

## L'EXPÉRIMENTATION TOXICOLOGIQUE SUR LE POISSON

Par P. LAURENT

Assistant à la Station Centrale d'Hydrobiologie appliquée.

---

Les résultats des essais toxicologiques sur les poissons présentent souvent une très grande dispersion et les chiffres trouvés varient parfois dans des proportions énormes d'un expérimentateur à l'autre. Cette hétérogénéité peut s'expliquer surtout par la mise en œuvre de conditions opératoires différentes ne permettant aucune comparaison entre les divers essais. Ajoutons d'ailleurs que les auteurs n'ont parfois pas précisé ou contrôlé de façon suffisante les constantes de leurs expériences, ce qui enlève beaucoup à la valeur des résultats.

Une standardisation s'avérait nécessaire et avait été préconisée par les spécialistes sans que des chiffres précis aient toutefois été avancés. Cette lacune a désormais été comblée par MM. WUHRMANN, WOKER, VIVIER, LECLERC et DEVLAMINCK qui, réunis à Zurich en Décembre 1952, ont proposé des conditions de travail précises et uniformes pour les essais de toxicologie sur les poissons.

Dans le présent travail, nous avons cherché le moyen expérimental de réaliser les données de la convention de Zurich et avons étudié, à titre d'illustration, l'influence de l'acide sulfurique sur le poisson.

### I. — Réalisation expérimentale des conditions opératoires préconisées à Zurich.

#### 1. — APPAREILLAGE UTILISÉ (FIG. 1).

Il nous a semblé préférable d'opérer nos essais en eau renouvelée : d'une part, cette méthode élimine toute interférence due à l'accumulation du gaz carbonique en aquarium stagnant pendant des expériences de durée assez longue ; d'autre part, on peut modifier à volonté la composition de l'eau du tonnelet sans perturber le liquide de l'erlenmeyer et sans déranger les poissons en expérience. L'inconvénient majeur de ce procédé est d'exiger la préparation de gros volumes de solution toxique. Cependant, en assurant l'écoulement par un tube effilé, le débit devient

assez modéré pour que 25 litres permettent l'étude du comportement de 10 poissons.

Le dispositif d'écoulement de l'erlenmeyer supprime pratiquement tout contact entre le liquide toxique où évolue le poisson et l'atmosphère. Il suffit dès lors de maintenir au taux voulu l'oxygène dissous dans l'eau du tonnelet, pour assurer une teneur correspondante et invariable dans le récipient d'expérience.

Pour les essais menés par groupe de 10 poissons, la difficulté à vaincre était le repérage des sujets. La répartition en ballons de 3 litres de deux groupes de 5 poissons et le marquage par échancrure de la nageoire caudale, ont permis une observation précise de chaque animal.

## 2. — CONDITIONNEMENT ET COMPOSITION CHIMIQUE DE L'EAU.

*Chauffage.* — Les essais ont été menés à 20° C. Il nous était plus facile de chauffer que de refroidir la solution à 7° C. Une résistance logée dans une gaine en verre pyrex remplie de sable, assurait le chauffage du tonnelet. Une simple canne chauffante d'aquarium maintenait le bain thermostatique des récipients d'essai à la température choisie. Le réglage automatique à 2/10° de degré près était assuré par thermomètre à contacts ; enfin, un système d'agitation lente donnait au liquide du tonnelet l'homogénéité thermique indispensable.

L'utilisation d'un bain thermostatique autour du tonnelet eût été préférable au chauffage direct, mais le volume des récipients à utiliser serait alors devenu trop important.

*Oxygène.* — Le conditionnement de l'eau en oxygène dissous s'est avéré le problème le plus ardu à résoudre. Des tentatives de dilution par de l'eau bouillie refroidie à l'abri de l'air n'ont pas donné de résultat satisfaisant : les volumes d'eau dégazée à utiliser étaient trop importants ; l'ébullition entraînait une précipitation des bicarbonates à l'état de carbonates et modifiait ainsi les caractéristiques chimiques primitives de l'eau d'expérience.

Le barbotage d'azote dans le tonnelet à travers une plaque de verre fritté s'est avéré, par contre, le procédé le plus commode et le plus souple pour chasser l'excès d'oxygène dissous et amener l'eau à 70 % de la saturation.

Restait à trouver un contrôle analytique rapide et rigoureux pour s'assurer de cette teneur à tout instant, suivre son évolution et la ramener au taux désiré. La méthode polarographique semblait dans ce cas la plus intéressante. M. le Conservateur VIVIER m'ayant donné la possibilité de doter mon laboratoire d'un polarographe, j'ai pu mettre en œuvre cette technique. Je rappellerai très sommairement le principe de la méthode polarographique et indiquerai la marche d'un dosage d'oxygène dissous.

Le polarographe est un appareil qui permet le tracé de la courbe courant-tension d'un récipient d'électrolyse qui contient la substance

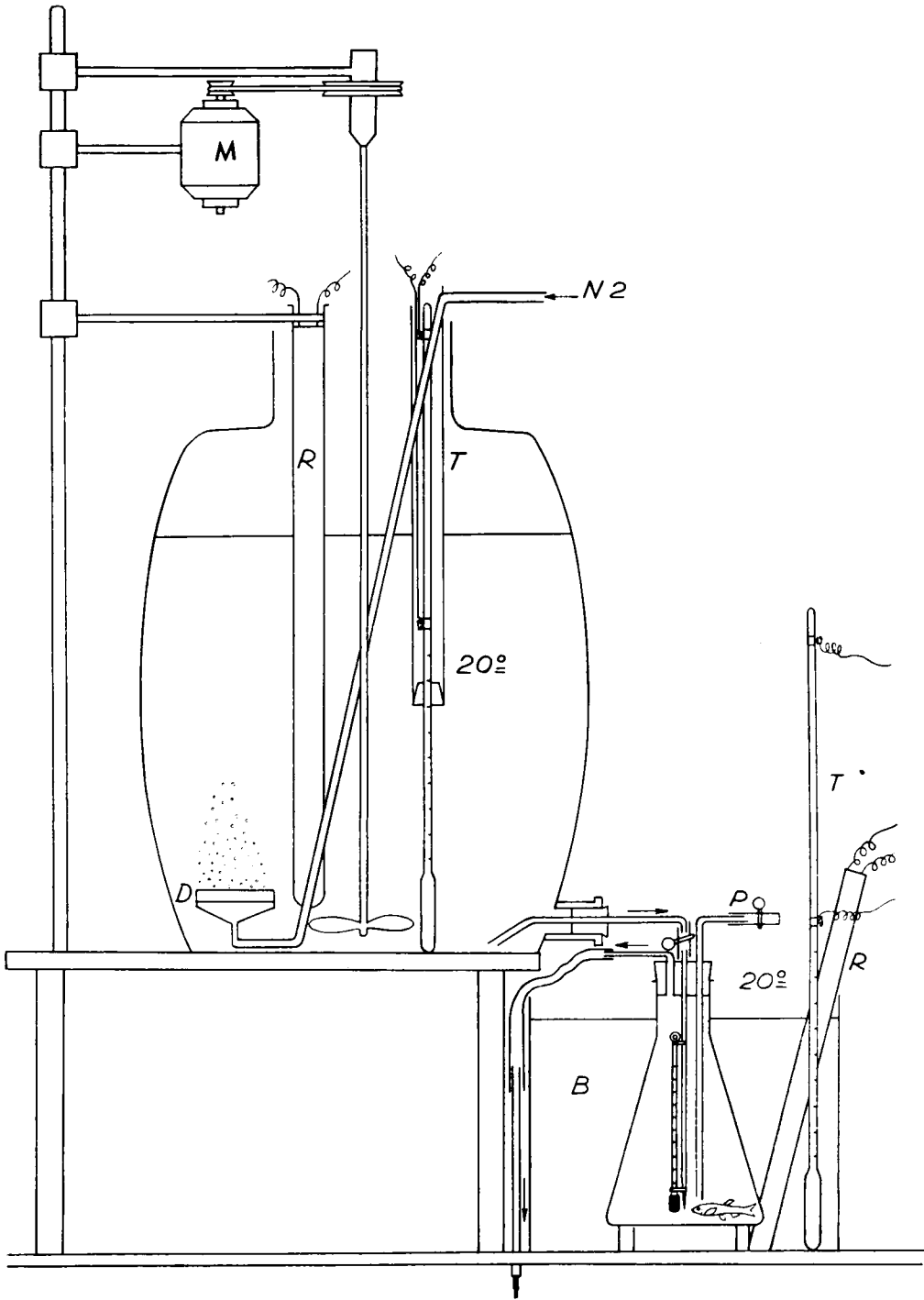


FIG. 1. — Appareillage pour l'expérimentation toxicologique.

- B. Bain thermostatique.
- M. Moteur.
- P. Tuyau muni d'une pince de Mohr pour prise d'échantillons dans l'Erlenmeyer.
- R. Résistances.
- T. Thermomètre à contacts.

à analyser. Les bornes de la cellule d'électrolyse sont constituées, d'une part, par une électrode essentiellement polarisable formée d'un flot de mercure qui s'écoule goutte à goutte par un capillaire, à une cadence très régulière et sous un débit donné; l'autre électrode, d'autre part, impolarisable est une électrode au calomel dont le potentiel sert de référence. On modifie la tension appliquée aux bornes de la cellule et les modifications d'intensité sont transmises par un galvanomètre et notées. La courbe obtenue ou polarogramme présente, pour un potentiel donné, des paliers et des accroissements ou vagues. La hauteur d'un palier dans des conditions expérimentales définies est proportionnelle à la concentration de l'élément à doser. Dans le cas de l'oxygène, la courbe présente deux paliers correspondant à une réduction en deux étapes : d'abord,

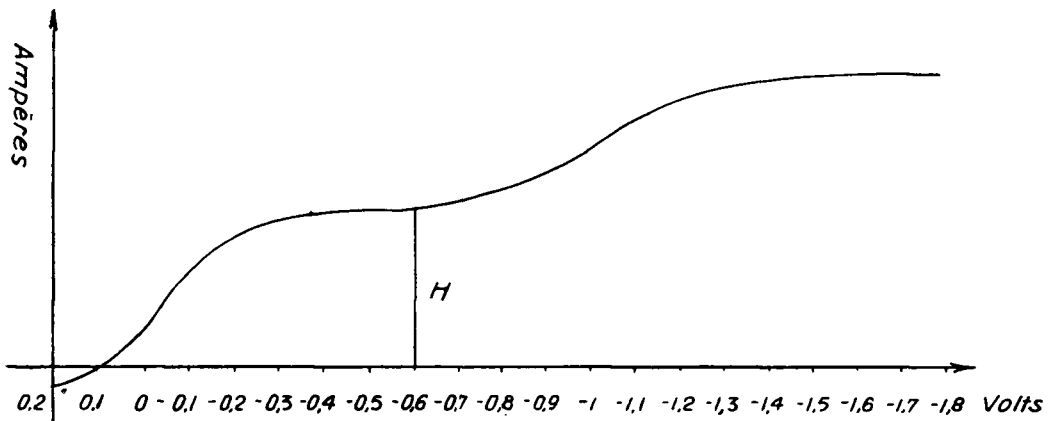


FIG. 2. — Polarogramme d'un dosage d'O<sub>2</sub>

formation d'eau oxygénée (H<sub>2</sub> O<sub>2</sub>), puis décomposition et réduction de celle-ci (fig. 2). Le premier palier présente un large maxima gênant le dosage, mais qu'on supprime totalement par addition d'un colloïde.

Une mesure est très vite effectuée et se déroule comme suit : on place 2 cm<sup>3</sup> de solution fraîche de gélatine à 0 gr. 2% dans la cellule, on chasse l'air de celle-ci par un courant d'hydrogène que l'on maintient en surface pendant le dosage. Puis, on introduit, sans bulle, une quantité connue d'eau à analyser. Il ne reste plus qu'à mesurer la hauteur du palier à — 0,6 volt pour avoir, par comparaison avec un graphique étalon (fig. 3), le taux d'oxygène. Ce graphique est établi au préalable, la méthode de Winkler de dosage de l'oxygène servant de référence; il reste valable si on respecte les mêmes conditions expérimentales.

La méthode polarographique permettrait le dosage continu de l'oxygène dissous, mais l'appareillage serait plus complexe et comme, pratiquement, les échanges sont lents entre l'eau et l'atmosphère, ce perfectionnement nous a semblé inutile pour l'instant.

On pourrait, d'autre part, assurer plus de constance au taux d'oxygène dissous en dirigeant un courant d'azote à la surface de l'eau du

tonnelet, mais ce procédé exigerait de grosses quantités de gaz et serait onéreux. Nous avons pu nous maintenir dans les limites prévues à Zurich sans avoir recours à cette amélioration.

*Composition chimique de l'eau.* — Les expériences ont été faites avec une eau d'un T. A. C. de 15° Fr. L'eau des sources du Paraclat a été

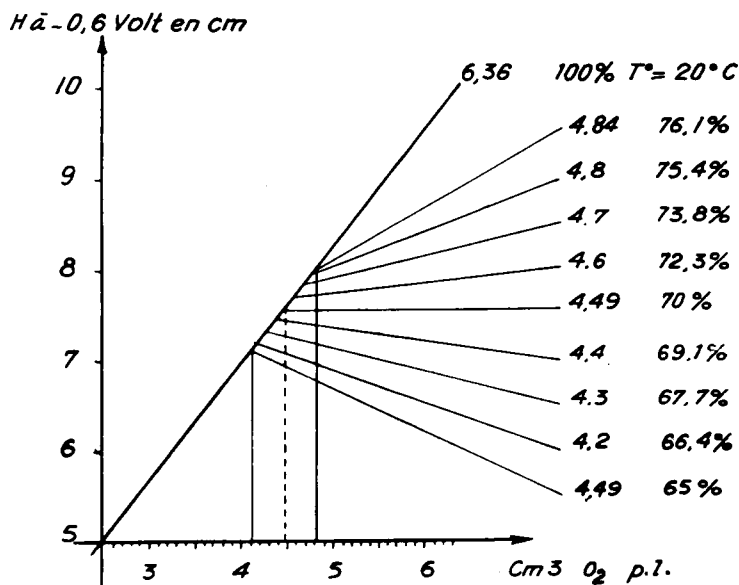


FIG. 3. — Diagramme-étalon du dosage d' $O_2$

amenée à ce titre par addition d'eau distillée ; les caractéristiques chimiques de l'eau d'expérience obtenue sont indiquées ci-après :

T. A. = 0° Fr.

T. A. C. = 15° Fr.

Calcium en Ca = 63 mg pl.

Magnésium en Mg = 5 mg 7 pl.

Chlorures en  $Cl_2$  = 9 mg 1 pl.

Sulfates en  $SO_4$  = 5 mg 2 pl.

Nitrates en  $NO_3$  = 16 mg 9 pl.

Pouvoir réducteur ( $O_2$  emprunté au  $MnO_4K$  — en milieu  $CO_3HNa$  — 10' à ébullition) 1 mg 02 pl.

Nitrites,  $NH_3$ ,  $SH_2$  : néant.

Il eut été difficile de travailler avec une eau à 1°25 Fr, les volumes d'eau distillée à employer devenant alors trop importants.

pH. Il a été mesuré au pHmètre avec une électrode de verre.

### 3. — POISSONS UTILISÉS.

Les vairons mis en expérience avaient été pêchés dans une rivière voisine : la Celle. Ces poissons, après stockage à une température voisine de 20°, n'ont montré aucun signe de maladie ou de déficience.

Après expérience, chaque vairon a été mesuré (du bout du museau à l'extrémité de la nageoire caudale) puis pesé.

Les réactions des sujets ont été notées selon les symboles de SCHEURING (1), aussi bien pour les intoxications individuelles que collectives : la détermination exacte du temps de première manifestation exige, en effet, une surveillance constante, et le fait de noter le comportement des poissons entre dans le travail d'observation.

La mise en observation de 48 heures prévue à Zurich pour les poissons ayant supporté une dose de toxique voisine de la dilution limite, a été observée au cours de nos essais, mais le taux de 70% de la saturation en oxygène dissous n'a pas été maintenu. Il eut fallu, en effet, surveiller de façon ininterrompue pendant 48 heures la teneur en oxygène, ce qui était impossible. Les poissons mis en observation ont été simplement placés dans de l'eau à 15° Fr, à la température de 20° C, sous une faible épaisseur d'eau et une surface étendue, de façon à obtenir un taux d'oxygène voisin de la saturation.

## II. — Application de la méthode précédemment exposée. Étude de la toxicité de l'acide sulfurique sur les Poissons.

### 1. — SOLUTIONS TOXIQUES.

Les différentes doses toxiques ont été établies à l'aide d'une solution à 100 gr. par litre d'acide sulfurique R.P. pur pour analyse.

La teneur de l'eau en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  total a été contrôlée par la méthode pondérale; la quantité de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  libre restant était connue du fait que l'eau avec un T.A.C. de 15° Fr avait un pouvoir de neutralisation de 147 mg de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  par litre (2).

---

(1) Les symboles de SCHEURING sont des conventions qui permettent de traduire par un signe l'attitude d'un poisson intoxiqué. Voici la signification des signes utilisés dans nos essais.

Les cercles traduisent le mouvement : ○ = calme ; ⊙ = agité.

Les flèches, la position du corps : ↑ normale ; ↗ sur le côté ; → sur le flanc ; ↓ sur le dos.

Les signes ⊕ = moribond et ✕ = mort.

(2) Le T. A. (titre alcalimétrique) et le T. A. C. (titre alcalimétrique complet) ne sont que des modes d'expression : lorsqu'on titre une eau par un acide en présence d'un indicateur coloré (Hélianthine-phtaléine) on dose globalement les bicarbonates, carbonates et hydrates présents dans cette eau ; exprimer alors le résultat

SO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> 169 mg. p.l.

EAU PURE TAC = 15.0 Fr TEMPERATURE 20°C TEMPS MOYEN DE MORT APPARENTE 3<sup>h</sup> 56' 4"

pH = 7.2

POISSON	REACTIONS															OBSERVATIONS			
	5'	10'	15'	20'	30'	45'	1 <sup>h</sup>	1 <sup>h</sup> 1/2	2 <sup>h</sup>	2 <sup>h</sup> 1/2	3 <sup>h</sup>	3 <sup>h</sup> 1/2	4 <sup>h</sup>	4 <sup>h</sup> 1/2	5 <sup>h</sup>		6 <sup>h</sup>	1 <sup>re</sup> manifestation	mort apparente
BALLON A																			
long. poids	70	1.930	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	+	5 <sup>M</sup> 49'
	53	0.920	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	+	4 <sup>M</sup> 42'
	57	1.150	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	+	4 <sup>M</sup> 26' 30"
	54	1	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	+	4 <sup>M</sup> 14'
	50	0.800	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	+	3 <sup>M</sup> 18'
		avant																	
		exo.																	
		3.6																	
		pH																	3.65
		O <sub>2</sub>																	75%
BALLON B																			
long. poids	63	1.630	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	2 <sup>M</sup> 26'
	55	1.170	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	3 <sup>M</sup> 31'
	50	0.600	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	4 <sup>M</sup> 40'
	53	0.770	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	3 <sup>M</sup> 21'
	50	0.670	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	⊙	2 <sup>M</sup> 57'
		avant																	
		exo.																	
		3.6																	
		pH																	3.65
		O <sub>2</sub>																	75%

Fig. 4. — Notation des réactions.

Les longueurs des poissons sont exprimées en millimètres et leur poids en grammes. Certains poissons présentent des phases d'agitation avant le temps de première manifestation et il semble qu'il y ait alors contradiction dans la notation. En fait, ces phases correspondent à ce que WUHRMANN désigne sous le nom de « temps d'apparition » (première réaction nette à l'action du toxique) ; le temps de manifestation, lui, est différent : c'est le moment où les animaux ne sont plus capables de coordonner leurs mouvements. Dans le cas de l'acide sulfurique, cette manifestation ne s'accompagne pas nécessairement d'un basculement du poisson sur le côté, d'où la difficulté de noter ce temps avec précision.

Des expériences ont été commencées avec la dose de 250 mg de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  par litre, pour peu à peu être réduites jusqu'à atteindre la dilution limite.

## 2. — UTILISATION DES POISSONS.

Chaque dose toxique a donné lieu à un essai sur 10 vairons au moins, soit individuellement pour les doses fortes où les réactions se succèdent rapidement et rendent malaisée l'observation simultanée de plusieurs sujets, soit par groupe de 10 pour les doses plus voisines de la dilution limite. Le comportement de chaque poisson a été rassemblé en un tableau pour une teneur donnée de toxique (fig. 4).

La détermination du temps de première manifestation a été faite dans la mesure du possible, mais, dans le cas de l'acide sulfurique, cette réaction nous a semblé délicate à observer, le poisson ne manifestant pas toujours son intoxication par un basculement sur le flanc, mais par des symptômes bien moins évidents tel un engourdissement progressif sans perte d'équilibre.

Par contre, le temps de mort apparente a pu être déterminé avec beaucoup plus de précision sur le critère de la cessation des mouvements du corps et des opercules.

## 3. — ÉLABORATION GRAPHIQUE.

Nous avons retenu pour l'établissement de notre courbe de toxicité le temps de mort apparente des sujets. Les résultats de chacun de nos tableaux nous ont permis de calculer une moyenne de ce temps de mort apparente pour une dose donnée de toxique. Les variations de ces deux grandeurs nous ont donné le graphique représenté par la fig. 5.

## 4. — CONCLUSIONS SUR LA TOXICITÉ DE $\text{SO}_4\text{H}_2$ .

La courbe de toxicité affecte une forme hyperbolique régulière, caractéristique; l'asymptote à une parallèle aux ordonnées nous donne la valeur de la dose minima mortelle, soit : 167 mg par litre.

La dilution limite établie expérimentalement est très voisine : 165 mg par litre.

Si on se souvient que l'eau avait un pouvoir de neutralisation équivalent à 147 mg de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  par litre, on voit de suite que la *dose minima mortelle* correspond à 20 mg de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  libre par litre et la *dilution* limite à 18 mg de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  libre par litre.

---

en Ca 0, par exemple, ne correspond à rien. On ne peut chiffrer sa mesure qu'en degrés. On a pris comme base une grandeur équivalente au degré français soit 1 : 10.000<sup>ème</sup> de molécule par litre de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ ,  $(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Ca}$ ,  $\text{CO}_3\text{Mg}$ ,  $(\text{CO}_3\text{H})_2\text{Mg}$ . Pour un T. A. (dosage en présence de phtaléine) ou un T. A. C. (virage en présence d'Hélianthine) de 1° Fr, il faut  $0,5 \text{ cm}^3$  de  $\text{SO}_4\text{H}_2 \frac{\text{N}}{25}$  pour une prise de 100  $\text{cm}^3$ .



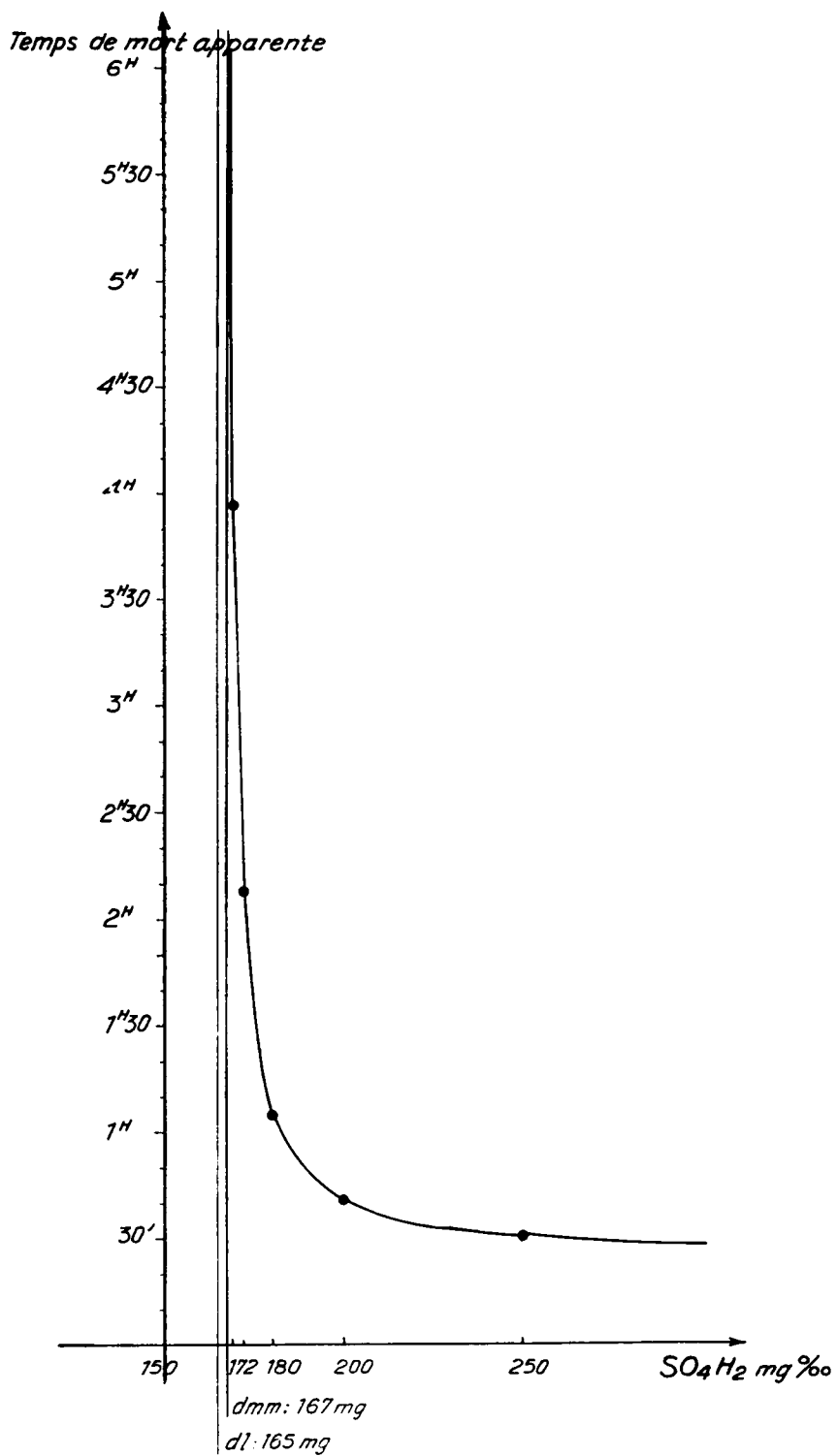


FIG. 5. — Courbe de toxicité.

Nos chiffres sont comparables, en  $\text{SO}_4\text{H}_2$  libre, à ceux trouvés pour le vairon par LÉGER : dilution limite en eau distillée aérée 20 mg par litre. Il en est de même pour la dose minima mortelle : LÉGER trouvait 40 mg en eau distillée ; sur notre graphique, l'abscisse au point de la courbe correspondant à 1 heure nous donne 36 mg par litre de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  libre, en tenant compte du pouvoir de neutralisation de notre eau d'expérience.

Par contre, nous n'avons pas observé, comme LÉGER, d'action néfaste sur le poisson pour des doses d'acide inférieures au pouvoir de neutralisation de l'eau. Cet auteur attribuait à juste titre ce phénomène au  $\text{CO}_2$  libéré des bicarbonates et carbonates par l'acide. Dans nos expériences, ce fait ne se produisait pas : le courant d'azote utilisé pour régler le taux d'oxygène entraînait en même temps le  $\text{CO}_2$  libéré. L'action toxique observée n'était donc attribuable qu'à l'acide sulfurique.

Cette étude de l'influence de l'acide sulfurique sur le poisson nous a servi surtout à montrer un exemple pratique de l'utilisation de notre appareillage. On a pu voir que l'expérimentation toxicologique exigeait une attention soutenue et que l'établissement d'un point du graphique de toxicité représentait une somme de travail importante. Le pourcentage d'erreur diminue avec l'augmentation du nombre des relevés et ce n'est qu'au prix de nombreuses heures d'expérience qu'il sera possible de déterminer, dans les conditions expérimentales définies à Zurich et avec une précision convenable, la toxicité des corps présents dans les effluents.

Nous pensons qu'il était indispensable de fixer des conditions expérimentales rigoureuses pour les essais toxicologiques au laboratoire et surtout de les uniformiser. A notre avis, les chiffres standards obtenus serviront de repère au cas concret et pratique de la pollution des rivières où, bien souvent, on ne peut donner pour un produit toxique qu'un ordre de grandeur. Compte tenu des modifications de conditions et des interférences éventuelles, on pourra se référer aux tables toxicologiques dressées pour estimer approximativement l'intensité d'une pollution.

---

## BIBLIOGRAPHIE

---

- ELLIS (M. M.). — Détection and measurement of stream pollution. *Bull. of the Bureau of Fisheries*, n° 22, Washington 1937.
- HUBAULT (E.) et DESAVELLE (H.). — La pollution des eaux par les effluents industriels. *Bull. du Centre Belge d'Études et de Documentation des Eaux*, n° 14, 197-207, 1951.
- HUET (M.). — Toxicologie des Poissons. *Bull. du Centre Belge d'Études et de Documentation des Eaux*, n° 7, 396-406, 1950.
- KOLTHOFF (I. M.) and LINGANE (I.). — Polarography. *Interscience publishers New-York, London*, 1952.
- LECLERC (E.) et DEVLAMINCK (F.). — Considérations préliminaires à la détermination de la dose minima mortelle pour le poisson, de quelques substances à caractère nocif. *Bull. du Centre Belge d'Études et de Documentation des Eaux*, n° 18, 483-485, 1950.
- LECLERC (E.) et DEVLAMINCK (F.). — Étude toxicologique de quelques substances généralement présentes dans les effluents d'usine à gaz. *Bull. du Centre belge d'Études et de Documentation des Eaux*, n° 8, 486-493, 1950.
- LÉGER (L.). — Études sur l'action nocive des produits de déversement industriels chimiques dans les eaux douces. *Trav. Lab. de Pisc. de l'Université de Grenoble*, année 1911, Grenoble, 1912.
- MANNING. — A method for obtaining continuous records of dissolved oxygen in lake waters. *Ecology*, 21, 509-512, 1940.
- MOORE, MORRIS, OKUN. — The polarographic détermination of dissolved oxygen in water and sewage. *Sewage Works*, 20, 1041-1053, 1948.
- SPOOR (W. A.). — Use of the dropping mercury electrode for the continuous measurement of dissolved oxygen in flowing water. *Science*, 108, 421, 1948.
- VITEK (V.). — The estimation of oxygen contained in gases and solutions. *Coll des Trav. Chim. de Tchécoslovaquie*, 7<sup>e</sup> année, 537-541, 1935.
- VIVIER (P.). — Remarques sur le « test poisson ». *Bull. du Centre Belge d'Études et de Documentation des Eaux*, n° 15, 61-65, 1952.
- WUHRMANN (K.). — Sur quelques principes de la toxicologie du poisson. *Bull. du Centre Belge d'Études et de Documentation des Eaux*, n° 15, 49-60, 1952.
- WUHRMANN (K.), WOKER (H.), VIVIER (P.), LECLERC (H.), HUET (M.) et DEVLAMINCK (F.). — Essais de Toxicologie des poissons. *Bull. du Centre Belge d'Études et de Documentation des Eaux*, n° 19, 67-68, 1953.
-