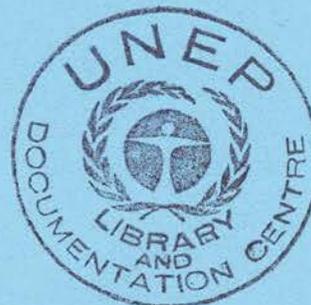


Rapport de la réunion FAO/PNUE sur

**LA TOXICITÉ ET LA BIOACCUMULATION
DE CERTAINES SUBSTANCES
DANS LES ORGANISMES MARINS**

Rovinj, Yougoslavie, 5-9 novembre 1984

préparé dans le cadre du



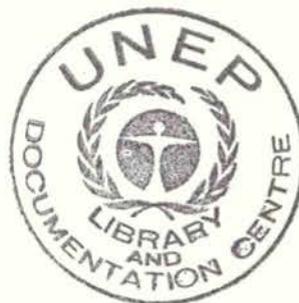
**Programme à long terme de surveillance continue et de recherche
en Méditerranée (MED POL Phase II)**



ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE

Rapport de la
REUNION FAO/PNUE SUR LA
TOXICITE ET LA BIOACCUMULATION DE CERTAINES SUBSTANCES
DANS LES ORGANISMES MARINS

Rovinj, Yougoslavie, 5-9 novembre 1984



Les appellations employées dans cette publication et la présentation des données qui y figurent n'impliquent de la part de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture aucune prise de position quant au statut juridique des pays, territoires, villes ou zones, ou de leurs autorités, ni quant au tracé de leurs frontières ou limites.

Ocn
Pol/55 f

M-45
ISBN 92-5-202278-3

Reproduction interdite, en tout ou en partie, par quelque procédé que ce soit, sans l'autorisation écrite de l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, détentrice des droits avec le Programme des Nations Unies pour l'environnement. Adresser une demande motivée au Directeur de la Division des publications, Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, Via delle Terme di Caracalla, 00100 Rome, Italie, en indiquant les passages ou illustrations en cause.

© FAO et PNUE 1986

PREPARATION DU PRESENT DOCUMENT

Le présent rapport a été préparé dans le cadre d'un projet du Programme des Nations Unies pour l'environnement, intitulé

Plan d'Action pour la Méditerranée: soutien à la mise en oeuvre de MED POL - Phase II,

avec l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture
l'Organisation des Nations Unies pour l'éducation, la science et la culture,
la Commission océanographique intergouvernementale,
l'Organisation mondiale de la santé,
l'Organisation météorologique mondiale et
l'Agence internationale de l'énergie atomique
comme agences de coopération.

Un volume contenant des conférences sera imprimé en supplément de ce rapport.

DEFINITION DE POLLUTION DU MILIEU MARIN

On entend par pollution du milieu marin: "L'introduction, directe ou indirecte, par l'homme, de substances ou d'énergie dans le milieu marin (y compris les estuaires) lorsqu'elle a des effets nuisibles tels que dommage aux ressources biologiques, risques pour la santé de l'homme, entrave aux activités maritimes, y compris la pêche, altération de la qualité de l'eau de mer du point de vue de son utilisation et dégradation de valeurs d'agrément."

Groupe mixte d'experts OMI/FAO/Unesco/OMM/OMS/AIEA/ONU/PNUE chargé d'étudier les aspects scientifiques de la pollution des mers (GESAMP).

Distribution:

Département des pêches de la FAO
Fonctionnaires régionaux des pêches
de la FAO
Sélecteur CGPM (Fr)
PNUE

La référence bibliographique de ce document
doit être donnée ainsi:

FAO/PNUE, Rapport de la réunion FAO/PNUE sur
1986 la toxicité et la bioaccumulation
de certaines substances dans les
organismes marins. Rovinj,
Yougoslavie, 5-9 novembre 1984.
FAO Rapp.Pêches, (334):22 p.

TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
1. GENERALITES	1
2. METHODES DE MESURE DE LA TOXICITE LETALE AIGUE - BESOINS DE METHODES NORMALISEES	1
2.1 Conditions expérimentales	2
2.2 Espèces utilisées pour les expériences	4
2.3 Analyse, interprétation et notation des résultats	4
2.4 Considérations spéciales applicables à certains polluants	5
3. OBJECTIFS DES EPREUVES DE TOXICITE	6
3.1 Epreuves de triage rapide	6
3.2 Recherches proprement dites	7
3.3 Surveillance continue des effets toxiques des polluants sur les populations naturelles	8
4. BIOACCUMULATION DE CONTAMINANTS DANS DES ORGANISMES MARINS	8
5. CONCLUSIONS	9
6. RECOMMANDATIONS	10
7. BIBLIOGRAPHIE	11
ANNEXE I : SUGGESTIONS METHODOLOGIQUES ET EXEMPLES D'EPREUVES DE TOXICITE AIGUE A L'EGARD DES ORGANISMES MARINS UTILISABLES DANS UN BUT DE TRIAGE RAPIDE	16
ANNEXE II : LISTE DES PARTICIPANTS	18
ANNEXE III: LISTE DES COMMUNICATIONS PRESENTEES	21

1. GENERALITES

La toxicité de certains produits chimiques introduits dans le milieu marin a suscité dans l'opinion publique des inquiétudes qui ont conduit les administrateurs de nombreux pays à prendre des mesures législatives en vue de prévenir la pollution du milieu marin et ses conséquences.

Les Parties contractantes de la Convention pour la protection de la mer Méditerranée contre la pollution ont adopté des protocoles relatifs à la pollution due aux opérations d'immersion et à la pollution d'origine tellurique, qui visent à interdire ou éliminer la pollution par certaines substances, en égard à leur toxicité, à leur persistance dans le milieu et à leur bioaccumulation.

Le programme coordonné de surveillance continue et de recherche en matière de pollution en Méditerranée (MED POL - Phase II), qui est le programme scientifique/technique de longue durée entrepris au titre du Plan d'action pour la Méditerranée, prévoit deux catégories fondamentales d'activités, à savoir la surveillance et la recherche. La composante recherche est elle-même subdivisée en douze éléments, dont l'un (activité de recherche "G") intéresse la toxicité, la persistance, la bioaccumulation, la mutagénicité et la cancérogénicité de certaines substances. Dans le cadre des activités de surveillance, les concentrations de contaminants (principalement métaux lourds et hydrocarbures chlorés) présentes dans certains organismes marins, dans l'eau de mer et dans les sédiments sont mesurées périodiquement.

Le Centre de recherche marine de Rovinj a accueilli une réunion conjointe FAO/PNUE convoquée au titre de l'activité de recherche "G". Le titre de cette réunion, organisée sous la responsabilité technique de la FAO, était "Toxicité et bioaccumulation de certaines substances dans les organismes marins".

La réunion a été tenue à Rovinj (Yougoslavie) du 5 au 9 novembre 1984, à l'aimable invitation du centre local de recherche marine, l'Institut "Rudjer Boskovic", avec 34 participants (voir annexe II). Le Dr. Mirjana Krajnovic-Ozretic a été élu Président, M. le Professeur A.K.H. El-Sebae Vice-Président et le Dr. P.D. Abel Rapporteur. Le Dr. G.P. Gabrielides, Fonctionnaire principal des pêches de la FAO (pollution marine), a rempli les fonctions de Secrétaire technique.

Les objectifs de la réunion étaient les suivants :

- a) faire le point des progrès accomplis dans l'exécution des projets entrepris au titre de l'activité de recherche "G". Les experts scientifiques ont présenté leur travail qui a ensuite été soumis à un examen critique. La liste des documents présentés figure à l'annexe III au présent rapport;
- b) échanger des vues sur la validité et l'interprétation en milieu naturel des résultats déjà obtenus;
- c) examiner la possibilité de mettre au point des méthodes normalisées pour les épreuves de toxicité;
- d) formuler des recommandations pour les recherches futures.

Les communications présentées à la réunion sont publiées dans un supplément au texte présent qui est le rapport préparé et adopté par les participants pour rendre compte des échanges de vues et des conclusions et recommandations de la réunion.

2. METHODES DE MESURE DE LA TOXICITE LETALE AIGUE - BESOINS DE METHODES NORMALISEES (Le lecteur es prié de se reporter simultanément à l'annexe I)

Dans l'ensemble, on s'est déjà mis d'accord sur des méthodes appropriées pour estimer la toxicité létale aiguë des agents de pollution à l'égard des organismes

aquatiques, et le lecteur en trouvera de bonnes descriptions dans les publications scientifiques (voir, par exemple Sprague, 1969, 1970, 1973; Brown, 1973; Cairns et Dickson, 1973; Mayer et Hamelink, 1977; Marking et Kimerle, 1979; Buikema et Cairns, 1980; Eaton et al., 1980; McLean et al., 1980; Bellan, 1981; Branson and Dickson, 1981; Great Britain Standing Committee of Analysts, 1981; OCDE, 1981; Alabaster et Lloyd, 1982; Ward et Parrish, 1982). Les participants ont reconnu que, si ces méthodes exigent des moyens matériels et un personnel qualifié dont de nombreux pays méditerranéens sont dépourvus, il n'en est pas moins nécessaire de définir certains critères minimaux et de les observer rigoureusement dans toutes les expériences qui supposent l'exposition d'organismes aquatiques à des polluants toxiques présents dans le milieu environnant. Bien qu'au stade actuel il n'apparaisse ni indispensable ni profitable de spécifier les conditions dans lesquelles doivent se dérouler les épreuves de toxicité tous les laboratoires participant au programme MED POL devraient s'efforcer d'adopter aussitôt que possible des méthodes scientifiques valables.

Quatre aspects des épreuves de toxicité ont été jugés particulièrement importants, à savoir:

- Les conditions expérimentales;
- Les espèces utilisées pour l'expérimentation;
- L'analyse, l'interprétation et la communication des résultats;
- Les méthodes spéciales à utiliser pour certains agents de pollution.

2.1 Conditions expérimentales

Il apparaît essentiel d'observer les prescriptions ci-après dans toute expérience consistant à placer des animaux aquatiques dans un milieu où ils sont exposés à des agents de pollution toxiques;

- a) Les conditions expérimentales doivent être de nature à permettre la survie d'organismes témoins pendant la durée de l'épreuve. Certes, il est parfois impossible d'assurer la survie de tous les témoins - par exemple dans les cas où l'on utilise des juvéniles - mais, si l'expérience est de brève durée par rapport au cycle biologique normal, la mort de témoins pendant son déroulement est inacceptable et l'emploi de "coefficients d'ajustement" est scientifiquement inadmissible. Dans les expériences utilisant des sujets parvenus au stade adulte ou à des stades post-larvaires de relativement courte durée dans le cycle biologique normal, une forte mortalité parmi les témoins indique que les conditions expérimentales sont inappropriées et à donc pour effet d'invalider l'épreuve; ici aussi, l'utilisation de "coefficients d'ajustement" est erronée. Leur application doit être limitée aux cas où la durée de l'épreuve représente une importante partie de la durée de la vie normale.
- b) Les conditions expérimentales peuvent influencer la concentration des polluants présents dans les bacs utilisés. Lorsque l'expérience prévoit l'adjonction de concentrations relativement faibles d'un produit chimique (polluant) à un certain volume d'eau dans lequel seront introduits les sujets, la concentration initiale changera rapidement. Elle peut être modifiée par l'un quelconque des nombreux processus ci-après:
 - (i) absorption de la substance toxique par les organismes soumis à l'épreuve;
 - (ii) adsorption de la substance toxique par les parois du bac expérimental;
 - (iii) volatilisation de la substance toxique dans l'atmosphère, en particulier lorsque le bac expérimental est aéré;

(iv) transformation chimique ou biologique de la substance toxique ayant pour effet de la rendre plus ou moins toxique que la substance initialement administrée.

b) La conclusion à tirer de ce qui précède est que, théoriquement, l'eau contenue dans les bacs utilisés devrait être renouvelée fréquemment. Il est parfaitement démontré que, dans la pratique, les solutions expérimentales doivent être renouvelées ou remplacées durant l'expérience à un rythme qui dépend des propriétés physico-chimiques de la substance toxique soumise à épreuve (par exemple stabilité chimique et biologique, volatilité, etc.). En conséquence, il est évident que les laboratoires qui effectuent des recherches toxicologiques devraient s'efforcer de se doter aussi tôt que possible des moyens techniques nécessaires pour procéder à des tests en continue. En général, il est prescrit que la solution toxique doit être renouvelée toutes les 6 à 10 heures pendant la durée de l'expérience, selon les propriétés de la substance toxique et les autres conditions expérimentales. On trouvera dans les publications scientifiques de nombreux exemples de méthodes appropriées (Alabaster et Abram, 1965; Mount et Brungs, 1967; Stark, 1967; Burke et Ferguson, 1968; Solon et al., 1968; Abram, 1973; Wuerthele et al., 1973; Bahner et al., 1975; Benoit et al., 1982; Smith et Hargreaves, 1983). Le coût et le degré de complexité des systèmes utilisés sont variables, mais il existe de nombreux dispositifs relativement simples qui n'exigent pas grand chose de plus que des appareils courants de laboratoire, et certains d'entre eux ont été spécifiquement conçus sur une échelle réduite pour les expériences portant sur des sujets de petite taille et pour les laboratoires où l'espace disponible est limité.

Les participants ont reconnu que faute de moyens financiers, certains laboratoires ne pourront pas se doter d'installations de ce type dans l'avenir immédiat. Il pourrait donc être nécessaire de continuer à effectuer des tests de toxicité dans des conditions "statiques". En tels cas, diverses précautions sont indispensables pour assurer que les résultats des expériences soient scientifiquement valables. En premier lieu, les bacs expérimentaux doivent être suffisamment grands. On trouvera des recommandations détaillées à ce sujet dans Sprague (1969, 1973), Alabaster et Lloyd (1982), et Ward et Parrish (1982) (voir aussi annexe I). En outre, il est souhaitable que les solutions d'épreuve soient régulièrement renouvelées. La périodicité à observer dépend, comme on l'a dit, des propriétés de la substance toxique et des conditions expérimentales; en général toutefois, les solutions d'épreuve devraient être renouvelées approximativement toutes les 12 à 24 heures.

c) Etant donné que la concentration de la substance toxique à laquelle les sujets sont exposés peut varier au cours de l'expérience (qu'il s'agisse d'un test statique ou d'un test en continu), il est vivement conseillé de mesurer fréquemment la concentration effectivement présente dans chaque bac expérimental pendant le déroulement de l'épreuve.

d) Les variables du milieu qui sont susceptibles d'influencer le degré de toxicité de la substance étudiée et/ou la physiologie des sujets doivent également être surveillées au cours des expériences (citons par exemple la température, le pH, la salinité, la teneur en oxygène dissous). Les renseignements correspondants doivent être consignés avec les résultats de l'expérience.

e) Il faut veiller de près à des aspects tels que le choix de l'effectif de l'échantillon, l'acclimatation des organismes étudiés aux conditions expérimentales et la sélection des sujets à prélever dans les stocks de réserve. Ces remarques sont valables pour toutes les expériences utilisant des organismes vivants, et non pas seulement pour les épreuves toxicologiques; en outre, il convient de se conformer strictement aux

pratiques scientifiques établies en la matière. Pour ce qui concerne plus particulièrement les épreuves de toxicité, on trouvera des recommandations détaillées dans Sprague (1969, 1973) et dans Ward et Parrish (1982).

2.2 Espèces utilisées pour les expériences

Le choix des espèces utilisées pour les épreuves de toxicité est soumis aux restrictions applicables à toutes les expériences biologiques. Il est limité, par exemple, aux espèces qui peuvent être élevées dans des conditions de laboratoire et qui sont disponibles en nombre suffisant. En outre, l'espèce choisie dépend du motif de l'expérimentation et les participants ont examiné divers critères de sélection. Par exemple, l'utilisation d'une espèce "standard" est appropriée dans certaines situations, par exemple lorsque l'expérience a pour but de comparer les modes opératoires adoptés par différents laboratoires pour les épreuves de toxicité. Par contre, s'il s'agit d'évaluer le risque auquel un polluant déterminé pourrait exposer l'environnement, il est évidemment souhaitable de sélectionner une série d'espèces représentatives des différents niveaux trophiques et des différents groupes taxonomiques. Les participants ont reconnu que la question du choix des espèces et celle du degré de normalisation requis ne se posent pas seulement dans les études toxicologiques, mais dans toutes les expériences biologiques, et qu'il y a lieu de se conformer aux pratiques scientifiques établies, le critère fondamental étant que l'espèce sélectionnée doit être adaptée au but de l'expérience. Il existe une abondante documentation sur ces aspects des épreuves de toxicité (voir par exemple Sprague, 1970; Brown, 1973; Bellan, 1981).

2.3 Analyse, interprétation et notation des résultats

Les participants ont reconnu que la confusion règne souvent parce que de nombreux chercheurs utilisent des méthodes inappropriées d'analyse des données et ne consignent pas clairement les résultats. Des vues ont été échangées sur les méthodes appropriées d'analyse des données et de notation des résultats et il a été convenu qu'il faudrait s'efforcer de satisfaire à certaines exigences fondamentales.

Dans les épreuves de toxicité létale, la plupart des chercheurs utilisent les méthodes de Litchfield (1949) et de Litchfield et Wilcoxon (1949), qui sont des versions modifiées de la méthode de Bliss (1935, 1937) - consistant à transformer en probits les pourcentages du mortalité et établir une régression linéaire en fonction des logarithmes des concentrations utilisées - pour estimer les concentrations létales médianes (CL50) ou les durées médianes de survie (TL50). L'utilisation de cette technique pour déterminer la toxicité des polluants à l'égard des animaux aquatiques a été très bien décrite par Sprague (1969, 1973). De nombreux chercheurs qui s'intéressent à la Méditerranée ont recouru à la méthode de Stora (1972, 1975) qui est une adaptation de la méthode de Bliss, donnant des résultats acceptables quoiqu'assez peu conventionnels; toutefois, comme il n'est pas tenu compte de la modification de Litchfield-Wilcoxon, le calcul des résultats risque d'être inutilement long et fastidieux. D'autres méthodes appropriées ont été examinées par divers auteurs (Sprague, 1969; Stephan, 1977) mais en pratique il semble que, dans la plupart des cas, la méthode utilisée n'ait guère d'influence sur le résultat final.

Les résultats peuvent être exprimés par la CL50 au bout de périodes spécifiées (par exemple 24 h, 48 h, 96 h). Les limitations de ce mode d'expression sont bien connues et ont été clairement expliquées par Sprague (1969): il convient d'en tenir compte pour l'interprétation des résultats.

Une démarche préférable consiste à noter fréquemment la mortalité dans les bacs expérimentaux et à construire une courbe complète de toxicité. Idéalement, l'expérience devrait être poursuivie jusqu'à ce qu'une concentration létale seuil ait pu être déterminée, car elle donne une indication plus fiable de la toxicité létale que la CL50 à court terme (Sprague, 1969).

L'utilisation d'ordinateurs pour faciliter l'analyse des données a été discutée. Les ordinateurs permettent de calculer rapidement les résultats mais comme on risque de se fier exagérément à ce qu'ils indiquent, on peut passer à côté d'erreurs simples, et le calcul manuel de données représentatives est donc recommandé pour chaque épreuve à titre de contrôle.

Les résultats doivent être présentés de façon claire et être faciles à interpréter par d'autres chercheurs. Une attention particulière doit être portée aux points suivants:

- a) des estimations de l'erreur doivent toujours être fournies (par exemple pour les concentrations), et il convient de préciser s'il s'agit d'écart-types, d'erreurs-types ou de limites de confiance à 95 pour cent;
- b) les méthodes expérimentales doivent être décrites de manière suffisamment détaillée pour aider le lecteur à évaluer les résultats. Il faut s'efforcer, comme dans toute autre publication scientifique, de donner assez d'informations pour que l'expérience puisse être répétée par un chercheur indépendant;
- c) lors de l'examen des résultats, il ne faut pas oublier que la validité de l'interprétation dépend des limitations de la méthode expérimentale. Par exemple, si les conditions expérimentales sont telles que la concentration de la substance toxique varie de ± 20 pour cent, cela influencera le degré de précision avec lequel il conviendra de consigner les résultats.

2.4 Considérations spéciales applicables à certains polluants

Certains polluants, en raison de leurs propriétés physico-chimiques ou de leur mode de libération dans l'environnement, exigent des expériences spécialement conçues. Deux catégories de polluants peuvent être données en exemple:

- a) Substances volatiles: dans ce cas, le problème est celui du maintien des concentrations au cours de l'expérience (voir section 2.1 b). Pour les épreuves intéressant des organismes de petite taille, il existe des méthodes utilisant des récipients clos (voir, par exemple Galassi et Vighi, 1981), mais les épreuves intéressant des organismes de grande taille peuvent présenter des difficultés particulières qui conditionneront le mode opératoire adopté, le degré de constance des conditions expérimentales et la précision du résultat final.
- b) Les dispersants des hydrocarbures présentent diverses caractéristiques inhabituelles qui influencent le choix des méthodes de mesure de leur toxicité. En premier lieu, les organismes vivant dans le milieu naturel sont normalement exposés à de fortes concentrations de ces produits pendant de courtes périodes si bien qu'en tels cas des expériences de brève durée rendent raisonnablement compte de la réalité. En deuxième lieu, de nombreux dispersants récemment mis au point sont relativement peu toxiques. Comme ils ne sont pas miscibles à l'eau, leur solubilité est fréquemment inférieure à leur toxicité (exprimée en CL50, 48 h ou 96 h). Toutefois, étant donné que les dispersants des hydrocarbures ne sont déversés que dans des environnements qui ont été gravement pollués par le pétrole, le but des épreuves de toxicité létale est de déterminer si le dispersant et le mélange dispersant/hydrocarbure sont plus ou moins toxiques que l'hydrocarbure à lui seul.

Le mesure de la toxicité des hydrocarbures, des dispersants des hydrocarbures et des émulsions hydrocarbure/eau/dispersant présente de nombreuses difficultés; ainsi, par exemple, le degré de toxicité du produit à tester dépend au plus haut point de la nature de l'émulsion; en pratique donc, le résultat d'une épreuve de toxicité est en grande partie fonction du mode de mélange avec l'eau du dispersant, de l'hydrocarbure ou du mélange dispersant hydrocarbure. En outre, les hydrocarbures ne sont pas des produits précisément définissables, mais des mélanges variables de nombreux composés distincts. Toutefois, plusieurs méthodes de mesure de la toxicité des dispersants des hydrocarbures ont été mises au point dans diverses régions du monde et des techniques appropriées ont été décrites en détail notamment par Laroche et al. (1970), McCarthy et al. (1973), 1978), Beynon et Cowells (1974), Blackman et al. (1977), Thompson et Wu (1981) et Molden et Chapman (1983).

Ces exemples montrent que certaines substances toxiques ont des caractéristiques physico-chimiques particulières dont il faut tenir compte lorsque l'on choisit les méthodes d'épreuve. De manière générale, les propriétés physico-chimiques du polluant doivent toujours être prises en considération pour la conception, la conduite et l'interprétation des épreuves de toxicité.

N.B. On trouvera à l'annexe I quelques suggestions méthodologiques et quelques exemples d'organismes marins utilisables pour les tests d'élimination préliminaires aux épreuves de toxicité aiguë.

3. OBJECTIFS DES EPREUVES DE TOXICITE

Les expériences et observations toxicologiques sont entreprises pour diverses raisons; dans la zone de la Méditerranée, on peut les classer dans trois catégories principales:

- a) épreuves de triage rapide entreprises à des fins juridiques/administratives;
- b) recherches visant, par exemple, à identifier les risques que certains polluants font courir ou pourraient faire courir à l'environnement ou à faciliter l'établissement de critères de qualité des eaux;
- c) surveillance continue des effets toxiques des polluants sur les populations naturelles.

3.1 Epreuves de triage rapide

Dans de nombreux pays, l'autorisation de déverser un effluent ou d'utiliser un dispersant particulier des hydrocarbures est subordonnée à une mesure de la toxicité du produit. Si celle-ci dépasse une certaine limite (quelle qu'en soit la définition), l'autorisation de le déverser dans l'environnement est refusée. Une épreuve applicable à cet effet doit être conforme aux prescriptions suivantes:

- a) La méthode doit être clairement définie et rigoureusement suivie. Etant donné que le résultat de l'épreuve est nécessaire à des fins juridiques ou administratives, et qu'il peut avoir des incidences économiques (par exemple dans le cas où un dispersant des hydrocarbures ne satisfait pas à l'épreuve prescrite), il peut être contesté. Etant donné que les variations des conditions expérimentales ont quelquefois une grande influence sur les résultats, il existe un risque qu'une partie intéressée puisse contester les résultats en alléguant que la procédure expérimentale n'a pas été convenablement suivie.
- b) Sous réserve d'être conforme aux normes méthodologiques minimales recommandées dans le présent rapport, le mode opératoire devrait être aussi simple que possible, tout d'abord parce qu'il peut être nécessaire de procéder à un grand nombre d'épreuves et, en deuxième lieu, parce que les moyens de laboratoire disponibles à cet effet peuvent être limités.
- c) Pour des raisons analogues, l'épreuve devrait être de durée relativement brève.

Des épreuves de triage rapide ont été mises au point dans de nombreux pays. Les tests applicables aux dispersants des hydrocarbures ont été évoqués plus haut. Parmi les épreuves de caractère plus général, les mieux connues sont les méthodes de l'APHA/AWWA/WPCF (1980) et de l'OCDE (1981). Des épreuves de triage utilisées dans divers pays pour obtenir une indication de la toxicité à l'égard des poissons d'eau douce ont été décrites en détail par la CECPI (1983) et par Alabaster et Lloyd (1982). Des épreuves de toxicité à l'égard des organismes marins ont été décrites par Persoone et al. (1984, 1984 a).

3.2 Recherches proprement dites

Des études toxicologiques sont également nécessaires pour:

- a) déterminer les risques qu'un agent de pollution particulier fait courir ou pourrait faire courir à l'environnement. Les études de ce genre peuvent revêtir un intérêt particulier en cas d'introduction de nouveaux composés chimiques dans l'environnement naturel; elles doivent être entreprises conformément aux procédures prescrites pour les épreuves d'évaluation rapide de la toxicité aiguë visant à déterminer approximativement l'ordre de grandeur des risques potentiels, qui sont décrites dans divers textes législatifs internationaux, par exemple, le sixième amendement à la directive 79/831 de la CEE sur les substances dangereuses.
- b) contribuer à la détermination des concentrations "sans danger" ou environnementalement acceptables des agents de pollution des eaux, autrement dit, à l'élaboration de critères de qualité des eaux.

Il conviendrait par exemple d'étudier: les effets des conditions de milieu sur la toxicité et la bioaccumulation des agents de pollution (effets de la salinité dans le cas de déversements dans des eaux saumâtres ou dans des estuaires, effets de la température dans le cas de déversements d'effluents chauds, etc.); la toxicité de combinaisons d'agents de pollution; enfin, la possibilité que des organismes vivant dans des zones polluées se soient génétiquement ou physiologiquement adaptés à des polluants particuliers.

Cet objectif ne peut être atteint qu'en recourant à toute une variété de procédures expérimentales. Il est donc inapproprié de tenter de définir des méthodes "normalisées" pour ce qui concerne, par exemple, les espèces à soumettre aux épreuves ou les conditions de milieu. La seule règle à observer dans les recherches de ce type est celle de l'application de méthodes scientifiques éprouvées.

Cela étant, des techniques très diverses peuvent être utiles. Les épreuves de toxicité létale aiguë restent d'un grand intérêt, en particulier dans le cadre des programmes d'évaluation progressive des risques, de type décrit par Duthie (1977), Maki et Duthie (1978) et Tooby (1978). Toutefois, il faut bien se rendre compte que l'application des résultats des épreuves de toxicité létale aiguë à l'évaluation des risques pour l'environnement n'est scientifiquement valable que si certaines prescriptions supplémentaires ont été observées (par exemple pour ce qui est de la durée des épreuves et de l'estimation de concentrations létales seuils). Ce point a déjà été évoqué à la section 2.3.

En outre, on reconnaît de manière générale l'intérêt des expériences de longue durée pour étudier les effets de doses sublétales de polluants, notamment ceux qui intéressent des variables biologiques importantes sur le plan écologique (par exemple croissance, reproduction et développement). Parmi les autres méthodes qui ont fait la preuve de leur utilité, on peut mentionner l'utilisation d'écosystèmes contrôlés ou partiellement contrôlés aussi bien en laboratoire que sur le terrain. Les études sur la bioaccumulation des polluants conduites en milieu naturel ou au laboratoire présentent également de l'intérêt, toujours sous réserve d'être entreprises dans le cadre d'un programme d'évaluation des risques clairement défini. Néanmoins, étant donné que dans la région méditerranéenne comme dans le reste du monde, les recherches toxicologiques ont un but pratique qui est de surveiller et contrôler la pollution, rien ne s'oppose sur le plan scientifique à ce que les études menées à bonne fin et publiées dans d'autres régions du monde soient adaptées aux problèmes de la Méditerranée. De fait, on peut faire valoir qu'une grande partie des recherches actuellement entreprises dans les pays méditerranéens reproduisent inutilement des études qui ont été effectuées il y a plusieurs années dans d'autres parties du monde exactement dans le même but. Par exemple, il existe une abondante documentation sur la toxicité létale à l'égard des espèces marines de polluants très répandus tels que les métaux lourds et les pesticides. Rien ne permet de supposer que, de manière générale, les espèces méditerranéennes aient une vulnérabilité aux polluants très différente de celle des espèces d'autres régions. Dans certains cas même, les études toxicologiques publiées au

cours des vingt dernières années indiquent que les différences inter- et intra-spécifiques de vulnérabilité aux polluants sont relativement peu importantes. Cela donne à penser que lorsque l'on s'occupe de mesurer la toxicité létale de polluants de type courant tels que les métaux lourds et de nombreux pesticides à l'égard des espèces méditerranéennes, on n'utilise peut-être pas au mieux les ressources matérielles et humaines qui pourraient être consacrées à des activités plus utiles.

3.3 Surveillance continue des effets toxiques des polluants sur les populations naturelles

L'étude de la bioaccumulation des polluants dans les organismes aquatiques est un aspect important des recherches toxicologiques puisque les polluants sont évidemment dépourvus d'effets s'ils ne pénètrent pas dans les tissus vivants. En conséquence, on s'est beaucoup attaché à surveiller les concentrations de polluants présentes dans les tissus d'organismes vivants provenant de populations naturelles, en partie dans le but de contrôler et surveiller la pollution et en partie pour se rendre compte des conséquences possibles pour la santé publique. Une documentation considérable a été recueillie sur les concentrations de polluant présentes dans les tissus d'espèces vivant dans de nombreuses zones de la Méditerranée. Il importe toutefois de déterminer la corrélation entre les concentrations de polluants mesurées dans les tissus végétaux et animaux et l'existence d'effets toxiques ayant des répercussions écologiques. Pour s'attaquer à ce problème, il peut être utile d'entreprendre des recherches dans plusieurs domaines à la fois. Des études de longue durée sur la dynamique des populations d'espèces vivant dans des zones polluées et non polluées de la Méditerranée sont nécessaires pour déterminer si les populations vivant dans les premières sont écologiquement affectées par le degré existant de pollution. Par exemple, il peut être profitable d'entreprendre des études sur la densité des populations, la composition par âge, le taux de croissance et le succès de la reproduction de certaines espèces conjointement à des études suivies sur la bioaccumulation. Il peut être utile d'effectuer en outre des études dans des écosystèmes contrôlés, en milieu naturel et au laboratoire.

Il est néanmoins évident que les recherches de ce type demandent beaucoup de temps et coûtent cher; il pourrait donc être avantageux d'étudier les possibilités d'emploi de méthodes plus rapides pour déceler les effets toxiques sublétaux dans les populations naturelles exposées à la pollution. Plusieurs techniques ont été récemment mises au point à cet effet. Citons par exemple la mesure de la teneur en métallothionine des tissus, qui donne une indication du degré d'exposition des organismes à la pollution par des métaux lourds (voir par exemple Howard et Nickless, 1975; Olafson et al., 1979; Roesijadi, 1980; Roch et al., 1982; Roch et McCarter, 1984); l'utilisation de techniques génotoxicologiques (Kohn et al., 1976; Zahn et al., 1981, 1982, 1983; Hoehn-Bentz et al., 1983; Kurelec et al., 1983); et l'utilisation des oxidases à fonction mixte pour obtenir une indication de l'exposition au PAH et au PCB (Nebert et Gelboin, 1968; Payne et Penrose, 1975; Kurelec et al., 1977; Kezic et al., 1983). Quelques laboratoires de la région méditerranéenne ont déjà commencé à utiliser ces techniques. Toutefois, bien que l'on reconnaisse qu'elles pourraient être extrêmement utiles, elles exigent des moyens techniques très importants et un personnel qualifié. Il faudrait peut être étudier de plus près leurs possibilités d'emploi dans la zone méditerranéenne.

4. BIOACCUMULATION DE CONTAMINANTS DANS DES ORGANISMES MARINS

Divers facteurs peuvent contribuer à la bioaccumulation de contaminants dans les organismes marins.

La température de l'eau ambiante exerce une influence sur le métabolisme des organismes vivants et, par conséquent, sur l'absorption et l'élimination des contaminants. Certaines différences entre les concentrations de contaminants trouvées dans des sujets de la même espèce à différentes saisons peuvent être attribuées aux différences de température qui affectent le métabolisme des graisses. Si les teneurs en oxygène dissout sont suffisamment faibles pour affecter les processus respiratoires, la bioaccumulation des contaminants peut en être influencée. Quoique le pH de l'eau de mer soit en général très constant, il peut y avoir des variations locales dans des zones particulières. Celles-ci peuvent influencer indirectement la bioaccumulation, puisque

le pH est l'un des principaux facteurs qui déterminent le degré auquel certains polluants, en particulier les métaux, forment des complexes inorganiques ou organométalliques, influençant ainsi l'assimilabilité biologique du contaminant. Les variations de la salinité, là où elles se produisent, peuvent également avoir une influence indirecte sur la bioaccumulation, étant donné que l'adaptation à une salinité anormale peut nécessiter un considérable ajustement du métabolisme.

Outre les facteurs abiotiques précités, la bioaccumulation peut être conditionnée par l'état biologique de l'organisme considéré. Par exemple, on observe fréquemment des corrélations entre les concentrations de contaminants présentes dans les tissus et l'âge ou la taille de l'organisme. Des différences entre les concentrations de contaminant présentes dans l'ensemble de l'organisme ou dans des tissus déterminés sont également possibles selon le stade du cycle biologique. Par exemple, avant la formation et la maturation des gonades chez le poisson, la nourriture est stockée sous la forme de graisses dans le foie et dans d'autres parties du corps. Cela pourrait influencer le stockage des composés organiques et organométalliques dont beaucoup ont une forte affinité pour les lipides. Avant et pendant la période de reproduction, les réserves alimentaires sont mobilisées et redistribuées, ce qui aura évidemment une influence sur les concentrations de contaminants décelées dans des tissus particuliers, par exemple les gonades. C'est là l'une des explications de la grande variabilité des résultats communiqués en ce qui concerne les concentrations de contaminants trouvées dans de nombreuses espèces.

Etant donné ce qui précède, la réunion a formulé les recommandations suivantes pour la surveillance des concentrations de polluants dans les organismes marins:

- a) Des informations appropriées sur les conditions de milieu (par exemple température, salinité, teneur en oxygène dissout, concentrations de matières organiques etc., selon le cas) doivent être recueillies, de préférence non seulement au moment de l'échantillonnage, mais aussi, si possible, pendant la période précédant l'échantillonnage.
- b) Les données biologiques ci-après doivent être recueillies: longueur, poids, sexe et maturité des spécimens. Si possible, l'âge des spécimens sera estimé.
- c) On s'efforcera d'analyser non seulement la chair, mais aussi d'autres tissus et organes (par exemple foie, gonades) selon les besoins.
- d) Etant donné que des dépôts et/ou de la nourriture seront présents dans le tube digestif des sujets, il conviendra de les retirer avant l'analyse.
- e) On analysera à la fois des échantillons d'une espèce individuelle et des échantillons composés. Ces derniers seront constitués d'au moins 10 sujets de la même taille. Pour les échantillons d'espèces individuelles, un minimum de 10 sujets est également recommandé.
- f) Il conviendra d'examiner l'influence éventuelle de l'activité reproductrice sur les résultats des analyses. Par exemple, chaque fois que possible, des échantillons seront prélevés avant, pendant et après le frai; on notera aussi chaque fois que possible, si les spécimens sont au stade de la reproduction.

5. CONCLUSIONS

La validité des résultats des études toxicologiques dépend dans une très large mesure des méthodes employées. Le manque de personnel qualifié et de moyens matériels dans certains laboratoires explique en partie la valeur douteuse des résultats de nombreuses recherches.

Il est possible de se mettre d'accord sur certains critères méthodologiques minimaux auxquels devraient satisfaire tous les laboratoires qui entreprennent des recherches toxicologiques. Le travail de recherche ne devrait être encouragé que lorsqu'il a été

établi que ces spécifications peuvent être satisfaites, et les instituts qui ne sont pas en mesure de s'y conformer devraient être incités à se doter des moyens nécessaires.

De nombreuses études toxicologiques font double l'emploi avec des recherches en cours ou déjà achevées et publiées ailleurs. Toutefois, des recherches toxicologiques sur certaines questions précises se justifieraient dans la zone méditerranéenne et il faudrait les encourager.

Indépendamment des critères méthodologiques fondamentaux, le degré souhaitable de normalisation des méthodes est en fonction des objectifs de l'étude. Dans la mesure où elle est praticable, la normalisation des épreuves de triage rapide effectuées à des fins juridiques et administratives présente, par exemple, certains avantages et devrait être encouragée. Certaines recherches toxicologiques sont destinées à faciliter l'évaluation des risques pour l'environnement ou l'établissement de critères de qualité des eaux. En tel cas, une approche plus diversifiée est alors désirable, sous réserve que les spécifications méthodologiques minimales soient satisfaites.

Certains thèmes de recherche ont été jugés particulièrement intéressants en ce qui concerne la Méditerranée et les laboratoires participants devraient être incités à intensifier leurs travaux dans ces domaines (voir sections 3.1 et 3.2).

Quelques laboratoires se dotent actuellement des moyens techniques et des compétences nécessaires pour l'emploi de certaines techniques et il y a lieu de les encourager.

Dans l'avenir prévisible, le niveau de compétence technique des laboratoires restera probablement très variable. Mais si n'importe quel laboratoire s'efforce de s'aligner sur les autres, par exemple en se procurant un équipement coûteux et spécialisé, il n'utilisera pas forcément au mieux ses ressources limitées. En outre, de nombreuses études jugées souhaitables exigent des moyens que ne peut posséder un laboratoire isolé. Il faut donc promouvoir la collaboration entre les institutions, non seulement dans le domaine de la recherche mais aussi pour la formation du personnel scientifique et technique.

Les propositions en vue d'entreprendre telle ou telle recherche ne devraient être appuyées que si elles répondent à certains critères énoncés dans le présent rapport, à savoir l'acceptabilité des méthodes qui seront employées et la démonstration que l'étude envisagée sera conforme à un ou plusieurs des objectifs énumérés à la section 3.

Des données considérables ont été recueillies sur les concentrations de polluants présentes dans les tissus des organismes végétaux et animaux de la Méditerranée. Leur valeur est limitée, et cela pour diverses raisons. Des facteurs tels que la taille, l'âge, l'état physiologique, le stade qui a été atteint dans le cycle de reproduction et les conditions de milieu ont, comme on le sait, une forte influence sur le métabolisme et la distribution des métaux et autres substances toxiques dans les organismes marins. Toutefois, les données pertinentes ne sont pas toujours collectées à l'occasion du prélèvement de l'organisme dans le milieu. En conséquence, il est souvent difficile de dire si les différences entre les concentrations de polluants trouvées dans des organismes provenant de zones différentes s'expliquent par des degrés différents de contamination de l'environnement ou par d'autres facteurs.

6. RECOMMANDATIONS

Sur les bases de ces conclusions, la réunion a formulé les recommandations suivantes:

- a) les laboratoires devraient être encouragés à se doter des moyens techniques nécessaires pour utiliser des méthodes de recherche appropriées, ce qui permettra d'améliorer la qualité et la fiabilité des résultats;
- b) il importe de normaliser les protocoles des épreuves de toxicité à l'égard d'organismes marins effectuées dans un but de triage rapide et intéressant des substances telles que les dispersants des hydrocarbures et quelques

autres, dans les cas où les résultats peuvent avoir une importance juridique ou administrative, plutôt que strictement biologique. La FAO devrait préparer un document décrivant en détail les méthodes recommandées pour les épreuves de triage rapide, analogue à celui qui a été préparé par l'OCDE pour les organismes d'eau douce (Guidelines for Testing of Chemicals);

- c) il est souhaitable de varier les approches adoptées pour les études de toxicité (par exemple étude de la toxicité aiguë et chronique, études en écosystèmes contrôlés, études de la bioaccumulation) effectuées sur diverses espèces, mais il faut prendre soin d'éviter les doubles emplois;
- d) la préférence doit être donnée aux études effectuées dans des conditions analogues aux conditions naturelles, ou dont les résultats soient facilement utilisables dans les conditions naturelles, par exemple dans le cadre d'un programme d'évaluation progressive des risques pour l'environnement;
- e) il faut s'efforcer de déterminer si les concentrations observées de polluants dans les populations naturelles sont associées à des effets toxiques sublétals (par exemple en effectuant des études écologiques de longue durée et des études dans des écosystèmes contrôlés, ou en utilisant des techniques biochimiques, physiologiques, immunotoxicologiques ou génotoxicologiques);
- f) il faudrait étudier de près les substances énumérées dans les annexes au protocoles de la Convention de Barcelone, étant donné l'insuffisance des informations à leur sujet;
- g) la collaboration interinstitutions pour la conduite de certains projets de recherche devrait être encouragée, car l'étude de nombreuses questions importantes exige des moyens qui ne sont pas à la portée d'un laboratoire isolé;
- h) la collaboration interinstitutions pour la formation des chercheurs et des techniciens est souhaitable. Les visites rendues à titre individuel ou par petits groupes dans d'autres laboratoires participants pour s'y familiariser avec des techniques particulières, devraient être encouragées;
- i) les instituts de recherche, ainsi que les chimistes et les biologistes devraient se mettre d'accord sur des méthodes détaillées d'échantillonnage des substances biologiques et d'analyse des agents de pollution dans les tissus.

Les recommandations a), g) et h) sont jugées particulièrement importantes.

7. BIBLIOGRAPHIE

- Abram, F.S.H., Apparatus for control of poison concentration in toxicity studies
1973 with fish. Water Res., 7, 1875-9.
- Alabaster, J.S. and F.S.H. Abram, Development and use of a direct method of evaluating
1965 toxicity to fish. Adv. Water Pollut. Res., 1:41-54
- Alabaster, J.S. and R. Lloyd, Water quality criteria for freshwater fish. London,
1982 Butterworth for FAO, 361 p. 2nd ed.
- APHA/AWWA/WPCF, Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington
1980 D.C., American Public Health Association/American Water Works
Association/Water Pollution Control Federation, 1134 p. 15th ed.
- Bahner, L.H., C.D. Kraft and D.R. Nimmo, A saltwater flow-through bioassay method with
1975 controlled temperature and salinity. Prog. Fish-Cult., 37:126-9.

- Bellan, G., Manuel des méthodes de la recherche sur l'environnement aquatique. Septième
1981 partie. Bioessais sélectionnés pour la Méditerranée (Tests utilisés dans le
Projet commun coordonné FAO(CGPM)/PNUÉ sur la pollution en Méditerranée).
FAO Doc.Tech.Pêches, (208):37 p..
- Benoit, D.A., V.R. Mattson and D.L. Olson, A continuous-flow minidiluter system for
1982 toxicity testing. Water Res., 16:457-64.
- Beynon, L.R. and E.B. Cowells (eds), Ecological aspects of toxicity testing of oil and
1974 dispersants. London, Applied Science Publishers, 149p.
- Blackman, R.A.A. et al., New procedures for the toxicity testing of oil slick
1977 dispersants. Fish.Res.Tech.Rep.Dir.Fish.Res.G.B., (39):7p.
- Bliss, C.I., The calculation of the dose-mortality curve. Ann.Appl.Biol., 22:134-67.
1935
- _____, The calculation of the time-mortality curve. Ann.Appl.Biol., 24:815-52.
1937
- Bronson, D.R. and K.L. Dickson, Aquatic toxicology and hazard assessment. Proceedings
1981 of the fourth annual Symposium on aquatic toxicology. ASTM Spec.Tech.Publ.
(737):466 p.
- Brown, V.M., Concepts and outlook in testing the toxicity of substances to fish. In
1973 Bioassay techniques and environmental chemistry, edited by G.E. Glass. Ann
Arbor, Ann Arbor Science Publishers, pp. 73-95
- Buikema, A.L.Jr. and J. Cairns Jr. (eds), Aquatic invertebrate bioassays. ASTM
1980 Spec.Techn.Publ., (715):209 p.
- Burke, W.D. and D.E. Ferguson, A simplified flow-through apparatus for maintaining fixed
1968 concentrations of toxicants in water. Trans.Am.Fish.Soc., 97:498-500.
- Cairns, J.Jr. and K.L. Dickson (eds), Biological methods for the assessment of water
1973 quality. ASTM Spec.Tech.Publ., (528):262p.
- Commission européenne consultative pour les pêches dans les eaux intérieures, Groupe
1983 de travail sur les systèmes de tests de toxicité, Rapport révisé sur les
tests de toxicité sur les poissons. Doc.Tech.CECPI, (24) Rév.1:41 p.
- Duthie, J.R., The importance of sequential assessment in test programs for estimating
1977 hazard to aquatic life. In Aquatic toxicology and hazard assessment, edited
by F.L. Mayer and J.L. Hamelink. ASTM Spec.Tech.Publ., (634):17-35
- Eaton, J.G., P.R. Parrish and A.C. Hendricks, Aquatic toxicology. Proceedings of the
1980 Third annual Symposium on aquatic toxicology. ASTM Spec.Tech.Publ.,
(707):417 p.
- Galassi, S. and M. Vighi, Testing toxicity of volatile substances with algae.
1981 Chemosphere, 10(10):1123-6
- Great Britain, Standing Committee of Analysts, Methods for the examination of waters and
1981 associated materials. Acute toxicity testing with aquatic organisms. London,
HMSO, 68 p.
- Hoehn-Bentz, J, B. Kurelec and R.K. Zahn, Fast ephemeral DNA damage upon BaP injection.
1983 Sci.Total Environm., 32:13-27.
- Howard, A.G. and A.G. Nickless, Protein binding of cadmium, zinc and copper in
1975 environmentally insulted limpets Patella vulgata. J.Chromatogr., 104:457-9
- Kezic, N. et al., Activity of benzo(a)pyrene monooxygenase in fish from the Sava river,
1983 Yugoslavia: correlation with pollution. Sci.Total.Environ., 27:59-69.

- Kohn, K.W. et al. Fractionation of DNA from mammalian cells by alkaline elution.
1976 Biochemistry 15:4629-37
- Kurelec, B. et al., Benzo(a)pyrene monooxygenase induction in marine fish. Molecular
1977 response to oil pollution. Mar.Biol., 44:211-6
- _____, Sea water chlorination: creation of mutagenic byproducts.
1983 Rapp.P.-V.Réun.CIESM 28(7):135-6
- Laroche, G., R. Eisler and C.M. Tarzwell, Bioassay procedures for oil and oil dispersant
1970 toxicity evaluation. J.Water Pollut.Control Fed., 42:1982-9
- Litchfield J.T., A method for rapid graphic solution of time - per cent effect curves.
1949 J.Pharmacol.Exp.Ther. 97:399-408
- Litchfield, J.T. and F. Wilcoxon, A simplified method of evaluating dose-effect
1949 experiments. J.Pharmacol.Exp.Ther., 96:99-113
- Maki, A.W. and J.R. Duthie, Summary of proposed procedures for the evaluation
1978 of aquatic hazard. In Estimating the hazards of chemical substances to
aquatic life, edited by J. Cairns Jr., K.L. Dickson and A.W. Maki. ASTM
Spec.Tech.Publ. (657):153-63
- Marking, L.L. and R.A. Kimerle (eds), Aquatic toxicology. Proceedings of the Second
1979 annual Symposium on aquatic toxicology. ASTM Spec.Tech.Publ., (667):392 p.
- Mayer, F.L. and J.L. Hamelink (eds), Aquatic toxicology and hazard evaluation.
1977 Proceedings of the First annual Symposium on aquatic toxicology. ASTM
Spec.Tech.Publ., (634):315 p.
- McCarthy, L.T., I. Wilder and J.S. Dorrier, Standard dispersant effectiveness and
1973 toxicity tests. EPA Environ.Prot.Technol.Ser., (R2-73-201):37 p.
- McCarthy, L.T., G.P. Linblom and H.F. Walter (eds), Chemical dispersants for the
1978 control of oil spills. ASTM Spec.Tech.Publ., (659):328 p.
- McLean, M.P., R.E. McNicol and E. Sherer, Bibliography of toxicity test methods for the
1980 aquatic environment. Can.Spec.Publ.Fish.Aquat.Sci., (50):29 p.
- Moldan, A.G.S. and P. Chapman, Toxicity testing of oil spill dispersants in South Africa.
1983 S.Afr.J.Mar.Sci., 1:145-52
- Mount, D.I. and W.A. Brungs, A simplified dosing apparatus for fish toxicity studies.
1967 Water Res., 1:21-9
- Nebert, D.W. and H.V. Gelboin, Substrate inducible microsomal aryl hydroxylase in
1968 mammalian culture. 1. Assay and properties of induced enzyme. J.Biol.Chem.,
243:6242-9
- OCDE, Guidelines for the testing of chemicals. Paris, Organisation for Economic
1981 Co-operation and Development.
- Olafson, R.W., R.G. Sion and K.G. Boto, Isolation and chemical characterisation of the
1979 heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates.
Comp.Biochem.Physiol. (B Comp.Biochem.), 62:407-16
- Payne, J.F. and W.R. Penrose, Induction of aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase
1975 in fish by petroleum. Bull.Environm.Contam.Toxicol., 14:112-6
- Persoone G., E. Jaspers and C. Claus (eds.), Ecotoxicological testing for the marine
1984 environment. Vol. 1. Reviews, syntheses of round tables. Ghent, Belgium,
State University of Ghent, and Institute for Marine Scientific Research,
Bredene, 772 p.

- _____, Ecotoxicological testing for the marine environment. Vol. 2. Experience
1984a papers. Ghent, Belgium, State University of Ghent and Institute for Marine
Scientific Research, Bredene, 580 p.
- Roch, M. et al., Hepatic metallothionein in rainbow trout (Salmo gairdneri) as an
1982 indicator of metal pollution in the Campbell river system.
Can.J.Fish.Aquat.Sci., 39(12):1596-601
- Roch, M. and J.M. McCarter, Hepatic metallothionein production and resistance to heavy
1984 metals by rainbow trout (Salmo gairdneri) held in a series of contaminated
lakes. Comp. Biochem.Physiol. (C Comp.Pharmacol.), 77:77-82
- Roesijadi, G., The significance of low molecular weight, metallothionein-like proteins
1980 in marine invertebrates: current status. Mar.Environ.Res., 4:167-79.
- Smith, R.L. and B.R. Hargreaves, A simple toxicity apparatus for continuous-flow with
1983 smaller volumes: demonstration with mysids and naphthalene.
Bull.Environ.Contam. Toxicol., 30:406-12
- Solon, J.M., J.L. Lincer and J.H. Nair, A continuous flow automatic device for
1968 short-term toxicity experiments. Trans.Am.Fish.Soc., 97:501-2
- Sprague, J.B., Measurement of pollutant toxicity to fish. 1. Bioassay methods for acute
1969 toxicity. Water Res., 3:793-821
- _____, Measurement of pollutant toxicity to fish. 2. Utilizing and applying
1970 bioassay results. Water Res., 4:3-32
- _____, The ABC's of pollutant bioassay using fish. In Biological methods for the
1973 assessment of water quality, edited by J. Cairns Jr. and K.L. Dickson ASTM
Spec.Tech.Publ., (528):6-30
- Stark, G.T.C., An automated dosing apparatus made with standard laboratory ware.
1967 Lab.Pract., 16:594-5
- Stephan, C.E., Methods for calculating an LC50. In Aquatic toxicology and hazard
1977 evaluation. Proceedings of the First annual Symposium on aquatic toxicology,
edited by F.L. Mayer and J.L. Hamelink. ASTM Spec.Tech.Publ., (634):65-84
- Stora, G., Contribution à l'étude de la notion de concentration létale limite moyenne
1972 (CL50) appliquée à des invertébrés marins. 1. Etude méthodologique. Tethys,
4:597-644
- _____, Contribution à l'étude de la notion de concentration létale limite moyenne.
1975 2. CL50 et détermination de la toxicité de produits polluants.
Rev.Int.Océanogr.Méd., 37/38:97-123
- Thompson, G.B. and R.S. Wu, Toxicity testing of oil slick dispersants in Hong Kong.
1981 Mar.Poll.Bull., 12:233-7
- Toody, T.E., A scheme for the evaluation of hazards to non-target aquatic organisms from
1978 the use of chemicals. Proc.Eur.Weed Res.Soc.Symp., 5:287-94
- U.S. Environmental Protection Agency, Marine algal assay procedure. Bottle test.
1974 Corvallis, Oregon, National Environment Research Council.
- Ward, G.S. and P.R. Parrish, Manuel des méthodes de recherche sur l'environnement
1983 aquatique. Sixième partie. Tests de toxicité. FAO Doc.Tech. Pêches, (185):24
p.
- Wuerthele, M. et al., Descriptions of a continuous-flow bioassay laboratory trailer and
1973 the Michigan diluter. In Bioassay techniques and environmental chemistry,
edited by G.E. Glass. Ann Arbor, Ann Arbor Science Publishers, pp.345-56

Zahn, R.K. et al., Assessing consequences of marine pollution by hydrocarbons using
1981 sponges as model organisms. Sci.Total Environ., 20:147-69

_____, The effect of benzo(a)pyrene on sponges as model organisms in marine
1982 pollution. Chem.Biol.Interact., 39:205-20

_____, DNA damage by PAH and repair in a marine sponge. Sci.Total Environ., 26:137-56
1983

ANNEXE I

SUGGESTIONS METHODOLOGIQUES ET EXEMPLES D'EPREUVES DE TOXICITE AIGUE
A L'EGARD DES ORGANISMES MARINS UTILISABLES
DANS UN BUT DE TRIAGE RAPIDE

N.B. Les suggestions ci-dessous ne sont valables que si les principes généraux indiqués à la section 2 du présent rapport sont également observés.

Organismes

Les épreuves de toxicité devraient être effectuées sur des organismes représentatifs de trois niveaux trophiques différents: producteurs primaires, consommateurs primaires et consommateurs secondaires (principalement les poissons).

Les critères ci-après sont importants pour le choix des organismes à utiliser pour les épreuves:

- ils doivent être faciles à se procurer tout au long de l'année;
- ils doivent être faciles à héberger au laboratoire dans des conditions contrôlées;
- ils doivent être facile à identifier taxonomiquement (espèces);
- leur biologie doit être bien connue, autrement dit il faut être suffisamment renseigné sur leur physiologie normale, leur écologie, leurs antécédents etc.;
- il est souhaitable d'utiliser du matériel génétiquement homogène;
- on utilisera si possible des organismes se trouvant à des stades précoces et vulnérables de leur cycle biologique;
- on utilisera si possible des organismes "cosmopolites", autrement dit des espèces abondamment représentées dans toute la méditerranée.

a) Producteurs primaires

Plusieurs algues planctoniques sont actuellement utilisées pour les épreuves dans des conditions normalisées. Par exemple, il est facile de se procurer des cultures pures de la chlorophycée Dunaliella tertiolecta et des diatomées Phaeodactylum tricorutum et Skeletonema costatum auprès des instituts de botanique et de biologie marine. Une méthode simple de culture est décrite dans "Marine Algal Assay Procedure" (US EPA, 1974).

Les modes opératoires adoptés pour les épreuves de toxicité pourraient être analogues à ceux qui ont été proposés par l'OCDE pour les algues d'eau douce dans ses directives pour le testage des produits chimiques (Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, 1981).

b) Consommateurs primaires

Divers invertébrés marins peuvent être proposés, par exemple:

- Artemia salina;
- les copépodes planctoniques ou autres crustacés phytophages;
- les mollusques;
- les oursins.

Les méthodes de culture d'Artemia et de testage de la toxicité à son égard sont bien connues. Pour d'autres organismes animaux, il est nécessaire de déterminer clairement la sensibilité et les réactions.

Il importe d'utiliser des échantillons homogènes (stade de développement et catégorie de taille).

Si l'on utilise des organismes animaux provenant du milieu naturel, ils doivent être prélevés dans des zones non pollués.

c) Poissons

Pour les épreuves de toxicité, on utilise habituellement de jeunes spécimens de mulot (genre Mugil ou Liza), de 6 à 8 cm de long. D'autres espèces peuvent être employées si elles possèdent les caractéristiques généralement souhaitables pour les organismes de laboratoire. Des espèces commerciales provenant d'établissements d'aquaculture (par exemple Dicentrarchus labrax) peuvent également être très utiles.

Conditions expérimentales

L'eau de mer synthétique et l'eau de mer naturelle prélevée dans des zones non polluées sont toutes deux acceptables pour les épreuves de toxicité. Il peut-être nécessaire de filtrer l'eau de mer naturelle pour éviter la présence de matières réduites en particules et de populations planctoniques naturelles, en particulier pour l'expérimentation sur des algues. Lorsque l'on utilise de l'eau de mer synthétique, il faut prendre soin de l'équilibrer convenablement avec de l'air avant utilisation et d'éliminer par filtration tout précipité qui aurait pu se former. Le rapport entre quantité d'eau et poids des organismes introduits ne devrait pas dépasser 0,5 g d'organisme (poids frais) par litre d'eau.

La salinité doit être contrôlée et consignée; elle doit normalement se situer aux alentours des niveaux typiques pour la Méditerranée (38 ‰ S).

La température doit être contrôlée et consignée pendant la durée de l'expérience et elle ne devrait pas varier de plus de $\pm 1^{\circ}\text{C}$. Les conditions de température doivent être clairement précisées dans la présentation des résultats.

Selon le type d'épreuve et d'organisme on pourra opérer sous éclairage permanent, avec alternance de lumière et d'obscurité ou dans l'obscurité permanente. Les conditions d'éclairage doivent être consignées.

La teneur en oxygène doit être mesurée chaque jour; elle doit s'établir à au moins 70 pour cent de la saturation tout au long de l'expérience.

Si l'on utilise de l'eau de mer artificielle, le pH doit être contrôlé et maintenu à 8,2 ($\pm 0,2$). En général, il sera possible de l'ajuster par aération.

La concentration du produit chimique testé doit être d'au moins 80 pour cent de la concentration initiale tout au long de l'expérience. Il est préférable de la mesurer régulièrement au cours de l'expérience.

Il convient d'adopter des dispositifs permettant de maintenir cette concentration à plus de 80 pour cent (écoulement continu ou semi-continu si nécessaire).

Les organismes doivent être acclimatés à l'eau utilisée pour les épreuves pendant une période appropriée qui dépend du type d'organisme (par exemple deux jours pour les crustacés planctoniques, au moins cinq jours pour les poissons).

Il convient de consigner le taux de mortalité au cours de la période d'acclimatation.

Normalement, les organismes animaux ne doivent pas être nourris pendant les 24 heures précédant les expériences, ni pendant les expériences elles-mêmes.

ANNEXE II

LISTE DES PARTICIPANTS

P.D. Abel,
Centre de la Recherche marine
Aghios Kosmas, Hellinikon,
16604 Athènes,
GRECE.

Tel.: 9829237
Telex: 224135 IOAKE

N. Ajdacic,
"Boris Kidric" Institute of Nuclear
Sciences-Vinca,
Radiation Protection Department,
P.O. Box 522, Vinca,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 4440871, 458222
Telex: 11563 VINCA YU

A. Balci,
Institute of Marine Science and
Technology,
Dokuz Eylul University,
SSK Tesisleri Blok D Kat. 2,
Konak-Izmir,
TURQUIE

Tel.: 254328, 254958
Telex: 52889 DBTE TR

M. Belkhir,
Laboratoire d'océanographie et de
la pollution marine
INSTOP/Salambo,
2060 La Goulette,
TUNISIE.

Tel.: 277187

J. Castritsi-Catharios,
Laboratoire de zoologie,
Université d'Athènes,
Panepistimiopolis,
15771 Athènes
GRECE.

Tel.: 7243244

A.V. Catsiki,
Centre de la Recherche marine
Aghios Kosmas, Hellinikon,
16604 Athènes,
GRECE.

Tel.: 9829237
Telex: 224135 IOAKE

L. Dalla Venezia,
Institute of Marine Biology,
Riva 7 Martiri 1364/A,
30122 Venice,
ITALIE.

Tel.: 707622

O. A.-M. El-Rayis,
Oceanography Department,
Faculty of Science,
Alexandria University,
Alexandrie,
EGYPTE.

Tel.: 22919
Telex: 54467 UNIVY UN

A.H. El-Sebae,
Division of Pesticide Chemistry,
Faculty of Agriculture,
Alexandria University,
Alexandrie,
EGYPTE.

Tel.: 71862
Telex: 54467 UNIVY UN

D. Fuks,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

M.J. Gasic,
Institute of Chemistry,
Faculty of Science,
University of Belgrade,
Studentski Trg. 16, P.O.Box 550,
11001 Belgrade,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 183460

I. Ivancic,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

O. Jelisavcic,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

M. Krajnovic-Ozretic,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

C. Lucu,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

D. Martic,
"Boris Kidric" Institute of Nuclear
Sciences-Vinca,
Radiation Protection Department,
P.O. Box 522,
11000 Belgrade (Vinca),
YUGOSLAVIE.

Tel. 458222, 4440871
Telex: 11563 VINCA YU

D. Martincic,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
Bijenicka 54, P.O.Box 1016,
41001 Zagreb,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 435111
Telex: 11393 IRB YU

M. Moraitou-Apostolopoulou,
Laboratoire de zoologie
Université d'Athènes,
Panepistimiopolis,
15771 Athènes,
GRECE.

Tel.: 7243244

M. Najdek,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

B. Ozretic,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

E. Papathanassiou,
Centre de la Recherche marine
Aghios Kosmas, Hellinikon,
16604 Athènes,
GRECE.

Tel.: 9829237
Telex: 224135 IOAKE

J. Pavicic,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

R. Precali,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

H.H. Saleh,
Institute of Oceanography and
Fisheries,
Kayet Bay,
Alexandrie,
EGYPTE.

Tel.: 801553, 801499

M. Skreblin,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

M. Tudor,
Institute of Oceanography and
Fisheries,
Mose Rijade 63, P.O. Box 114,
58000 Split,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 46688

M. Tusek-Znidaric,
Institute "Jozef Stefan",
Jamova 39,
61111 Ljubljana,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 313022
Telex: 31296 YU JOSTIN

N. Ukmar,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

M. Unsal,
Middle East Technical University,
Institute of Marine Sciences,
P.K. 28,
Erdemli, Icel,
TURQUIE.

Tel.: 1842
Telex: 67208 DMS TR

M. Vighi,
Institute of Entomology,
Faculty of Agriculture,
University of Milan,
Via Celoria 2,
20133 Milan,
ITALIE.

Tel.: 2363439

I. Vukadin,
Institute of Oceanography and
Fisheries,
Mose Rijade 63, P.O. Box 114,
58000 Split,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 46688

G. Zahn,
Commission Molecular Biology,
Academy Science and Literature,
D-65 Mainz,
ALLEMAGNE.

Tel.: 22984

R.K. Zahn,
Institute of Physiological
Chemistry,
Johannes Gutenberg University,
D-65 Mainz,
ALLEMAGNE.

Tel.: 395911

N. Zavodnik,
Center for Marine Research,
"Ruder Boskovic" Institute,
52210 Rovinj,
YUGOSLAVIE.

Tel.: 811544, 811567

ORGANISATION DES NATIONS UNIES POUR
L'ALIMENTATION ET L'AGRICULTURE

G.P. Gabrielides (Secrétaire technique),
Fonctionnaire principal des pêches
(Pollution marine),
Bureau du Projet FAO,
Vassileos Konstantinou 48,
11635 Athènes,
GRECE.

Tel.: 7236586, 7244536
Telex: 222611 MEDU GR

ANNEXE III

LISTE DES COMMUNICATIONS PRESENTEES

1. Abel P.D. and E. Papathanassiou
"Effects of toxic pollutants on the filtration rate of a Mediterranean bivalve mollusc."
2. Balci A.
"Toxicity and bioaccumulation of PCBs in marine organisms."
3. Belkhir M.
"Oil dispersant toxicity to fish and molluscs."
4. Calamari D. and M. Vighi
"The role of Log P in predicting bioconcentration and toxic potential of organic chemicals for aquatic organisms."
5. Castritsi-Catharios J. and V. Kiortsis
"Acute toxicity of an oil dispersant to Artemia Salina."
6. Catsiki A.V.
"The variability in levels of copper and zinc in the tissues of selected species from the Berre lagoon (France)."
7. Dalla Venezia L. and V.U. Fossato
"Effects of PCBs in Leander adspersus: toxicity, bioaccumulation, oxygen consumption, osmoregulation."
8. El-Rayis O. A.-M. and A.A. Ezzat
"Bioaccumulation of some heavy metals in coastal marine animals in the vicinity of Alexandria. I: Bio-assay."
9. El-Rayis O. A.-M. and A.A. Ezzat
"Bioaccumulation of some heavy metals in coastal marine animals in vicinity of Alexandria. II: Surveying."
10. El-Rayis O. A.-M.
"Bioaccumulation of cadmium in plankton, bivalves, crustacea and in different organs of six fish from Mex Bay, west of Alexandria."
11. El-Sebae A.H., M.A. El-Amayem, I. Sharaf and M. Massod
"Factors affecting acute and chronic toxicity of chlorinated pesticides and their biomagnification in Alexandria region."

12. Krajnovic-Ozretic M. and B. Ozretic
"Toxicity testing in the marine environment."
13. Martic M., N. Ajdacic, J. Stjepcevic and M.J. Gasic
"Investigation of trace element distribution in the aquatic system of the Boka Kotorska Bay."
14. Moraitou-Apostolopoulou M. and G. Verriopoulos
"Lethal and sublethal effects of some contaminants (heavy metals, oils, dispersants) to marine planktonic animals."
15. Obersnel V. and C. Lucu
"Effects of Cadmium on spermatozoa and fertilized eggs of sea urchins Paracentrotus lividus Lam."
16. Ozretic B. and M. Krajnovic-Ozretic
"Sea urchin gametes and their developing embryos in marine toxicology studies."
17. Papathanassiou E.
"Effects of cadmium ions in the process of Oogenesis of the common prawn Palaemon serratus (Pennant)."
18. Pavicic J., M. Skreblin, I. Kregar, M. Tusek-Znidaric and P. Stegnar
"Determination of Cd-binding proteins similar to metallothionein in the digestive gland of Mytilus galloprovincialis with regard to a preliminary treatment of the sample."
19. Saleh H.H. and A. Hamza
"Study on the health condition of Tilapia zillii Gerv. surviving in the polluted water of Lake Mariut, Alexandria (Egypt)."
20. Tudor M. and I. Katavic
"Acute toxicity of an oil dispersant to the developmental stages of the sea bass Dicentrarchus labrax."
21. Tusek-Znidaric M., M. Skreblin, J. Pavicic, I. Kregar and P. Stegnar
"Mercury-binding proteins of the gills and digestive gland of Mytilus galloprovincialis."
22. Unsal M.
"Uptake, accumulation and toxicity of vanadium and tin in marine organisms."
23. Zahn R.K. and B. Kurelec
"Genotoxic risk assessment."

