respectivement le cadmium, cuivre et nickel de 1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, 15 $\mu\text{g.L}^{-1}$ et 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$.

Ces résultats démontrent que l'ordre de toxicité établi sur la base du jp1 est identique à celui établi sur la base de la survie, néanmoins au vu des concentrations minimales provoquant un effet significatif (LOEC), il apparaît que le paramètre jp1 est plus sensible à la toxicité du nickel que ne l'est le paramètre survie.

Le nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours est inversement proportionnel aux concentrations métalliques pour chacun des trois métaux étudiés, en effet pour le témoin la valeur moyenne du n.d.p en 21 jours est de 80,21 alors que pour des concentrations de 5 $\mu\text{g Cd.L}^{-1}$, 30 $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ et 200 $\mu\text{gNi.L}^{-1}$ cette valeur est de respectivement 7 ; 9,6 et 28,8.

Les concentrations minimales provoquant une baisse significative du n.d.p sont de 1 $\mu\text{gCd.L}^{-1}$, 20 $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ et 200 $\mu\text{gNi.L}^{-1}$.

Nous constatons d'une part que l'ordre de toxicité établi sur la base du n.d.p est identique à celui établi sur la base de la survie et du jp1, et d'autre part au vu des concentrations minimales provoquant un effet significatif (LOEC) il apparaît que le paramètre n.d.p est moins sensible à la toxicité du cuivre et du nickel que ne l'est le paramètre jp1.

L'ensemble des résultats sur les trois paramètres considérés indiquent que le jp1 est le paramètre le plus sensible à la toxicité des métaux étudiés, suivi par la survie alors que le n.d.p s'est avéré comme étant le paramètre le moins sensible.

Le taux intrinsèque de croissance de la population (r_m) tend à baisser en fonction des concentrations métalliques croissantes, c'est ainsi que pour le témoin la valeur du (r_m) est de 0,3971 alors qu'elle est de 0,2162 pour une concentration de 5 $\mu\text{gCd.L}^{-1}$, de 0,2171 pour une concentration de 30 $\mu\text{gCu.L}^{-1}$ et de 0,3090 pour une concentration de 200 $\mu\text{gNi.L}^{-1}$.

Néanmoins cette baisse n'est significative que pour le cuivre ($r = 0,98$; $p < 0,01$) et le nickel ($r = 0,91$; $p < 0,05$) .

Le rejet d'azote ammoniacal a été considéré comme paramètre de suivi de la toxicité aussi bien dans les tests de toxicité aiguë qu'a long terme.

Pour le test aigu les résultats relatifs aux quantités de N-NH₄ rejetées par individu en 48 heures (augmentation de la quantité de N-NH₄ excrétée en fonction des concentrations croissantes de cations métalliques) semblent être prometteurs, pour l'utilisation du rejet d'ammoniaque comme révélateur de la toxicité métallique, en effet pour des concentrations de 0,1 ; 1,8 ; 2 et 2,2 mg de K₂Cr₂O₇.L⁻¹ les quantités de N-NH₄ rejetées par individu sont de respectivement 0,15; 0,18; 0,21; et 0,22 µg de N-NH₄.

Pour les tests de toxicité à long terme les résultats indiquent d'une part que pour un intervalle de temps fixe la toxicité croissante de Cd, Cu et Ni affecte le processus d'excrétion de N-NH₄ par *Daphnia magna* en provoquant des rejets d'ammoniaque plus importants que ceux obtenus dans les témoins et d'autre part que l'évolution des rejets d'ammoniaque en fonction du temps indiquent une augmentation jusqu'à un maximum puis une baisse, cette baisse serait due à un ralentissement du métabolisme corrélée à l'inhibition de la survie et de la reproduction. D'une manière générale l'ensemble de ces résultats permettent de proposer l'analyse de N-NH₄ dans les milieux de vie de *Daphnia magna* comme un outil de diagnostic de la qualité des eaux contenant des quantités sublétales de métaux lourds.

APPENDICE A

LISTE DES SYMBOLES ET DES ABREVIATIONS

CI50	Concentration d'immobilisation de 50% de la population testée
CL50	Concentration létale pour 50% de la population testée
F	Variable de Snedecor
LOEC	Low Observed Effect Concentration
NOEC	No Observed Effect Concentration
Z	Variable normale
jp1	Premier jour de ponte
n.d.p	Nombre de jeunes daphnies pondues
p	Probabilité d'erreur
r	Coefficient de corrélation
r_m	Taux intrinsèque de croissance de la population
s	Ecart type estimé
s²	Variance
t	Variable de Student
\bar{x}	Moyenne arithmétique
α	Degré de signification
δ	Ecart type observé
ξ	Variable normale réduite

Exemple de détermination des CI50 48h à l'aide d'une échelle

Gausso - logarithmique

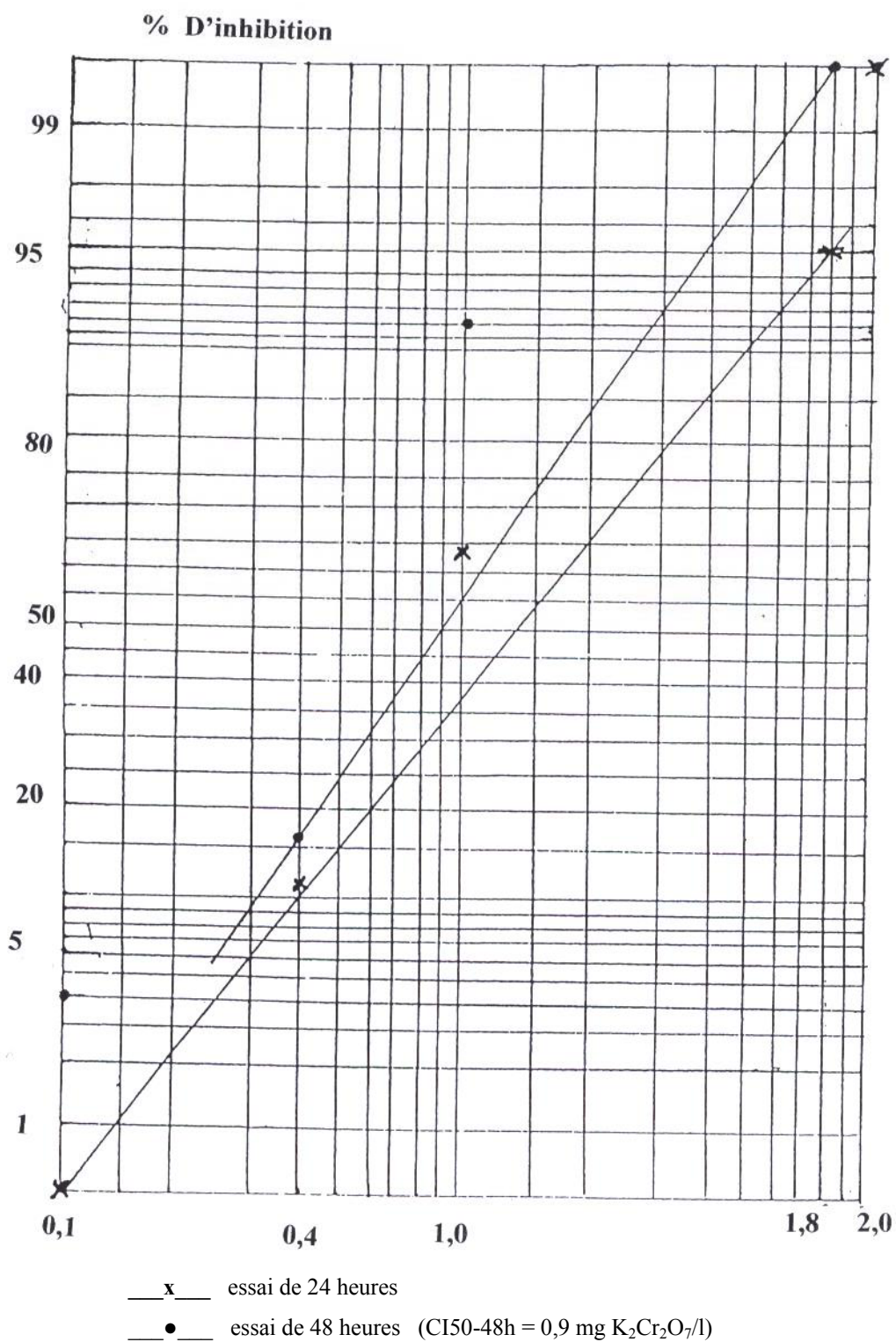


Figure 1 : Exemple de détermination des CI50 48h à l'aide d'une échelle Gausso-logarithmique

Détermination de la CL50-21 jours par l'interpolation polynomiale :

La détermination des CL50-21 jours, se fait à l'aide des relations établies entre les pourcentages de survie après 21 jours et les différentes concentrations métalliques, et ce à l'aide du logiciel "ORIGIN".

Le traitement des résultats a permis d'établir les relations suivantes (on considère que "y" est le pourcentage de survie et "x" est la concentration de métal):

$$\text{Pour le cadmium : } y = 0,23941074 \cdot x^2 - 1,1264112 \cdot x + 0,88718009$$

$$\text{Pour le cuivre : } y = 2,5669782 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 - 0,026519875 \cdot x + 0,78751651$$

$$\text{Pour le nickel : } y = 1,3666334 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 - 0,0058841159 \cdot x + 0,92127872$$

Ces relations sont exprimées par les graphes suivants :

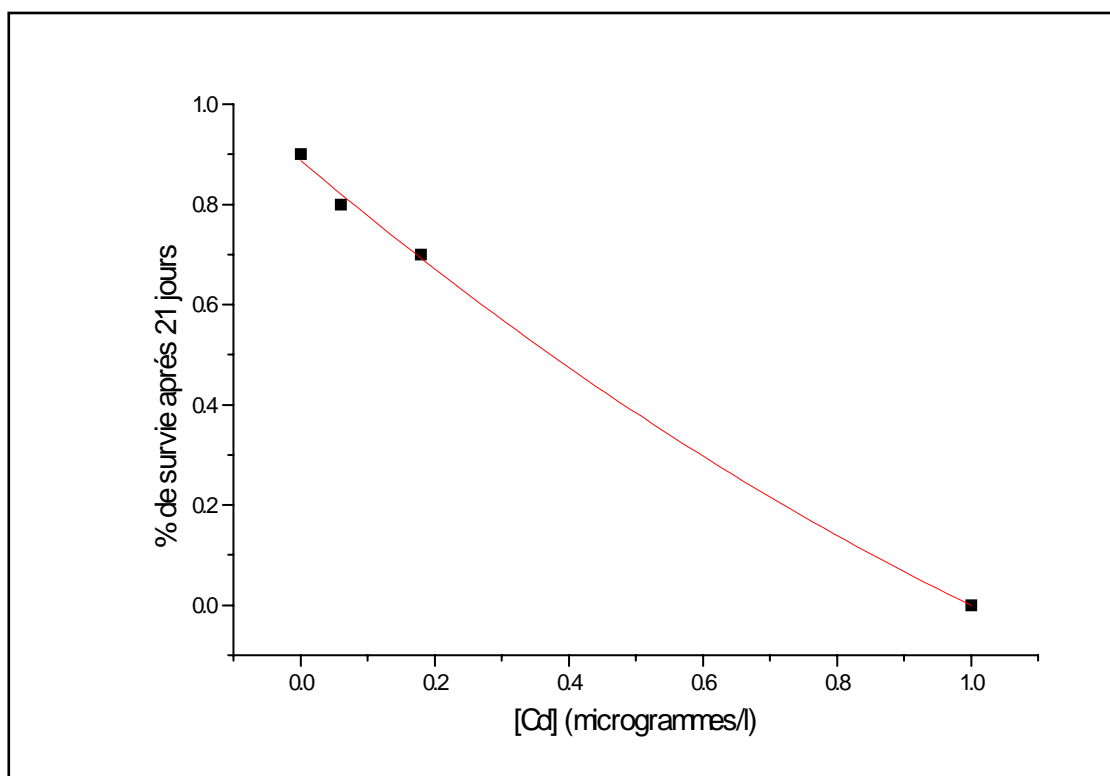


Figure 2: Courbe représentative de la variation du pourcentage de survie après 21 jours en fonction des différentes concentrations de cadmium.

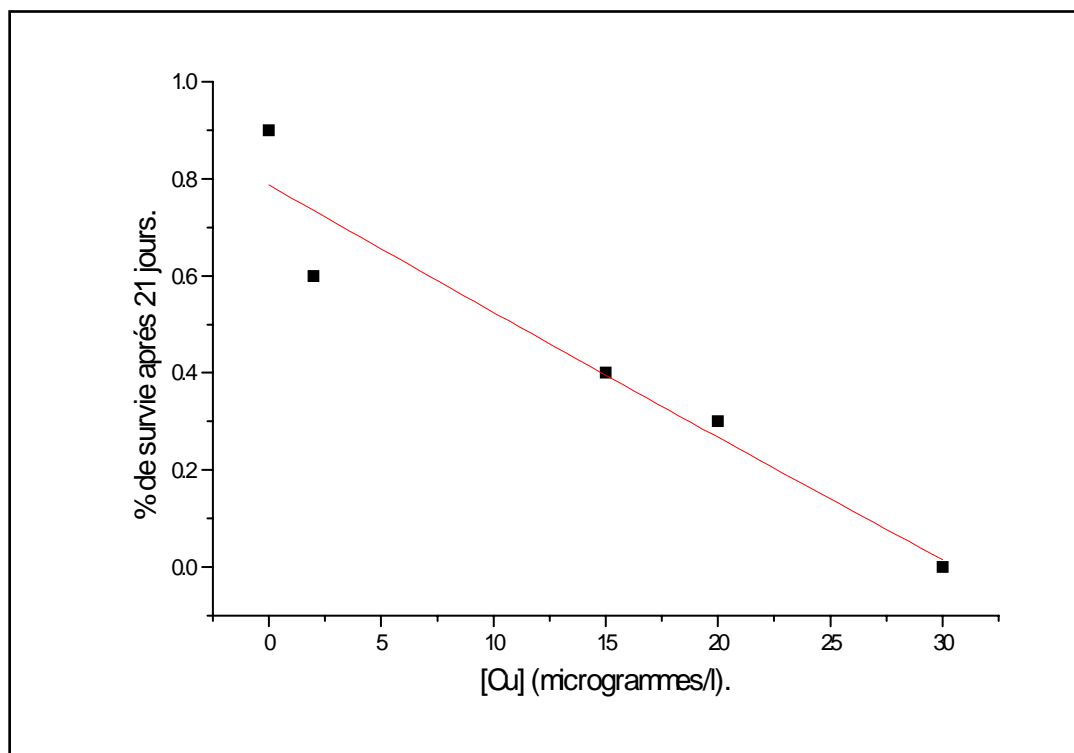


Figure 3: Courbe représentative de la variation du pourcentage de survie après 21 jours en fonction des différentes concentrations de cuivre.

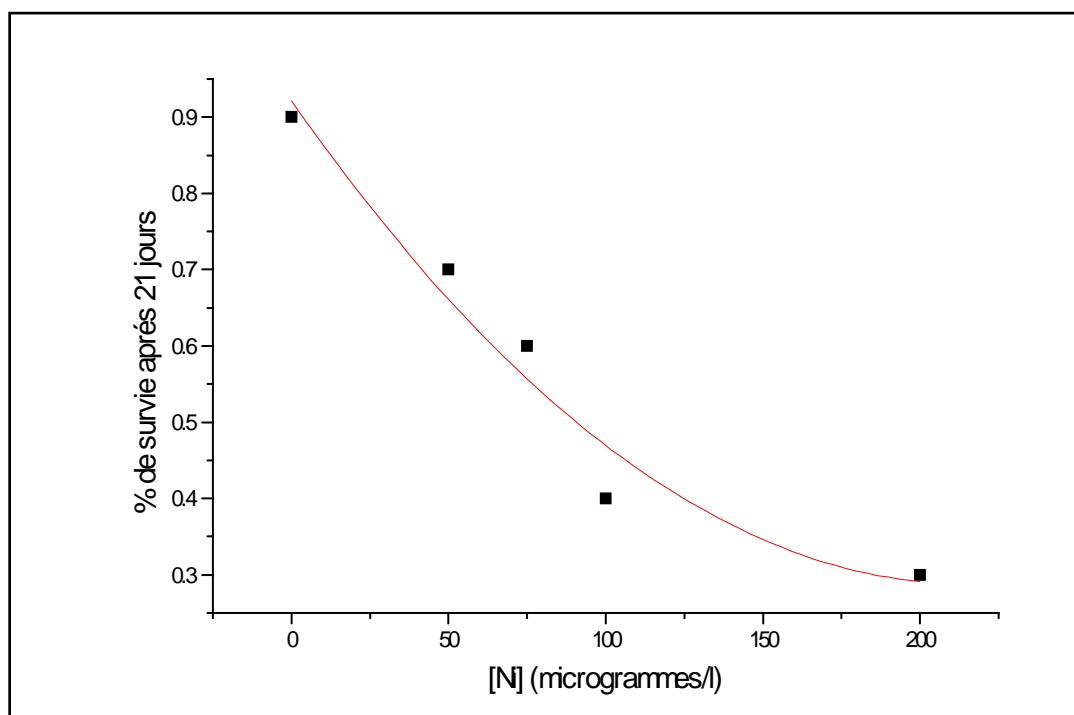


Figure 4: Courbe représentative de la variation du pourcentage de survie après 21 jours en fonction des différentes concentrations de nickel.

Pour déterminer la CL50-21 jours, on procède à une interpolation c'est à dire qu'on pose $y = 0,5$ ce qui correspond à un pourcentage de survie de 50%, et on détermine la valeur de "x" (concent^{ion} métallique) correspondante, donc la CL50-21 jours.

Ainsi pour le cadmium en posant $y = 0,5$ on obtient l'équation suivante :

$$0,23941074 \cdot x^2 - 1,1264112 \cdot x + 0,38718009 = 0$$

Cette équation admet comme solution la valeur 0,37 µg/l qui peut également être confirmée graphiquement (en recherchant l'abscisse "x" du point appartenant à la courbe et ayant comme ordonnée $y=0,5$) comme étant celle qui provoque la mortalité de 50 % des individus, donc pour le cadmium la CL50-21 jours = 0,37µg/l.

Pour le cuivre en posant $y = 0,5$ l'équation obtenue est la suivante :

$$2,5669782 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 - 0,026519875 \cdot x + 0,28751651 = 0$$

Cette équation admet comme solution la valeur 10,95 µg/l qui peut également être confirmée graphiquement comme étant la CL50-21 jours du cuivre.

Dans le cas du nickel pour $y = 0,5$ on obtient l'équation suivante :

$$1,3666334 \cdot 10^{-5} \cdot x^2 - 0,0058841159 \cdot x + 0,42127872 = 0$$

de manière analogue aux cas du cuivre et du cadmium, la résolution de l'équation ainsi que la vérification graphique nous ont permis de déterminer pour le nickel la valeur de la CL50-21 jours qui est de 90,70 µg/l.

Exemple d'application du principe de l'approximation par un polynome déterminé par le critère des moindres carrés :

On prend l'exemple des résultats obtenus dans le test avec le nickel.

Les valeurs expérimentales relatives au pourcentage de survie après 21 jours notées "b_i" en fonction des différentes concentrations de nickel "a_i", sont les suivantes :

$$a_1 = 0 \quad b_1 = 0,9$$

$$a_2 = 50 \quad b_2 = 0,7$$

$$a_3 = 75 \quad b_3 = 0,6$$

$$a_4 = 100 \quad b_4 = 0,4$$

$$a_5 = 200 \quad b_5 = 0,3$$

Nous avons cinq points donc $N = 5$, et nous recherchons un polynôme de 2^{ème} degré ($p = 2$) de la forme :

$$C_1 \cdot X^2 + C_2 \cdot X + C_3$$

Les valeurs des coefficients C_1 , C_2 et C_3 peuvent être déterminées en résolvant le système d'équations de la forme :

$$C_1 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i)^4 + C_2 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i)^3 + C_3 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i)^2 = \sum_{i=1}^5 b_i \cdot (a_i)^2$$

$$C_1 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i)^3 + C_2 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i)^2 + C_3 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i) = \sum_{i=1}^5 b_i \cdot (a_i)$$

$$C_1 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i)^2 + C_2 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i) + C_3 \cdot \sum_{i=1}^5 (a_i)^0 = \sum_{i=1}^5 b_i \cdot (a_i)^0$$

en remplaçant différentes valeurs " a_i " et " b_i " on obtient le système d'équations suivant :

$$1737890625 \cdot C_1 + 9546875 \cdot C_2 + 58125 \cdot C_3 = 21125$$

$$9546875 \cdot C_1 + 58125 \cdot C_2 + 425 \cdot C_3 = 180$$

$$58125 \cdot C_1 + 425 \cdot C_2 + 4 \cdot C_3 = 2$$

les solutions de ce système d'équation sont $C_1 = 1,3666334 \cdot 10^{-5}$

$$C_2 = -0,0058841159$$

$$C_3 = 0,92127872$$

Détermination des seuils de toxicité NOEC et LOEC :

1- Détermination de la NOEC :

La NOEC (No Observed Effect Concentration) est définie comme étant la plus forte concentration à laquelle aucun effet toxique n'est observé.

Dans le cas par exemple des résultats relatifs au nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours, la plus grande concentration de cadmium qui ne provoque pas de différence significative par rapport au témoin et ceci dans tous les tests considérés (Newman et Keuls, Dunett, Bon Ferroni et Mann whitney) est $C_2 = 0,18 \mu\text{g/l}$ donc la NOEC = $0,18 \mu\text{g/l}$.

2- Détermination de la LOEC :

La LOEC (Low Observed Effect Concentration) est définie comme étant la plus faible concentration provoquant un effet toxique, elle correspond à la plus faible concentration qui provoque une différence significative par rapport au témoin, dans le cas des résultats relatifs au nombre de jeunes daphnies pondues en 21 jours (test cadmium), cette concentration correspond pour tous les tests utilisés (Newman et Keuls, Dunett, Bon Ferroni et Mann whitney) à $C_3 = 1 \mu\text{gCd/l}$ donc la LOEC = $1 \mu\text{gCd/l}$.

Evaluation du taux intrinsèque de croissance de la population (r_m) :

Pour évaluer ce paramètre il faut résoudre une équation non linéaire pour cela nous avons utilisé un programme disponible au niveau de l'institut d'aéronautique de l'université de Blida.

Nous donnons dans ce qui suit un exemple des équations non linéaires qui nous ont permis d'évaluer la valeur du " r_m " pour les individus témoins.

Ainsi donc

pour le 7^{ème} jour l'équation est

$$7,7 \times e^{-7r_m} = 1. \text{ et le } r_m = 0,2916$$

pour le 9^{ème} jour l'équation est

$$7,7 \times e^{-7r_m} + 11,9 \times e^{-9r_m} = 1 \text{ et le } r_m = 0,3704$$

pour le 12^{ème} jour l'équation est

$$7,7 \times e^{-7r_m} + 11,9 \times e^{-9r_m} + 18,3 \times e^{-12r_m} = 1 \text{ et le } r_m = 0,3932$$

pour le 16^{ème} jour l'équation est

$$7,7 \times e^{-7r_m} + 11,9 \times e^{-9r_m} + 18,3 \times e^{-12r_m} + 12,8 \times e^{-16r_m} = 1$$

et le $r_m = 0,3959$

pour le 19^{ème} jour l'équation est

$$7,7 \times e^{-7r_m} + 11,9 \times e^{-9r_m} + 18,3 \times e^{-12r_m} + 12,8 \times e^{-16r_m} + 15,03 \times e^{-19r_m} = 1$$

et le $r_m = 0,3968$

pour le 21^{ème} jour l'équation est

$$7,7 \times e^{-7r_m} + 11,9 \times e^{-9r_m} + 18,3 \times e^{-12r_m} + 12,8 \times e^{-16r_m} + 15,03 \times e^{-19r_m} + 12,79 \times e^{-21r_m} = 1 \text{ et le } r_m = 0,3971$$

APPENDICE B

Résultats expérimentaux relatifs au test de toxicité aiguë :

1- Survie :

Les résultats relatifs au paramètre survie (pourcentage d'inhibition après 48 heures) pour les différents métaux testés sont donnés dans les tableaux suivants:

Tableau 1: Pourcentage d'inhibition des daphnies (après 48 heures) en fonction des différentes concentrations de $K_2Cr_2O_7$.

Concentration de $K_2Cr_2O_7$ (mg/l)	% d'inhibition après 48 heures
Témoin	0
0,1	4
0,4	16
1	92
1,8	100
2	100
2,2	100

Tableau 2: Pourcentage d'inhibition des daphnies (après 48 heures) en fonction des différentes concentrations de cadmium.

Concentration de Cadmium (mg/l)	% d'inhibition après 48 heures
Témoin	0
0,004	32
0,06	40
0,15	84
0,24	100

Tableau 3: Pourcentage d'inhibition des daphnies (après 48 heures) en fonction des différentes concentrations de cuivre.

Concentration de Cuivre (mg/l)	% d'inhibition après 48 heures
Témoin	0
0,009	4
0,04	4
0,07	32
0,14	100

Tableau 4: Pourcentage d'inhibition des daphnies (après 48 heures) en fonction des différentes concentrations de nickel.

Concentration de nickel (mg/l)	% d'inhibition après 48 heures
Témoin	0
1	88
6	84
12	100
14	100

2- Evaluation de la quantité d'azote ammoniacal excrétée par individu en 48 heures :

Tableau 5: Quantité de N-NH₄ rejetée par individu en 48 heures dans le test avec K₂Cr₂O₇

[K ₂ Cr ₂ O ₇] (mg/l)	Quantité de N-NH ₄ rejetée (µg/ind/48h)
Témoin	0,11
0,1	0,15
0,4	0,1
1	0,16
1,8	0,18
2	0,21
2,2	0,22

Tableau 6: Quantité de N-NH₄ rejetée par individu en 48 heures dans le test avec le Cadmium

[Cd] (mg/l)	Quantité de N-NH ₄ rejetée (µg/ind/48h)
Témoin	0,11
0,004	1,06
0,06	1,04
0,15	1,23
0,24	1,65

Tableau 7: Quantité de N-NH₄ rejetée par individu en 48 heures dans le test avec le Cuivre

[Cu] (mg/l)	Quantité de N-NH ₄ rejetée (µg/ind/48h)
Témoin	0,11
0,009	0,36
0,04	0,40
0,07	0,40
0,14	0,39

Tableau 8: Quantité de N-NH₄ rejetée par individu en 48 heures dans le test avec le Nickel

[Ni] (mg/l)	Quantité de N-NH ₄ rejetée (µg/ind/48h)
Témoin	0,11
1	1,18
6	1,42
12	1,25
14	2,12

Résultats expérimentaux relatifs au test de toxicité chronique

1- Survie :

Tableau 9 : Valeur moyenne du pourcentage de survie en fonction du temps ± écart type (test cadmium)

[Cd ⁺⁺] Temps Jours	Témoin	0,06 (µg/l)	0,18 (µg/l)	1 (µg/l)	5 (µg/l)
02	100	100	100	100	100
05	100	100	100	100	100
07	100	100	100	100	100
09	100	100	100	100	100
12	100	100	100	70 ± 45,82	20 ± 42,16
16	100	90 ± 30	80 ± 40	20 ± 42,16	0
19	90 ± 30	80 ± 40	80 ± 40	0	0
21	90 ± 30	80 ± 40	70 ± 45,82	0	0

Tableau 10 : Valeur moyenne du pourcentage de survie en fonction du temps \pm écart type (test cuivre)

[Cu⁺⁺] Temps Jours	Témoin	2 (µg/l)	15 (µg/l)	20 (µg/l)	30 (µg/l)
02	100	100	100	100	100
05	100	100	100	100	100
07	100	100	100	100	100
09	100	100	100	100	100
12	100	100	100	100	100
16	100	100	100	100	40 \pm 48,98
19	90 \pm 30	60 \pm 48,98	70 \pm 45,82	50 \pm 50	0
21	90 \pm 30	60 \pm 48,98	40 \pm 48,98	30 \pm 45,82	0

Tableau 11 : Valeur moyenne du pourcentage de survie en fonction du temps \pm écart type (test nickel)

[Ni⁺⁺] Temps Jours	Témoin	50 (µg/l)	75 (µg/l)	100 (µg/l)	200 (µg/l)
02	100	100	100	100	100
05	100	100	100	100	100
07	100	100	100	100	100
09	100	100	100	100	100
12	100	100	100	100	100
16	100	80 \pm 40	70 \pm 45,82	80 \pm 40	40 \pm 48,98
19	90 \pm 30	80 \pm 40	60 \pm 48,98	70 \pm 45,82	40 \pm 48,98
21	90 \pm 30	70 \pm 45,82	60 \pm 48,98	40 \pm 48,98	30 \pm 45,82

2- Reproduction

2-1- Premier jour de ponte

Tableau 12: Valeur moyenne du premier jour de ponte \pm écart type
(test cadmium)

	Témoin	0,06 (µg/l)	0,18 (µg/l)	1 (µg/l)	5 (µg/l)
1^{er} jour de ponte	7	7,4 \pm 0,8	7,8 \pm 0,979	8,2 \pm 0,979	9

Tableau 13 : Valeur moyenne du premier jour de ponte \pm écart type
(test cuivre)

	Témoin	2 (µg/l)	15 (µg/l)	20 (µg/l)	30 (µg/l)
1^{er} jour de ponte	7	7,8 \pm 0,979	9,3 \pm 0,9	10,1 \pm 2,42	10,5 \pm 1,5

Tableau 14 : Valeur moyenne du premier jour de ponte \pm écart type
(test nickel)

	Témoin	50 (µg/l)	75 (µg/l)	100 (µg/l)	200 (µg/l)
1^{er} jour de ponte	7	7,4 \pm 0,8	7,8 \pm 0,979	8,4 \pm 0,91	8,3 \pm 1,55

2-2- Nombre de jeunes daphnies pondues

Tableau 15 : Valeur moyenne du nombre de jeunes daphnies pondues en fonction du temps \pm écart type (test cadmium)

[Cd⁺⁺] Temps Jours	Témoin	0,06 (µg/l)	0,18 (µg/l)	1 (µg/l)	5 (µg/l)
02	/	/	/	/	/
05	/	/	/	/	/
07	7,7 \pm 3	7,3 \pm 4,49	6,2 \pm 5,23	3 \pm 3,74	0
09	11,9 \pm 4,88	12,5 \pm 4,36	15 \pm 3,54	4,5 \pm 3,80	7 \pm 1,18
12	18,3 \pm 5,45	22,3 \pm 5,58	24,7 \pm 4,64	0	0
16	12,8 \pm 3,62	14 \pm 4,93	16,8 \pm 4,53	0	0
19	16,7 \pm 5,1	15,22 \pm 3,22	16,5 \pm 1,87	0	/
21	14,22 \pm 6,56	11,25 \pm 4,25	16,75 \pm 3,07	/	/

Tableau 16 : Valeur moyenne du nombre de jeunes daphnies pondues en fonction du temps \pm écart type (test cuivre)

[Cu⁺⁺] Temps Jours	Témoin	2 (µg/l)	15 (µg/l)	20 (µg/l)	30 (µg/l)
02	/	/	/	/	/
05	/	/	/	/	/
07	7,7 \pm 3	5,6 \pm 5,02	0	0,4 \pm 1,2	0
09	11,9 \pm 4,88	14 \pm 4,95	9,9 \pm 4,01	3,9 \pm 2,7	4,3 \pm 4,47
12	18,3 \pm 5,45	23,1 \pm 5,71	22,3 \pm 4,02	10,4 \pm 3,87	5,3 \pm 4,81
16	12,8 \pm 3,62	14,9 \pm 3,72	13,5 \pm 3,17	9,7 \pm 6,22	0
19	16,7 \pm 5,1	15,7 \pm 3,55	18,5 \pm 4,5	12,5 \pm 8,17	0
21	14,22 \pm 6,56	17,33 \pm 5,40	16,42 \pm 3,01	12,4 \pm 9,45	/

Tableau 17 : Valeur moyenne du nombre de jeunes daphnies pondues en fonction du temps \pm écart type (test nickel)

[Ni⁺⁺] Temps Jours	Témoin	50 (µg/l)	75 (µg/l)	100 (µg/l)	200 (µg/l)
02	/	/	/	/	/
05	/	/	/	/	/
07	7,7 \pm 3	7,9 \pm 4,67	4,8 \pm 4,19	2,2 \pm 3,42	2,7 \pm 2,86
09	11,9 \pm 4,88	14,1 \pm 3,7	9,7 \pm 2	8,5 \pm 2,5	6,2 \pm 3,4
12	18,3 \pm 5,45	23 \pm 4,62	20,6 \pm 6,8	19,7 \pm 2,41	11,6 \pm 8,32
16	12,8 \pm 3,62	14,3 \pm 5,19	15,6 \pm 3,8	14,6 \pm 3,69	4,4 \pm 5,93
19	16,7 \pm 5,1	20,62 \pm 6,47	23,42 \pm 4,03	23 \pm 6,34	7 \pm 7,14
21	14,22 \pm 6,56	12,75 \pm 4,40	9,33 \pm 2,68	9,14 \pm 1,72	2,75 \pm 2,94

3-Valeurs du taux intrinsèque de croissance de la population (r_m) à la fin du test :

Tableau 18 : Valeur du (r_m) à la fin du test pour les individus témoins et pour ceux exposés aux différentes concentrations de cadmium

	Témoin	0,06 (µg/l)	0,18(µg/l)	1(µg/l)	5(µg/l)
r_m	0,3971	0,3997	0,4023	0,2494	0,2162

Tableau 19 : Valeur du (r_m) à la fin du test pour les individus témoins et pour ceux exposés aux différentes concentrations de cuivre

	Témoin	2(µg/l)	15(µg/l)	20(µg/l)	30(µg/l)
r_m	0,3971	0,3938	0,3329	0,2691	0,2171

Tableau 20 : Valeur du (r_m) à la fin du test pour les individus témoins et pour ceux exposés aux différentes concentrations de nickel

	Témoin	50(µg/l)	75(µg/l)	100(µg/l)	200(µg/l)
r_m	0,3971	0,4091	0,3694	0,3413	0,3090

4-Evaluation de la quantité moyenne d'azote ammoniacal rejetée par individu :

Tableau 21 :Quantité moyenne d'azote ammoniacal (exprimée en μg) rejetée par individu \pm écart type pour les témoins et le test cadmium

Changement de milieu	N-NH ₄ /individu ($\mu\text{g}/\text{ind}$)				
	Valeur moyenne \pm Ecart type				
	Témoin	0,06	0,18	1	5
1 ^{er} (02 jours)	1,38 \pm 0,63	1,7 \pm 0,38	1,16 \pm 0,32	1,69 \pm 0,35	1,4 \pm 0,08
2 ^{ème} (05 jours)	3,22 \pm 0,87	-	-	3,79 \pm 0,38	1,96 \pm 0,86
3 ^{ème} (07 jours)	9,09 \pm 7,11	4,32 \pm 0,92	13,89 \pm 7,35	9,24 \pm 5,31	9,22 \pm 3,91
4 ^{ème} (09 jours)	3,53 \pm 1,09	5,29 \pm 0,88	9,96 \pm 5,80	6,97 \pm 1,95	7,8 \pm 5,09
5 ^{ème} (12 jours)	21,58 \pm 8,90	16,28 \pm 7,7	12,78 \pm 6,1	12,79 \pm 6,52	11,95 \pm 3,13
6 ^{ème} (16 jours)	21,32 \pm 6,98	9,51 \pm 1,26	7,36 \pm 0,87	9,3 \pm 1,23	10,51 \pm 0,05
7 ^{ème} (19 jours)	8,17 \pm 2,35	8,24 \pm 2,12	10,18 \pm 4,42	3,66 \pm 0,3	-
8 ^{ème} (21 jours)	4,67 \pm 1,01	5,21 \pm 1,15	6,28 \pm 1,90	-	-

Tableau 22 :Quantité moyenne d'azote ammoniacal (exprimée en μg) rejetée par individu \pm écart type pour les témoins et le test cuivre

Changement de milieu	N-NH ₄ /individu ($\mu\text{g}/\text{ind}$)				
	Valeur moyenne \pm Ecart type				
	Témoin	2	15	20	30
1 ^{er} (02 jours)	1,38 \pm 0,63	3,21 \pm 1,19	3,43 \pm 1,75	2,68 \pm 1,38	2,92 \pm 1,89
2 ^{ème} (05 jours)	3,22 \pm 0,87	1,53 \pm 0,73	1,57 \pm 0,61	1,55 \pm 0,09	1,66 \pm 0,72
3 ^{ème} (07 jours)	9,09 \pm 7,11	22,59 \pm 9,16	13,71 \pm 7,86	19,97 \pm 7,69	27,55 \pm 5,97
4 ^{ème} (09 jours)	3,53 \pm 1,09	19,07 \pm 9,64	3,99 \pm 1,07	4,21 \pm 1,60	3,89 \pm 0,92
5 ^{ème} (12 jours)	21,58 \pm 8,90	10,67 \pm 5,13	5,65 \pm 1,50	6,7 \pm 2,67	9,72 \pm 1,35
6 ^{ème} (16 jours)	21,32 \pm 6,98	16 \pm 6,08	19,24 \pm 9,25	8,51 \pm 0,22	8,69 \pm 0,26
7 ^{ème} (19 jours)	8,17 \pm 2,35	12,7 \pm 7,8	10,21 \pm 5,20	9,72 \pm 4,60	11,16 \pm 2,52
8 ^{ème} (21 jours)	4,67 \pm 1,01	5,76 \pm 2,64	5,77 \pm 1,69	5,3 \pm 0,95	-

Tableau 23 :Quantité moyenne d'azote ammoniacal (exprimée en μg) rejetée par individu \pm écart type pour les témoins et le test nickel

Changement de milieu	N-NH ₄ /individu ($\mu\text{g}/\text{ind}$)				
	Valeur moyenne \pm Ecart type				
	Témoin	50	75	100	200
1^{er} (02 jours)	1,38 \pm 0,63	1,77 \pm 0,62	1,69 \pm 0,48	1,72 \pm 0,93	1,53 \pm 0,64
2^{ème} (05 jours)	3,22 \pm 0,87	3,02 \pm 1,23	1,69 \pm 0,16	2,17 \pm 1,02	1,93 \pm 0,87
3^{ème} (07 jours)	9,09 \pm 7,11	34,67 \pm 20,08	24,94 \pm 14,52	37,78 \pm 18,57	25,45 \pm 10,11
4^{ème} (09 jours)	3,53 \pm 1,09	15,25 \pm 9,99	14,91 \pm 6,92	9,6 \pm 3,99	11,31 \pm 6,16
5^{ème} (12 jours)	21,58 \pm 8,90	13,67 \pm 8,95	12,75 \pm 7,67	13,97 \pm 8,73	16,32 \pm 9,29
6^{ème} (16 jours)	21,32 \pm 6,98	11,46 \pm 2,49	11,45 \pm 2,01	10,96 \pm 1,85	10,36 \pm 1,18
7^{ème} (19 jours)	8,17 \pm 2,35	21,26 \pm 12,08	23,53 \pm 15,83	27,36 \pm 17,13	18,18 \pm 7,53
8^{ème} (21 jours)	4,67 \pm 1,01	11,94 \pm 3,85	6,89 \pm 3,37	13,97 \pm 5,97	9,41 \pm 5,79

5-Evaluation de la quantité moyenne d'azote ammoniacal rejetée par individu et par jour tout au long de la durée du test de toxicité à long terme :

Cette évaluation donnée dans les tableaux suivants, a été obtenue en divisant la quantité moyenne rejetée par individu (tableaux 21 à 23) par le nombre de jours ayant précédé le changement de milieu (récupération de l'échantillon).

Tableau 24 :Quantité moyenne d'azote ammoniacal (exprimée en μg) rejetée par individu et par jour \pm écart type pour les témoins et le test cadmium

Changement de milieu	N-NH ₄ /individu/jour ($\mu\text{g}/\text{ind}/\text{jour}$)				
	Valeur moyenne \pm Ecart type				
	Témoin	0,06	0,18	1	5
1^{er} (02 jours)	0,69 \pm 0,31	0,85 \pm 0,19	0,58 \pm 0,16	0,84 \pm 0,17	0,7 \pm 0,04
2^{ème} (05 jours)	1,07 \pm 0,29	-	-	1,26 \pm 0,12	0,65 \pm 0,28
3^{ème} (07 jours)	4,54 \pm 3,55	2,16 \pm 0,46	6,94 \pm 3,67	4,62 \pm 2,65	4,61 \pm 1,95
4^{ème} (09 jours)	1,76 \pm 0,54	2,64 \pm 0,44	4,98 \pm 2,9	3,48 \pm 0,97	3,9 \pm 2,54
5^{ème} (12 jours)	7,19 \pm 2,96	5,42 \pm 2,56	4,26 \pm 2,03	4,26 \pm 2,17	3,98 \pm 1,04
6^{ème} (16 jours)	5,33 \pm 1,74	2,37 \pm 0,31	1,84 \pm 0,21	2,32 \pm 0,30	2,62 \pm 0,01
7^{ème} (19 jours)	2,72 \pm 0,78	2,74 \pm 0,70	3,39 \pm 1,47	1,22 \pm 0,1	-
8^{ème} (21 jours)	2,33 \pm 0,50	2,60 \pm 0,57	3,14 \pm 0,95	-	-

Tableau 25 :Quantité moyenne d'azote ammoniacal (exprimée en μg) rejetée par individu et par jour \pm écart type pour les témoins et le test cuivre

Changement de milieu	N-NH ₄ /individu/jour ($\mu\text{g}/\text{ind}/\text{jour}$)				
	Valeur moyenne \pm Ecart type				
	Témoin	2	15	20	30
1^{er} (02 jours)	0,69 \pm 0,31	1,60 \pm 0,59	1,71 \pm 0,87	1,34 \pm 0,69	1,46 \pm 0,94
2^{ème} (05 jours)	1,07 \pm 0,29	0,51 \pm 0,24	0,52 \pm 0,20	0,51 \pm 0,03	0,55 \pm 0,24
3^{ème} (07 jours)	4,54 \pm 3,55	11,29 \pm 4,58	6,85 \pm 3,93	9,98 \pm 3,84	13,77 \pm 2,98
4^{ème} (09 jours)	1,76 \pm 0,54	9,53 \pm 4,82	1,99 \pm 0,53	2,10 \pm 0,8	1,94 \pm 0,46
5^{ème} (12 jours)	7,19 \pm 2,96	3,55 \pm 1,71	1,88 \pm 0,5	2,23 \pm 0,89	3,24 \pm 0,45
6^{ème} (16 jours)	5,33 \pm 1,74	4 \pm 1,52	4,81 \pm 2,31	2,12 \pm 0,05	2,17 \pm 0,06
7^{ème} (19 jours)	2,72 \pm 0,78	4,23 \pm 2,6	3,40 \pm 1,73	3,24 \pm 1,53	3,72 \pm 0,84
8^{ème} (21 jours)	2,33 \pm 0,50	2,88 \pm 1,32	2,88 \pm 0,84	2,65 \pm 0,47	-

Tableau 26 :Quantité moyenne d'azote ammoniacal (exprimée en μg) rejetée par individu et par jour \pm écart type pour les témoins et le test nickel

Changement de milieu	N-NH ₄ /individu/jour ($\mu\text{g}/\text{ind}/\text{jour}$)				
	Valeur moyenne \pm Ecart type				
	Témoin	50	75	100	200
1^{er} (02 jours)	0,69 \pm 0,31	0,88 \pm 0,31	0,84 \pm 0,24	0,86 \pm 0,46	0,76 \pm 0,32
2^{ème} (05 jours)	1,07 \pm 0,29	1 \pm 0,41	0,56 \pm 0,05	0,72 \pm 0,34	0,64 \pm 0,29
3^{ème} (07 jours)	4,54 \pm 3,55	17,33 \pm 10,04	12,47 \pm 7,26	18,89 \pm 9,28	12,72 \pm 5,05
4^{ème} (09 jours)	1,76 \pm 0,54	7,62 \pm 4,99	7,45 \pm 3,46	4,8 \pm 1,99	5,65 \pm 3,08
5^{ème} (12 jours)	7,19 \pm 2,96	4,55 \pm 2,98	4,25 \pm 2,55	4,65 \pm 2,91	5,44 \pm 3,09
6^{ème} (16 jours)	5,33 \pm 1,74	2,86 \pm 0,62	2,86 \pm 0,50	2,74 \pm 0,46	2,59 \pm 0,29
7^{ème} (19 jours)	2,72 \pm 0,78	7,08 \pm 4,02	7,84 \pm 5,27	9,12 \pm 5,71	6,06 \pm 2,51
8^{ème} (21 jours)	2,33 \pm 0,50	5,97 \pm 1,92	3,44 \pm 1,68	6,98 \pm 2,98	4,70 \pm 2,89

APPENDICE C

Caractéristiques (origine et qualité) des différents produits chimiques utilisés :

L'origine et la qualité des produits chimiques utilisés dans les manipulations expérimentales sont données dans le tableau 27:

Tableau 27: Origine et qualité des produits chimiques utilisés

Produit	Formule	Origine	Pureté (%)	Aspect
Nitrate de calcium	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Prolabo	99	Poudre blanche
Nitrate de potassium	KNO_3	Prolabo	99	Poudre blanche
Sulfate de magnésium	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Panreac	99	Poudre blanche
Hydrogénophosphate de potassium	K_2HPO_4	Prolabo		Poudre blanche
Heptamolybdate d'ammonium	$(\text{NH}_4)_2\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Windsor Laboratories limited	99	Poudre blanche
Sulfate de zinc	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Normapur	99,5	Poudre blanche
Chlorure de cobalt	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Fluka	99	Poudre violet
Nitrate de manganèse	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck	98,5	Liquide rose
Acide citrique	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Prolabo		Cristaux blancs
Citrate de fer	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fluka		Pastilles noires
Sulfate de fer	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Panreac	99	Poudre verdâtre
Chlorure de fer	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Fluka	99	Solide jaune
Sulfate de cadmium	$3\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Normapur	99	Poudre blanche
Dichromate de potassium	$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Panreac	99	Poudre orange
Sulfate de nickel	$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck	99	Cristaux verts
Chlorure de calcium	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Prolabo	99	Grains blancs
Sulfate de cuivre	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Panreac	99	Cristaux bleus
Hydrogénocarbonate de sodium	NaHCO_3	Prolabo	99	Poudre blanche
Chlorure de potassium	KCl	Fluka	99	Poudre blanche

Dosage de l'azote ammoniacal par la méthode spectrométrique manuelle

(Norme internationale ISO 7150/1-1984) :

1- Principe :

Mesurage spectrométrique du composé bleu formé par réaction de l'ammonium avec les ions salicylate et hypochlorite en présence de nitrosopentacyanoferrate (III) (Nitroprussiate de sodium).

2- Réactifs :

2-1- Réactif coloré :

Dissoudre 130 ± 1 g de Salicylate de sodium ($C_7H_6O_3Na$) et 130 ± 1 g de Citrate trisodique dihydraté ($C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) dans de l'eau distillée, contenue dans une fiole jaugée de 1000 ml.

Ajouter une quantité d'eau suffisante pour avoir un volume total de liquide d'environ 950ml, puis ajouter $0,970 \pm 0,005$ g de sodium nitrosopentacyanoferrate (III) (Nitroprussiate de sodium) [$Fe(CN)_6NO$] $Na_2 \cdot 2H_2O$], et compléter le volume au trait de repère avec l'eau distillée.

2-2- Dichloroisocyanurate de sodium, solution :

Dissoudre $32 \pm 0,1$ g d'hydroxyde de sodium dans 500 ± 50 ml d'eau distillée. Refroidir la solution à température ambiante et ajouter $2 \pm 0,02$ g de dichloroisocyanurate dihydraté ($C_3N_3O_3Cl_2Na \cdot 2H_2O$), et transférer quantitativement la solution dans une fiole jaugée de 1000ml. Diluer au trait de repère avec l'eau distillée.

2-3- Azote ammoniacal, solution étalon à 10 mg/l :

Prélever à la pipette 0,5ml de la solution étalon de concentration 1000mg/l d'azote ammoniacal, et les introduire dans une fiole jaugée de 50ml. Diluer au trait de repère avec de l'eau distillée.

1ml de cette solution étalon contient 10 μ g d'azote ammoniacal.

Cette solution est préparée immédiatement avant emploi, elle est utilisée pour la préparation de la gamme étalon.

3- Appareillage :

Spectrophotomètre pouvant opérer à une longueur d'onde de 655 nm, équipé de cuves de parcours optique compris entre 10 et 50 mm.

4- Mode opératoire :**4-1- Prise d'essai :**

La prise d'essai maximale est de 40ml ; elle peut être utilisée pour des concentrations en azote ammoniacal allant jusqu'à 1mg/l.

4-2- Dosage :

4-2-1- Formation du composé absorbant :

Ajouter $4,00 \pm 0,05$ ml de réactif coloré et homogénéiser.

Ajouter alors $4,00 \pm 0,05$ ml de solution de dichloroisocyanurate de sodium et homogénéiser.

Diluer au trait de repère avec de l'eau distillée, et agiter vigoureusement la fiole.

4-2-2- Mesurages spectrophotométriques :

Après au moins 60 minutes, mesurer l'absorbance de la solution à la longueur d'onde d'absorbance maximale, environ 655nm, dans une cuve de parcours optique adéquat (10ou40mm).

4-3- Essai à blanc :

On procède comme décrit dans le dosage mais en utilisant 40 ± 1 ml d'eau distillée à la place de la prise d'essai.

4-4- Etalonnage :

Dans une série de neuf fioles jaugées de 50ml, ajouter au moyen d'une burette les volumes de solution étalon d'azote ammoniacal à 10mg/l (préparée juste avant emploi) indiqués ci-dessous, dans le tableau 28.

Pour la formation du composé absorbant, on procède comme indiqué dans le dosage pour les solutions d'essai.

Tableau 28 : Volumes de la solution étalon (10mg de N-NH₄/l) ajoutés dans les fioles de 50ml avec les concentrations de N-NH₄ correspondantes (préparation de la gamme étalon).

Volume en ml de la solution d'azote ammoniacal à 10mg/l	Concentration d'azote ammoniacal (mg/l)
0,05	0,01
0,1	0,02
0,25	0,05
0,5	0,1
1	0,2
1,5	0,3
2	0,4
2,5	0,5
3	0,6

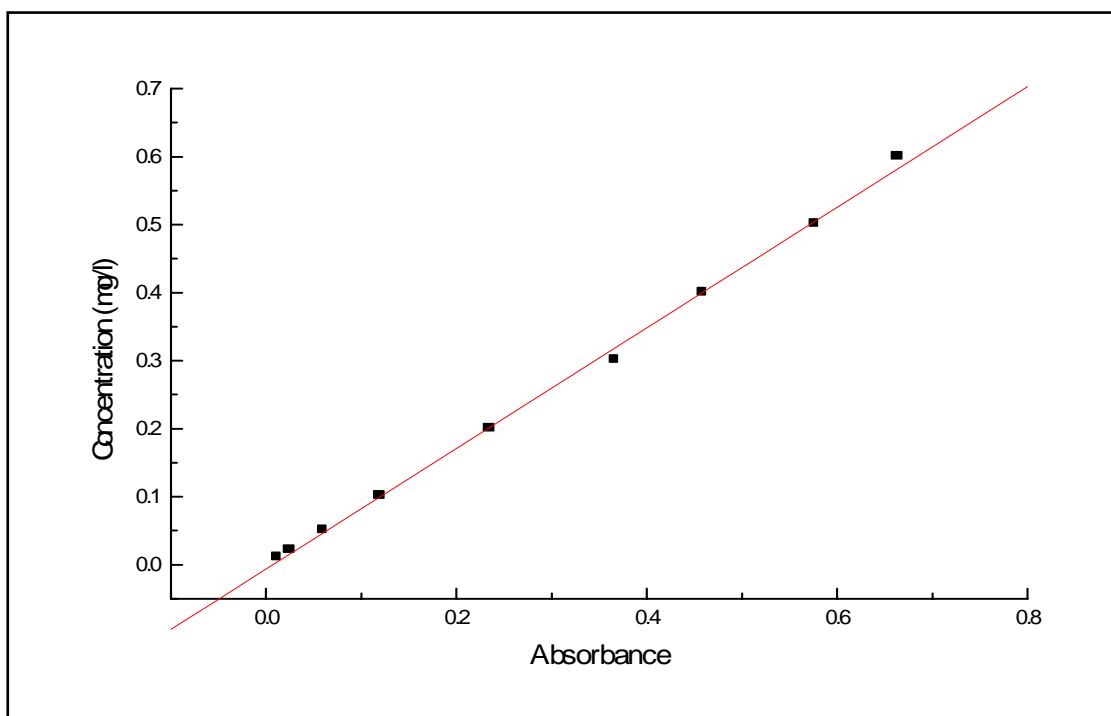
Pour les différentes concentrations d'ammonium, ainsi que pour l'essai à blanc on mesure l'absorbance correspondante puis on trace (figures 5 et 6) la courbe d'étalonnage

$$Ar = f([N-NH_4]) \text{ ou}$$

$$Ar = As - Ab \text{ avec}$$

As = Absorbance de la solution d'essai.

Ab = Absorbance de la solution d'essai à blanc.



Une droite d'équation :

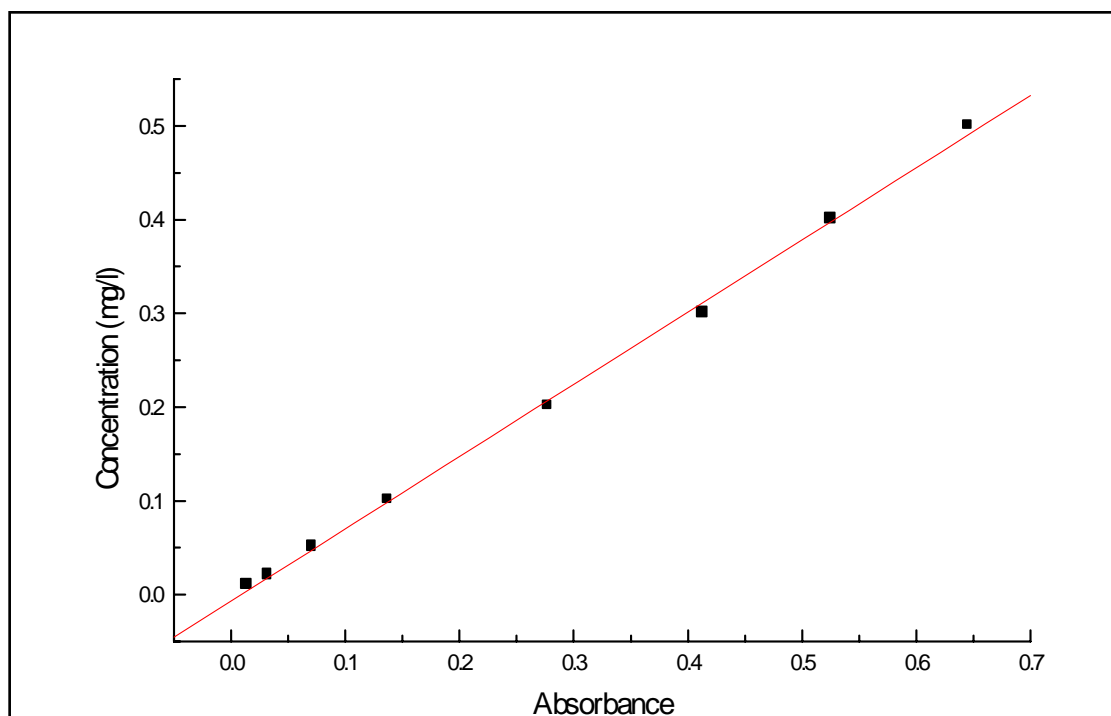
$$\text{Conc} = F(0) \cdot \text{Abs} + F(1) \quad \text{ou}$$

$$F(0) = 0,8862$$

$$F(1) = -0,0063$$

Avec un coefficient de corrélation $r = 0,999$

Figure 5 : Droite d'étalonnage exprimant la concentration d'azote ammoniacal en fonction de l'absorbance.



Une droite d'équation :

$$\text{Conc} = F(0) \cdot \text{Abs} + F(1) \quad \text{ou}$$

$$F(0) = 0,7704$$

$$F(1) = -0,0068$$

Avec un coefficient de corrélation $r = 0,999$

Figure 6 : Droite d'étalonnage exprimant la concentration d'azote ammoniacal en fonction de l'absorbance.

Evaluation de la quantité d'azote ammoniacal apportée par le milieu d'essai dans les tests de toxicité à long terme :

L'azote ammoniacal contenu dans le milieu d'essai est du au milieu de Lefèvre czarda (LC), l'eau minérale Saida étant exempte d'azote ammoniacal.

Pour la préparation de la solution "I", seule composante du milieu LC à contenir de l'azote ammoniacal, on doit dissoudre 60 mg d'heptamolybdate d'ammonium $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}, 4\text{H}_2\text{O}]$ dans 01 litre d'eau distillée.

La masse moléculaire de $[(\text{NH}_4)_6\text{M}_7\text{O}_{24},4\text{H}_2\text{O}]$ étant de 1235,59 gr et la masse moléculaire de $(\text{NH}_4)_6$ étant de 108,23 gr, la quantité d'azote ammoniacal contenue dans 01 litre de la solution "T" est de $4,08 \cdot 10^{-3}$ gr .

Pour la préparation d'un litre de milieu LC nous n'utilisons que 0,5 ml de la solution "T", c'est à dire $2,040 \cdot 10^{-6}$ gr d'azote ammoniacal, donc la concentration d'azote ammoniacal dans le milieu LC est de $2,040 \cdot 10^{-6}$ g/l.

Dans 01 litre de milieu d'essai que nous avons utilisé dans les tests de toxicité à long terme il y'a 200 ml de milieu LC donc 0,40 μg d'azote ammoniacal.

Dans chaque bêcher de test c'est à dire dans 100 ml de milieu d'essai cette quantité a été soustraite de la concentration mesurée

Evaluation de la quantité d'azote ammoniacal rejetée par individu à partir de la valeur dosée :

1- Test de toxicité aigue :

L'échantillon prélevé après 48 heures a un volume de 50ml (05 tubes de 10ml), le dosage donne la concentration de l'échantillon en (mg/l), à partir de cette valeur on détermine la quantité d'azote ammoniacal contenue dans 50ml de solution, cette quantité étant produite par 25 daphnies (05 daphnies par tube) elle doit être divisée par 25 afin de retrouver la quantité de $[\text{N-NH}_4]$ produite par individu en 48 heures.

Dans le cas du test aigu le milieu d'essai est totalement exempt d'azote ammoniacal c'est à dire que $[\text{N-NH}_4]_{\text{initial}} = 0$ mg/l ainsi toute la quantité d'azote ammoniacal dosée $[\text{N-NH}_4]_{\text{final}}$ est due à l'excrétion des daphnies.

2- Test de toxicité à long terme :

L'échantillon prélevé après 48, 72 ou 96 heures a un volume de 100 ml (contenu dans le bêcher test) le dosage nous donne la concentration de N-NH_4 en (mg/l), on détermine à partir de cette valeur la quantité de N-NH_4 contenue dans 100 ml ($[\text{N-NH}_4]_{\text{final}}$).

Pour déterminer la quantité d'azote ammoniacal rejetée par individu testé il faut soustraire la quantité d'azote ammoniacal initialement contenue dans le milieu d'essai $[N-NH_4]_{initial}$ et qui est de $0,04 \mu g/100ml$, ainsi donc la quantité d'azote ammoniacal rejetée par individu est : $[N-NH_4]_{rejetée} = [N-NH_4]_{final} - [N-NH_4]_{initial}$.

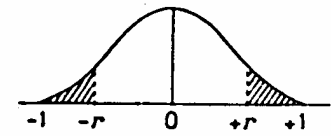
En divisant cette valeur par le nombre de jours (2, 3 ou 4 séparant deux changements de milieu) on obtient la quantité de $N-NH_4$ rejetée par individu et par jour.

Utilisation de la cellule de Malassez :

- On essuie la cellule de Malassez et on la recouvre d'une lamelle.
- A l'aide d'une pipette Pasteur, on prélève quelques gouttes de la solution d'algue et on remplit l'intervalle entre lame et lamelle, puis on laisse sédimenter pendant au moins 05 minutes.
- On place la cellule sous le microscope et on fait la mise au point (grossissement X 100). Le quadrillage de la cellule de comptage apparaît au dessous des cellules algales, ce quadrillage est composé de 25 rectangles et chaque rectangle comporte 20 carrés élémentaires.
- On dénombre les cellules contenues dans 10 carrés élémentaires (on observe un seul rectangle) et on déduit le nombre moyen de cellules contenues par carré élémentaire c'est à dire dans un volume de $5 \times 10^{-7} ml$ (un rectangle correspond à un volume de $0,01 m^3$).
- On détermine la concentration de la solution d'algue en calculant le nombre de cellules contenues dans un volume de 1 ml.

Table du coefficient de corrélation (*)

La table indique la probabilité α pour que le coefficient de corrélation égale ou dépasse, en valeur absolue, une valeur donnée r , c'est-à-dire la probabilité extérieure à l'intervalle $(-r, +r)$, en fonction du nombre de degrés de liberté (d.d.l.).



d.d.l. \ α	0,10	0,05	0,02	0,01
1	0,9877	0,9969	0,9995	0,9999
2	0,9000	0,9500	0,9800	0,9900
3	0,8054	0,8783	0,9343	0,9587
4	0,7293	0,8114	0,8822	0,9172
5	0,6694	0,7545	0,8329	0,8745
6	0,6215	0,7067	0,7887	0,8343
7	0,5822	0,6664	0,7498	0,7977
8	0,5494	0,6319	0,7155	0,7646
9	0,5214	0,6021	0,6851	0,7348
10	0,4973	0,5760	0,6581	0,7079
11	0,4762	0,5529	0,6339	0,6835
12	0,4575	0,5324	0,6120	0,6614
13	0,4409	0,5139	0,5923	0,6411
14	0,4259	0,4973	0,5742	0,6226
15	0,4124	0,4821	0,5577	0,6055
16	0,4000	0,4683	0,5425	0,5897
17	0,3887	0,4555	0,5285	0,5751
18	0,3783	0,4438	0,5155	0,5614
19	0,3687	0,4329	0,5034	0,5487
20	0,3598	0,4227	0,4921	0,5368
25	0,3233	0,3809	0,4451	0,4869
30	0,2960	0,3494	0,4093	0,4487
35	0,2746	0,3246	0,3810	0,4182
40	0,2573	0,3044	0,3578	0,3932
45	0,2428	0,2875	0,3384	0,3721
50	0,2306	0,2732	0,3218	0,3541
60	0,2108	0,2500	0,2948	0,3248
70	0,1954	0,2319	0,2737	0,3017
80	0,1829	0,2172	0,2565	0,2830
90	0,1726	0,2050	0,2422	0,2673
100	0,1638	0,1946	0,2301	0,2540

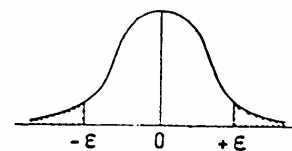
Exemple : Avec d.d.l. = 30, pour $r = 0,3494$ la probabilité est $\alpha = 0,05$.

(*) D'après Fisher et Yates, Statistical tables for biological, agricultural and medical research (Oliver and Boyd, Edinburgh), avec l'aimable autorisation des auteurs et des éditeurs.

Table utilisée dans le calcul de l'intervalle de confiance d'un pourcentage

Table de l'écart-réduit (loi normale) (*)

La table donne la probabilité α pour que l'écart-réduit égale ou dépasse, en valeur absolue, une valeur donnée ε , c'est-à-dire la probabilité extérieure à l'intervalle $(-\varepsilon, +\varepsilon)$.



α	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,00	∞	2,576	2,326	2,170	2,054	1,960	1,881	1,812	1,751	1,695
0,10	1,645	1,598	1,555	1,514	1,476	1,440	1,405	1,372	1,341	1,311
0,20	1,282	1,254	1,227	1,200	1,175	1,150	1,126	1,103	1,080	1,058
0,30	1,036	1,015	0,994	0,974	0,954	0,935	0,915	0,896	0,878	0,860
0,40	0,842	0,824	0,806	0,789	0,772	0,755	0,739	0,722	0,706	0,690
0,50	0,674	0,659	0,643	0,628	0,613	0,598	0,583	0,568	0,553	0,539
0,60	0,524	0,510	0,496	0,482	0,468	0,454	0,440	0,426	0,412	0,399
0,70	0,385	0,372	0,358	0,345	0,332	0,319	0,305	0,292	0,279	0,266
0,80	0,253	0,240	0,228	0,215	0,202	0,189	0,176	0,164	0,151	0,138
0,90	0,126	0,113	0,100	0,088	0,075	0,063	0,050	0,038	0,025	0,013

La probabilité α s'obtient par addition des nombres inscrits en marge.

Exemple : Pour $\varepsilon = 1,960$ la probabilité est $\alpha = 0,00 + 0,05 = 0,05$.

Table pour les petites valeurs de la probabilité

α	0,001	0,000 1	0,000 01	0,000 001	0,000 000 1	0,000 000 01	0,000 000 001
ε	3,29053	3,89059	4,41717	4,89164	5,32672	5,73073	6,10941

(*) D'après Fisher et Yates, Statistical tables for biological, agricultural, and medical research (Oliver and Boyd, Edinburgh) avec l'aimable autorisation des auteurs et des éditeurs.

Limites supérieures de signification' de la distribution F P = 0,05

P = P (droite) = intégrale entre F et l'infini

Table with columns for degrees of freedom (1 to infinity) and rows for various values of F (161.44 to 3.84). The table provides critical values for the F-distribution at a significance level of 0.05.

TABLES DES VALEURS CRITIQUES DU TEST DE NEWMAN ET KEULS: $\alpha = 0,05$

Valeurs critiques $q_{1-\alpha}$

pour $\alpha = 0,05$, $p = 2(1)20$ et $k = 2(1)20, 24, 30, 40, 60, 120, \infty$.

$k \backslash p$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
2	6,08	8,33	9,80	10,88	11,74	12,44	13,03	13,54	13,99	14,39	14,75	15,08	15,38	15,65	15,91	16,14	16,37	16,57	16,77
3	4,50	5,91	6,82	7,50	8,04	8,48	8,85	9,18	9,46	9,72	9,95	10,15	10,35	10,52	10,69	10,84	10,98	11,11	11,24
4	3,93	5,04	5,76	6,29	6,71	7,05	7,35	7,60	7,83	8,03	8,21	8,37	8,52	8,66	8,79	8,91	9,03	9,13	9,23
5	3,64	4,60	5,22	5,67	6,03	6,33	6,58	6,80	6,99	7,17	7,32	7,47	7,60	7,72	7,83	7,93	8,03	8,12	8,21
6	3,46	4,34	4,90	5,30	5,63	5,90	6,12	6,32	6,49	6,65	6,79	6,92	7,03	7,14	7,24	7,34	7,43	7,51	7,59
7	3,34	4,16	4,68	5,06	5,36	5,61	5,82	6,00	6,16	6,30	6,43	6,55	6,66	6,76	6,85	6,94	7,02	7,10	7,17
8	3,26	4,04	4,53	4,89	5,17	5,40	5,60	5,77	5,92	6,05	6,18	6,29	6,39	6,48	6,57	6,65	6,73	6,80	6,87
9	3,20	3,95	4,41	4,76	5,02	5,24	5,43	5,59	5,74	5,87	5,98	6,09	6,19	6,28	6,36	6,44	6,51	6,58	6,64
10	3,15	3,88	4,33	4,65	4,91	5,12	5,30	5,46	5,60	5,72	5,83	5,93	6,03	6,11	6,19	6,27	6,34	6,40	6,47
11	3,11	3,82	4,26	4,57	4,82	5,03	5,20	5,35	5,49	5,61	5,71	5,81	5,90	5,98	6,06	6,13	6,20	6,27	6,33
12	3,08	3,77	4,20	4,51	4,75	4,95	5,12	5,27	5,39	5,51	5,61	5,71	5,80	5,88	5,95	6,02	6,09	6,15	6,21
13	3,06	3,73	4,15	4,45	4,69	4,88	5,05	5,19	5,32	5,43	5,53	5,63	5,71	5,79	5,86	5,93	5,99	6,05	6,11
14	3,03	3,70	4,11	4,41	4,64	4,83	4,99	5,13	5,25	5,36	5,46	5,55	5,64	5,71	5,79	5,85	5,91	5,97	6,03
15	3,01	3,67	4,08	4,37	4,59	4,78	4,94	5,08	5,20	5,31	5,40	5,49	5,57	5,65	5,72	5,78	5,85	5,90	5,96
16	3,00	3,65	4,05	4,33	4,56	4,74	4,90	5,03	5,15	5,26	5,35	5,44	5,52	5,59	5,66	5,73	5,79	5,84	5,90
17	2,98	3,63	4,02	4,30	4,52	4,70	4,86	4,99	5,11	5,21	5,31	5,39	5,47	5,54	5,61	5,67	5,73	5,79	5,84
18	2,97	3,61	4,00	4,28	4,49	4,67	4,82	4,96	5,07	5,17	5,27	5,35	5,43	5,50	5,57	5,63	5,69	5,74	5,79
19	2,96	3,59	3,98	4,25	4,47	4,65	4,79	4,92	5,04	5,14	5,23	5,31	5,39	5,46	5,53	5,59	5,65	5,70	5,75
20	2,95	3,58	3,96	4,23	4,45	4,62	4,77	4,90	5,01	5,11	5,20	5,28	5,36	5,43	5,49	5,55	5,61	5,66	5,71
24	2,92	3,53	3,90	4,17	4,37	4,54	4,68	4,81	4,92	5,01	5,10	5,18	5,25	5,32	5,38	5,44	5,49	5,55	5,59
30	2,89	3,49	3,85	4,10	4,30	4,46	4,60	4,72	4,82	4,92	5,00	5,08	5,15	5,21	5,27	5,33	5,38	5,43	5,47
40	2,86	3,44	3,79	4,04	4,23	4,39	4,52	4,63	4,73	4,82	4,90	4,98	5,04	5,11	5,16	5,22	5,27	5,31	5,36
60	2,83	3,40	3,74	3,98	4,16	4,31	4,44	4,55	4,65	4,73	4,81	4,88	4,94	5,00	5,06	5,11	5,15	5,20	5,24
120	2,80	3,36	3,68	3,92	4,10	4,24	4,36	4,47	4,56	4,64	4,71	4,78	4,84	4,90	4,95	5,00	5,04	5,09	5,13
∞	2,77	3,31	3,63	3,86	4,03	4,17	4,29	4,39	4,47	4,55	4,62	4,68	4,74	4,80	4,85	4,89	4,93	4,97	5,01

Exemple: $q_{0,95} = 3,96$ pour $p = 4$ populations et $k = 20$ degrés de liberté.

TABLES DES VALEURS CRITIQUES DU TEST DE DUNNETT: $\alpha = 0,05$ Valeurs critiques $d_{1-\alpha/2}$

pour $\alpha = 0,05$, $p = 1(1)12, 15, 20$ (nombre de populations à l'exclusion du ou des témoins)
et $k = 5(1)20, 24, 30, 40, 60, 120, \infty$.

$k \backslash p$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	15	20
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,90	3,97	4,03	4,09	4,14	4,26	4,42
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,64	3,71	3,76	3,81	3,86	3,97	4,11
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,47	3,53	3,58	3,63	3,67	3,78	3,91
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,35	3,41	3,46	3,50	3,54	3,64	3,76
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,26	3,32	3,36	3,40	3,44	3,53	3,65
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,19	3,24	3,29	3,33	3,36	3,45	3,57
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,14	3,19	3,23	3,27	3,30	3,39	3,50
12	2,18	2,50	2,68	2,81	2,90	2,98	3,04	3,09	3,14	3,18	3,22	3,25	3,34	3,45
13	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,06	3,10	3,14	3,18	3,21	3,29	3,40
14	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,02	3,07	3,11	3,14	3,18	3,26	3,36
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,00	3,04	3,08	3,12	3,15	3,23	3,33
16	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,97	3,02	3,06	3,09	3,12	3,20	3,30
17	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,95	3,00	3,03	3,07	3,10	3,18	3,27
18	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,94	2,98	3,01	3,05	3,08	3,16	3,25
19	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,92	2,96	3,00	3,03	3,06	3,14	3,23
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,90	2,95	2,98	3,02	3,05	3,12	3,22
24	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,86	2,90	2,94	2,97	3,00	3,07	3,16
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,82	2,86	2,89	2,92	2,95	3,02	3,11
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,77	2,81	2,85	2,87	2,90	2,97	3,06
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,73	2,77	2,80	2,83	2,86	2,92	3,00
120	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,69	2,73	2,76	2,79	2,81	2,87	2,95
∞	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,61	2,65	2,69	2,72	2,74	2,77	2,83	2,91

Exemple: $d_{0,975} = 2,54$ pour $p = 3$ (trois populations comparées à un témoin) et $k = 20$ degrés de liberté.

TABLE DES DISTRIBUTIONS t DE STUDENTValeurs critiques t_p telles que :

$$\int_{-\infty}^{t_p} c(1 + t^2/k)^{-(k+1)/2} dt = p,$$

pour $p = 0.6(0.1)0.9, 0.95, 0.975, 0.99, 0.995, 0.999, 0.9995$
 et $k = 1(1)30, 40(20)100, 200, 500, \infty$.

$k \backslash p$	0.6	0.7	0.8	0.9	0.95	0.975	0.99	0.995	0.999	0.9995
1	0,325	0,727	1,376	3,078	6,314	12,71	31,82	63,66	318,3	636,6
2	0,289	0,617	1,061	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925	22,33	31,60
3	0,277	0,584	0,978	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841	10,22	12,94
4	0,271	0,569	0,941	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604	7,173	8,610
5	0,267	0,559	0,920	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032	5,893	6,859
6	0,265	0,553	0,906	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707	5,208	5,959
7	0,263	0,549	0,896	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499	4,785	5,405
8	0,262	0,546	0,889	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355	4,501	5,041
9	0,261	0,543	0,883	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250	4,297	4,781
10	0,260	0,542	0,879	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169	4,144	4,587
11	0,260	0,540	0,876	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106	4,025	4,437
12	0,259	0,539	0,873	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055	3,930	4,318
13	0,259	0,538	0,870	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012	3,852	4,221
14	0,258	0,537	0,868	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977	3,787	4,140
15	0,258	0,536	0,866	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947	3,733	4,073
16	0,258	0,535	0,865	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921	3,686	4,015
17	0,257	0,534	0,863	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898	3,646	3,965
18	0,257	0,534	0,862	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878	3,611	3,922
19	0,257	0,533	0,861	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861	3,579	3,883
20	0,257	0,533	0,860	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845	3,552	3,850
21	0,257	0,532	0,859	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831	3,527	3,819
22	0,256	0,532	0,858	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819	3,505	3,792
23	0,256	0,532	0,858	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807	3,485	3,767
24	0,256	0,531	0,857	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797	3,467	3,745
25	0,256	0,531	0,856	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787	3,450	3,725
26	0,256	0,531	0,856	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779	3,435	3,707
27	0,256	0,531	0,855	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771	3,421	3,690
28	0,256	0,530	0,855	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763	3,408	3,674
29	0,256	0,530	0,854	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756	3,396	3,659
30	0,256	0,530	0,854	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750	3,385	3,646
40	0,255	0,529	0,851	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704	3,307	3,551
60	0,254	0,527	0,848	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660	3,232	3,460
80	0,254	0,527	0,846	1,292	1,664	1,990	2,374	2,639	3,195	3,415
100	0,254	0,526	0,845	1,290	1,660	1,984	2,365	2,626	3,174	3,389
200	0,254	0,525	0,843	1,286	1,653	1,972	2,345	2,601	3,131	3,339
500	0,253	0,525	0,842	1,283	1,648	1,965	2,334	2,586	3,106	3,310
∞	0,253	0,524	0,842	1,282	1,645	1,960	2,326	2,576	3,090	3,291

Exemples: $t_{0,975} = 2,228$ pour $k = 10$ degrés de liberté;

$t_{0,025} = -2,086$ pour $k = 20$ degrés de liberté.

REFERENCES

1. Gu, M.B. and Chol, S.H., "Monitoring and classification of toxicity using recombinant bioluminescent bacteria", *Water science and technology*, V.43, n°2, (2001), 147-154.
2. Vindimian, E. et Garric, J., "Bio-essais et Bio-indicateurs de toxicité dans le milieu naturel", Cemagref, Lyon, (1993), 55p.
3. Terhaar, C.J., Ewell, W.S., Dziuba, S.P., White, W.W. and Murphy, P.J., "A laboratory model for evaluating the behavior of heavy metals in an aquatic environment", *Water Research*, V.11, n°1, (1977), 101-110.
4. Polprasert, C., "Heavy metal pollution in the Chao phraya river estuary, Thailand", *Water Research*, V.16, n°6, (1982), 775-784.
5. Ramade, F., "Eléments d'Ecologie : Ecologie Appliquée", Mc Graw-Hill, Paris, (1982), 452p.
6. Bishop, P.L., "Marine Pollution and its Control", Mc Graw-Hill Book Company, New York, (1983), 357p.
7. An, H.K., Park, B.Y. and Kim, D.S., "Crab shell for the removal of heavy metals from aqueous solution", *Water Research*, V. 35, n°15, (2001), 3551-3556.
8. Lauwerys, R.R., "Toxicologie Industrielle et Intoxications Professionnelles", Masson, Paris, (1992), 679p.
9. Ramade, F., "Ecotoxicologie", Masson, Paris, (1979), 224p.
10. Académie des sciences-CADAS., "Etat de la recherche toxicologique en France – Rapport commun N°9-", Lavoisier Technique et Documentation, Paris, (1998), 92p.
11. Chavéron, H., "Introduction à la Toxicologie Nutritionnelle", Editions Technique et Documentation, Paris, (1999), 213p.
12. Kintz, P., "Toxicologie et Pharmacologie Médicolégales", Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, Nancy, (1998), 9-10.
13. Cabridenc, R. et Lundahl, P., "Intérêt et limites d'un test daphnie pour l'étude des nuisances des polluants vis à vis de l'environnement", *Techniques Sciences Méthodes*, V.6, n°2, (1974), 340-345.
14. Derache, P., "Toxicologie et Sécurité des Aliments -Mécanisme d'action des toxiques-", Technique et Documentation Lavoisier, Paris, (1989), 39-64.
15. Angelier, E., "Ecologie des Eaux Courantes", Technique et Documentation, Paris, (2001), 195p.

16. Marquet, P. et Lachatre, G., "Toxicologie et Pharmacologie Médicolégales - Devenir des xénobiotiques dans l'organisme-", Editions Scientifiques et Médicales Elsevier, Nancy, (1998), 27-66.
17. Bounias, M., "Traité de Toxicologie Générale", Springer, Paris, (1999), 789p.
18. Glomot, R., "Toxicologie et Sécurité des Aliments -Etude toxicologique in vivo-", Technique et Documentation- Lavoisier, Paris, (1989), 65-84.
19. Fournier, E., "Toxicologie", Ellipses, Paris, (1993), 848p.
20. Picot, A. et Grenouillet, P., "La Sécurité en Laboratoire de Chimie et de Biochimie", Technique et Documentation Lavoisier, Paris, (1992), 424p .
21. Lu, F. C., "Toxicologie : Données générales, procédure d'évaluation, organes cibles, évaluation du risque", Masson, Paris, (1992), 361p.
22. Rondia, D., "Introduction à la Toxicologie de l'Environnement", Edition Université de Liège Faculté des Sciences Appliquées, Liège, (1977), 272p.
23. Douart, J.P., "L'oligothérapie en pathologie fonctionnelle", Editions Maloine, Paris, (1994), 293p.
24. Brodie, B. and Maickel, R., "Proceedings of the First International Pharmacological Meeting -Metabolic factors controlling duration of drug action-", Pergamon Press, New York, (1962), 299-310.
25. Williams, R., "Metabolic fate of foreign compounds and toxicity", Archives of Environmental Health, V.7, n°4, (1963), 612-621.
26. Wang, J., Zhang, M., Xu, J. and Wang, Y., "Reciprocal effect of Cu, Cd, Zn on a kind of marine alga", Water Research, V.29, n°1, (1995), 209-214.
27. Pailler, F.M., "Protection de la Santé, Hygiène et Environnement -Ecotoxicologie et pollution industrielle-", Editions Frison-Roche, Paris, (1993), 335-367.
28. Baudo, R., "Memorie del Istituto Italiano di Idrobiologia - Ecotoxicological testing with Daphnia-", Peters and Bernardi Editors, Verbania Pallanza, (1987), 461-482.
29. Gardner, W.S., Miller, W.H. and Imlay, M.J., "Free amino acids in mantle tissues of the bivalve *Amblema picata* : possible relation to environmental stress", Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, V.26, n°1, (1981), 157-162.
30. Saiz, E. and Alcaraz, M., "Enhanced excretion rates induced by small-scale turbulence in *Acartia* (Copepoda-Calanoida)", Journal of Plankton Research, V.14, n°5, (1992), 681-689.

31. Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Forlin, L., Fowler, B.A., Sanders, B.M. and Van Veld, P.A., "Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress - Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect", Lewis Publishers, Chelsea, (1992), 235-335.
32. Mahyaoui, M. et Saghi, M., "Etude de la pollution de l'eau de mer par les métaux lourds", *Revue Internationale d'Océanographie Médicale*, V.88, n°1, (1987), 115-124.
33. Taylor, R.M., Watson, G.D. and Alikhan, M.A., "Comparative sub-lethal and lethal acute toxicity of copper to the freshwater crayfish *Cambarus robustus* (Cambaridae, Decapoda, Crustacea) from an acidic metal-contaminated lake and a circumneutral uncontaminated stream", *Water Research*, V.29, n°2, (1995), 401-408.
34. Suedel, B.C., Deaver, E. and Rodgers, J.H., "Experimental factors that may affect toxicity of aqueous and sediment-bound copper to freshwater organisms", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, V.30, n°1, (1996), 40-46.
35. Suedel, B.C., Rodgers, J.H. and Deaver, E., "Experimental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, V.33, n°2, (1997), 188-193.
36. Rainbow, P.S., "Trace metal accumulation in marine invertebrates : Marine biology or Marine chemistry ?", *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, V.77, n°1, (1997), 195-210.
37. Knops, M., Altenburger, R. and Segner, H., "Alterations of physiological energetics, growth and reproduction of *Daphnia magna* under toxicant stress", *Aquatic Toxicology*, V.53, n°2, (2001), 79-90.
38. Matthews, R.A., Buikema, A.L., Cairns, J. and Rodgers, J.H., "Receiving system functional methods, relationships and indices", *Water Research*, V.16, n°2, (1982), 129-139.
39. Herricks, E.E. and Cairns, J., "Receiving system methodology based on community structure", *Water Research*, V.16, n°2, (1982), 141-153.
40. Péry, A.R.R., Bedaux, J.J.M., Zonneveld, C. and Kooijman, S.A.L.M., "Analysis of bioassays with time-varying concentrations", *Water Research*, V.35, n°16, (2001), 3825-3832.
41. Bellas, J., Vazquez, E. and Beiras, R., "Toxicity of Hg, Cu, Cd and Cr on early developmental stages of *Ciona intestinalis* (Chordata, Ascidiacea) with potential application in marine water quality assessment", *Water Research*, V.35, n°12, (2001), 2905- 2912.

42. Reish, D.J. and Martin, J.M., "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 Research*, V.10, n°4, (1976), 299-302.
43. Graney, R.L., Cherry, D.S. and Cairns, J., "The influence of substrate, pH, diet and temperature upon cadmium accumulation in the asiatic clam (*Corbicula fluminea*) in laboratory artificial streams", *Water Research*, V.18, n°7, (1984), 833-842.
44. Kluttgen, B. and Ratte, H.T., "Effects of different food doses on cadmium toxicity to *Daphnia magna*", *Environmental Toxicology and Chemistry*, V.13, n°10, (1994), 1619-1627.
45. Gaujous, D., "La pollution des Milieux Aquatiques", Technique et Documentation, Paris, (1995), 219p.
46. Falk, D.L. and Dunson, W.A., "The effects of season and acute sub-lethal exposure on survival times of brook trout at low pH", *Water Research*, V.11, n°1, (1977), 13-15.
47. Zischke, J.A., Arthur, J.W., Nordlie, K.J., Hermanutz, R.O., Standen, D.A. and Henry, T.P., "Acidification effects on macroinvertebrates and fathead minnows (*Pimephales promelas*) in outdoor experimental channels", *Water Research*, V.17, n°1, (1983), 47-63.
48. Pynnonen, K., "Effect of pH, hardness and maternal pre-exposure on the toxicity of Cd, Cu and Zn to the glochidial larvae of a freshwater clam *Anodonta cygnea*", *Water Research*, V.29, n°1, (1995), 247-254.
49. Markarian, R.K., Matthews, M.C. and Connor, L.T., "Toxicity of nickel, copper, zinc and aluminium mixtures to the white sucker (*Catostomus commersoni*)", *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, V.25, n°4, (1980), 790-796
50. Stendahl, D.H. and Sprague, J.B., "Effects of water hardness and pH on vanadium lethality to rainbow trout", *Water Research*, V.16, n°10, (1982), 1479-1488.
51. Kunz, A. and Jardim, W.F., "Complexation and adsorption of copper in raw sewage", *Water Research*, V.34, n°7, (2000), 2061-2068.
52. Sigg, L., Behra, P. et Stumm, W., "Chimie des Milieux Aquatiques", Dunod, Paris, (2000), 549p.
53. Goss, L.B. and Bunting, D.L., "Thermal tolerance of zooplankton", *Water Research*, V.10, n°5, (1976), 387-398.
54. Kersting, K., "Some features of feeding, respiration and energy conversion of *Daphnia magna*", *Hydrobiologia*, V.59, n°2, (1978), 113-120.
55. Chapman, P.M., Farrell, M.A. and Brinkhurst, R.O., "Effects of species interactions on the survival and respiration of *Limnodrilus hoffmeisteri* and *Tubifex tubifex* (Oligochaeta, Tubificidae) exposed to various pollutants and environmental factors", *Water Research*, V.16, n°9, (1982), 1405-1408.

56. Zauke, G.P., "Cadmium in Gammaridae (Amphipoda :Crustacea) of the rivers Werra and Weser", *Water Research*, V.16, n°6, (1982), 785-792.
57. Chapron, C., "Principes de Zoologie", Dunod, Paris, (1999), 203p.
58. Muller, H.G., "Experiences with test systems using *Daphnia magna*", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, V.4, n°1, (1980), 21-25.
59. Keating, K.I., "A system of defined (sensu stricto) media for daphnid (cladocera) culture", *Water Research*, V.19, n°1, (1985), 73-78.
60. Jana, B.B. and Pal, G.P., "Some life history parameters and production of *Daphnia carinata* King grown in different culturing media", *Water Research*, V.17, n°7, (1983), 735-741.
61. Van Leeuwen, C.J., Luttmer, W.J. and Griffioen, P.S., "The use of cohorts and populations in chronic toxicity studies with *Daphnia magna* : a cadmium example", *Ecotoxicology and environmental safety*, V.9, n°1, (1985), 26-39.
62. Ajmal, M. and Ullah khan, A., "Effect of water hardness on the toxicity of cadmium to micro-organisms", *Water Research*, V.18, n°12, (1984), 1487-1491.
63. Erickson, R.J., Brooke, L.T., Kahl, M.D., Venter, F.V., Harting, S.L., Markee, T.P. and Spehar, R.L., "Effects of laboratory test conditions on the toxicity of silver to aquatic organisms", *Environmental Toxicology and Chemistry*, V.17, n°4, (1998), 572-578.
64. Biesinger, K.E. and Christensen, G.M., "Effects of various metals on survival, growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna*", *Journal Fisheries Research Board of Canada*, V.29, n°12, (1972), 1691-1700.
65. Forget, J., Menasria, R. et Pavillon, J.F., "Influence de la teneur en matière organique de l'eau de mer sur la toxicité de l'argent vis à vis du copépode harpacticoïde : *Tigriopus brevicornis muller*", *Journal de Recherche Oceanographique*, V.20, n°1, (1995), 63-69.
66. Taylor, G., Baird, D.J. and Soares, A.M.V.M., "Surface binding of contaminants by algae: consequences for lethal toxicity and feeding to *Daphnia magna* Straus", *Environmental Toxicology and Chemistry*, V.17, n°3, (1998), 412-419.
67. Rainbow, P.S., Wolowicz, M., Fialkowski, W., Smith, B.D. and Sokolowski, A., "Biomonitoring of trace metals in the gulf of Gdansk, using mussels (*Mytilus trossulus*) and barnacles (*Balanus improvisus*)", *Water Research*, V.34, n°6, (2000), 1823-1829.
68. Parkinson, A., Barry, M.J., Roddick, F.A. and Hobday, M.D., "Preliminary toxicity assessment of water after treatment with UV-irradiation and UVC/H₂O₂", *Water Research*, V.35, n°15, (2001), 3656-3664.

69. Sylva, R.N., "The environmental chemistry of copper (II) in aquatic systems", *Water Research*, V.10, n°9, (1976), 789-792.
70. Andrew, R.W., Biesinger, K.E. and Glass, G.E., "Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper to *Daphnia magna*", *Water Research*, V.11, n°3, (1977), 309-315.
71. Borgmann, U. and Ralph, K.M., "Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique", *Water Research*, V.17, n°11, (1983), 1697-1703.
72. Winner, R.W., Keeling, T., Yeager, R. and Farrell, M.P., "Effect of food type on the acute and chronic toxicity of copper to *Daphnia magna*", *Freshwater Biology*, V.7, n°2, (1977), 343-349.
73. Norme internationale, ISO 8692., "Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*", (1993), 6p.
74. Norme internationale, ISO 6341., "Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)-Essai de toxicité aiguë", (1996), 9p.
75. Khangarot, B.S. and Ray, P.K., "Investigation of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna* Straus", *Ecotoxicology and environmental safety*, V.18, n°1, (1989), 109-120.
76. Mark, U. and Solbé, J., "Analysis of the ECETOC aquatic toxicity (EAT) database. V- The relevance of *Daphnia magna* as a representative test species", *Chemosphère*, V.36, n°1, (1998), 155-166.
77. Kenega, E.E., "Test organisms and methods useful for early assessment of acute toxicity of chemicals", *Environmental Science and Technology*, V.12, n°7, (1978), 1322-1329.
78. Pascoe, D., Wenzel, A., Janssen, C., Girling, A.E., Juttner, I., Fliedner, A., Blockwell, S.J., Maund, S.J., Taylor, E.J., Diedrich, M., Persoone, G., Verhelst, P., Stephenson, R.R., Crossland, N.O., Mitchell, G.C., Pearson, N., Tattersfield, L., Lay, J.P., Peither, A., Neumeier, B. and Velletti, A.R., "The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms", *Water Research*, V.34, n°8, (2000), 2323-2329.
79. Santojanni, A., Gorbi, G. and Sartore, F., "Prediction of mortality in chronic toxicity tests on *Daphnia magna*", *Water Research*, V.29, n°6, (1995), 1453-1459.
80. Guilhermino, L., Sobral, O., Chastinet, C., Ribeiro, R., Goncalves, F., Silva, M.C. and Soares, A.M.V.M., "A *Daphnia magna* first-brood chronic test: an alternative to the conventional 21-day chronic bioassay?", *Ecotoxicology and Environmental Safety*, V.42, n°1, (1999), 67-74.

81. Nebeker, A.V., "Evaluation of a *Daphnia magna* renewal life-cycle test method with silver and endosulfan", *Water Research*, V.16, n°5, (1982), 739-744.
82. Shieh, J.N., Chao, M.R. and Chen, C.Y., "Statistical comparisons of the no-observed effect concentration and the effective concentration at 10 % inhibition (EC 10) in algal toxicity tests", *Water Science and Technology*, V.43, n°2, (2001), 141-146.
83. Munzinger, A., "Effects of nickel on *Daphnia magna* during chronic exposure and alterations in the toxicity to generations pre-exposed to nickel", *Water Research*, V.24, n°7, (1990), 845-852.
84. Enserink, L., De La Haye, M. and Maas, H., "Reproductive strategy of *Daphnia magna* : Implications for chronic toxicity tests", *Aquatic Toxicology*, V.25, n°1, (1993), 111-124.
85. Walthall, W.K. and Stark, J.D., "Comparison of two population-level ecotoxicological endpoints : The intrinsic (r_m) and instantaneous (r_i) rates of increase", *Environmental toxicology and chemistry*, V.16, n°5, (1997), 1068-1073.
86. Haguenoer, J.M. et Furon, D., "Toxicologie et Hygiène Industrielles : Les dérivés minéraux", *Technique et Documentation*, Paris, (1982), 47-592.
87. Goullé, J.P., "Toxicologie et Pharmacologie Médicolégales -Métaux-", *Editions Scientifiques et Médicales Elsevier*, Nancy, (1998), 189-232.
88. Baruthio, F., "Les Oligo-éléments en Médecine et en Biologie -Toxicologie des éléments trace essentiels -", *Lavoisier Tec et Doc*, Paris, (1991), 213-310.
89. Nieboer, E.E. and Richardson, D.H.S., "The replacement of the nondescript term ' Heavy metals ' by a biologically and chemically significant classification of metal ions", *Environmental pollution*, V.1, n°1, (1980), 3-26.
90. Rousselet, F., "Les Oligo-éléments en Médecine et en Biologie - Oligo-éléments ou éléments trace ? -", *Lavoisier Tec et Doc*, Paris, (1991), 1-6.
91. Tarr, M.A., Wang, W., Bianchi, T.S. and Engelhaupt, E., "Mechanisms of ammonia and amino acid photoproduction from aquatic humic and colloidal matter", *Water Research*, V.35, n°15, (2001), 3688-3696.
92. Boudene, C., "Toxicologie et Sécurité des Aliments -Toxicité des métaux-", *Technique et Documentation Lavoisier*, Paris, (1989), 159-198.
93. Association Française pour l'Etude des Eaux., "Les micropolluants minéraux dans les eaux superficielles continentales : rapport N°4 le zinc- le cadmium", *Centre National de Documentation et d'Information sur l'Eau*, Paris, (1978), 117p.

94. Houot, O. et Tarallo, P., "Les Oligo-éléments en Médecine et en Biologie -Le cuivre-", Lavoisier Tec et Doc, Paris, (1991), 459-498.
95. Duhamel, J.F., Bouglé, D., Brouard, J., Deschrevel, G., Nivot, S., Bonnemains, H., Bureau, F. et Foucault, P., "Les Oligo- éléments en Médecine et en Biologie -Les Variations physiologiques des oligo-éléments-", Lavoisier Tec et Doc, Paris, (1991), 177-211.
96. Van den berg, G.A., Meijers, G.G.A., Van der heijdt, L.M. and Zwolsman, J.J.G., "Dredging-related mobilisation of trace metals: a case study in the Netherlands", *Water Research*, V.35, n°8, (2001), 1979-1986.
97. Turbak, S.C., Olson, S.B. and Mc Feters, G.A., "Comparison of algal assay systems for detecting waterborne herbicides and metals", *Water Research*, V.20, n°1, (1986), 91-96.
98. Ivorra, N., Kraak, M.H.S. and Admiraal, W., "Use of lake water in testing copper toxicity to Desmid species", *Water Research*, V.29, n°9, (1995), 2113 - 2117.
99. Calamari, D., Marchetti, R. and Vailati, G., "Influence of water hardness on cadmium toxicity to *Salmo gairdneri* rich", *Water Research*, V.14, n°10, (1980), 1421-1426.
100. Arnac, M. et Lassus, C., "Accumulation de quelques métaux lourds (Cd, Cu, Pb et Zn) chez l'Eperlan (*Osmerus mordax*) prélevé sur la rive nord de l'estuaire du Saint-Laurent ", *Water Research*, V.19, n°6, (1985), 725 – 734.
101. Brungs, W.A., Geckler, J.R. and Gast, M., "Acute and chronic toxicity of copper to the Fathead minnow in a surface water of variable quality ", *Water Research*, V.10, n°1, (1976), 37 – 43.
102. Pickering, Q., Brungs, W. and Gast, M., "Effect of exposure time and copper concentration on reproduction of the Fathead minnow (*Pimephales promelas*)", *Water Research*, V.11, n°11, (1977), 1079 – 1083.
103. Davies, P.H., Goettl, J.P. and Sinley, J.R., "Toxicity of silver to rainbow trout (*Salmo gairdneri*)", *Water Research*, V.12, n°2, (1978), 113-117.
104. Benoit, D.A., "Toxic effects of hexavalent chromium on Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) and Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ", *Water Research*, V.10, n°6, (1976), 497 – 500.
105. Davies, P.H., Goettl, J.P., Sinley, J.R. and Smith, N.F., "Acute and Chronic toxicity of lead to rainbow trout *Salmo gairdneri*, in hard and soft water", *Water Research*, V.10, n°3, (1976), 199-206.
106. Salanki, J., Balogh, K.V. and Berta, E., "Heavy metals in animals of lake Balaton", *Water Research*, V.16, (1982), 1147 – 1152.

107. Baudin, J.P., Adam, C. and Laplace, J.G., “Dietary uptake retention and tissue distribution of Mn, Co and Cs in the Rainbow trout (*Oncorhynchus mikiss walbaum*”, Water Research, V.34, n°11, (2000), 2869 – 2878.
108. Fargasova, A., “Toxicity of metals on *Daphnia magna* and *Tubifex tubifex*”, Ecotoxicology and environmental safety, V.27, n°2, (1994), 210-213.
109. Musibono, D.E. and Day, J.A., “The effect of Mn on mortality and growth in the freshwater amphipod *Paramelita nigroculus* (Barnard) exposed to a mixture of Al and Cu in acidic waters”, Water Research, V.33, n°1, (1999), 207-213.
110. Winner, R.W., “Bioaccumulation and toxicity of copper as affected by interactions between humic acid and water hardness”, Water Research, V.19, n°4, (1985), 449-455.
111. Michels, E., Leynen, M., Cousyn, C., De Meester, L. and Ollevier, F., “Phototactic behavior of daphnia as a tool in the continuous monitoring of water quality : Experiments with a positively phototactic *Daphnia magna* clone”, Water Research, V.33, n°2, (1999), 401-408.
112. Rainbow, P.S. and Dallinger, R., “Ecotoxicology of Metals in Invertebrates - Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates -”, Lewis Publishers, Boca Raton, (1993), 119-131.
113. Rainbow, P.S. and White, S.L., “Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle”, Hydrobiologia, V.174, n°2, (1989), 245-262.
114. Rainbow, P.S. and White, S.L., “Comparative accumulation of cobalt by three crustaceans : a decapod, an amphipod and a barnacle”, Aquatic toxicology, V.16, n°2, (1990), 113-126.
115. White, S.L. and Rainbow, P.S., “Regulation of zinc concentration by *Palaemon elegans* (crustacea decapoda): zinc flux and effects of temperature, zinc concentration and moulting”, Marine Ecology Progress Series, V.16, n°1, (1984), 135-147.
116. Ginet, R. et Roux, A.L., “Les Plans d’Organisation du Règne Animal”, Doin Editeur, Paris, (1986), 247p.
117. Bailenger, J., “Evolution de l’Organisation Animale”, Masson, Paris, (1989), 125p.
118. Vandel, A., “Traité de Zoologie, Tome VI - Composition de l’embranchement des arthropodes-”, Masson et Cie Editeurs, Paris, (1968), 79-158.
119. Jurd, R.D., “Biologie Animale”, Berti Editions, Paris, (2000), 329p.
120. Beaumont, A. et Cassier, P., “Biologie Animale des Protozoaires aux Métazoaires Epithélioneuriens”, Dunod, Paris, (1983), 954p.

121. Amoros, C., "Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises : Crustacés Cladocères", Bulletin Mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, V.53, n°3, (1984), 71-129.
122. Hrbacek, J., "Memorie del Istituto Italiano di Idrobiologia -Systematics and Biogeography of Daphnia species in the northern temperate region-", Peters and Bernardi Editors, Verbania pallanza, (1987), 37-76.
123. Blanchard, R. et Richard, J., "Faune des lacs salés d'Algérie : Cladocères et copépodes", Bulletin de la Société Zoologique de France, V.4, n°3, (1891), 512-535.
124. Amoros, C., "Traité de Zoologie, Tome VII -Branchiopodes-", Masson, Paris, (1996), 353- 383.
125. Lampert, W., "Memorie del Istituto Italiano di Idrobiologia - Feeding and nutrition in Daphnia -", Peters and Bernardi Editors, Verbania Pallanza, (1987), 143-192.
126. Zaffagnini, F., "Memorie del Istituto Italiano di Idrobiologia - Reproduction in Daphnia -", Peters and Bernardi Editors, Verbania Pallanza, (1987), 245-284.
127. Porter, K.G., "Viable gut passage of gelatinous green algae ingested by Daphnia", Verhandlungen Internationale Vereinigung Fur Theoretische Und Angewandte Limnologie, V.19, n°15, (1975), 2840-2850.
128. Webster, K.E. and Peters, R.H., "Some size-dependent inhibitions of larger cladoceran filterers in filamentous suspensions", Limnology and Oceanography, V.23, n°7, (1978), 1238-1245.
129. Lewis, M.A. and Maki, A.W., "Effects of water hardness and diet on productivity of *Daphnia magna* Straus, in laboratory culture", Hydrobiologia, V.85, n°1, (1981), 175-179.
130. Infante, A. and Abella, S.E.B., "Inhibition of Daphnia by Oscillatoria in lake Washington", Limnology and Oceanography, V.30, n°6, (1985), 1046-1052.
131. Vaga, R., Culver, D.A. and Munch, C.S., "The fecundity ratios of Daphnia and Bosmina as a function of inedible algal standing crop", Verhandlungen Internationale Vereinigung Fur Theoretische Und Angewandte Limnologie, V.22, n°16, (1985), 3072-3075.
132. Sarnelle, O., "Field assessment of the quality of phytoplanktonic food available to Daphnia and Bosmina", Hydrobiologia, V.131, n°1, (1986), 47-56.
133. Scavia, D. and Gardner, W.S., "Kinetics of nitrogen and phosphorus release in varying food supplies by *Daphnia magna*", Hydrobiologia, V.96, n°1, (1982), 105-111.

134. Burns, C.W., "The relationship between body size of filter-feeding cladocera and the maximum size of particles ingested", *Limnology and Oceanography*, V.13, n°4, (1968), 675-678.
135. Peters, R.H., "Memorie del Istituto Italiano di Idrobiologia - Metabolism in *Daphnia* -", Peters and Bernardi Editors, Verbania Pallanza, (1987), 193-243.
136. Belabed, W. et Kestali, N., "Etude de la toxicité des métaux lourds cadmium, cuivre, zinc, nickel, fer, aluminium, chrome et plomb à l'aide d'un crustacé *Daphnia magna*", Mémoire de fin d'étude pour l'obtention du diplôme d'ingénieur d'état en chimie Industrielle, Université de Blida, (1992), 93p.
137. Kobayashi, M., "Oxygen consumption of *Daphnia magna*", *Science Reports of Niigata University Serie D*, V.11, n°1, (1974), 1-10.
138. Goss, L.B. and Bunting, D.L., "Daphnia development and reproduction: responses to temperature", *J. Therm. Biol.*, V.8, n°2, (1983), 375-380.
139. Kryuchkova, N.M., "Effect of temperature and trophic conditions on the duration of cladocera development", *Hydrobiologia*, V.9, n°1, (1973), 39-47.
140. Lampert, W., "Studies on the carbon balance of *Daphnia pulex* De Geer as related to environmental conditions", *Archiv Fuer Hydrobiologie Supplementband*, V.48, n°2, (1977), 310-335.
141. Goss, L.B. and Bunting, D.L., "temperature effects on zooplankton respiration", *Comparative Biochemistry and Physiology*, V.66, n°4, (1980), 651-658.
142. Blazka, P., Brandl, Z. and Prochazkova, L., "Oxygen consumption and ammonia and phosphate excretion in pond zooplankton", *Limnology and Oceanography*, V.27, n°2, (1982), 294-303.
143. Ringelberg, J., "Memorie del Istituto Italiano di Idrobiologia - Light induced behaviour in *Daphnia* -", Peters and Bernardi Editors, Verbania Pallanza, (1987), 285-323.
144. Haney, J.F., "Regulation of cladoceran filtering rates in nature by body size, food concentration, and diel feeding patterns", *Limnology and Oceanography*, V.30, n°3, (1985), 397-411.
145. Starkweather, P.L., "Diel patterns of grazing in *Daphnia pulex* Leydig", *Verhandlungen Internationale Vereinigung Fur Theoretische Und Angewandte Limnologie*, V.19, n°15, (1975), 2851-2857.
146. Lampert, W., "A tracer study of the carbon turnover of *Daphnia pulex*", *Verhandlungen Internationale Vereinigung Fur Theoretische Und Angewandte Limnologie*, V.19, n°15, (1975), 2913-2921.

147. Peters, R.H., "Phosphorus excretion and the measurement of feeding and assimilation by zooplankton", *Limnology and Oceanography*, V.20, n°5, (1975), 858-859.
148. Horton ,P.A., Rowan, M., Webster, K.E. and Peters, R.H., "Browsing and grazing by cladoceran filter feeders", *Canadian Journal of Zoology*, V.57, n°2, (1979), 206-212.
149. Richman, S. and Dodson, S.I., "The effect of food quality on feeding and respiration by *Daphnia* and *Diaptomus*", *Limnology and Oceanography*, V.28, n°5, (1983), 948-956.
150. Lagerspetz, K., "The brackish-water tolerance of some freshwater crustaceans", *Verhandlungen Internationale Vereinigung Fur Theoretische Und Angewandte Limnologie*,V.13, n°4, (1958), 717-721.
151. Green, J., "Variation in the haemoglobin content of *Daphnia*", *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences*, V.145, n°2, (1956), 214-232.
152. Moraitou-Apostolopoulou, M., "Acute toxicity of copper to a copepod", *Marine Pollution Bulletin*, V.9, n°2, (1978), 278-280.
153. Blazka, P., "Metabolism of natural and cultured populations of *Daphnia* related to secondary production", *Verhandlungen Internationale Vereinigung Fur Theoretische Und Angewandte Limnologie*,V.16, n°2, (1966a), 380-385.
154. Parker, R.A. and Olson, M.I., "The uptake of inorganic phosphate by *Daphnia Schoedleri Sars*", *Physiological Zoology*, V.39, n°1, (1966), 53-65.
155. Vollenweider, R.A. and Ravera, O., "Preliminary observations on the oxygen uptake by some freshwater zooplankters", *Verhandlungen Internationale Vereinigung Fur Theoretische Und Angewandte Limnologie*, V.13, n°1, (1958), 84-100.
156. Francko, D.A. and Wetzel, R.G., "Production and release of cyclic AMP", *Journal of Freshwater Ecology*, V.1, n°2, (1982), 365-371.
157. Lampert, W., "Release of dissolved organic carbon by grazing zooplankton", *Limnology and Oceanography*, V.23, n°5, (1978), 831-834.
158. Smaridge, M.W., "Iron excretion by *Daphnia* during haemoglobin loss", *Nature*, V.173, n°4, (1954), 782-783.
159. Mc Mahon, J.W., "A tracer study of ingestion and metabolic cycling of iron in *Daphnia magna*", *Canadian Journal of Zoology*, V.48, n°5, (1970), 873-878.
160. Hall, T.M., "Free ionic nickel accumulation and localization in the freshwater zooplankton, *Daphnia magna*", *Limnology and Oceanography*, V.27, n°4, (1982), 718-727.

161. Jacobsen, T.R. and Comita, G.W., "Ammonia-Nitrogen excretion in *Daphnia pulex*", *Hydrobiologia*, V.51, n°3, (1976), 195-200.
162. Gardner, W.S. and Miller, W.H., "Intracellular composition and net release rates of free amino acids in *Daphnia magna*", *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, V. 38, n°1, (1981), 157-162.
163. Médale, F., Brauge, C., Vallée, F. and Kaushik, S.J., "Effects of dietary protein / energy ratio, ration size, dietary energy source and water temperature on nitrogen excretion in rainbow trout", *Water Science and Technology*, V.31, n°10, (1995), 185-194.
164. Ganf, G. and Blazka, P., "Oxygen uptake, ammonia and phosphate excretion by zooplankton of a shallow equatorial lake (lake George, Uganda)", *Limnology and Oceanography*, V.19, n°2, (1974), 313-324.
165. Takahashi, M. and Ikeda, T., "Excretion of ammonia and inorganic phosphorus by *Euphasia pacifica* and *Metridia pacifica* at different concentrations of phytoplankton", *Journal Fisheries Research Board of Canada*, V.32, n°12, (1975), 2189-2195.
166. Blazka, P., "Nutrient recycling by zooplankton", *Limnologica*, V.10, n°2, (1976), 279-286.
167. Caicedo, J.R., Van der steen, N.P., Arce, O. and Gijzen, H.J., "Effect of total ammonia nitrogen concentration and pH on growth rates of duckweed (*Spirodela polyrrhiza*)", *Water Research*, V.34, n°15, (2000), 3829-3835.
168. Rigler, F.H., "The uptake and release of inorganic phosphorus by *Daphnia magna* Straus", *Limnology and Oceanography*, V.6, n°1, (1961), 165-174.
169. Anderson, J.W. and Stephens, G.C., "Uptake of organic material by aquatic invertebrates", *Marine Biology*, V.4, n°2, (1969), 243-249.
170. Peters, R.H. and Lean, D.R.S., "The characterisation of soluble phosphorus released by limnetic zooplankton", *Limnology and Oceanography*, V.18, n°2, (1973), 270-279.
171. Guillen-Jimenez, E., Alvarez-Mateos, P., Romero-Guzman, F. and Pereda-Marin, J., "Bio-mineralization of organic matter in dairy wastewater as affected by pH : The evolution of ammonium and phosphates", *Water Research*, V.34, n°4, (2000), 1215-1224.
172. Mullin, M.M., Perry, M.J., Renger, E.H. and Evans, P.M., "Nutrient regeneration by oceanic zooplankton : a comparison of methods", *Mar.Sci.Comm*, V.1, n°1, (1975), 1-13.
173. Ikeda, T., Hing Fay, E., Hutchinson, S.A. and Bato, G.M., "Ammonia and inorganic phosphate excretion by zooplankton from inshore water of the great barrier reef", *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, V.33, n°1, (1982), 55-70.

174. Conover, R.J. and Corner, E.D., "Respiration and nitrogen excretion by some marine zooplankton in relation to their life cycle", *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, V.48, n°1, (1968), 49-75.
175. Blazka, P., "The ratio of crude protéin, glycogen and fat in the individual steps of the production chain", *Hydrobiol.Stud*, V.1, n°2, (1966b), 395-408.
176. Fabre, R. et Truhaut, R., "Précis de Toxicologie", Société d'Édition d'Enseignement Supérieur, Paris, (1965), 713p.
177. Fiala, M., "Phytoplankton: biomasse, production, numération et culture", Document élaboré par le Laboratoire ARAGO Université Pierre et Marie Curie, Banyulus sur mer, (1978), 77-97.
178. Finney, D.J., "Probit Analysis", Cambridge University Press, London, (1952), 318p.
179. Lazar, P. et Shwartz, D., "Eléments de Probabilités et Statistique", Flammarion, Paris, (1997), 163p.
180. Dagnelie, P., "Théorie et Méthodes Statistiques : applications agronomiques", Les Presses Agronomiques de Gembloux, Gembloux, (1986), 463p.
181. Miller, I. and Freund, J.E., "Probability and Statistics for Engineers", Prentice-Hall Inc, Englewood Cliffs – New Jersey, (1977), 274-279.
182. Barata, C., Baird, D.J. and Markich, S.J., "Comparing metal toxicity among *Daphnia magna* clones : An approach using concentration-time response surfaces", *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, V.37, n°3, (1999), 326-331.
183. Robinson, P.W., "The toxicity of pesticides and organics to Mysid shrimps can be predicted from *Daphnia spp* toxicity data", *Water Research*, V.33, n°6, (1999), 1545-1549.
184. Moreau, M. et Mathieu, A., "Statistique Appliquée à l'Expérimentation", Editions Eyrolles, Paris, (1979), 188p.
185. Atteia, M. et Pradel, M., "Eléments d'Analyse Numérique", Cepadues-Éditions, Toulouse, (1990), 154p.
186. Gourdin, A. et Boumahrat, M., "Méthodes Numériques Appliquées", Technique et Documentation-Lavoisier, Paris, (1989), 440p.
187. Proulx, D. and De La Noue, J., "Harvesting *Daphnia magna* grown on urban tertiary-treated effluents", *Water Research*, V.19, n°10, (1985), 1319-1324.
188. Hanazato, T., "Growth analysis of daphnia early juvenile stages as an alternative method to test the chronic effect of chemicals", *Chemosphère*, V. 36, n°8, (1998), 1903-1909.

189. Klein, B., "Age as a factor influencing results in the acute daphnid test with *Daphnia magna straus*", Water Research, V.34, n°5, (2000), 1419-1424.
190. Neubecker, T.A. and Allen, H.E., "The measurement of complexation capacity and conditional stability constants for ligands in natural waters", Water Research, V.17, n°1, (1983), 1-14.
191. Semsari, S., "Impact ecotoxicologique du chrome trivalent et des sulfures présents dans les effluents de tannerie: Application à l'unité de tannerie-megisserie de Rouiba", Thèse de Magister, Université Houari Boumedienne, (1992), 156p.
192. Giesy, J.P., Leverssee, G.J. and Williams, D.R., "Effects of naturally occurring aquatic organic fractions on cadmium toxicity to *Simocephalus serrulatus* (Daphnidae) and *Gambusia affinis* (Poeciliidae)", Water Research, V.11, n°11, (1977), 1013-1020.
193. Coquery, M. and Welbourn, P.M., "The relationship between metal concentration and organic matter in sediments and métal concentration in the aquatic macrophyte *Eriocaulon septangulare*", Water Research, V.29, n°9, (1995), 2094-2102.
194. Florence, T.M., "Trace metal species in fresh waters", Water Research, V.11, n°8, (1977), 681- 687.
195. Blutstein, H. and Smith, J.D., "Distribution of species of Cu, Pb, Zn and Cd in a water profile of the Yarra river estuary", Water Research, V.12, n°2, (1978), 119-125.
196. Matheickal, J.T., Yu, Q. and Woodburn, G.M., "Biosorption of cadmium from aqueous solutions by pre-treated biomass of marine alga *Durvillaea potatorum*", Water Research, V.33, n°2, (1999), 335-342.
197. Ho, Y.S. and Mckay, G., "The kinetics of sorption of divalent metal ions onto sphagnum moss peat", Water Research, V.34, n°3, (2000), 735-742.
198. Guilhermino, L., Ribeiro, R., Goncalves, F. and Soares, A. M. V.M., "METIER (Modular Ecotoxicity Tests Incorporating Ecological Relevance) for difficult substances-III. Effects of medium renewal and use of a carrier on the bioavailability of parathion", Environmental Pollution, V.92, n°1, (1996), 97-99.
199. Tacon, A.G.J., Phillips, M.J. and Barg, U.C., "Aquaculture feeds and the environment : The asian experience", Water Science and Technology, V.31, n°10, (1995), 41-59.