

Écotoxicologie

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE, CHEZ UN INVERTÉBRÉ D'EAU DOUCE : *LUMBRICULUS VARIEGATUS* (ANNÉLIDE, OLIGOCHÈTE), DE LA TOXICITÉ DE DIVERS CONTAMINANTS DE L'ENVIRONNEMENT CHAMPARDENNAIS

par

Isabelle VELTZ-BALATRE

Les travaux présentés ici ont été conduits dans le but d'apporter notre contribution à l'étude de la toxicité de divers contaminants métalliques (le cuivre, le plomb et le platine) déjà présents ou susceptibles de l'être dans l'environnement viticole champardennais, en utilisant comme modèle expérimental un Invertébré d'eau douce *Lumbriculus variegatus* (Annélide, Oligochète) qui y est largement répandu. Pour cela, nous avons dans un premier temps étudié la biologie du ver en milieu sain, en particulier les modalités de sa multiplication asexuée, et l'aptitude à la régénération céphalique (artificiellement provoquée) de cet animal dont la scissiparité architomique est rappelons-le l'unique moyen de reproduction. Nous avons dans un deuxième temps testé le cuivre, le plomb et le platine seuls ou en association sur *L. variegatus*, en mettant en œuvre pour cela différentes approches : bioconcentration, toxicité létale ou sublétales (susceptible d'entraîner des perturbations de la régénération céphalique).

Nous avons montré que Cu, Pb et Pt s'accumulent fortement dans le ver et présentent une très forte toxicité aiguë pour l'Annélide lorsqu'ils sont employés seuls. En mélange, cette toxicité augmente nettement (phénomènes de synergie). Ces trois métaux à dose sublétales induisent des retards de la régénération céphalique ; le plomb, le platine et les associations Cu/Pb et Cu/Pt entraînent de plus la formation de régénérats atypiques.

L'intoxication des vers par des eaux prélevées dans divers sites champardennais réputés contaminés par les métaux lourds montre que les concentrations environnementales de toxiques, bien que sublétales, sont suffisantes pour perturber sévèrement la régénération céphalique de l'Oligochète.

La sensibilité de la régénération céphalique du ver aux contaminants métalliques doit à présent être testée directement dans le milieu naturel afin de qualifier ce test en écotoxicologie.

Bulletin de la Société zoologique de France 125 (4)**Toxicity studies of some pollutants from the Champagne-Ardenne area on a freshwater invertebrate: *Lubriculus variegatus* (Annelida, Oligochaeta)**

The studies described here contribute to the toxicity studies of various metallic contaminants (copper, lead and platinum) already or potentially present in the wine-producing environment of Champagne-Ardenne. We used as a test organism a freshwater invertebrate *Lubriculus variegatus* (Annelida, Oligochaeta) which is widespread in this area.

First, clear water worm biology was studied, especially asexual reproduction and aptitude to cephalic regeneration (artificially induced) of this animal which only reproduces itself by architectural scissiparity. Secondly, copper, lead and platinum were tested alone or in mixtures on *L. variegatus*, with several approaches: bioconcentration, lethal toxicity and sublethal toxicity (which can perturb cephalic regeneration). Worms accumulate Cu, Pb and Pt, which are very toxic for the annelid when tested separately. Toxicity clearly increased in mixture (synergy). The sublethal concentrations of those three metals induce a delay in cephalic regeneration while Pb, Pt and Cu/Pb and Cu/Pt mixtures treatments can cause the formation of atypical regeneration.

Worms were affected by water samples from well known sites polluted with heavy metals of Champagne-Ardenne. Toxic concentrations are sublethal but sufficient to induce hard cephalic regeneration perturbations. Worm cephalic regeneration sensitivity to heavy metal pollution must be directly tested in the environment in order to qualify it as an ecotoxicological test.

Introduction

La pollution de l'environnement par les métaux lourds est un problème important en Champagne-Ardenne. Qu'ils soient émis sous forme de pesticides, rejetés par les industries ou dans les gaz d'échappement des véhicules à moteurs, ils sont emportés par les pluies et se retrouvent par ruissellement dans les eaux dont ils contaminent la faune et la flore (BOUDENE, 1980). Nous avons choisi d'étudier les effets du cuivre, du plomb et du platine.

Le plomb dont la toxicité est connue depuis l'antiquité est toujours rejeté dans l'environnement et ceci malgré l'utilisation des pots catalytiques. Il entre, de plus, dans la composition de nombreux pesticides sous forme d'éléments traces. Le cuivre est abondamment pulvérisé sur le vignoble sous forme de bouillie bordelaise. Bien qu'essentiel à la vie, il n'en est pas moins toxique à forte concentration. C'est notamment un inducteur de stress oxydant. Peu d'études ont été faites jusqu'à présent sur la toxicité du platine qui, rejeté par les pots catalytiques, risque de constituer à plus ou moins long terme une source de pollution notable (WEI et MORRISON, 1994).

Afin de déterminer et de quantifier la toxicité de ces contaminants, des tests ont été mis au point au laboratoire avant d'être utilisés directement dans le milieu naturel.

Toxicité envers *Lumbriculus variegatus*

Matériel et méthodes

Nous avons utilisé comme modèle biologique *Lumbriculus variegatus*, Oligochète limicole qui mène une vie benthique dans les eaux des régions tempérées. Détritivore de grande taille (5 ± 1 cm), il est d'élevage facile et se reproduit exclusivement de manière asexuée par scissiparité architomique (CHRISTENSEN, 1984) ce qui lui confère une grande capacité de régénération céphalique et caudale (VELTZ-BALATRE *et al.*, 1999a). Il présente une certaine sensibilité aux contaminants et pour cela il est de plus en plus utilisé en écotoxicologie (PHIPPS *et al.*, 1993). Nous avons étudié sa biologie dans des conditions saines (multiplication et capacité de régénération notamment de la région céphalique plus différenciée que la région caudale, VELTZ-BALATRE *et al.*, 1999a) avant de l'intoxiquer. Ainsi, la capacité d'accumulation métallique du ver, la toxicité aiguë des métaux testés seuls ou en association bimétallique, l'impact de ces métaux et de ces associations sur la régénération céphalique ont été testés (VELTZ-BALATRE *et al.*, 1999b). Les tests ont été effectués avec 2 types d'eaux, eau de source et eau distillée, dans lesquelles *L. variegatus* se développe et se multiplie fort bien (VELTZ *et al.*, 1996b). Cela nous a permis de travailler avec deux gammes de pH : pH=7 pour l'eau de source (e.s.) et pH=5 pour l'eau distillée (e.d.). Enfin les trois types de tests ont été utilisés pour étudier la qualité et rechercher la toxicité d'eaux provenant de milieux champardennais potentiellement contaminés.

Accumulation métallique et décontamination

Lumbriculus variegatus accumule rapidement et fortement les métaux (Figure 1) et cette accumulation est variable suivant le métal. Celle du plomb est considérable comparativement à celle du cuivre et du platine. Mais si l'on considère les facteurs de bioconcentration (Fb ; Figure 1), l'accumulation des métaux après 28 jours d'intoxication atteint des valeurs importantes. Notons que l'accumulation est variable suivant la nature de l'eau utilisée.

Lorsque les vers sont placés en eau saine, le taux de décontamination est variable suivant le métal et l'eau (Figure 1). La décontamination est rapide pour le cuivre et le platine, notamment pour le platine en eau distillée et très faible pour le plomb.

Toxicité aiguë, résistance au stress toxique, dégénération

À des concentrations métalliques plus élevées, en condition d'intoxication aiguë, les métaux induisent la mort de *L. variegatus* (VELTZ *et al.*, 1996a). Elle est rapide et touche un nombre de vers plus ou moins important en fonction du métal et de l'eau. Le calcul de la concentration létale moyenne (96h-CL₅₀) montre (Tableau 1) que le métal le plus toxique pour ce ver est le cuivre et que la toxicité de ces métaux est plus importante en eau déminéralisée et à pH bas (e.d.).

Tableau 1

Concentrations létales initiales moyennes 96h-CL₅₀ (mg.l⁻¹)
des différents contaminants étudiés isolément et dissous dans l'eau de source et dans l'eau distillée.

Métal	eau de source	eau distillée
Cuivre	0,186 ± 0,001	0,060 ± 0,001
Plomb	-	0,225 ± 0,002
Platine	30 ± 1	0,397 ± 0,001

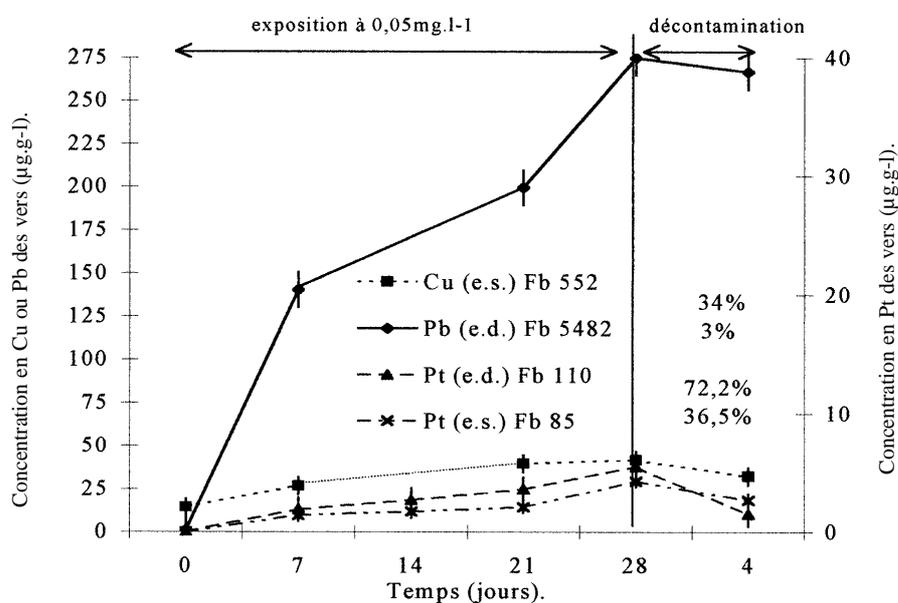


Figure 1

Concentration métallique des *L. variegatus* contaminés 28 jours par 0,05mg.l⁻¹ de Cu, Pb ou Pt, puis replacés 4 jours en eau non contaminée (e.d.) eau distillée, (e.s.) eau de source.
Fb : Facteur de bioconcentration à l'issue de l'intoxication (28 jours ; poids frais).
Pourcentage de décontamination à l'issue des 4 jours.

En mélange, à concentration égale, la toxicité du mélange est supérieure à la toxicité des métaux testés seuls. L'augmentation de la concentration de l'un ou (/et) l'autre des métaux du mélange augmente la toxicité de l'association. L'analyse des interactions montre des effets synergiques, parfois très forts (Cu/Pt), pour la majorité des mélanges ; de plus, la synergie est plus forte aux basses concentrations métalliques.

Outre la mortalité, ces métaux induisent des pathologies qui dans certains cas peuvent être interprétées comme une adaptation à l'intoxication et confèrent à l'animal un moyen de résistance au stress toxique : développement du tissu chloragène lié à la séquestration du plomb par *L. variegatus*, apparition d'œdèmes et d'excroissances sur l'épiderme ou encore décollement de la cuticule lors d'intoxication par le platine. Dans

Toxicité envers *Lumbriculus variegatus*

d'autres cas, elles sont le signe de la dégénérescence de l'animal ; citons l'apparition d'hémorragies, la fragmentation pathologique de l'animal et la dégénérescence caudale.

Régénération céphalique en milieu sain et contaminé

En milieu sain, *L. variegatus* reconstitue une région céphalique (7 segments sétigères et un prostomium) en 7 jours à 20°C, en eau douce ou en eau distillée et cela, que la fragmentation du ver soit naturelle ou artificiellement provoquée par section médiane. Nous avons décrit 8 stades de régénérations (0 à 7) grâce à des observations journalières des régénérats et à leur étude histologique (VELTZ-BALATRE *et al.*, 1999a).

Les effets des concentrations sublétales des métaux lourds et des associations sur la régénération céphalique sont de trois types :

- retard dans le déroulement de la reconstitution d'un régénérat céphalique normal ;
- régénérats atypiques présentant des malformations qui s'opposent à la reconstitution d'un régénérat normal ;
- mortalité des régénérants.

Le cuivre seul (Figure 2) ne provoque pas l'apparition de régénérats atypiques mais il perturbe fortement la régénération dès les très faibles concentrations (équivalentes à celles retrouvées dans des milieux contaminés). De plus, quel que soit le métal ou l'association métallique testée, l'importance de la durée du retard augmente avec la concentration métallique (de 1 jour à 5 jours) (VELTZ-BALATRE *et al.*, 1999b).

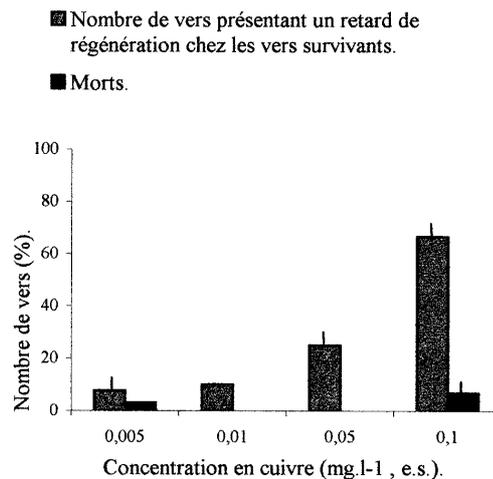


Figure 2

Effets du cuivre sur la régénération céphalique de *L. variegatus*.
Bilan des observations après 7 jours d'exposition (e.s. : eau de source).

Bulletin de la Société zoologique de France 125 (4)

Par ailleurs, dans le cas du plomb (Figure 3) et du platine, les régénérats atypiques apparaissent à de faibles concentrations et leur nombre augmente avec la concentration métallique aux dépens du nombre de régénérats présentant des retards.

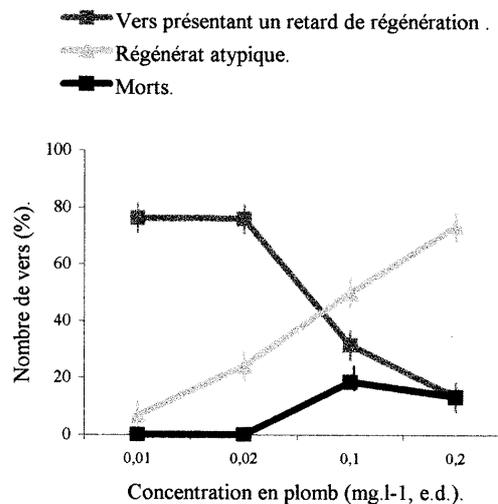


Figure 3

Évolution du nombre de régénérants morts, présentant un retard de régénération ou un régénérat atypique en fonction de la concentration en plomb après 7 jours de contamination (e.d. : eau distillée).

Nous avons classé les régénérats atypiques selon 6 grands types, en fonction de la taille qu'ils ont atteinte à l'issue des 7 jours d'intoxication. Je citerai par exemple, le stade 6' qui est le moins sévèrement atteint. Il est de la taille d'un régénérat normal au stade 6 (après 6 jours de régénération) mais est beaucoup plus chétif et présente de nombreux débris cellulaires et des chloragocytes libres à l'intérieur du prostomium. Le régénérat 5' (de la taille d'un régénérat après 5 jours de régénération) est quant à lui élargi par la dilatation de l'intestin qui comprime l'ensemble des organes. Les tissus d'origine mésodermique sont peu développés. Il n'a pas de bouche alors que le stade normal 5 est caractérisé par l'ouverture de celle-ci. Le stade 0' ne présente pas de blastème de régénération et dans le meilleur des cas on observe juste une cicatrisation de la plaie. Pour finir, notons que la sévérité des atteintes augmente avec la concentration en plomb ou en platine.

Les effets des mélanges métalliques se sont révélés aussi très toxiques pour la régénération céphalique. Ils induisent des perturbations très importantes dès de très faibles concentrations. De plus, la présence de cuivre associé au plomb ou au platine potentialise leurs effets notamment ceux concernant les régénérats atypiques que l'on voit apparaître à des concentrations en plomb ou platine qui, testées seules, n'induisaient pas de malformations. Les interactions induisent des effets synergiques remarquablement forts aux plus faibles concentrations étudiées.

Toxicité envers *Lumbricus variegatus*

Afin d'étudier une éventuelle réversibilité des atteintes, une partie des vers régénérants était placée après 24 heures d'intoxication en eau saine (ex : platine : Figure 4). Nous avons ainsi pu observer que, quel que soit le métal, les effets sur la régénération sont visibles dès les premières 24 heures puisqu'une partie des régénérants accuse un retard de régénération et que quelques régénérants sont morts. De plus, après 6 jours de décontamination, aucune réversibilité des atteintes n'a été observée et une aggravation des effets a été mise en évidence. Nous avons pu mettre en évidence une forte augmentation du nombre de régénérants présentant un retard, l'augmentation du nombre de morts et l'apparition de régénérants atypiques dans les cas d'intoxication par le plomb et le platine. Ainsi, une induction de 24h est suffisante pour perturber grandement la régénération.

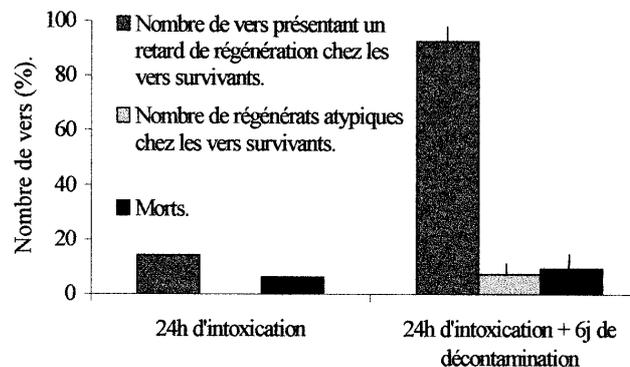


Figure 4

Perturbations de la régénération céphalique de *L. variegatus* après 24 heures d'intoxication par 0,1mgPt.l⁻¹ (eau distillée) puis après 6 jours de décontamination (eau distillée).

Intoxication des vers avec des eaux provenant de milieux potentiellement contaminés

La sensibilité des tests de toxicité aiguë, de régénération céphalique et de bioaccumulation métallique avec *L. variegatus* a été testée avec des eaux potentiellement contaminées prélevées dans divers sites de l'environnement Champardennais (exutoire de la station d'épuration de Reims, rivière traversant Reims (Vesle), bassin de recueil des eaux de ruissellement d'un parking d'hypermarché, et bassins de décantation et d'infiltration des eaux de ruissellement lessivant les vignobles de Reuil-sur-Marne. Signalons que les différents prélèvements, rapportés au laboratoire ont fait l'objet d'une étude physico-chimique poussée suivant les normes européennes et un dosage des métaux susceptibles d'être présents a été effectué.

Seules les eaux prélevées dans les bassins de Reuil-sur-Marne ont induit des effets toxiques sur les vers. Si aucune mortalité n'a été observée lors des tests de toxicité aiguë, d'importantes perturbations de la régénération céphalique des vers (retards importants, malformations sévères et mortalité des régénérants) ont été constatées. De plus, après 7 jours d'intoxication par les eaux de Reuil, les vers ont fortement accumulé le cuivre présent à des concentrations importantes dans ce milieu.

Conclusions et perspectives

Cette étude nous a tout d'abord permis de montrer que *Lumbriculus variegatus* est un bon modèle biologique car il possède toutes les qualités requises pour constituer un excellent matériel expérimental. Il présente une certaine sensibilité aux métaux lourds (on ne le retrouve d'ailleurs pas dans des environnements très contaminés contrairement à *Tubifex*, un autre Oligochète expérimental, qui proliférait dans les sédiments contaminés du site de prélèvement de Reuil-sur-Marne). On note, à faibles concentrations, une bonne capacité d'adaptation de ce ver puisqu'il montre une résistance au stress toxique. En revanche, lorsque la toxicité augmente, *Lumbriculus* entre en dégénérescence et l'on observe d'importantes modifications pathologiques liées aux processus morbides.

En ce qui concerne l'étude des métaux, le cuivre, le plomb et le platine sont toxiques pour *L. variegatus*. La mise en évidence de la toxicité du platine pour un des constituants des écosystèmes dulçaquicole est fondamentale car ce métal est un nouvel élément émis dans l'environnement par les pots catalytiques. C'est donc une pollution nouvelle qu'il va falloir prendre en compte dans l'avenir. La toxicité du cuivre est très importante pour notre modèle biologique et les concentrations qui se sont révélées toxiques sont celles que l'on retrouve dans l'environnement. Enfin, la synergie des effets toxiques des métaux en association est importante et nous avons pu constater que les synergies les plus fortes concernaient des concentrations environnementales.

Le troisième point que je soulignerai intéresse l'utilisation de la régénération céphalique. Ce test que nous avons mis au point est un support idéal pour les recherches de toxicologie de l'environnement. Il est très sensible, les résultats sont rapidement observables (dès 24h) ; il offre une bonne répétabilité et les observations sont faciles à effectuer. Les perturbations sont dépendantes de la concentration du (des) contaminant(s) et les techniques employées sont peu onéreuses.

Le modèle biologique employé, les tests mis au point et les résultats que nous avons obtenus nous offrent de nombreuses perspectives de recherche.

Je citerai tout d'abord quelques pistes concernant la régénération de la région céphalique de *L. variegatus*. Ainsi, le rôle des néoblastes lors de la reconstitution du blastème céphalique devra faire l'objet d'un travail plus poussé notamment par des études en microscopie électronique.

D'autres pistes en rapport avec les mécanismes d'action de ces toxiques devront être envisagées. La validation du test de régénération céphalique doit être effectuée directement en milieu naturel contaminé. La mise au point d'un système est d'ailleurs en cours d'élaboration. Dans un autre domaine il faudra déterminer la nature des types cellulaires touchés par les métaux lors de la régénération. L'étude des mécanismes bio-protecteurs et des mécanismes de séquestration (phagocytes, sphérocristaux, métalloprotéines...) des contaminants sur l'animal entier et lors de la régénération céphalique devra être poursuivie.

Toxicité envers *Lumbriculus variegatus***RÉFÉRENCES**

- BOUDENE, C. (1980).- Ces métaux lourds en question. *Pollution Atmosphérique*, **139**, 56-62.
- CHRISTENSEN, B. (1984).- Asexual propagation and reproductive strategies in aquatic Oligochaeta. *Hydrobiologia*, **115**, 91-95.
- PHIPPS, G.L., ANKLEY, G.T., BENOIT, D.A. & MATTSON, V.R. (1993).- Use of the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus* for assessing the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants. *Environ. Toxicol. Chem.*, **12**, 269-279.
- VELTZ, I., ARSAC, F., BIAGIANTI, S., HABETS, F., LECHENAULT, H. & VERNET, G. (1996a).- Effects of Hexachloroplatinum (Pt IV) in *Lumbriculus variegatus* Müller (Annelida, Oligochaeta) : Acute toxicity and bioaccumulation. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **31**, 63-67.
- VELTZ, I., LECHENAULT, H. & VERNET, G. (1996b).- Influencia de las variaciones físico-químicas (temperatura, dureza del agua, ph) y de la presencia de contaminantes (metales pesados) en el medio, sobre la regeneración cefálica de *Lumbriculus variegatus* Müll. (Oligochaeta). *Tomo Extraordinario. 125 Aniversario de la RSEHN, Madrid*, 149-153.
- VELTZ-BALATRE, I., BIAGIANTI, S. & VERNET, G. (1999a).- Sur la régénération céphalique de *Lumbriculus variegatus* Müller 1774 (Annelida, Oligochaeta). *Bull. Soc. Zool. Fr.*, **124** (1), 11-109.
- VELTZ, BIAGIANTI, S. & VERNET, G. (1999b).- De la régénération céphalique de l'Oligochète *Lumbriculus variegatus* Müller à l'étude de la toxicité des métaux lourds. *Année. Biol.* (sous presse).
- WEI, C. & MORRISON, G.M. (1994).- Platinum in road dusts and urban river sediments. *Sc. Total Environ.*, **146/147**, 169-174.

(reçu le 30/05/2000 ; accepté le 21/06/2000)

