

N° d'ordre 1240

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

50376
1984
227

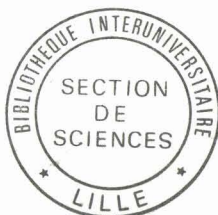
50376
1984
227

THESE

présentée pour l'obtention du titre de
Docteur de 3^{ème} Cycle en Biologie
et Physiologie Animales

par

Claude DELVAL



Réactions du flet vis à vis des pollutions
par les métaux (Cu, Zn, Cd et Pb)
sur le littoral de la mer du Nord :
Détoxification , Métallothionéines

Présentée et soutenue le 17 Décembre 1984, devant la commission d'examen :

- M. M.PORCHET, Professeur à l'Université de Lille IPrésident.
 - M. A.RICHARD, Professeur à l'Université de Lille I Rapporteur.
 - M. P.SAUTIERE, Professeur , (Unité associée au C.N.R.S 409)
(Institut de la recherche sur le cancer de Lille)...
 - M. M.WARTEL, Professeur à l'Université de Lille I.....
 - M. J.M.BOUQUEGNEAU, Docteur en Sciences Zoologiques, de
l'Université de Liège
- } Examineurs.

" Il faut avant tout que l'homme se persuade qu'il n'a pas le droit moral de mener une espèce animale ou végétale à son extinction. D'abord parce qu'il n'est pas capable de la créer mais seulement de la conserver "

Jean DORST

A mes parents ,

A mes amis ,

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury :

- Monsieur le Professeur M.PORCHET

Professeur à l'Université de Lille I, qui me fait l'honneur de bien vouloir présider mon jury de thèse.

- Monsieur le Professeur A.RICHARD

Professeur à l'Université de Lille I qui fut l'instigateur de ce travail
Je lui suis reconnaissante de m'avoir accordé sa confiance et de m'avoir soutenue dans cette recherche.

- Monsieur le Professeur P.SAUTIERE

de l'Unité associée au C.N.R.S (Institut de recherche sur le cancer de Lille) Je le remercie pour ses conseils dans l'analyse biochimique ainsi que pour m'avoir permis d'utiliser l'instrumentation de son laboratoire.

- Monsieur le Professeur M.WARTEL

de l'Université de Lille I qui a accepté de mettre à ma disposition l'appareillage de son laboratoire. Je tiens à le remercier pour les conseils et les encouragements prodigués lors de cette recherche.

- Monsieur le Docteur BOUQUEGNEAU

de l'Université de Liège qui a accepté de me recevoir en stage dans son laboratoire. J'associe à ces remerciements tout le personnel du service d'Océanologie de l'Université de Liège.

Je suis heureuse de remercier ici tous ceux qui m'ont aidée dans la réalisation de ce travail.

- Madame LEMAN ainsi que tous les membres du laboratoire de chimie analytique et marine de Lille pour leur aide précieuse et leur gentillesse. Qu'ils trouvent dans ce mémoire l'expression de ma gratitude.

- Je tiens à remercier également Mesdames D.WOUTERS et A.HEMFZ ainsi que tout le personnel de l'unité associée au C.N.R.S pour leur aide ainsi que pour leur soutien lors de la réalisation de ce travail.

- J'adresse un grand remerciement au personnel de la Station Marine de Wimereux, et en particulier à Madame M.A. JANQUIN, pour leur aide et leur soutien lors de la réalisation de ce travail.

Les illustrations ont été réalisées par D.MENU , la dactylographie par Madame M.PANNIER. Je tiens à leur exprimer ici toute ma gratitude pour la qualité du travail accompli et pour la gentillesse avec laquelle il a été effectué.

J'adresse également un grand merci à tous mes amis, à Thierry ainsi qu'à mes parents et Benoit sur qui j'ai toujours pu m'appuyer.

ERRATA



Introduction

- p. 1 - 10^{ème} ligne avant la fin, lire : "... de nombreux facteurs (sexe - taille - âge ...) ..."

CHAPITRE I

- p. 3 - 7^{ème} ligne, lire "... un premier rapport : (ADELFA : Association...)"
p. 5 - lire "... afin de compléter l'inventaire des maladies des poissons sur le littoral ..."
p. 5 - § 2, 3^{ème} ligne avant la fin, lire "jusqu'à 6 milles au large"
p. 7 - § 4 lire "...deux échantillonnages..."
p. 12 - 2^{ème} ligne, lire "... rejetaient systématiquement à la mer..."

CHAPITRE II

- p. 32 - § 1.4 lire "... sont également rejetés..."
p. 32 - § 1.5, 6^{ème} ligne lire "... Pour ces deux dernières zones..."
p. 36 - Les données utilisées pour cette figure proviennent du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin.
p. 42 - 16^{ème} ligne - lire "...polluants, dont la diversité..."
p. 42 - 18^{ème} ligne - lire "... les déchets sont rejetés au large..."
p. 47 - § 5.1.1. - 7^{ème} ligne - lire "... la croissance et de l'ossification..."
p. 51 - 20^{ème} ligne - lire "...Une réduction de 38 % de l'hématocrite..."
p. 53 - dernière ligne avant 5.2.3. lire "... de l'hématocrite des poissons marins."

CHAPITRE III

- p. 73 - 8^{ème} ligne avant la fin - lire "... qui n'est pas retrouvée..."
p. 75 - lire "...les différences entre les branchies des poissons sains..."
p. 76 - lire "...les différences entre les foies des poissons sains..."
p. 78 - § 5.1.2. - 10^{ème} ligne - lire "...dixième..."
p. 84 - 5^{ème} ligne, "...la teneur en plomb naturellement présent dans l'eau de mer est de 0.003 ppm ± 0.001 (bacs témoins)..."
p. 91 - 11^{ème} ligne "... Néanmoins la concentration de cet élément dans cet organe n'apparaît pas corrélée avec celle détectée dans le foie ou les reins."

CHAPITRE IV

- p. 108 - 9^{ème} ligne "... les avis des auteurs divergent; pour certains,..."
p. 112 - 8^{ème} ligne lire "...les auteurs à leur attribuer..."
p. 114 - dernière ligne, lire "... pendant 15 mn à + 4° C..."
p. 118 - § 1.3.5. - dernière ligne - lire "... soumises..."
p. 120 - 9^{ème} ligne - lire "... acide chlorhydrique..."
p. 139 - Les données des analyses d'acides aminés du foie de flet et du foie de l'anguille (1) sont inversées.
p. 141 - § 3.1. - 1^{ère} ligne - lire "... à 254 nm..."
p. 144 - Fig. 40 - lire " --- Zn ; — Cu"
p. 148 - 5^{ème} ligne - lire "... les valeurs (Tableau 23) sont très nettement supérieures à celles des poissons témoins (Tableau 22)..."
p. 149 - Tableau 23 - pour t = 1 jour lire "Cu = 81,9 %"
% relatif au contenu en métal de l'extrait soluble.
p. 153 - 18^{ème} ligne - lire "... Mais la quantité de cadmium augmente dans la fraction métallothionéïne des poissons contaminés par 10 ppm de CdCl₂."



p. 159 - Fig. 47 : lire " --- Zn , — Cu"
p. 161 - Tableau 24 - lire t = 0 ; Poissons témoins.

CONCLUSION

p. 172 - dernier paragraphe - lire "... L'examen des relevés des teneurs en polluants tels le cuivre, le zinc et le cadmium montre une tendance à l'augmentation sur le littoral de Calais à Dunkerque".

ANNEXES

Annexe 4 : lire

$$\sqrt{\frac{|M_1 - M_2|}{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

lire : WELSCH, 1949 (Communication personnelle de S. FRONTIER)



SOMMAIRE

	pages
Introduction	1
Chapitre I : Bilan des recherches concernant l'étude des ulcérations des poissons du littoral Nord-Pas-de-Calais (1978/1982)	3
I - Introduction	3
II - Enquête auprès des pêcheurs	5
III - Présentation de la zone étudiée	6
IV - Etude des chalutages	7
4.1. Prélèvements	7
4.2. Analyse des chalutages	7
4.2.1. Variation du tonnage entre 1978 et 1982	7
4.2.2. Répartition des traits de chalut	7
4.2.3. Pourcentage et répartition des poissons nécrosés par espèce	10
4.2.4. Répartition des nécroses en fonction de la taille des flets .	12
V - Description des lésions	12
5.1. Anomalies pigmentaires	12
5.2. Lymphocystis	13
5.3. Les pertes de substances	13
5.3.1. "Nécroses cutanées"	13
5.3.2. Fin rot disease	17
5.4. Les nodules	17
5.5. Autres affections	18
5.5.1. Hyperplasies et papillomes	18
5.5.2. Les déformations du squelette	18
5.5.3. Affections internes	18
5.5.4. Ectoparasites	20
5.5.5. Analyse des perturbations internes	20
5.5.6. Localisation anatomique des lésions	20
VI - Campagnes océanographiques	21
Chapitre II : Métaux lourds : répartition sur le littoral et toxicité	28
I - Etat des rejets sur le littoral de Calais à Dunkerque	30
1.1. Métallurgie	30
1.2. Secteur Chimie	30
1.3. Raffineries	32
1.4. Autres industries	32
1.5. Bilan	32
1.6. Conclusion	34
II - Teneur en métaux lourds dans l'eau de mer	34
2.1. Comparaison des différentes façades du littoral français par leur teneur en métaux lourds	34
2.2. Evaluation de la teneur en polluants de la station numéro 1 du R.N.O. à Dunkerque	37
2.3. Comparaison de la teneur en éléments métalliques en divers points du littoral de la mer du Nord	37
2.3.1. Comparaison entre le site de Calais - Dunkerque et le littoral belge pour 1975-1976	39

2.3.3. Comparaison entre le site de l'Aa et Dunkerque	39
III - Teneurs en métaux dans les sédiments	40
IV - Teneurs en polluants de la matière vivante	42
V - Toxicité des métaux lourds	45
5.1. Métaux essentiels	47
5.1.1. Le zinc	47
5.1.2. Le cuivre	49
5.1.3. Autres métaux	49
5.2. Métaux toxiques	50
5.2.1. Le plomb	50
5.2.2. Le mercure et le cadmium	51
5.2.3. Le titane	53
Conclusion	54
Chapitre III : Ecotoxicologie : Teneurs en métaux des flets de la Manche Mer du Nord - Intoxications expérimentales	55
I - Méthodes d'Etude Ecotoxicologique	55
1.1. Etude <i>in situ</i>	55
1.2. Utilisation de tests ecotoxicologiques	55
1.3. Microsystèmes expérimentaux	56
1.4. Chaînes trophiques expérimentales	57
II - Matériel biologique	58
2.1. Choix du matériel d'étude	58
2.2. Description et biologie du flet	59
III - Méthodes	60
3.1. Echantillonnage	60
3.2. Traitement des échantillons	60
3.2.1. Préparation	60
3.2.2. Minéralisation	61
3.3. Dosage des métaux	61
3.3.1. Principe	61
3.3.2. Analyses	63
IV - Analyse de la teneur en métaux des poissons du milieu naturel	65
4.1. Introduction	65
4.2. Analyse des résultats	65
4.2.1. Influence de la taille	66
a) Branchies	66
b) Reins	66
c) Foie	67
d) Homogénéité	68
e) Synthèse	68
4.2.2. Influence du sexe	69
a) Branchies	69
b) Reins	69
c) Foie	70
d) Synthèse	70
4.2.3. Influence de la saison	70
a) Branchies	71
b) Reins	71
c) Foie	71
d) Synthèse	72
4.2.4. Discussion	72

4.3. Comparaison Hardelot - Dunkerque	74
4.3.1. Analyse des résultats	74
a) Branchies	74
b) Reins	75
c) Foie	75
4.3.2. Synthèse	76
4.4. Conclusion	76
V - Intoxications expérimentales	77
5.1. Conditions expérimentales	77
5.1.1. Choix du contaminant	77
5.1.2. Concentration du contaminant dans le milieu	78
5.2. Dosage de l'eau de mer	80
5.2.1. Principe	80
5.2.2. Mode opératoire	81
5.2.3. Résultats de la teneur en plomb de l'eau de mer lors de la contamination	81
5.2.4. Evaluation de la quantité de plomb disponible pour les poissons	84
5.3. Résultats de la contamination par le zinc	84
5.3.1. Comparaison avec la teneur des poissons témoins	84
5.3.2. Cinétique d'accumulation du zinc	85
5.3.3. Cinétique du cuivre lors de l'intoxication par le zinc	89
5.3.4. Relations entre la teneur en cuivre et la teneur en zinc des différents organes	89
5.3.5. Relations entre les organes	89
5.3.6. Discussion	89
5.4. Résultats de la contamination par le plomb	91
5.4.1. Comparaison avec la teneur des poissons témoins	91
5.4.2. Cinétique d'accumulation du plomb	93
- Branchies - rein - Foie	93
- Sang	93
5.4.3. Relation entre les organes selon leur teneur en cuivre, en zinc et en plomb	97
5.4.4. Discussion	97
5.5. Résultats de la contamination par le cadmium	99
5.5.1. Comparaison avec les poissons témoins	99
5.5.2. Cinétique d'accumulation du cadmium	99
5.5.3. Cinétique d'accumulation du zinc et du cuivre lors de l'intoxication par le cadmium	103
5.5.4. Relations entre la teneur en cuivre, zinc et cadmium des différents organes	103
5.5.5. Relation entre les organes	103
5.5.6. Discussion	103
5.6. Conclusion	105
Chapitre IV : Métallothionéïnes - Rôle - Mise en évidence	106
I - Mécanismes de détoxification	106
1.1. Rappels	106
1.1.1. Invertébrés	106
1.1.2. Vertébrés	107
1.2. Métallothionéïnes	108
1.2.1. Poids moléculaire	108
1.2.2. Composition en acides aminés	109
1.2.3. Métallothionéïnes chez les mammifères	109

1.2.4.	Caractéristiques métalliques	109
1.2.5.	Polymorphisme	110
1.2.6.	Rôle des métallothionéïnes	110
1.2.7.	Critères de détermination des métallothionéïnes	112
1.2.8.	Présence des métallothionéïnes dans les organismes vivants	113
1.3.	Méthodes d'études pour la caractérisation des métallothionéïnes	114
1.3.1.	Extraction	114
1.3.2.	Fractionnement	115
1.3.3.	Chromatographies	116
1.3.4.	Caractérisation des métallothionéïnes	116
1.3.5.	Bilan des techniques séparatives utilisées	118
II -	Caractérisation des métalloprotéïnes : protocoles expérimentaux	118
2.1.	Préparation des extraits	118
2.2.	Chromatographie de filtration sur gel	118
2.2.1.	Conditions expérimentales	118
2.2.2.	Calibration des colonnes	120
2.2.3.	Mesure d'absorption dans l'U.V des protéïnes isolées par chromatographie	122
2.2.4.	Dosage des métaux - Expression des résultats	122
2.2.5.	Résultats	124
2.3.	Purifications supplémentaires	124
2.3.1.	Fractionnement acétonique	124
2.3.1.1.	Méthode	124
2.3.1.2.	Résultats	126
2.3.2.	Purification par chauffage	128
2.3.2.1.	Méthode	128
2.3.2.2.	Résultats	128
2.3.2.3.	Discussion	128
2.4.	Lyophilisation	130
2.5.	Electrophorèse	130
2.5.1.	Méthode	130
2.5.2.	Résultats	132
2.5.3.	Discussion	132
2.6.	Chromatographie d'échange d'ions	134
2.6.1.	Méthode	134
2.6.2.	Résultats	134
2.6.3.	Discussion	136
2.7.	Analyse d'acides aminés	138
2.8.	Bilan général	138
III -	Suivi expérimental de l'intoxication par le cadmium	141
3.1.	Chromatogrammes	141
3.2.	Distribution du zinc, du cadmium et du cuivre dans la fraction soluble des foies de flets dans l'expérience d'intoxication par le cadmium	146
3.2.1.	Poissons témoins	146
3.2.2.	Poissons intoxiqués	148
3.2.2.1.	Fraction soluble totale	148
3.2.2.2.	Fractions correspondant aux protéïnes de poids moléculaire voisin de 12 000	148
3.3.	Importance de la fraction de poids moléculaire voisin de 12 000 vis à vis des autres sites cellulaires de la fixation du cadmium	152
3.4.	Commentaires et discussion	152

IV - Expérience de contamination par le plomb	156
4.1. Rappels	156
4.2. Etude de la fraction soluble du foie par chromatographie sur gel de Séphadex G 75	156
4.3. Discussion	156
V - Expérience de contamination par le zinc	158
5.1. Rappels	158
5.2. Analyse des chromatogrammes	158
5.3. Distribution du cuivre et du zinc dans la fraction soluble des foies de flet	158
5.3.1. Poissons témoins	158
5.3.2. Poissons intoxiqués	162
5.3.3. Discussion	162
VI - Etude des chromatogrammes, obtenus à partir d'extraits de foie de poissons provenant du milieu naturel	163
6.1. Poissons provenant d'Hardelot	163
6.2. Poissons provenant de Dunkerque	164
6.3. Discussion	167
VII - Conclusion	168
 Conclusion générale	 170
Bibliographie	173
 Annexes	

INTRODUCTION

Depuis plusieurs années, la présence d'ulcérations tégumentaires sur les poissons pêchés sur le littoral français suscite l'inquiétude des pêcheurs. Nous avons étudié la répartition des poissons "nécrosés" sur le littoral de Calais à Dunkerque en répertoriant les différents types de maladies. Nous avons également effectué à cet effet, une campagne océanographique à bord du navire océanographique Cryos.

Les zones de pêche de poissons malades sont des zones de rejets industriels : nous avons donc effectué un bilan de la pollution par les métaux lourds sur le littoral de Calais à Dunkerque en considérant les industries responsables de ces rejets.

Parmi les substances polluantes, certains métaux traces, qu'ils soient biologiquement essentiels (Cu, Zn, ...) ou non (Cd, Hg, Pb, ...) sont à des concentrations relativement proches de leurs teneurs normales, mais peuvent être toxiques pour certains compartiments du milieu marin.

Trois analyses ont été réalisées : la mesure directe de la concentration en métaux lourds dans l'eau de mer, celle du contenu en métal des sédiments, et enfin la concentration dans les organismes vivants en nous intéressant plus particulièrement au flet (*Platichthys flesus*), poisson plat abondant sur le littoral. Les mesures de la teneur en polluants des organismes marins sont essentiellement effectuées sur des Lamelli-branches. Il nous a paru intéressant de préciser la concentration des métaux lourds dans les différents organes du flet, espèce qui présente de nombreuses ulcérations tégumentaires. Plusieurs études ont démontré que la teneur en métaux lourds des organismes vivants variait en fonction de nombreux paramètres.

Nous avons donc recherché les variations induites par la taille, le sexe, la saison et le lieu de pêche sur le flet.

Comme certains métaux sont responsables de phénomènes de toxicité importants en raison de leur accumulation dans la matière vivante, nous avons réalisé des intoxications expérimentales chez le flet, par le zinc, le cadmium et le plomb, qui sont des métaux présents en grande quantité sur le littoral de Calais à Dunkerque.

Nous avons précisé la cinétique d'accumulation de ces polluants dans les différents organes du flet ainsi que les interférences

pouvant exister entre le métabolisme des différents métaux.

Les organismes vivants possèdent des systèmes de détoxification variés, qu'ils utilisent face à des contaminations naturelles ou expérimentales. Les métallothionéines constituent un de ces mécanismes.

Nous avons donc recherché la présence de ces protéines lors d'intoxications expérimentales par le plomb, le cadmium et le zinc dans le foie des flets, en comparant les résultats avec des poissons chalutés dans différentes zones: la zone d'Hardelot considérée comme zone témoin "saine" et la zone de Calais à Dunkerque, polluée.

CHAPITRE I

BILAN DES RECHERCHES CONCERNANT
L'ETUDE DES ULCERATIONS DES POISSONS
DU LITTORAL NORD - PAS-DE-CALAIS
(1978 A 1982)

CHAPITRE I

BILAN DES RECHERCHES CONCERNANT L'ETUDE DES ULCERATIONS DES POISSONS DU LITTORAL NORD - PAS-DE-CALAIS (1978/1982)

I - INTRODUCTION

Depuis plusieurs années la présence d'ulcérations affectant les poissons pêchés dans les eaux côtières de différents pays, suscite l'inquiétude et fait l'objet de programmes d'études internationaux (C.I.E.M., Conseil International pour l'exploration des Mers). Groupe d'Etudes sur la pathologie des organismes marins ; Campagnes internationales de Pêches.

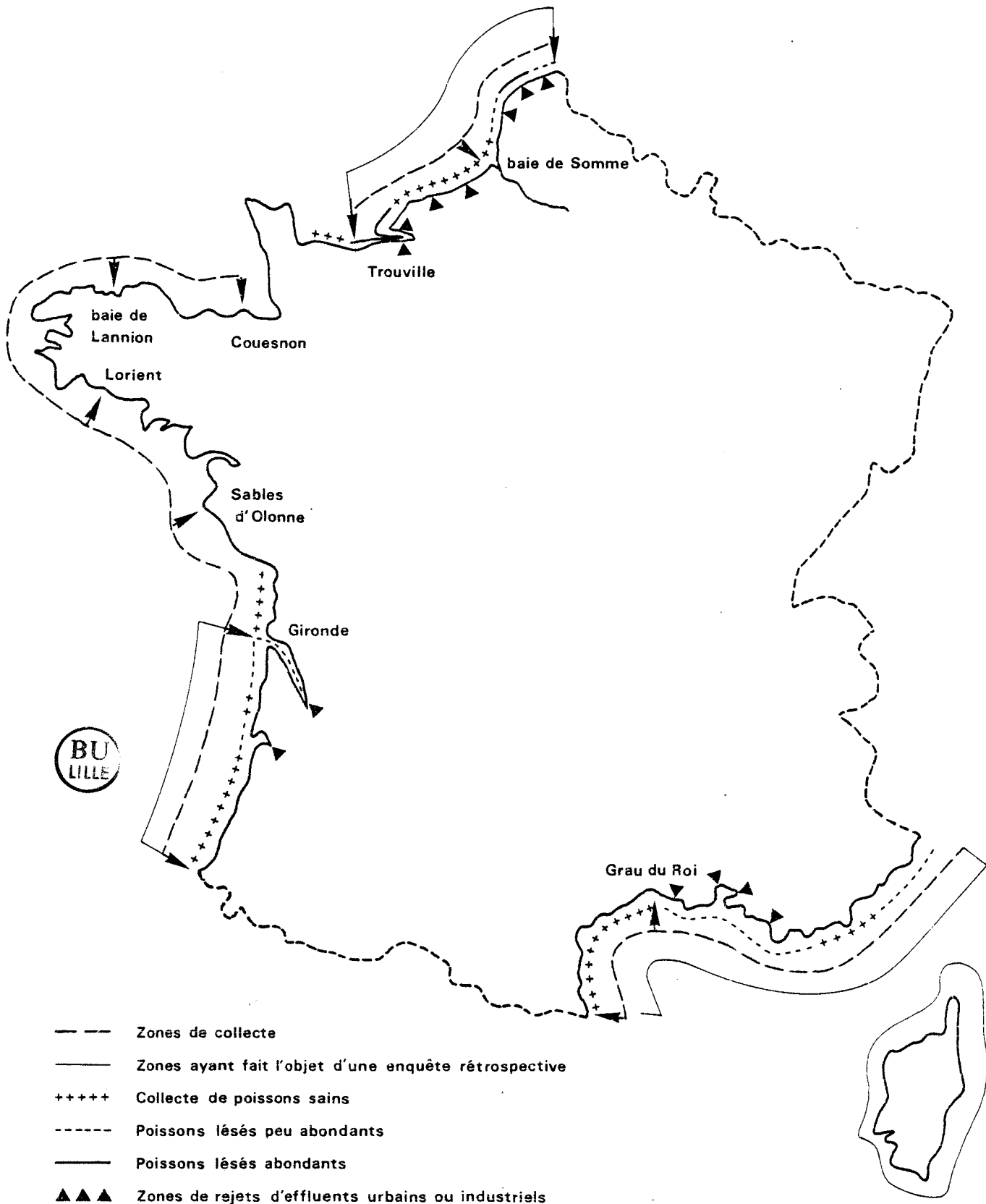
En France, la situation est préoccupante en de nombreux points du littoral. Dans la région Nord - Pas-de-Calais, un premier rapport de l'ADELFA (Association de Défense de l'Environnement du Littoral Flandres Artois) fut remis au tribunal de Boulogne-sur-mer, suite à une plainte déposée par les pêcheurs de Grand Fort Philippe (RICHARD, DURCHON, VANDORPE, 1975).

La même année, le syndicat des pêcheurs du Havre et les pêcheurs de Corse entamaient les mêmes démarches suite aux pollutions par les boues rouges et les phosphogypses en Baie de Seine et en Méditerranée (Voix du Nord, 31 janvier 1979 ; Le Monde, 31 janvier 1979 ; VIALE, 1974). Ces observations ont conduit le C.N.E.X.O. en 1977, à entreprendre une étude pluridisciplinaire des lésions des poissons et mammifères marins. (Fig. 1 : répartition des zones à "nécroses" sur le littoral français).

Vingt laboratoires français ont participé à cette étude. Le travail dévolu à la Station Marine de Wimereux s'est déroulé en deux étapes. La première phase, réalisée par deux équipes successives (RICHARD et al., 1977 et 1979), comportait une enquête rétrospective auprès des pêcheurs, sur une zone allant du Tréport à Dunkerque, une étude des chalutages avec détermination du pourcentage de poissons atteints d'ulcérations et une description anatomique de ces lésions. Des prélèvements

Fig. 1 : Réseau de collecte du matériel biologique sur le littoral français

(NOUNOU et al, 1980)



étaient également effectués à des fins d'analyses anatomo-pathologiques et confiés au laboratoire d'Anatomo- pathologie de l'Hopital St Antoine (Professeur ORCEL), ou cytologiques, transmises au laboratoire d'histo-physiologie Fondamentale et appliquée (Professeur MARTOJA).

La deuxième phase avait pour but de confirmer la proportion de poissons lésés sur le littoral français. Des essais de toxicité de produits chimiques ou autres polluants, en laboratoire, devaient permettre d'infirmier ou de confirmer les hypothèses avancées, quant à leur rôle pathogène. Le travail de la Station Marine fut alors de poursuivre les recensements de poissons nécrosés ainsi que les prélèvements d'échantillons, afin de compléter les maladies des poissons sur le littoral (DELVAL, 1982).

II - ENQUETE AUPRES DES PECHEURS

Le phénomène des "Nécroses" est essentiellement côtier, et atteint particulièrement des poissons sédentaires et adultes. La limande est fréquemment endommagée, alors que la limande-sole, qui vit plus au large est indemne.

Des pêcheurs ont également signalé l'apparition de morues malades en hiver, lorsqu'elles arrivent à la côte pour se nourrir. D'autres, ont observé une périodicité du phénomène ; les limandes seraient plus touchées en Mai (jusqu'au quart des prises) que pendant le reste de l'année, et les soles nécrosées sont capturées près de la côte (RICHARD et al., 1977).

Quant aux causes de ces lésions, les pêcheurs sont unanimes, ils évoquent les rejets urbains et industriels ainsi que les pollutions diverses.

En fait, il semble que le Sud de la Mer du Nord et les zones situées à proximité des centres urbains côtiers telles que :

- l'Est de la ville de Calais
- Gravelines (jusqu'à 6 miles au large)
- L'estuaire de la Tamise
- La Baie de Somme

soient les plus touchées.

D'autres sites occasionnels de nécroses ont également été mis en évidence (Sandettie, Bassurelle, Vergoyer), c'est un fait que les zones incriminées sont celles où se dispersent les polluants.

D'après cette enquête, il apparaît que le nombre de poissons nécrosés est plus important dans la région du littoral compris entre Calais et Dunkerque. Cette zone a donc fait l'objet d'une prospection plus intense. Toutefois à titre de comparaison, quelques chalutages ont été effectués plus au sud vers Hardelot.

III - PRESENTATION DE LA ZONE ETUDIEE

Elle est située entre 51° et 51° 05 de latitude Nord et entre 1°55 et 2°15 de longitude Est, et a une superficie d'une cinquantaine de kilomètres carrés. Le courant de flot porte à l'E.N.E. et le jusant à l'W.S.W. Le flot est plus court que le jusant mais a une intensité supérieure. Les fonds sont au maximum de 40 mètres (SHOM n° 550). Les chalutages ont été effectués à la côte sur des fonds de 10 à 15 mètres, et au large sur des fonds de 25 à 30 mètres.

Les faciès granulométriques constituant cette zone, ont été divisés en 4 groupes (SMIGIELSKI, 1976) :

- 1 Sables purs légèrement envasés.
- 2 Sables coquilliers qui forment une série de ridens alternés avec des souilles (faciès 3).
- 3 "Souilles" de sédiments hétérogènes envasés.
- 4 Zones de vase pure à *Abra alba*, aux abords de Calais et au large du Feu de Walde.

La zone de chalutage correspond essentiellement au type 4. Cette zone est caractérisée par la présence d'un peuplement à *Abra alba* (DEWARUMEZ et al., 1976), qui constitue l'essentiel du régime alimentaire du flet (*Platichthys flesus*) avec le polychète *Lanice conchilega* (DELVAL, 1982). On sait également que la nature et la granulométrie des sédiments sont importantes puisqu'elles conditionnent la rétention des métaux. Dans cette zone les couches superficielles riches en fractions fines, sont très chargées en métaux (SMIGIELSKI, 1978).

IV - ETUDE DES CHALUTAGES

4.1. Prélèvements

Depuis 1978, 62 chalutages ont été effectués entre Calais et Dunkerque. L'embarquement à bord des chalutiers professionnels nous a permis de participer à la totalité du tri du poisson, chaque animal lésé (lésion visible à l'oeil nu) était alors répertorié (fiche de renseignements, Annexe I). Chaque poisson nécrosé est autopsié, et des fragments de lésion sont fixés et envoyés pour des études cytologiques et anatomo pathologiques aux laboratoires associés . (NOUNOU et al., 1980).

4.2. Analyse des chalutages

4.2.1. - Variation du tonnage entre 1978 et 1982

En 5 ans les trois équipes travaillant dans le cadre des contrats n'ont pas nécessairement récolté les mêmes espèces de poissons. En effet le nombre et le mode de chalutage varient d'une année à l'autre. La saison de pêche des morues est hivernale. Deux échantillonnages ont été réalisés au cours des hivers 76 et 80 lors de la première phase, contre un seul en 1981. La quantité de morues pêchées lors de la 2ème phase est donc moindre. Il en est de même pour les limandes et les carrelets. Le tonnage des tacauds de 1981/1982 n'a pas été évalué, les pêcheurs les rejetant systématiquement. (tableau 1).

L'attention particulière que nous avons porté au flet (*Platichthys flesus*) et le tonnage important pêché en 1981/82, s'expliquent par le pourcentage élevé de "nécrosés" dans cette espèce. Ce poisson n'est pas commercialisé sur le littoral français, mais sur celui de la Mer du Nord, les individus de taille inférieure à 35 cm sont rejetés, les autres étant conservés puis vendus à quai.

4.2.2.- Répartition des traits de chalut

En 1978/80, on distingue 3 zones de pêche de poissons nécrosés au large de Calais Dunkerque :

- 1 - Le haut fond de Gravelines
- 2 - En bordure du chenal d'entrée de Dunkerque Est
- 3 - A la côte entre le Feu de Walde et l'avant port Ouest de Dunkerque.



TABLEAU 1 : EVALUATION DU TONNAGE ET DU POURCENTAGE DES
PRINCIPALES ESPECES PECHEES EN 1979/1980 et 1981/1982

	1979-1980		1981-1982	
	Tonnage (Kg)	% de l'espèce	Tonnage (Kg)	% de l'espèce
Morues	4589	41,02	2825	33,9
Flets	433	3,87	1383	16,6
Carrelets	2000	17,88	849	10,2
Limandes	762	6,81	217	2,6
Soles	548	4,90	522	6,3
Merlans	2335	20,88	1260	15,1
Aloses	-	-	18	0,2
Chinchards	60	0,54	41	0,5
Tacauds	15	0,13	-	--

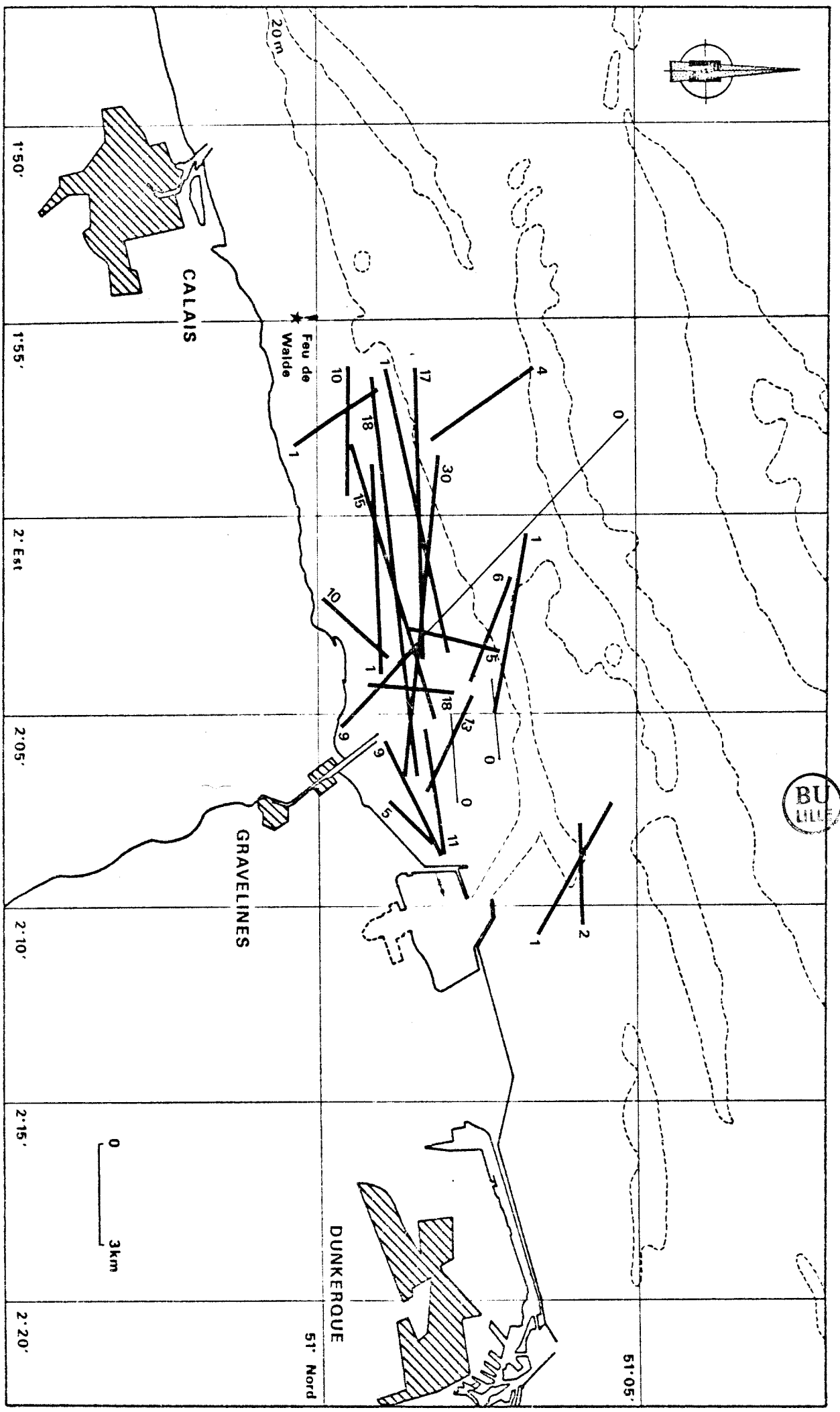


Fig. 2 : Répartition des traits de chalut pour le flet

(— x : nbre de poissons nécrésés)

La zone n° 2 n'a pas été prospectée en 81/82, les pêcheurs ne la fréquentant plus. Il ne semble pas y avoir de différences quant au taux de poissons nécrosés entre les deux autres zones. (Fig. 2). Quelques traits représentés pour le flet sont exempts de poissons nécrosés. Il a paru intéressant d'effectuer des chalutages plus au large afin de confirmer ou, infirmer, la thèse des pêcheurs concernant la dispersion des poissons nécrosés en mer. Cet objectif a été réalisé lors des campagnes océanographiques entreprises par le C.N.E.X.O. (cf. paragraphe 3).

4.2.3. Pourcentage et répartition des poissons nécrosés par espèce
.....
(tableau n°2)

En 1978/1980, 70 poissons malades ont été recensés, dont 57,1 % de flets, et 17,1 % de morues. L'espèce qui représente le pourcentage intrinsèque de nécroses le plus élevé est le flet (2,7 %), ce qui représente 0,10 % du poids total de la pêche, les morues nécrosées représentant 0,46 % de ce même poids. Aucune alose ou chinchard, n'ont été recensés lors de ces chalutages. Le poids brut de l'ensemble des poissons nécrosés représente 0,62 % du poids total de pêche toutes espèces confondues.

En 1981/1982, 221 poissons malades ont été répertoriés dont 86,4 % de flets. Ce pourcentage assez élevé, peut être lié à l'attention particulière que nous avons portée à cette espèce, toutefois il faut noter que 3,7 % des flets sont atteints de nécroses et qu'ils représentent 0,62 % du poids total de pêche ; la morue, quant à elle représente 0,34 % de ce même poids. L'alose qui n'avait pas été pêché en 1979, semble très touchée en 1981 (4,2 % pondéral de poissons affectés). Aucune conclusion ne peut cependant être envisagée, le nombre pêché étant très faible. Aucun merlan et aucune sole nécrosés n'ont été pêchés en 1981/1982. Le petit nombre de chalutages effectués sur le littoral d'Hardelot n'a pas apporté de données supplémentaires, mais cette zone ne semble pas exempte de poissons nécrosés (5 flets, 1 morue, 2 tacauds). Après avoir comparé les pourcentages pondéraux des poissons nécrosés par espèce, nous pouvons constater que seuls le flet et la limande semblent les plus touchés en 1981, respectivement de 2,7 % à 3,7 % et de 0,21 % à 0,31 %). Le pourcentage total de poissons nécrosés, dans l'ensemble des pêches, a évolué de 0,62 % en 1978 à 1 % en 1982.

TABLEAU 2 : REPARTITION PAR ESPECE

DES POISSONS NECROSES RECOLTES DE 1979 A 1982



	Nombre de Poissons nécrosés		Pourcentage des Poissons nécrosés par rapport au nombre total de Poissons nécrosés		Pourcentage pondéral des poissons nécrosés par rapport à l'espèce		Pourcentage pondéral des poissons nécrosés par rapport au poids total des poissons nécrosés		Pourcentage pondéral des poissons nécrosés par rapport à l'ensemble de la pêche	
	79/80	81/82	79/80	81/82	79/80	81/82	79/80	81/82	79/80	81/82
Flets	40	191	57,1	86,4	2,7	3,7	16,8	61,7	0,10	0,62
Morues	12	8	17,1	3,6	1,13	1	74,6	33,8	0,46	0,34
Carrelets	6	8	8,6	3,6	0,14	0,11	3,9	1,2	0,02	0,012
Limandes	6	7	8,6	3,2	0,21	0,31	2,3	0,8	0,01	0,008
Soles	3	-	4,3	-	0,18	-	1,4	-	0,009	-
Merlans	2	-	2,9	-	0,02	-	0,7	-	0,004	-
Tacauds	1	3	1,4	1,4	(*)	(*)	0,3	1,2	0,009	-
Aloses	-	2	-	0,9	-	4,2()	-	0,9	-	0,008
Chinchards	-	2	-	0,9	-	0,3()	-	0,3	-	-
TOTAL	70	221							0,62	1

(*)Le pourcentage pondéral des tacauds pêchés ne peut être pris en compte, les pêcheurs les rejettant à la mer systématiquement.

()Pourcentage non interprétable, le nombre d'individus étant trop réduit.

Au début pour ne pas perdre leur clientèle, les pêcheurs de Grand-Fort-Philippe rejetaient systématiquement les poissons lésés. Mais l'étonnement fit place à l'inquiétude quand les espèces d'importance économique telles que la morue ou la limande, apparurent endommagées ; la situation étant moins catastrophique lorsque les espèces atteintes ont peu de valeur commerciale (flet, tacaud). L'augmentation de la quantité de poissons nécrosés à Grand Fort, se traduit par une mévente à quai, la clientèle ne voulant plus acheter des poissons provenant de cette zone (FOURNIER, marin-pêcheur - communication personnelle).

4.2.4. Répartition des nécroses en fonction de la taille des flets

Le flet est le plus atteint par les ulcérations sur le littoral de Calais à Dunkerque.

Il se reproduit dans les eaux côtières vers le mois de janvier (DESMARCHELIE 1982). Les jeunes remontent ensuite dans les estuaires où ils passent leur première année (Mc CURDY, en 1977, a noté la présence d'un flet à plus de 70 km de l'embouchure d'une rivière irlandaise) (in SMIGIELSKI, 1976). Passé l'âge de un an, ils redescendent alors en mer pour vivre sur des fonds vaseux ; les poissons chalutés ont donc au moins un an. L'étude biométrique de la répartition des nécroses en fonction de la taille des flets (DESMARCHELIER, 1984), a montré qu'aucune lésion n'existait chez des poissons de moins de 18 cm. Les flets de 25 à 30 cm sont atteints dans une proportion de plus de 10 %, et jusqu'à 35 % pour les individus de 35 à 40 cm, ce qui correspond à des poissons âgés de 4 à 5 ans. Le maximum de flets nécrosés se situe dans cette dernière classe, et il semblerait que passé ce stade, les poissons malades disparaissent des récoltes. Cette disparition pourrait être attribuée à l'évolution de la nécrose, qui atteindrait alors un seuil létal (affaiblissement du poisson).

V - DESCRIPTION DES LESIONS

5.1. Anomalies pigmentaires

Trois groupes d'anomalies pigmentaires peuvent exister : l'albinisme, total ou partiel ; et le mélanisme. Lors de notre échantillonnage nous avons pu observer sur de nombreux poissons plats des taches pigmentaires plus visibles sur la face aveugle.

BRIGGS en 1977, a observé un flet pigmenté de manière uniforme sur les deux faces. Il s'agit d'un trouble du métabolisme des cellules qui élaborent les pigments, et plusieurs hypothèses sont émises pour l'interprétation de ce type de lésions ; soit la perte de la vision ; soit les pesticides tels que l'atrazine (WALSH, 1975). Cette anomalie n'est toutefois pas létale pour le poisson.

5.2. Lymphocystis

Cette maladie est une affection d'origine virale touchant particulièrement les poissons plats. On l'a observé pour la première fois en 1874 (LOWE, in SINDERMANN, 1970) sur un flet. Elle se présente sous forme de kystes de 1 à 2 mm de diamètre, leur concentration peut atteindre une surface de plusieurs cm², ou former une tumeur pédonculée. (Photo 1). Les granules sont présents indépendamment sur les deux faces du poisson, avec une dominance au niveau des nageoires caudales et anales et de l'anus. La transmission de la maladie paraît être de nature vénérienne (ROBERTS et BULLOCK, 1976). Les plies (*Pleuronectes platessa*) et les soles (*Solea solea*) sont rarement atteintes. En Mer du Nord, le long du littoral allemand, la limande (*Limanda limanda*) est très affectée. (Campagne de l'Anton Dohrn (C.I.E.M. Pêche) 1984). * Cette maladie a été également signalée en d'autres lieux et toujours sur des poissons plats, en mer de Béring (ALPERS, 1977) ; dans le golfe de Californie et le golfe de Panama (Mc COSKER et NIGRELLI, 1977). Sur le littoral de Calais à Dunkerque, seul le flet est atteint par ces lésions. L'infection n'est pas létale, mais elle peut altérer la nage du poisson et ainsi le rendre plus vulnérable aux prédateurs.

5.3. Les pertes de substances

Les pertes de substances concernent les érosions tégumentaires ou "Nécroses", et la maladie des nageoires ou "Fin Rot Disease".

5.3.1. "Nécroses" cutanées

La nécrose est une atteinte externe de l'épiderme, du derme et des tissus sous jacents (muscles, squelette). Il est parfois difficile

* Compte-tenu de la vaste répartition géographique de la limande, il est préconisé de la considérer comme un indicateur biologique de qualité. (CIEM, 1984).

de distinguer les atteintes typiques des ulcérations, des altérations dues aux chalutages. (Communication personnelle de Stig MELLEGAARD, campagne de l'Anton Dohrn, 1984).

L'épiderme des poissons est peu kératinisé, il est donc très délicat et sensible aux atteintes du milieu extérieur. L'étude histologique entreprise par le Professeur ORCEL (1980) nous a permis de distinguer quatre stades principaux dans ces lésions. Cette classification est basée sur l'aspect lésionnel prédominant, car il existe de nombreux cas intermédiaires :

- Stade pré-ulcéreux : il y a congestion et fragilisation de l'épiderme, avec présence de micro hémorragies et de pétéchies, indépendantes de la présence de parasites et d'ulcérations.
- Ulcérations à prédominance congestive et hémorragique.

La première phase est une phase de prolifération. L'épiderme est atteint, il ne subsiste qu'au bord de la lésion. Les contours de celle-ci sont peu nets et l'interprétation est difficile : s'agit-il d'un début de lésion ou d'une cicatrisation ?

La lésion devient ensuite très hémorragique, de couleur rouge-brun, et de limite très nette. (Photo 1). L'atteinte due à des copépodes tels que *Lepeophthirus pectoralis* peut présenter un tel aspect.

- Ulcérations avec granulome

Le granulome est un tissu pathologique constitué de cellules sanguines et de tissu conjonctif, douées de propriétés phagocytaires (NOUNOU et al., 1980). Les pertes de substances et les ulcérations sont importantes et profondes. Le derme compact est atteint et les écailles périphériques ont disparu. Les myotomes peuvent être atteints jusqu'à 5 ou 6 mm de profondeur. Il y a ensuite une réaction inflammatoire et une atrophie progressive des muscles. Les poissons ronds apparaissent plus touchés par ce type de lésions que les poissons plats. Les nécroses peuvent devenir purulentes. La nature du tissu épidermique est peut-être responsable de cette évolution. (Photo 2).

- Phase fibreuse

La lésion de type granulomateuse, évolue en un tissu fibreux qui se densifie. Il y a rétraction des téguments et réépidermisation. L'hémorragie est en nette régression, mais l'ulcère persiste, la zone périphérique

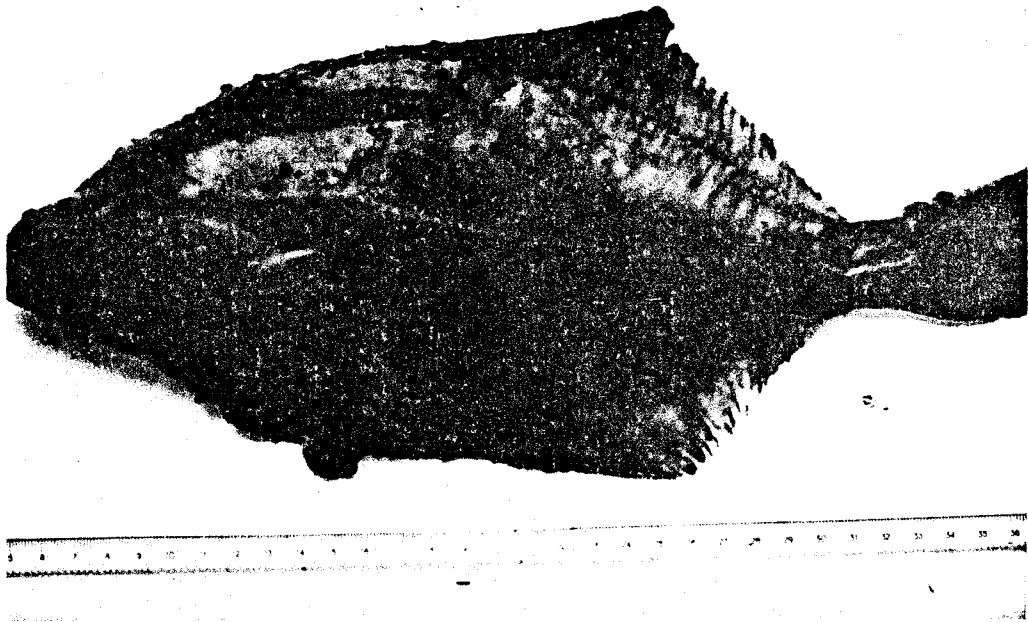


PHOTO 1 : Ulcération à prédominance congestive et hémorragique et kystes de lymphocystis chez le flet.



BU
LILLE

PHOTO 2 : Ulcérations avec granulomes chez la morue.

prenant une teinte blanchâtre. Cet aspect n'a été observé que sur des poissons plats (carrelets, limandes) sur le littoral Nord - Pas-de-Calais.

- Ulcérations cicatrisées

Ce type de lésion n'a pas été observé lors de notre échantillonnage.

Elles échappent à notre détermination par leur rétraction.

Dans l'état actuel de nos connaissances, il n'est pas possible de discerner l'aspect initial de la lésion, granulome ou nécrose. Deux possibilités semblent exister :

- . Il existe une réaction inflammatoire interne, qui prive l'épiderme de son support.
- . Une attaque exogène (blessure, parasite, allergie...) qui fragilise le tégument qui se trouve ensuite endommagé. (SMIGIELSKI, 1978).
Ces lésions deviennent, par la suite, le terrain de développement d'agents bactériens pathogènes, elles sont souvent associées à des Myxobactéries et des Saprologénacées chez *Salmo* sp. (ROBERTS et al., 1970).

Quand ces ulcérations sont profondes et étendues, elles peuvent empêcher le fonctionnement de muscles vitaux chez le poisson déjà affaibli par une perte constante de liquide. Elles peuvent également permettre l'entrée de substances exogènes nocives.

La concordance existant entre les zones de rejets de polluants et les zones de pêche de poissons nécrosés, a conduit SMIGIELSKI et LE MAGUER, en 1978, à entreprendre l'analyse de la teneur en métaux des nécroses. Les concentrations globales, en éléments métalliques, sont peu différentes entre les poissons sains* et les poissons nécrosés, (VANDORPE, 1976).

Il existe néanmoins des zones d'accumulation au sein des lésions. Un examen plus complet à la microsonde, a permis d'observer une disposition assez régulière des métaux (Cd, Pb, Cr, Ni, Mn) dans les nécroses, sous forme d'amas de 6 µ, les concentrations les plus fortes ont été décelées lors de la phase granulomateuse.

L'origine des métaux dans ces lésions est difficile à préciser. Ils peuvent provenir de macrophages, qui sont responsables de l'élimination et de la rétention des déchets métaboliques, la concentration en métaux y étant très importante, ou d'inclusions anhistes localisées dans le

* Un poisson sain est un animal ne montrant pas de lésions lors de l'examen macroscopique effectué au cours de la collecte.

tissu granulomateux (apport de substances exogènes).

5.3.2. "Fin Rot Disease" ou maladie érosive des nageoires

On distingue deux stades :

- érosion et atrophie des éléments tégumentaires qui, en disparaissant, laissent les rayons osseux libres. Ceux ci présentent alors des distorsions et des fusions partielles accompagnées d'hémorragies.
- les éléments du squelette disparaissent, et les myotomes sont endommagés.

Cette maladie atteint souvent des poissons affaiblis, ou porteurs d'autres lésions telles que nécroses ou lymphocystis. En Mer du Nord, seuls les poissons plats sont atteints par cette maladie, alors qu'en Méditerranée, elle détériore des poissons ronds tels que le Mulet ou la Dorade (AUBERT, 1979). La recrudescence de la "Fin Rot Disease" lors du naufrage de l'Amoco Cadiz, laisse supposer une action nocive des hydrocarbures. (MARCHAND, 1981).

5.4. Les Nodules

Des morues et des flets, pêchés entre Calais et Dunkerque, présentent des affections internes sur le foie et la rate qui ont un aspect granuleux. Ces nodules peuvent former des excroissances sphériques à la surface des organes. Leur taille varie de 1 à quelques millimètres et ils sont de couleur blanchâtre. Les tissus périphériques apparaissent comme sains. (Photo 3).

L'étude de la teneur en éléments métalliques des nodules hépatiques de morue a été entreprise par SMIGIELSKI en 1978. La nature des métaux paraît être d'origine endogène (macrophages). Il est possible de détecter dans les nodules, une grande quantité d'éléments divers tels que : Ti, Fe, Zn, Cu, Cr, Ca, K, S, P, Si, N. Les métaux sont répartis de façon irrégulière, mais il existe des plages riches en éléments métalliques dans les plus gros nodules. On note surtout la présence de Ti, Cr, Zn, Ni, Cu, et une très forte calcification.

5.5. Autres affections

Elles sont nombreuses et ont été étudiées lors des campagnes océanographiques (Thalassa, Cryos, Anton Dohrn).

5.5.1. Hyperplasies et papillomes

Les hyperplasies sont constituées par des tâches blanchâtres, arrondies d'un diamètre inférieur à 4 mm. L'épiderme est épaissi et les cellules muqueuses disparaissent.

Les papillomes ont l'aspect de saillies infiltrées par des micro-hémorragies (observations personnelles, Campagne Anton Dohrn, 1984).

Les limandes dans le golfe allemand de la mer du Nord sont très atteintes par cette lésion. WELLINGS, en 1976, signale cette maladie sur de nombreux poissons plats dans les zones polluées ou non du Puget Sound. Toutefois il n'existerait pas de relation directe entre la pollution et la présence de poissons lésés.

5.5.2. Les déformations du squelette

Ces atteintes sont de deux types :

- . atteinte de la tête du poisson, généralement des poissons ronds, atteinte de la machoire et des opercules.
- . atteinte de la colonne vertébrale par lordose ou scoliose, ou compression de la colonne.

Deux spécimens, une morue et un hareng ont été récoltés au Nord de la Baie de Seine à bord du CRYOS (RICHARD, 1983). (Photo 4).

5.5.3. Affections internes

- . affection des branchies : elles ont une consistance flasque, et sont recouvertes d'un enduit muqueux abondant qui inhibe les échanges gazeux (Anton Dohrn, 1984).
- . Tumeurs sur les pseudobranchies (Anton Dohrn, 1984)
- . Affections dues à des micro organismes : CHRISTENSEN a montré, lors de la campagne Thalassa, que la presque totalité des maquereaux étaient contaminés par un protozoaire *Ichtyophonus hoferi*. Cette maladie est responsable de la baisse du stock de hareng en Mer du Nord tous les 6 ans (40 %), et de 55 % pour les flets au Nord de l'Ecosse. (Campagne MAPPIC, MAGGI et al., 1981).

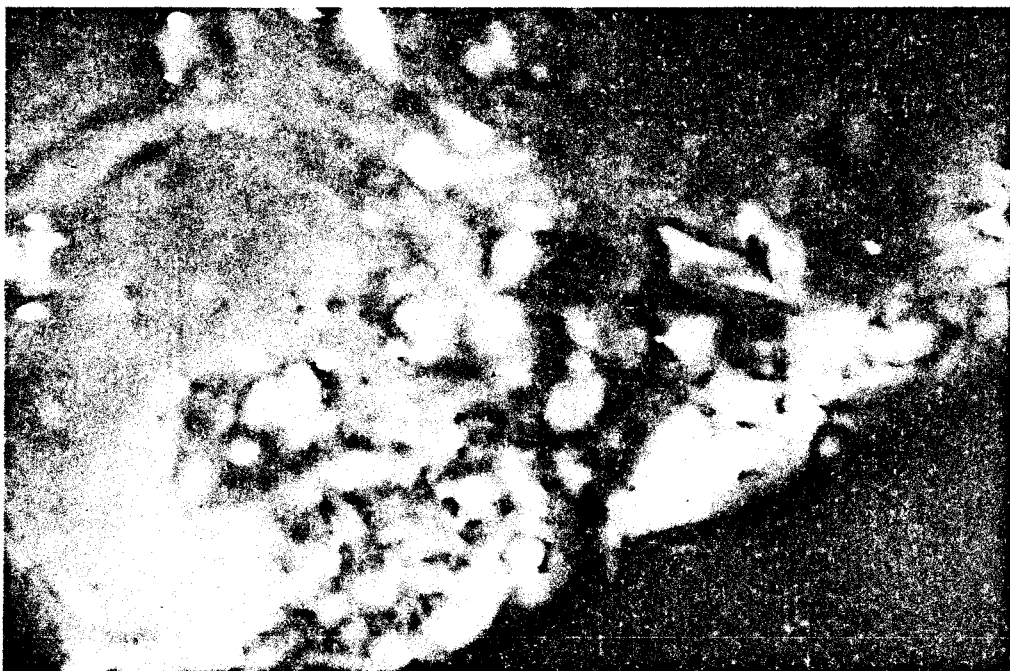


PHOTO 3 : Nodules sur le foie d'une morue.

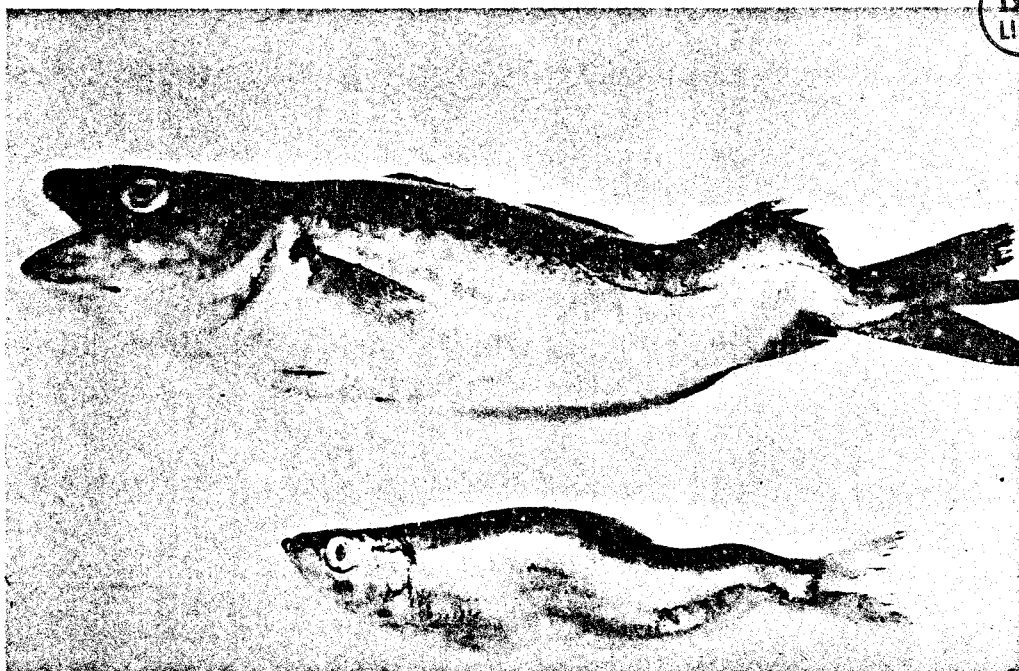


PHOTO 4 : Déformations du squelette chez la morue et le hareng.

Les flets et les limandes sont également infectés par la microsporidie *Clugea* sp.

Une autre affection due à un protozoaire inconnu a été répertoriée lors de la campagne ELPMM. Elle touche environ 40 % des maquereaux et 9 % des morues (ALDERMANN et al. - Campagne MAPPIC, 1981).

5.5.4. Ectoparasites

Les ectoparasites n'entraînent pas de lésion au poisson. Il est intéressant de noter la présence de *Lernaeocera branchialis* sur les branchies et les corps de la plupart des tacauds et de *Lepeophtheirus pectoralis* sur les poissons plats. Ces plaies que peuvent causer les parasites prennent parfois l'aspect de nécroses dermiques commençantes (NEWELL, 1979). Leur interprétation est ainsi rendue plus difficile.

5.5.5. Analyse des perturbations internes

- Taux de Ca dans le sang
- Etude des corpuscules de Stannius qui secrètent une hormone hypocalcémisante favorisant le flux de sortie branchial du calcium. La dégénérescence des corpuscules de Stannius coïncide avec des calcifications rénales. LOPEZ et al., 1984 ont observé une modification des lithiases calciques dans le cas de poissons atteints de lésions tégumentaires. (in MARTOJA, 1984)
- Etude des différentes bactéries. Les bactéries hétérotrophes semblent concourir activement au développement des nécroses chez les poissons marins. Des contaminations expérimentales réalisées en 1974 par SNIESKO avec *Vibrio anguillarum* (in AUBERT, 1979) ont entraîné des ulcérations précédées par de petites lésions à la base des écailles ainsi que des ecchymoses.

5.6. Localisation anatomique des lésions

On peut reprendre le bilan établi par DELVAL et al., 1982. Il n'existe pas de dispositions préférentielles dans la répartition des lésions, mais la face aveugle des poissons plats semble plus touchée que la face zénithale. Seuls ces poissons sont atteints par la maladie érosive des nageoires en Mer-du-Nord. Le flet présente de nombreux kystes

de lymphocystis avec une prédominance au niveau de l'anus et des nageoires caudales et anales. Cette maladie n'est jamais associée aux nécroses.

Les nodules internes sont plus fréquents chez les poissons ronds en particulier la morue. Seuls les poissons ronds sont atteints de nécroses au niveau de la tête.

VI - CAMPAGNES Océanographiques

Les prélèvements des différentes équipes participant à l'étude des ulcérations des poissons et des mammifères marins, ne sont pas nécessairement superposés dans le temps et l'espace. Afin de prospecter toute l'étendue de la zone et d'homogénéiser les chalutages, le CNEXO a mis en oeuvre deux campagnes océanographiques le long de la façade maritime Manche - Mer du Nord.

- Navire Océanographique "THALASSA"

La première a été effectuée par la "Thalassa", du 13/10/81 au 2/11/81 entre Brest et Dunkerque (campagne MAPPIC - MAGGI, 1981)

- Navire Océanographique "CRYOS"

La seconde, à bord du N/O "Cryos", du 11/06/82 au 21/06/82, dans la zone littorale de la Manche orientale (Baie de Seine) jusqu'au Sud de la Mer du Nord (Calais, Dunkerque, Frontière Belge).

Deux objectifs conditionnaient cette mission :

- compléter l'inventaire qualitatif et quantitatif des maladies chez les poissons d'intérêt économique, et effectuer une collecte plus sélective afin de déterminer les conditions dans lesquelles ces espèces pouvaient être utilisées comme indicateur biologique de la qualité du milieu marin.
- définir l'état du milieu environnant les espèces les plus affectées, par des prélèvements d'eau, de sédiments, de substances alimentaires dissoutes ou non ; afin de déterminer les polluants organiques ou métalliques, les bactéries, virus et champignons.

Résultats de la campagne "CRYOS"

Elle s'est déroulée du 11/06 au 22/06/82, et a couvert une étendue de côte importante, allant de la Baie de Seine au Nord d'Ostende.

Les figures 3 I, II, III et IV, représentent l'ensemble de la zone prospectée et les traits de chalutages. Seuls ceux effectués près des côtes et à proximité des centres urbains et industriels, comportaient des poissons nécrosés, exceptée la zone IV (Baie de Somme - Hardelot). Au cours de cette campagne, 101 poissons lésés ont été capturés. Ils se répartissent ainsi :

- 99 poissons plats, Flets, Carrelets, Limandes.
- 2 poissons ronds, 1 morue et 1 hareng.

Nous avons regroupé dans le tableau n° 3 la répartition par espèce et par zone. En ne retenant que les poissons plats, le flet est le poisson le plus touché et représente toujours plus de 70 % de l'effectif total de poissons lésés. Les différences de prises de poissons malades ne varient pas significativement pour chaque espèce entre les trois zones. Les comparaisons par espèce et par zone ne sont pas significatives, exceptées pour la zone 2I, où le pourcentage pondéral de flets nécrosés diffère significativement de celui des limandes.

La colonne 6 indique le pourcentage pondéral de poissons nécrosés par rapport au total de pêche de la zone. Les zones II et III diffèrent significativement de la première, mais non entre elles. Par conséquent, elles comportent plus de poissons malades en cette période de l'année que la zone du Havre.

CONCLUSION

La campagne "CRYOS" semble confirmer une partie des hypothèses émises quant aux causes des nécroses.

Les poissons malades ont été pêchés uniquement en eaux côtières, sur des fonds de moins de 30 mètres, près de zones à fortes activités industrielles et urbaines. Les poissons plats et plus particulièrement le flet, sont les plus touchés sur notre littoral.

Si les maladies des poissons peuvent être induites par de nombreux facteurs, (champignons, protozoaires, virus, facteurs génétiques...), il semble que les polluants tiennent une part non négligeable dans le genèse des ulcérations.

TABLEAU 3 : REPARTITION PAR ESPECE ET PAR ZONE DES POISSONS NECROSES RECOLTES LORS
DE LA CAMPAGNE DU N/O CRYOS

	Espèces	Tonnage	Pourcentage de l'espèce	Nombre de poissons nécrosés	Pourcentage du nombre de poissons nécrosés par rapport au nombre total	Pourcentage du poids des poissons nécrosés par rapport à l'espèce	Pourcentage du poids des poissons nécrosés par rapport au poids total de la pêche
Zone 1 Le Havre (côte)	Flets (<i>Platichthys flesus</i>)	15,6	1,38	11	73,3	10,57	0,19
	Limandes (<i>Limanda limanda</i>)	56,3	4,89	4	26,6	1,06	
	Carrelets (<i>Pleuronectes platessa</i>)	35,9	3,18	-	-	-	
Zone 2 Dunkerque Gravelines (côte)	Flets	147,65	19,45	40	74	7,24	1,8
	Limandes	162,5	21,40	5	9,2	0,40	
	Carrelets	73,8	9,72	9	16,6	2,44	
Zone 3 Belgique Nord d'Ostende	Flets	62,5	11,71	26	83,87	16,64	2,1
	Limandes	22,1	4,14	1	3,2	0,68	
	Carrelets	8,7	1,63	2	6,4	9,2	

Comparaisons des pourcentages :
Fréquence théorique :

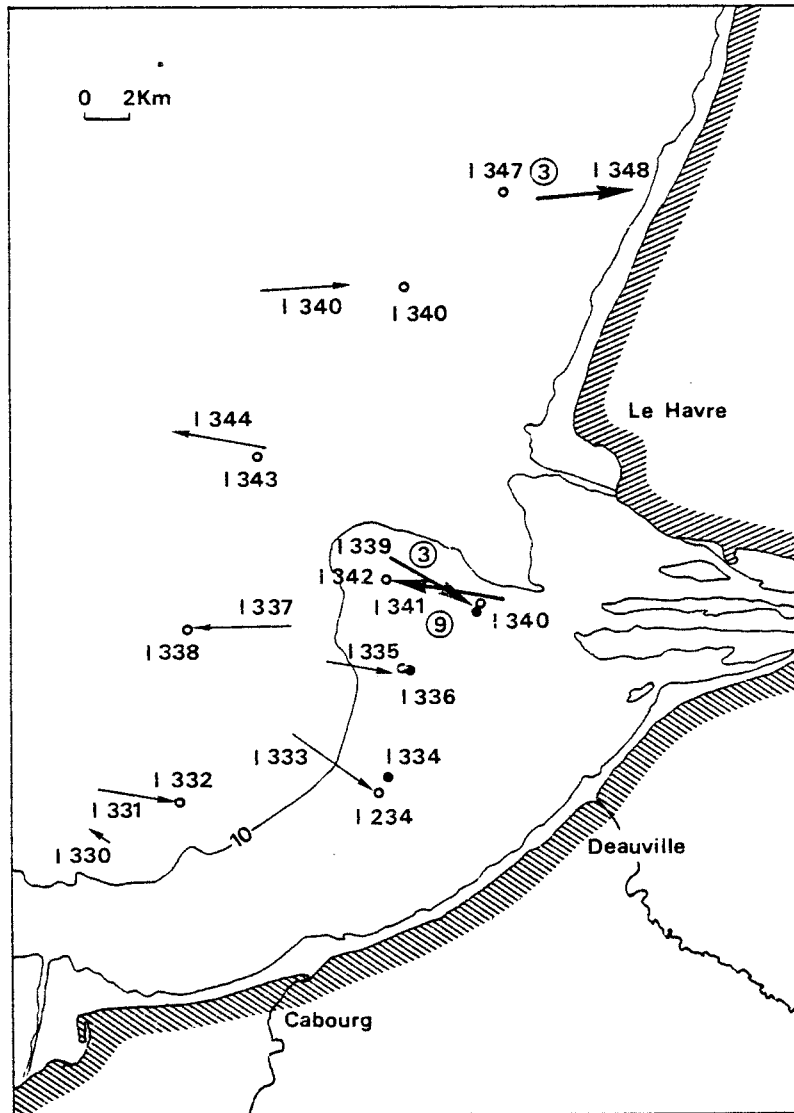
$$F = \frac{N1 F1 + N2 F2}{N1 + N2}$$

F1 : Fréquence d'effectif N1
F2 : Fréquence d'effectif N2

test : $\frac{F1 - F2}{\sqrt{\dots}}$

Fig. 3 : Localisation des chalutages, stations d'hydrologie et de molysmologie lors de la campagne CRYOS

Fig. 3 I : Baie de Seine (carte n: 6614D) SHOM



- Station hydrologie
- Station de molysmologie
- Traits de chalut
- ➔ Traits de chalut à nécroses
- ⊗ Nombre de poissons nécrosés

Fig. 3 II : Baie de Somme - Hardelot (carte n° L 2148) SHOM)

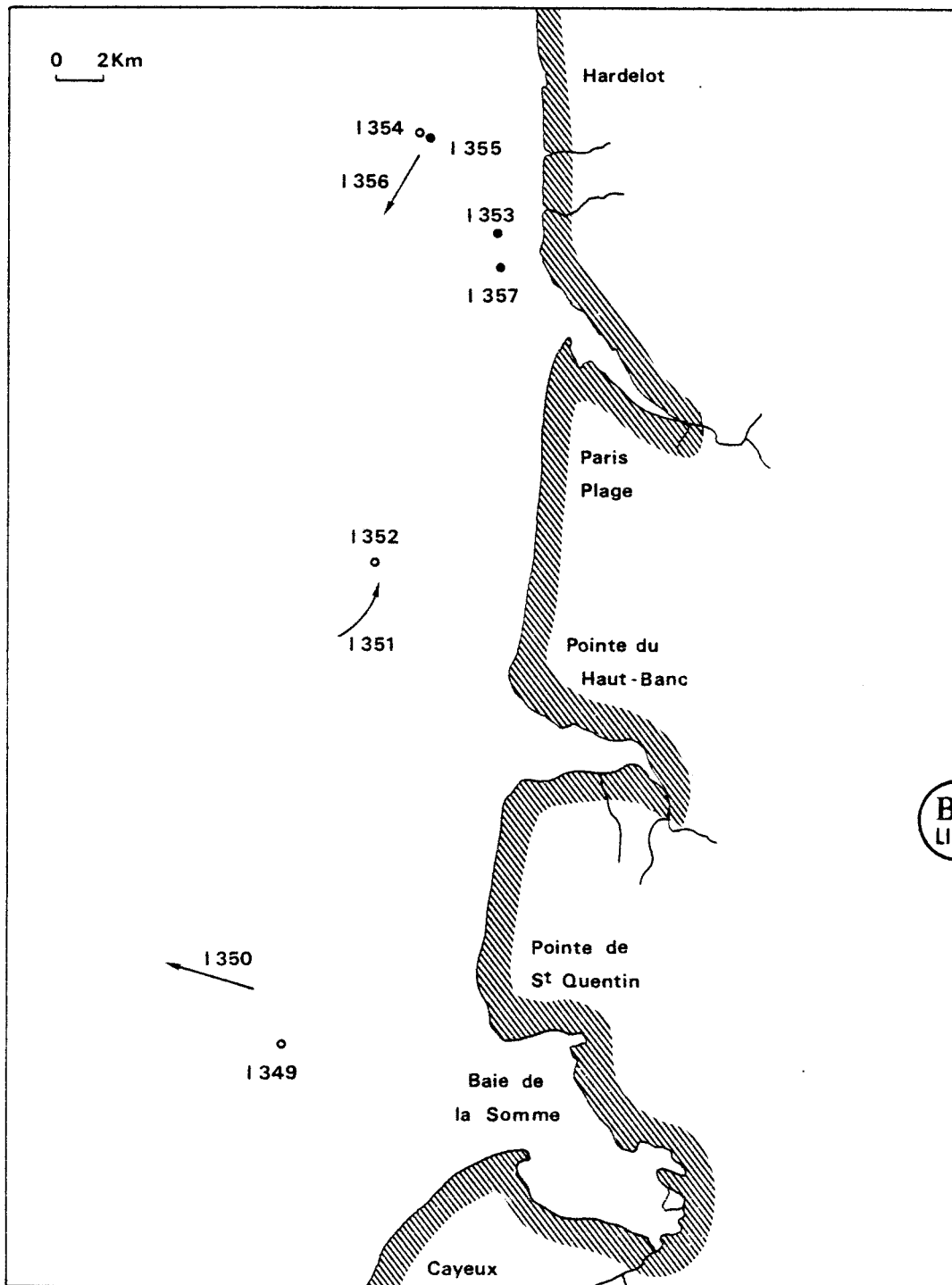


Fig. 3 III : Littoral de Calais à Dunkerque
(Carte n° L . D5 . 323) Hydrographic office)

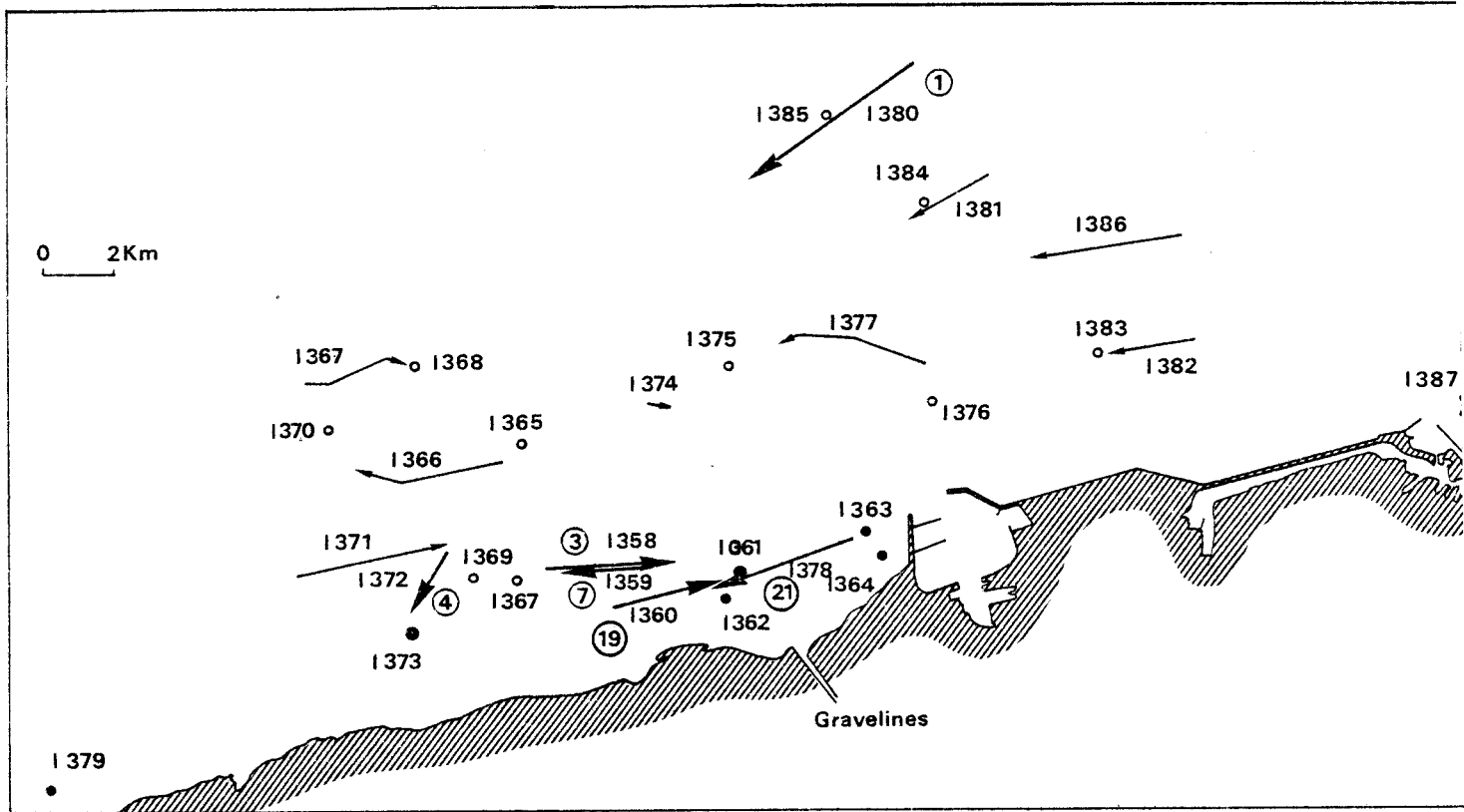
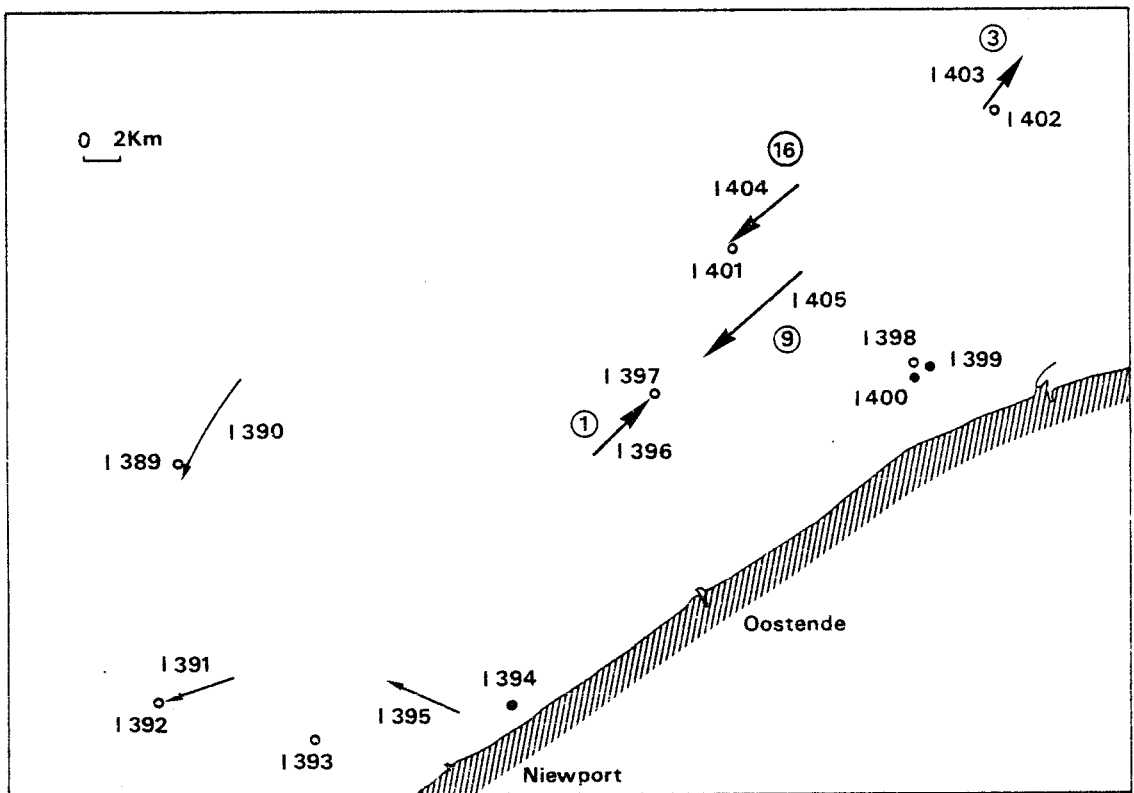


Fig. 3 IV : Littoral belge (carte n° 6735 D) SHOM)



En effet :

- la superposition des zones de pêche et celles des rejets des déchets industriels et urbains.
- l'action corrosive des substances toxiques présentes dans le milieu sur le mucus protecteur des poissons.
- la prolifération importante de bactéries dans tout milieu pollué,

semblent confirmer cette hypothèse.

La nature de ces polluants étant très variée, nous avons, pour notre étude, limité nos investigations aux métaux lourds, qui forment une partie importante des rejets industriels, et restreint, pour des raisons pratiques, notre zone de prospection au littoral compris entre Calais et Dunkerque.

CHAPITRE II

METAUX LOURDS : REPARTITION SUR LE LITTORAL
DE LA MER DU NORD ET TOXICITE

CHAPITRE II

METAUX LOURDS : REPARTITION SUR LE LITTORAL DE LA MER DU NORD ET TOXICITE

La pollution du milieu marin peut être due à des causes variées que GAUTHIER en 1976 a classé en cinq catégories :

- Pollution thermique

Elle est due aux rejets des centrales qui modifient la température et agissent sur le taux d'oxygène dissous du milieu. Elle induit ainsi un stress sur les organismes vivants.

- Pollution minérale et organique

Les matières en suspension et les matières oxydables (dues aux rejets urbains et industriels comme les papeteries ou les usines agro-alimentaires) vont se fixer sur les branchies des animaux et le tégument et les mènent à l'asphyxie.

- Pollution radioactive

- Pollution microbienne

Elle est due aux rejets urbains. Les germes ne sont pas pathogènes mais ils laissent présager la présence de bactéries pathogènes ou de virus dès que leur concentration est importante.

- Pollution chimique

Elle est due aux rejets industriels et agricoles. Certains éléments, tels que les hydrocarbures, les pesticides, ou les détergents, peuvent être détruits par les organismes marins, alors que d'autres sont rémanents (métaux lourds, organochlorés...). Leur toxicité augmente alors avec leur teneur dans le milieu.

Les résultats antérieurs (ADELFA, CNEXO...) semblent considérer ce type de pollution comme susceptible de provoquer ou de favoriser le développement des nécroses de poissons. Nous envisagerons donc dans ce deuxième chapitre, l'étude de la répartition et de l'origine des différents métaux lourds sur le littoral de Calais à Dunkerque au sein des trois compartiments du milieu marin (eau, sédiments, matière vivante) et de leur toxicité.

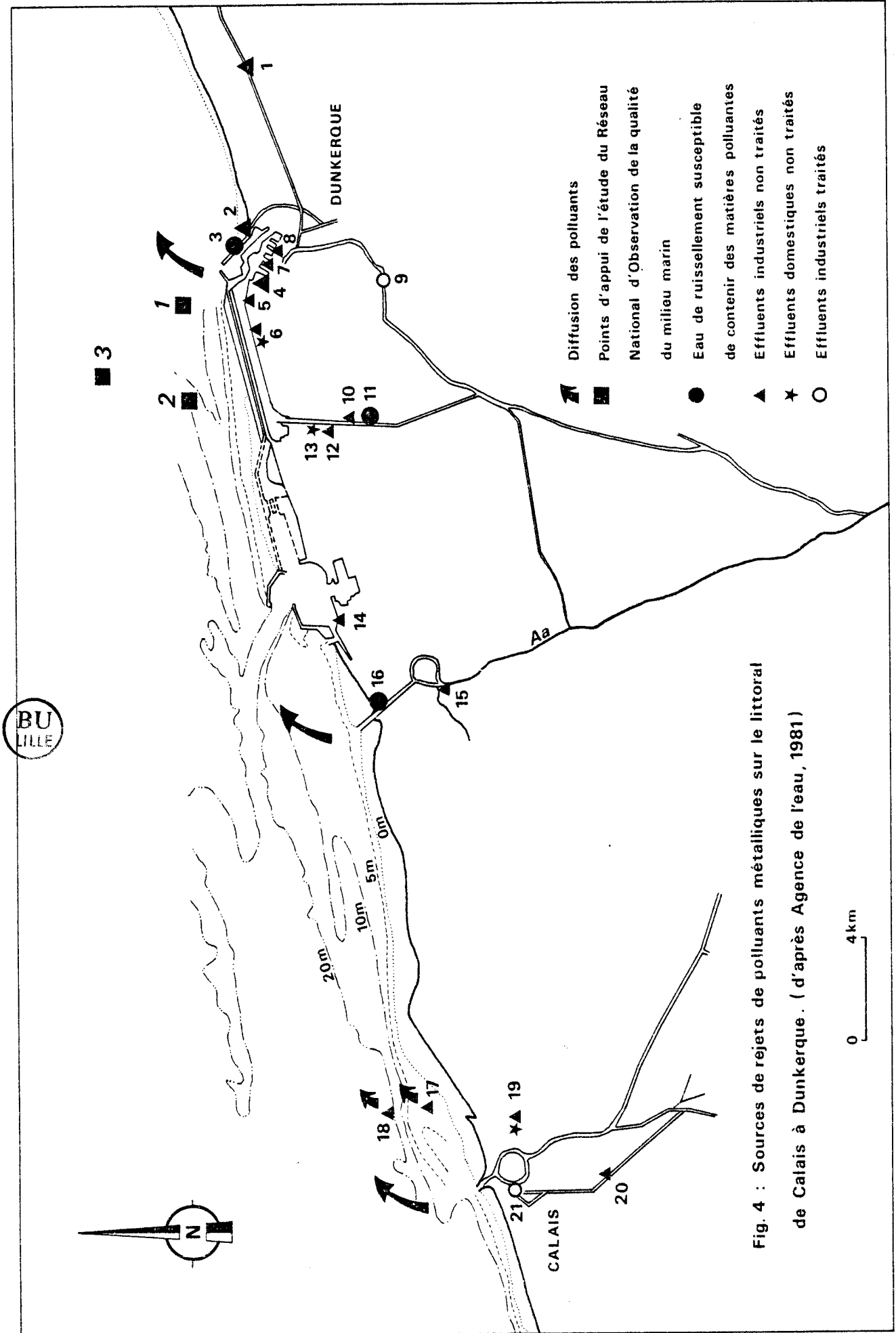


Fig. 4 : Sources de rejets de polluants métalliques sur le littoral de Calais à Dunkerque. (d'après Agence de l'eau, 1981)

I - ETAT DES REJETS SUR LE LITTORAL DE CALAIS A DUNKERQUE

Le bilan et l'analyse, publiés en 1981 par l'agence de l'eau, de l'état de la pollution dans le bassin Artois-Picardie, et de l'efficacité des émissaires en mer, tient compte de trois types de rejets :

- rejets d'eaux usées
- rejets d'eaux pluviales
- rejets d'eaux industrielles

C'est cette troisième catégorie qui est susceptible de contenir des micropolluants toxiques. La localisation des entreprises responsables de ces rejets est représentée figure 4.

Trois secteurs industriels sont prépondérants sur le littoral : la métallurgie, la chimie et la raffinerie.

Bien que l'hydrodynamisme de la Mer du Nord assure une dispersion, vers le Nord-Est, et une dilution des rejets industriels (RICHARD et coll., 1978), les concentrations en polluants sont souvent très importantes, selon les secteurs d'activités.

1.1. Métallurgie

Ce secteur est représenté à Dunkerque par les deux usines USINOR et CREUSOT-LOIRE. Les rejets proviennent surtout des lamineurs à froid et de la métallurgie du plomb et du zinc. Ces deux métaux ainsi que le cadmium et le plomb sont présents dans les effluents à des teneurs variant de 1 à 15 mg/l. LÅRSSON, en 1976 a montré qu'une teneur de 10 mg/l de cadmium dans l'eau de mer provoquait une réduction de 10,3 % de la concentration en hémoglobine chez les poissons (cf. Chapitre II : toxicité des métaux lourds).

1.2. Le secteur chimie

Plus de 70 % de la pollution chimique toxique est due aux rejets de l'usine Tioxyde de Calais (3 091 K Eq. tox/jour)(cf annexe 2)*. cette usine a produit 67 000 tonnes de dioxyde de titane. Elle a donc rejeté 469 000 t d'eaux acides, ce qui correspond à 118 858 t d'acide sulfurique, 9045 t de Fe, 1876 t de Al, 1 474 t de Ti, 328 t de V, 67 t de Cr,

* L'équivalent toxique est une unité de toxicité basée sur la mobilité des Daphnies dans un milieu pollué. D'après la norme AFNOR T 90 301 (avril 1974) les teneurs normales en équivalent toxique sont de 10 à 300. (Communication personnelle de Mr DURNET, Agence de l'eau).

TABLEAU 4 : ESTIMATION DES REJETS POLLUANTS SUR LE LITTORAL FRANCAIS DE LA MER DU NORD EN 1976

(d'après MERTENS J.L. et F. FRUDHON - 1976)



Zones de rejets	Estimation des débits moyens (m ³ /jour) Oct. 76	Charges journalières (Estimation des moyennes en Kg/jour)										
		Hydrocarbures totaux	Phénols	Pesticides organochlorés	Métaux							
					Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Ti	Va	Zn
Port de Calais + Rejets industriels	449 503 + 6 909	458,2	16,5	0,06	274	6,4	27014	396	71	1767	1539	313
Port de Gravelines (Aa)	357 671	403	9	0,02	0	0,1	66	8	5	-	-	11
Port de Dunkerque	300 647	644	3,5	0,02	17,7	9,8	123	54	263	-	-	103
TOTAUX (rejets moyens journaliers)	1 114 730	1 505	29	0,1	292	16,3	27203	458	339	*1767	*1539	427

* Ces valeurs ne tiennent compte que des rejets industriels de la Zone de Calais.

134 t de Mn, 18 t de Zn, 2,7 t de Ni, 603 kg de Pb, 13,4 kg de Cd et 469 kg de Sn. Les métaux toxiques cumulables (Cd, Pb, Hg) sont rejetés à moins de 1 kg/jour. Du Cr sous forme de Cr⁶⁺ est également rejeté par l'usine de traitement des textiles COURTAULD (NOEL et al., 1980).

1.3. Raffineries

Elles sont regroupées dans la région de Dunkerque, leurs rejets sont principalement constitués d'hydrocarbures biodégradables.

1.4. Autres industries

Des éléments toxiques sont également rejetés par les papeteries, cartonneries et les égouts, ces derniers amenant au milieu marin, les déchets des petites entreprises.

Toutefois, les effluents toxiques de ces industries ne provoquent d'actions néfastes qu'à long terme, par l'accumulation de produits minéraux ou non dégradables. Dans de telles conditions, SPRAGUE n'a observé des réactions de fuite chez le saumon, qu'à l'approche des doses létales (DONNIER, 1972).

1.5. Bilan

Une estimation des rejets polluants a été entreprise sur le littoral français de la Mer du Nord en 1976 par le S.E.C.A.D.U. (Syndicat mixte d'études pour l'aménagement du littoral Calais-Dunkerque - Tableau 4).

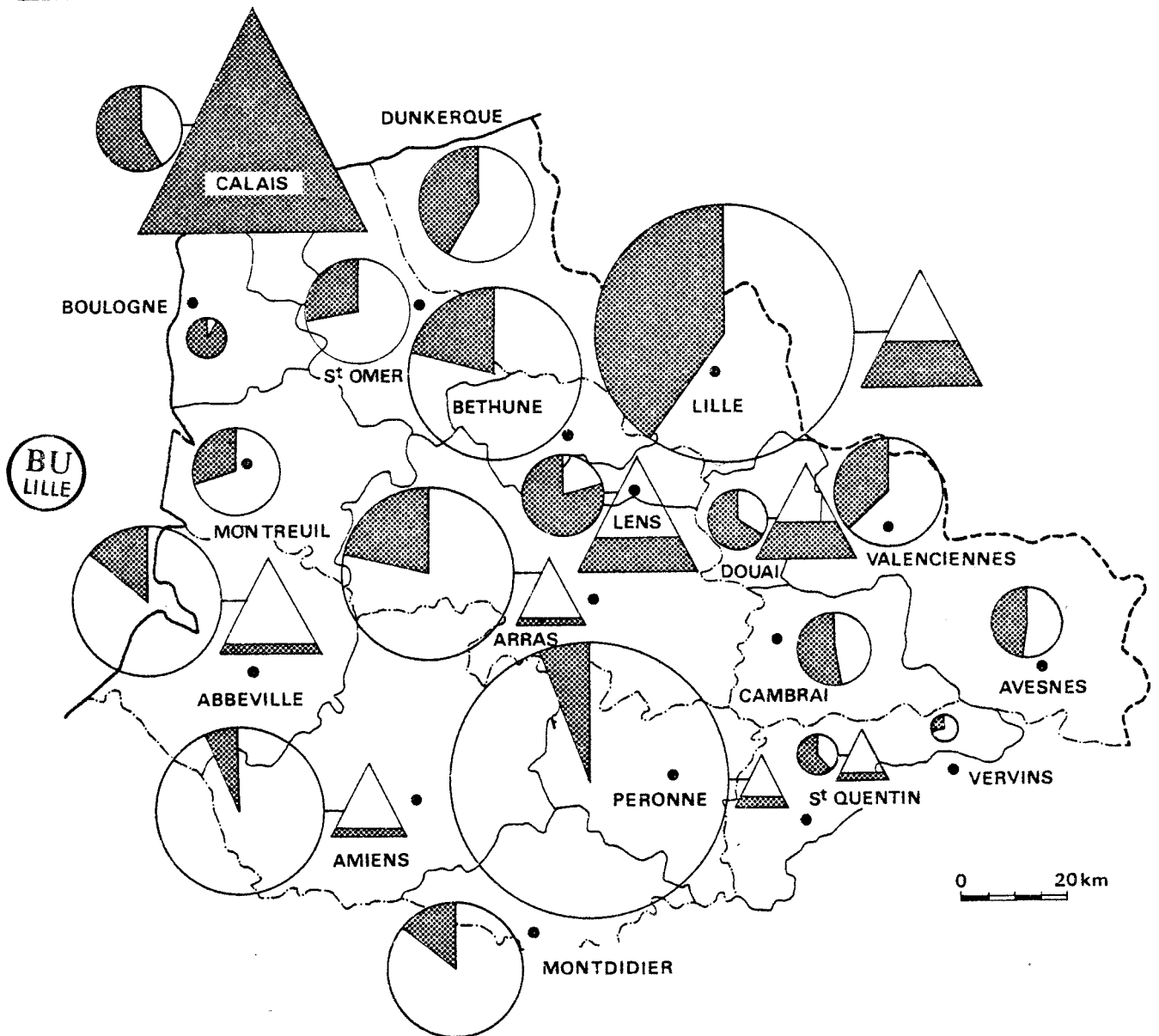
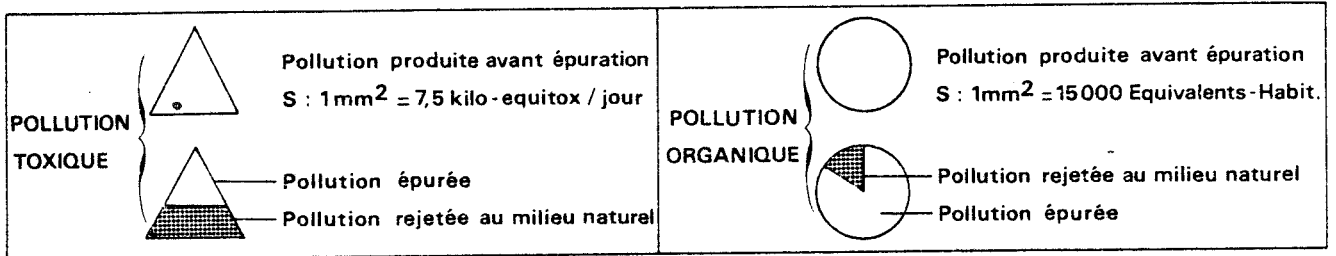
L'essentiel des rejets des métaux lourds provient de Calais, l'Aa et le port de Dunkerque rejetant beaucoup d'hydrocarbures. Pour ces deux zones les teneurs en métaux sont très inférieures à la première. Bien que des installations de traitement et d'épuration des déchets aient été prévues en 1979, les effluents industriels sont toujours rejetés directement dans le milieu marin (Fig. 5).

Du fait du pas de marée et de la dérive (N.E.) de la masse d'eau sur notre littoral, les produits issus des émissaires et des égouts sont entraînés vers Gravelines. C'est donc la zone comprise entre Calais et cette ville qui sera la plus touchée.

* Je remercie Katia Kanas de Greenpeace pour m'avoir fourni ces données obtenues auprès de la D.R.I.R. de Douai.

Fig. 5 : Répartition géographique des pollutions par arrondissement en 1979

(NOEL , 1980)



Le littoral de Hardelot à Equihen est pratiquement dépourvu d'industries. Seule, la zone d'Outreau sur le littoral Boulonnais constitue une zone polluée par les rejets industriels de la S.F.P.O. (Société des Ferro-manganèses PARIS - OUTREAU).

1.6. Conclusion

L'essentiel de la pollution par métaux lourds, sur le littoral Nord - Pas-de-Calais, provient de Calais.

Du fait de l'hydrodynamisme de la Mer du Nord, nous situerons notre zone de prospection entre Calais et Gravelines, partie du littoral la plus concernée par les rejets industriels.

Nous prendrons comme référence, la zone de St Valéry à Equihen, dépourvue de grosses industries, apparaissant donc comme plus "saine".

II - TENEURS EN METAUX LOURDS DANS L'EAU DE MER

2.1. Comparaison des différentes façades du littoral français par leur teneur en métaux lourds

Dans le cadre du Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin (R.N.O.) des analyses ont été effectuées sur les teneurs en métaux lourds dissous, sur 8 zones du littoral français, divisées en zones côtières et large. La façade Nord - Pas-de-Calais est représentée par Dunkerque.

En 1977, les différents sites ont été recensés selon leur teneur en métaux lourds (Fig. 6). Dunkerque se classe en deuxième zone pour le zinc et le plomb et troisième zone pour le cadmium et le cuivre (Publication du R.N.O., 1978). Grâce aux données recueillies par le R.N.O., nous avons effectué une comparaison des différents sites pour la période de 1978 à 1980. La façade n° 1, représentée par Dunkerque, possède la plus forte teneur en plomb, la deuxième en zinc, la troisième en cadmium et la quatrième en cuivre. Ces teneurs dépassent le seuil de risques de toxicité pour le Zn, le Cd (Fig. 7) (Water quality criteria in C.I.P.L.I.N.O.R., 1979).

Cependant, pour nuancer ce bilan, il faut remarquer que les teneurs relevées dans les eaux côtières se situent dans la partie inférieure des plages de variations des eaux côtières d'Europe (Tableau 5).

Fig. 6 : Teneurs en métaux lourds dissous en différents points du littoral français (publication du R.N.O. 1978)

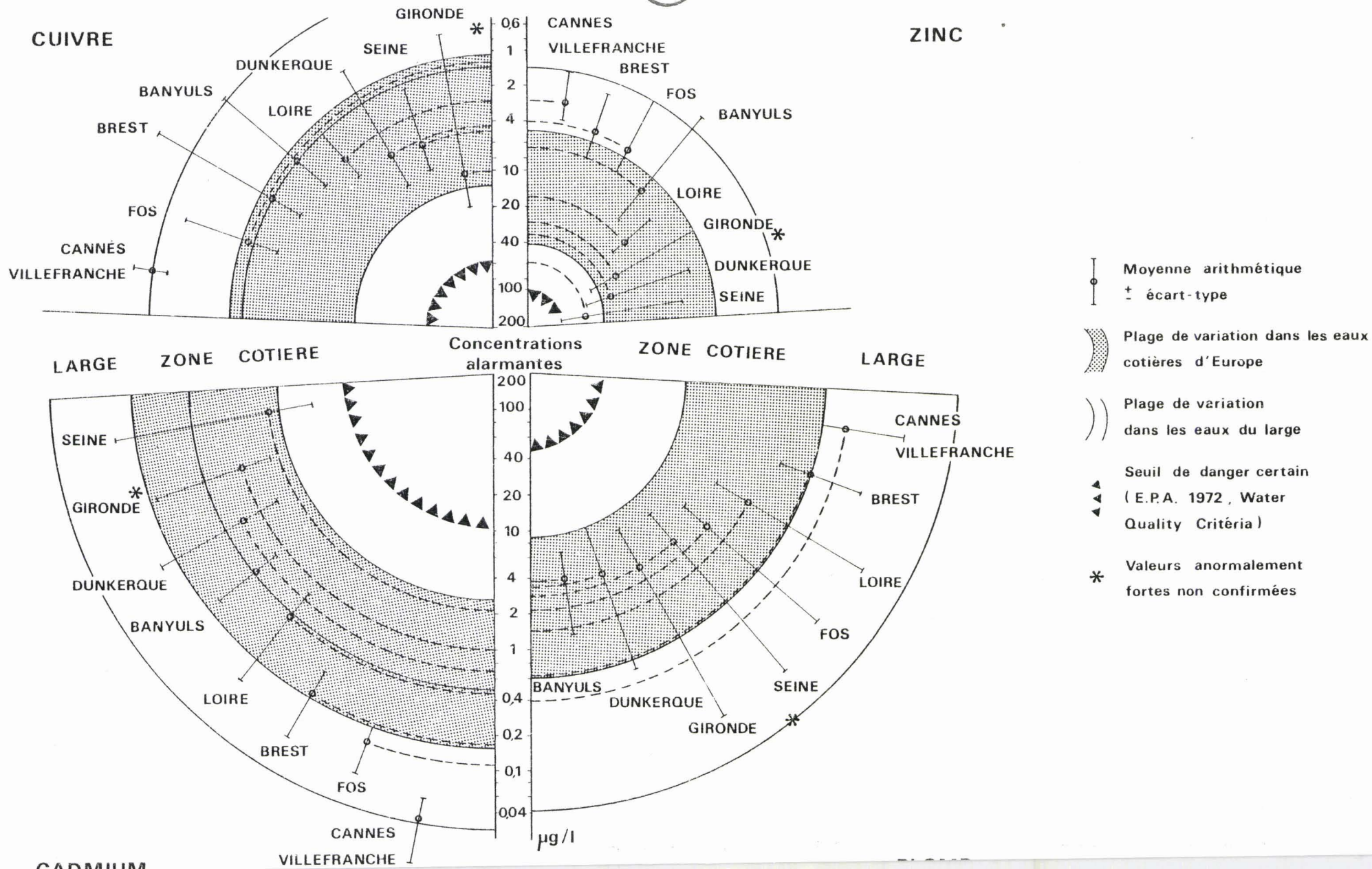


Fig. 7 : Teneurs en métaux lourds dissous en différents points du littoral français en 1980 (eaux côtières)

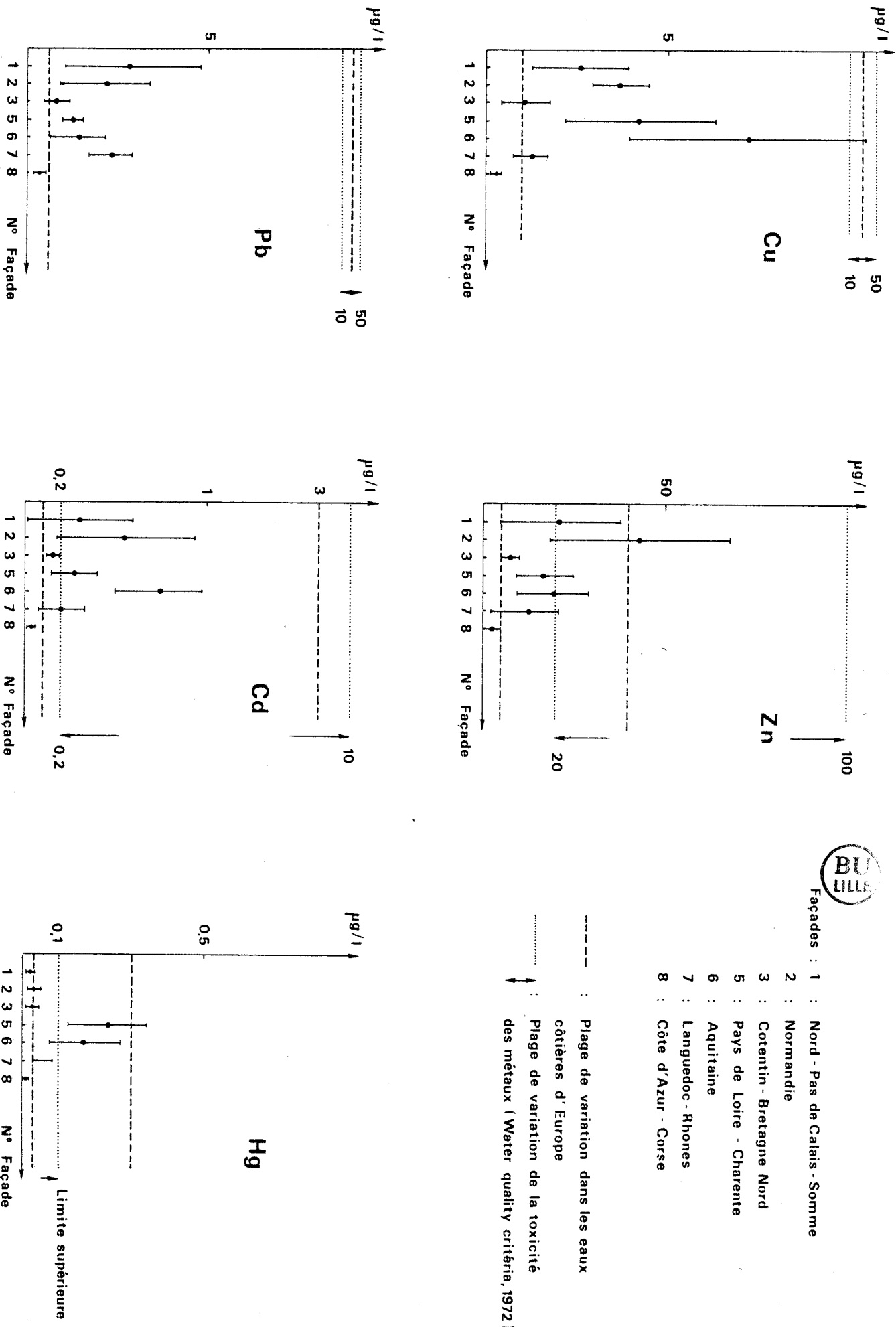


Tableau 5 : Teneur en métaux de l'eau de mer de Dunkerque comparée aux valeurs de l'Europe

	EAUX COTIERES "littoral"		EAUX COTIERES "large"	
	Europe	Dunkerque	Europe	Dunkerque
	(1)	(2)	(1)	(2)
Hg (ppt)	30-300	20	1-50	35
Zn (ppb)	5-40	15	1,5-7,0	25
Pb (ppb)	0,6-10	0,1	0,04-0,8	0,2
Cu (ppb)	1,0-15	2	0,1-1,5	2
Cd (ppb)	0,1-3	0,2	0,02-0,5	0,4

- (1) Plages de variation déduites de la bibliographie des eaux côtières d'Europe (eau filtrée à 0,45 μ).
- (2) Teneurs moyennes (Bilan des mesures du R.N.O. de 1975 à 1979).

Mais celles estimées pour la zone "large" se situent ou dépassent la moyenne des fourchettes pour l'Europe. Elles sont très supérieures pour le Cu et le Zn.

2.2. Evaluation de la teneur en polluants de la station numéro 1 du R.N.O. à Dunkerque

La station n° 1 est la station la plus côtière sur le site du Nord - Pas-de-Calais - Somme. Depuis 1976, il apparaît une baisse du taux de cadmium, de cuivre, de fer et de zinc dans l'eau de mer. (Tableau 6). On observe, au contraire une augmentation de la teneur en mercure et en plomb. Cette augmentation est inquiétante du fait de leur toxicité. Le seuil de danger donné par le Comité de protection de la vie aquatique est presque atteint (Fig. 7).

2.3. Comparaison de la teneur en éléments métalliques en divers points du littoral de la Mer du Nord

Le R.N.O. n'effectuant pas de prélèvements sur la côte entre Calais et Dunkerque, il est difficile de comparer ces deux sites dans le temps. Toutefois plusieurs études ont été entreprises en 1975, 1976 et 1978 sur le littoral français et belge permettant une comparaison pour cette période.

TABLEAU 6 : TENEUR EN POLLUANTS METALLIQUES A DUNKERQUE
(Station 1 du R.N.O.)

µg/l	1976			1977			1978			1981			1982		
	m	\bar{m}	M (1)	m	\bar{m}	M (2)	m	\bar{m}	M (3)	m	\bar{m}	M (4)	m	\bar{m}	M (5)
Cd	< 0,50	< 0,64	1,00	< 0,20	< 0,59	1,70	< 0,10	< 0,30	0,90	0,05	0,08	0,20	0,10	0,10	0,10
Cu	1	5,1	20	< 0,5	< 4,4	8	0,5	2,5	14	0,90	2,43	5,30	0,70	1,18	1,80
Fe	6	32,8	150	< 1	44,4	180	3	14,5	53	non mesuré		non mesuré		non mesuré	
Hg	< 0,01	< 0,07	< 0,20	< 0,02	< 0,03	0,69	< 0,02	< 0,04	0,12	0,02	0,03	0,07	0,05	0,07	0,08
Pb	0,3	< 1,52	5,00	< 0,05	< 2,71	8,50	0,8	4,35	12	0,80	2,11	6,00	0,80	1,91	3,43
Zn	6	42,5	160	3	42,9	100	5	23,8	85	2,00	6,10	9,70	3,40	6,10	7,70

m : valeur minimale \bar{m} : moyenne M : valeur maximale

- 1 : Valeurs relevées au point 1 du R.N.O. de janvier 76 à décembre 76 (Recueil des observations, campagne 1976).
- 2 : Valeurs relevées au point 1 du R.N.O. de janvier 77 à décembre 77 (Recueil des observations, campagne 1977).
- 3 : Valeurs relevées au point 1 du R.N.O. de janvier 78 à décembre 78 (Recueil des observations, campagne 1978).
- 4 : Valeurs relevées au point 1 du R.N.O. de juillet 81 à décembre 81 (Bulletin n° 18, 1982).
- 5 : Valeurs relevées au point 1 du R.N.O. de juillet 82 à décembre 82 (Bulletin n° 19, 1982).



2.3.1. Comparaison entre le site de Calais - Dunkerque et le littoral belge pour 1975-1976

Tableau 7 : Teneurs en polluants métalliques en divers points du littoral de la Mer du Nord (BOUGARD et al., 1978)

	Zone de Calais				Littoral Belge					Sortie du Port de Dunkerque 25.07.75 (AUBERT et Coll., 76)
	Port de Calais 75-76 (AUBERT et Coll., 76)			Valeur maximale (RICHARD et Coll., 78)	(BOUQUIAUX et HERMAN, 1978)		(4) Littoral			
	m	\bar{m}	M		(2) Radiale 1	(3) Radiale 2		m	\bar{m}	
Cd	0	1,7	3	0,8	0,63	1,08	0,17	0,56	1,08	1,7
Cr		44		1,5	-	-	-	-	-	50
Cu	70	77	80	85	9	11	9	12	18	370
Fe	60	64	70	710	253	354	253	420	616	50
Hg	traces			0,16	0,14	0,03	0,05	0,12	0,23	traces
Pb	22	38	45	8	7	13	7	14	19	10
Zn		-		101	42	57	40	59	85	-

(1) m : minimum ; \bar{m} : moyenne ; M : maximum, stations 1, 2, 3.

(2) valeurs à 400 m du rivage, radiale entre la Panne et Nieuport } Prélèvements

(3) valeurs à 400 m du rivage, radiale au nord-est de Nieuport } de 72 à 75

(4) valeurs à 400 m du rivage, toutes les radiales

Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g}/\text{l}$ ou ppb.



Le littoral belge paraît plus pollué par le zinc et par le plomb que la côte française. Les teneurs les plus élevées en fer, en titane et en mercure ont été relevées dans la zone de Calais.

Les teneurs en cuivre, chrome et cadmium sont très importantes à Dunkerque. Toutefois les données étant trop réduites, ces résultats ne peuvent qu'être indicatifs, et on ne peut émettre de conclusion significative quant à la teneur en métaux lourds des deux sites étudiés.

2.3.2. Comparaison entre le site de l'Aa et Dunkerque (Tableau 8)

Les teneurs en métaux lourds de l'Aa sont toujours supérieures à celles enregistrées pour la zone de Dunkerque, exceptée celle du mercure. Mais il est très important de noter que les teneurs en plomb et en cadmium atteignent des valeurs très proches des seuils de toxicité (+ 0,01 mg/l) pour le plomb, et plus de 0,2 $\mu\text{g}/\text{l}$ pour le cadmium ; et que la teneur en manganèse dépasse le seuil de tolérance (plus de 0,02 $\mu\text{g}/\text{l}$).

Tableau 8 : Comparaison de la teneur en métaux lourds de l'Aa et de la station 1 de Dunkerque en 1978

	Aa µg/l (1)	valeurs moyennes	Maximum (2)
Cd	2	< 0,30	0,90
Cr	1	-	-
Cu	40	2,5	14
Fe	130	14,5	53
Hg	0,05	< 0,04	0,12
Pb	10	4,35	12
Zn	110	23,8	85
Mn	200	-	-

1) CIPLINOR : port autonome de Dunkerque 1976 - 1978.

2) Bulletin du R.N.O. - 1978.

III - TENEURS EN METAUX DANS LES SEDIMENTS

Tableau 9 : Teneur en métaux des sédiments de Dunkerque

	Mesures de polluants Dunkerque 75/79	Milieu(*) naturel	Teneurs(*) anormales
Hg (ppb)	300	20 → 350	> 2500
Zn (ppm)	95	20 → 150	> 600
Pb (ppm)	30	10 - 70	> 500
Cu (ppm)	15	5 - 30	> 300
Cd (ppm)	0,3	0,1- 2,0	> 10

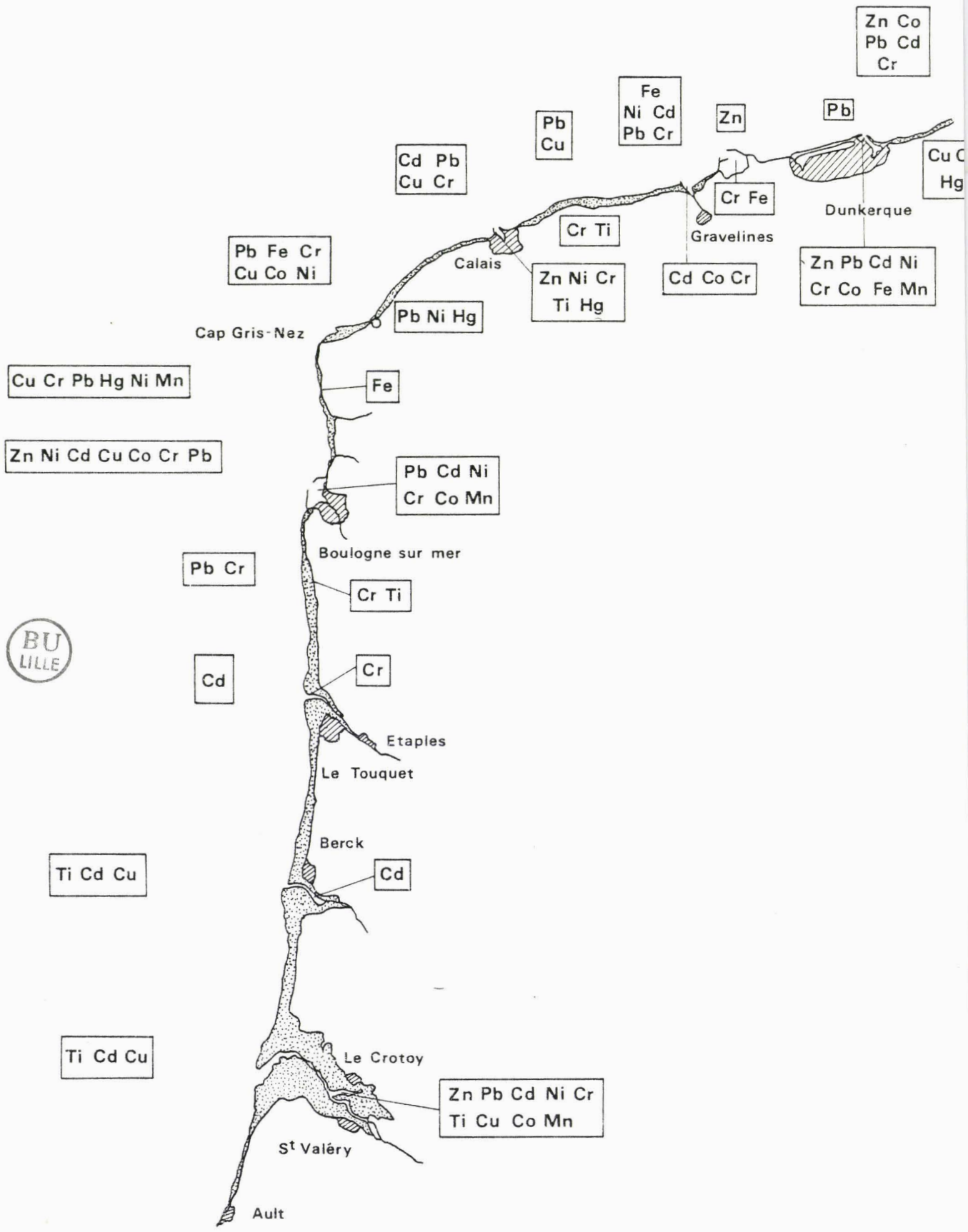
(*) Plages de variation déduites de la bibliographie (sédiments marins analysés dans la fraction fine < 65 µ) R.N.O. 75/79.

Elles sont normales sur le littoral de Dunkerque, pour le Hg, Zn, Pb, Cu, Cd, par rapport aux teneurs moyennes du littoral français.

Lors des campagnes HYDROBIOS (1980- 1982), des concentrations élevées en Cd, Zn et Cu ont été relevées au niveau des estuaires et des ports,

Fig. 8 : Principaux contaminants métalliques des sédiments

(d'après L'HOPITAULT et al ,1983)



ainsi qu'au sud de Bray-Dunes. Les études entreprises au cours de ces campagnes, ont révélé que les sédiments de l'estran de Dunkerque présentaient une forte teneur en titane, ces valeurs baissant quand on s'éloigne de la côte (L'HOPITAULT, 1980, 1983).

Comme on retrouve, au sud de Boulogne (Fig. 8) des quantités de titane très importantes, bien qu'il n'existe pas d'usine rejetant ce métal en ce point du littoral, on peut donc penser que dans le cas du titane, ces teneurs soient dues à la nature du sédiment.

La zone de Calais à Gravelines se caractérise par une contamination en Cu, Zn, Pb au large et par la présence de Hg au niveau de l'estran au nord de Calais et à la centrale E.D.F. de Dunkerque (Fig. 8). En général, les zones subtidales éloignées sont plus polluées en métaux lourds (Cd, Cr, Pb, Zn) que celles proches de l'estran. Plusieurs causes sont responsables de la teneur importante en métaux lourds de ces zones.

Les rejets industriels concentrent dans les ports et les estuaires les polluants ; dont la diversité est fonction de l'activité industrielle prépondérante. Ces zones font l'objet de travaux d'entretien périodiques, des dragages essentiellement dont les déchets sont rejetés au large, rejets qui contribuent à disperser les polluants. D'après le rapport de l'Institut Pasteur sur l'impact des dragages (in L'HOPITAULT, 1982), les vases ^{sont} réductrices ; or elles s'oxydent dans ce milieu marin et perdent alors leurs propriétés séquestrantes pour certains métaux (Cd, Zn). La résultante SW → NE des courants de marée ferait alors remonter cette pollution "déplacée", en entraînant les fractions fines.

CONCLUSION

La zone de Calais à Gravelines paraît donc être également contaminée par les métaux lourds, au niveau des sédiments. Celle comprise entre Etaples et Equihen n'étant que très faiblement polluée.

IV - TENEURS EN POLLUANTS DE LA MATIERE VIVANTE

Les caractéristiques d'un indicateur de pollution ont été définies par BITTEL en 1968.

- Ubiquité
- Stable selon les saisons
- Permanence de la localisation
- Affinité importante pour les polluants

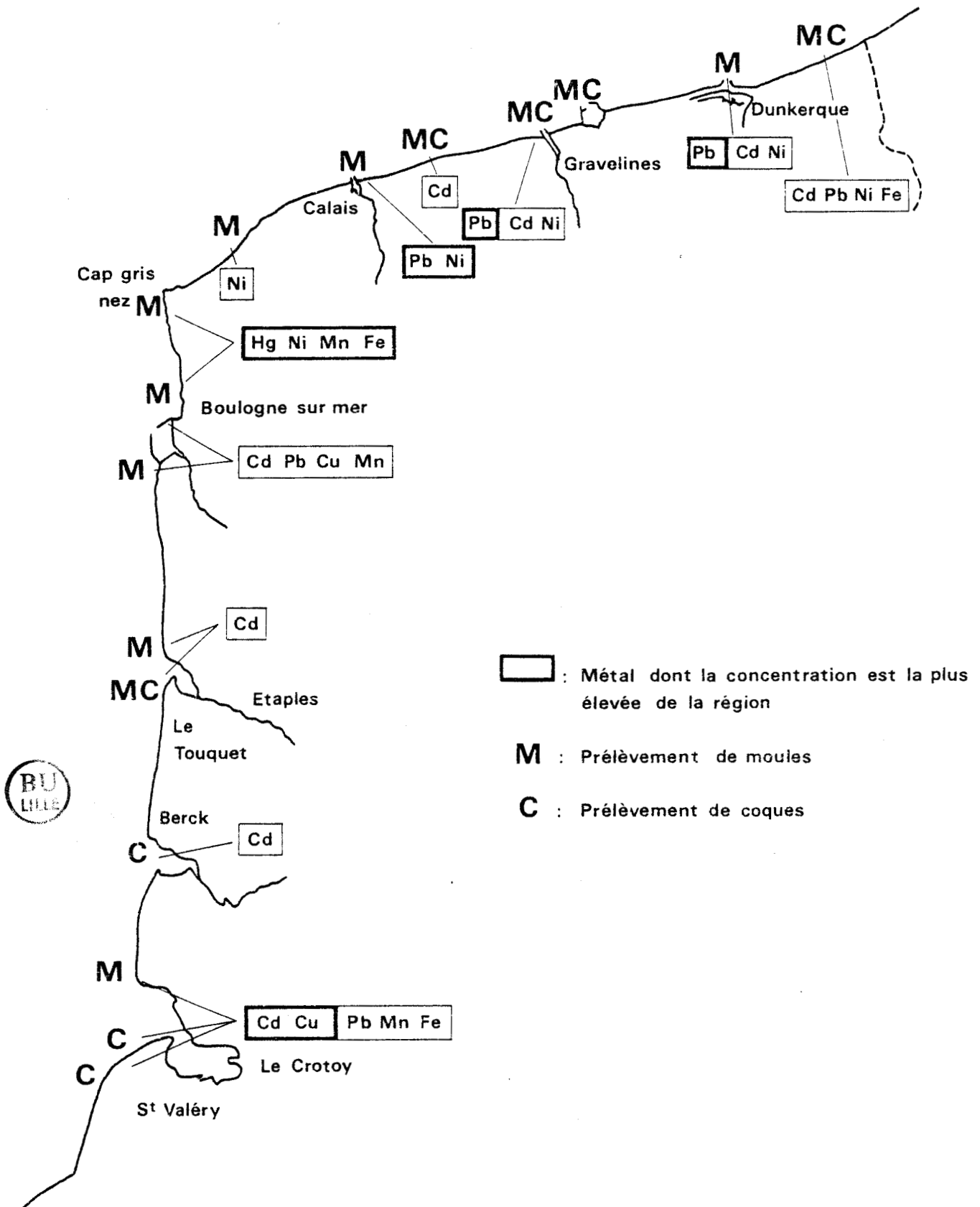


Fig. 9 : Contaminants métalliques majeurs des moules et des coques

(d'après L'HOPITAULT , 1982)

- Grand facteur de concentration
- Réaction rapide aux polluants
- Facile à prélever
- Abondance de l'espèce.

Les Mollusques (*Mytilus edulis* L. et *Cardium edule*) qui répondent à ces critères sont utilisés pour les mesures des teneurs en métaux sur le littoral de Ault à Dunkerque. Le tableau 10 représente l'ensemble des données obtenues ; d'autres résultats cités dans la bibliographie y figurent également à titre de comparaison.

Tableau 10 : Concentration en métaux lourds des moules et coques sur le littoral de Ault à Dunkerque (L'HOPITAUT, 1982)

a) Moules

Métal mg/Kg poids sec	Moyenne des mesures	Ecart type	Maximum	Résultats obtenus par FORTSNER et al - 1981
Fe	181	60	650	112 - 2640
Mn	10,6	3,0	26,5	3,5- 38
Cu	6,3	0,8	10,0	5 - 88
Zn	70	15	163	31 - 1350
Cd	0,75	0,28	3,45	1 - 60
Pb	1,70	0,45	19,0	1 - 352
Hg	0,25	0,11	1,12	0,4- 13
Cr	0,55	0,42	1,66	1,5- 49
Ni	0,70	0,32	146	1 - 43



b) Coques

Métal µg/g poids sec	Moyenne des mesures	Ecart type	Maximum	Résultats obtenus par FORTSNER et al - 1981
Fe	517	144	750	590
Mn	21,4	7,1	33	6,3
Cu	4,75	0,44	5,4	6 - 26
Zn	85,7	14,2	127	100 - 200
Cd	0,53	0,31	1,07	0,3- 2,5
Pb	1,64	0,28	3	0,7- 2
Hg	0,23	0,04	0,3	0,16- 0,80
Cr	0,85	0,61	2,35	-
Ni	25	16,7	24,5	7,9

Les valeurs régionales de la teneur en métaux des moules sont inférieures à celles citées par FORTSNER, exception faite du nickel dont la valeur maximale est triplée.

Les coques présentent des concentrations en manganèse, en plomb et en nickel plus élevées que les teneurs données en référence (FORTSNER, 1981).

La figure 9 représente les sites où les concentrations en métaux sont anormales avec dépassement des capacités d'autoépuration des mollusques (L'HOPITAULT, 1982). On remarque que les zones à problèmes sont essentiellement les ports et les estuaires. Les polluants, Pb, Ni, sont les éléments dont la concentration dans les moules et les coques est la plus élevée, à Calais et Dunkerque, le Cd et le Cu sont très élevés dans l'estuaire de la Somme.

V - TOXICITE DES METAUX LOURDS

Les propriétés physiques et chimiques des métaux lourds varient selon leur position dans la classification périodique. Dans certains groupes, tels que I B et II B, la toxicité du métal augmente avec son électropositivité, $Hg > Cd > Zn$, $Au > Ag > Cu$; elle est due à une affinité importante pour les groupements amines et sulfhydriles qui sont des sites actifs de nombreux enzymes (SOMERS, 1960 in LUCKEY, 1975).

Les différents éléments métalliques ont été classés par WOOD en 1975 (Tableau 11). Les métaux tels que le sodium, le potassium et la magnésium ont un rôle essentiel dans les fonctions métaboliques. D'autres éléments, sont aussi considérés comme essentiels. Ils participent aux réactions biochimiques qui maintiennent les conditions dynamiques des cellules vivantes. Le transport de l'oxygène par exemple, est assuré par des métalloprotéines contenant du cuivre et du fer (hemoglobine, hemocyanine) (FRIEDEN, 1976). Ce sont également des constituants d'enzymes (Superoxyde dismutase, cytochrome oxydase, ferroxidase, anhydrase carbonique. Le manganèse et le nickel sont des activateurs d'enzymes et le cobalt est un constituant de la vitamine B12.

La déficience de ces composés perturbe donc la croissance ou le métabolisme des organismes vivants ; par contre lorsque les doses sont élevées, ces substances deviennent inhibitrices et sont mêmes toxiques*

* Un métal est considéré comme toxique s'il gêne la croissance, la reproduction ou le métabolisme de l'organisme quand il est soumis à une concentration donnée (WONG et al., 1978).

TABLEAU 11 : CLASSIFICATION DES ELEMENTS SELON
LEUR TOXICITE (WOOD, 1975)

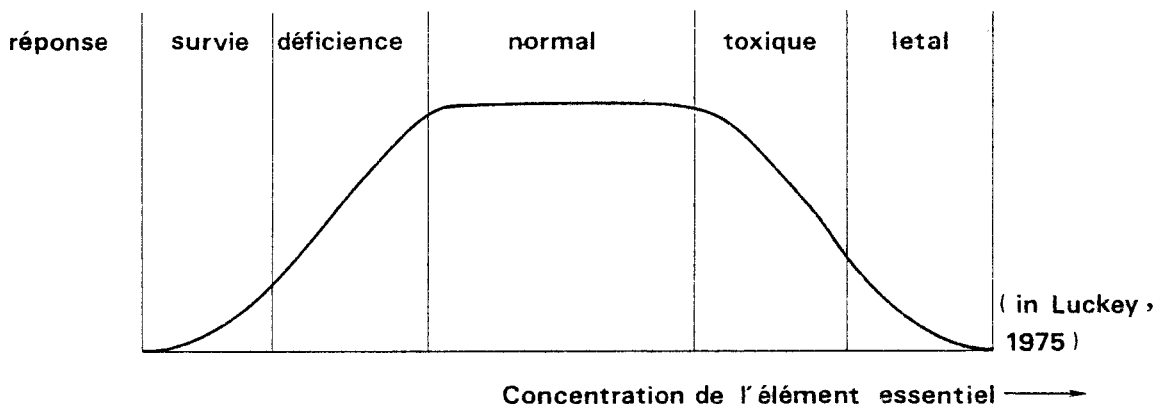
Eléments non critiques { Na, K, Mg, Ca, H, O, N, C, P, Fe, S
Cl, Br, F, Li, Rb, Sr, Ba, Al, Si

Eléments très toxiques et relativement accessibles { Be, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, As, Se, Te,
Pd, Ag, Cd, Pt, Av, Hg, Tl, Pb, Sb, Bi

Eléments toxiques mais très insolubles ou très rares { Ti, Hf, Zn, W, Nb, Ta, Re, Ga, La, Os
Rh, Ir, Ru



LUCKEY a représenté l'effet des ions métalliques essentiels sur les processus physiologiques selon leur concentration dans le milieu.



Les autres éléments métalliques qui n'interviennent pas dans les processus biologiques, produisent, à des concentrations très faibles, des effets néfastes sur les organismes vivants.

5.1. Métaux essentiels

5.1.1. Le zinc

Le zinc joue un rôle important dans la synthèse des protéines. Il participe à l'élaboration des acides nucléiques et à la division des cellules. C'est un élément essentiel d'enzymes: l'anhydrase carbonique, la déshydrogenase lactique (VALLEE et al., 1956), la peptidase carboxique et la phosphatase alcaline (MATHIES, 1958). Les effets néfastes de la déficience en zinc ont été étudiés pour l'être humain. Il provoque l'infantilisme, un retard de la croissance et de l'oscification (VALLEE, 1976 ; DUCHAUSSOY, 1971), une atrophie des testicules, des dermatoses ainsi qu'un blocage de la division cellulaire (KRISHAN, 1975) chez l'homme, les cas d'empoisonnement naturel par le zinc sont rares. Toutefois, le zinc commença à être étudié de façon intensive vers 1920, lorsqu'on se rendit compte que ses émanations étaient toxiques pour les ouvriers (BATCHELOR et al., 1926 in BOUQUEGNEAU, 1975).

Le syndrome est un accès de fièvre, quelques heures après l'exposition et des nausées. Cependant expérimentalement on peut montrer que l'augmentation du zinc dans le régime de rats femelles en gestation augmente le taux d'hydrocéphalie des foetus. (O'DELL, 1969).

Chez les invertébrés marins, GEORGE a montré que l'accumulation de ce métal était proportionnelle à sa concentration dans le milieu. Chez la Moule, les sites de transfert entre l'eau et l'organisme sont le manteau, les branchies et le sang (GEORGE, 1980).

Les stades larvaires d'oursin apparaissent plus sensibles que les adultes. Il n'existe plus de sperme mobile, après 96 heures de contamination par 0,1 mg/l de zinc. Le développement de l'oeuf est inhibé par une concentration de 1 mg/l Zn, tandis que les adultes ne montrent pas de signes de toxicité après 20 jours dans une solution de 10 mg/l. (CASTAGNA et al., 1981).

Les études entreprises chez les vertébrés marins ont révélé que les juvéniles de poisson étaient plus atteints par une pollution en zinc que les adultes. CRANDALL et GOODNIGHT en 1963 ont signalé des perturbations de la croissance et de la reproduction chez les guppies pour une dose de 1,15 mg/l de zinc. Les poissons nouveaux-nés présentent, après 55 jours d'intoxication, des altérations des gonades et des atrophies des vaisseaux sanguins dans le foie. Après 95 jours, on note la présence de nombreuses vacuoles dans cet organe (in KATZ, 1975). D'autres études réalisées chez *Salmo gairdneri* ont montré que le zinc agissait de façon néfaste sur les branchies. Des dommages cytologiques apparaissent après une contamination de 3 mg/l durant 48 heures, puis les lamelles branchiales enflent (LYODD, 1960 in KATZ, 1975). Ces perturbations provoquent une résistance pour le transfert de l'oxygène. Les variations des différents paramètres respiratoires ont été signalées par SKIDMORE en 1970. L'action du zinc sur les branchies se traduit donc par la production de mucus et par une atteinte cytologique conduisant à l'asphyxie et à la mort de l'animal (WONG et al., 1978). Bien qu'étant un élément essentiel, le zinc est responsable de phénomènes toxiques chez les juvéniles de poissons. La concentration de cet élément dans le milieu est donc à surveiller, surtout près des nurseries.

Les teneurs en zinc utilisées dans les tests de toxicité sont supérieures à celles trouvées sur le littoral de Dunkerque (la concentration est 10 fois supérieure).

5.1.2. Le cuivre

Le cuivre participe aux transferts d'électrons dans la photosynthèse, à la formation des phospholipides, au métabolisme de la purine et au développement du système nerveux. Il est utilisé dans la synthèse de la cytochrome C. oxydase. Ce métal possède des propriétés bactéricides, utilisées pour éliminer les algues dans l'eau. Les phénomènes cliniques dus à une déficience en cuivre de l'organisme sont encore inconnus mais il agit de façon synergique avec le zinc. Par contre une augmentation de la teneur en cuivre, équivalente à 100 fois la dose biologique, provoque des nécroses du foie et des anémies (LUCKEY, 1975). La quantité moyenne de cuivre nécessaire à l'homme est de 2 000 à 5 000 µg/jour. Des cancers du colon ont été mis en évidence chez les travailleurs de l'industrie du cuivre (TOKUDOME, 1976 in HILDEBRAND, 1984).

La toxicité de cet élément a été étudiée dans les poissons. la dose létale (L C 50, 96 h) pour le saumon est de 17 µg Cu/l.

(ROCH, 1982). Les effets toxiques, apparaissant pour des concentrations de 5 µg/l (soit une teneur inférieure à celle trouvée en 1978 dans l'Aa : 40 µg/l) se traduisent par une perte de l'appétit et un arrêt de la croissance (BUCKLEY, 1982). Des phénomènes de congestion au niveau des branchies et du foie ont été observés par CALVENTI en 1961 (in PEQUIGNOT, 1975). Le cuivre est responsable d'un ralentissement de la mucosécrétion au niveau du tégument et de l'intestin chez les alevins de truite (PEQUIGNOT, 1975).

5.1.3. Autres métaux

Le manganèse participe à l'élaboration des mucopolysaccharides du cartilage (LABAT et al., 1977). Il est responsable de l'activation de plusieurs enzymes et peut se substituer au fer dans les hèmes protéines. Il est aussi impliqué dans la formation de la mélanine. Les effets dus à une déficience en manganèse n'ont pas été observés chez l'homme. Les intoxications chroniques produisent des désordres psychiques et neurologiques et la formation de nodules hépatiques.

Chez l'homme, le chrome trivalent (Cr^{3+}) est utilisé comme cofacteur dans les réactions de l'insuline ; il est nécessaire pour l'utilisation du glucose. Il peut stabiliser les structures des acides nucléiques et il stimule plusieurs systèmes enzymatiques ainsi que la synthèse des acides gras et du cholestérol dans le foie. L'inhalation

de vapeurs d'acide chromique et de poussières de Cr^{3+} provoque des cancers du poumon (LUCKEY, 1975). Une toxicité de cet élément sous forme de Cr^{6+} , a été envisagée lors de l'étude des nécroses de poissons.

Le vanadium est un élément essentiel pour les poulets et les rats et probablement pour l'homme : il agit comme un catalyseur dans de nombreux systèmes biologiques soit en les activant ou en les inhibant (ribonucléase, ATPases...). La déficience en vanadium produit chez les rats un retard de croissance. L'augmentation dans la nourriture se traduit par une perturbation des processus métaboliques tels que la synthèse du cholestérol et une inhibition des systèmes enzymatiques (MACARA, 1980 ; AUBERT, 1973). Les seuls organismes capables d'accumuler sélectivement cet élément sont un champignon (*Amarita muscaria*) et quelques espèces de tuniciers. En effet, le vanadium est un composant métalloprotéïdique essentiel, utilisé par les ascidies dans les processus respiratoires (SIMKISS, 1984).

5.2. Métaux toxiques

5.2.1. Le plomb

On connaît sous le nom de saturnisme la maladie professionnelle induite par le plomb. Charcot en 1876 en a décrit les symptômes "Un saturnien est un malade affecté de coliques de plomb. L'acide urique s'accumule facilement dans le sang chez les saturniens, alors même qu'ils ne sont pas à proprement parler atteints de goutte" (CHARCOT, 1876 in LITTRE, Dictionnaire encyclopédique). Par la suite, d'autres phénomènes toxiques ont été découverts. Le plomb provoque l'anémie, la perte de mémoire, le coma et la mort. Il induit aussi une perturbation des cycles ovariens et de la spermatogénèse (CAPLUN, et al., 1978) ainsi que des anomalies des chromosomes (DEKNUDT, 1978). Les phénomènes de transfert de ce métal sont peu connus. Après avoir pénétré dans le système circulatoire, le plomb peut se déposer dans tous les organes mais plus de 90 % se retrouve dans le squelette (BOWEN, 1966).

Les effets toxiques du plomb se manifestent sur les algues par une inhibition de l'activité métabolique, de la respiration et de la photosynthèse (WOOLERY, 1976). Une concentration de 0,05 à 10 $\mu\text{g}/\text{l}$ de Pb provoque un arrêt de croissance de *Skeletonema costatum* (RIVKIN, 1979). Ces teneurs sont comparables à celles de notre littoral.

(1,91 µg/l de plomb à la station n° 1 de Dunkerque en 1982 et 10 µg/l de plomb dans l'Aa en 1978). Le plomb ne fait pas l'objet de régulations, sa concentration dans les tissus augmente donc en fonction de la teneur dans le milieu. L'huître, *Crassostrea virginica* est capable de prélever quelques mg de plomb dans une eau contenant 0,2 ppm de plomb, par kg et par jour, sans autre limite que la mort (PRINGLE, 1968 in BITTEL, 1973).

Des concentrations sublétales en plomb peuvent causer des dommages dans les populations de poissons en réduisant leur croissance et en perturbant leur reproduction. Des teneurs en plomb de 0,5 mg/l n'ont pas d'effets sur la métamorphose du carrelet (*Pleuronectes platessa*). Par contre une inhibition de la croissance est obtenue quand ces organismes sont exposés à 2 mg Pb/l (DILLING et al., 1926 in WONG et al., 1978). Les effets toxiques du plomb se manifestent également par une perturbation au niveau du système circulatoire. DAWSON en 1935, a observé une anémie prononcée chez la barbotte brune (*Ameiurus nebulosus*) selon les conditions d'incubations données ci-après (exposition à 28 mg/l dans l'eau douce renouvelée toutes les 48 heures pendant 16 à 183 jours). Les erythrocytes sont déformés et on note l'accumulation de hème-pigments dans le foie et la rate (in WONG, 1978). Une réduction de 38 % de hematocrite a été signalée chez la Carpe (PEQUIGNOT et al. 1975). La concentration de 2 ppb de plomb (soit une teneur comparable à celle de notre littoral) provoque après 8 semaines, une baisse de glucose dans le sang chez l'Omble de fontaine (CHRISTENSON et al., 1977 ; in REICHERT, 1979). Après 5 jours d'exposition à 200 µg/l de plomb le Cyprin doré présente une perturbation de la synthèse de l'hémoglobine et de la densité des globules rouges. Ces deux effets toxiques seraient dus à une inhibition de la δ amino levulinique acide deshydratase (ALA-D) (JACKIM, 1973). DAVIES en 1976 a exposé des truites à de faibles concentrations en plomb pendant 18 mois. Les animaux présentaient des queues noires (41 %), des érosions des nageoires (6 %) et des altérations de la colonne vertébrale (lordoses et scolioses) (3 %) après 6 mois de traitement avec 13 µg/l de nitrate de plomb.

5.2.2. Le mercure et le cadmium

C'est au Japon qu'ont été décelés les effets toxiques du mercure et du cadmium. Les taux de mortalité ainsi que les malformations

induites par le mercure n'ont été signalés qu'en 1950 et 1965 à Minamata. Les batailles juridiques entre le pollueur et les pêcheurs touchés par cette contamination ont ameuté et sensibilisé l'opinion mondiale quant aux effets toxiques des métaux dans l'environnement. D'autres intoxications par le mercure ont été signalées en Irak (1956, 1960, 1972) (BAKIR et al., 1973), au Pakistan, au Guatemala (1966), au Nouveau Mexique (1969) ainsi que dans les pays Scandinaves (JERNELOV et al., 1975). La région Nord-Ouest de l'Ontario, Canada, est polluée par du mercure provenant de la rivière Wabigoon - English. Les chats de la réserve voisine présentent des symptômes correspondants à une atteinte du cortex cérébral (mouvements anormaux, ataxie, convulsions, salivation abondante). Les cellules de Purkinje sont dégénérées (TAKEUCHI, 1977). Les pêcheurs de Minamata et de Niigata, intoxiqués par le mercure présentaient des troubles nerveux. Des effets mutagènes et tératogènes ont été observés se manifestant sur les foetus par le retard mental et des troubles moteurs (TAKEUCHI, 1977). Les teneurs en mercure de l'eau de mer de Minamata sont de 1,6 et 3,6 ppb (KLEIN, 1970) (la teneur naturelle de l'eau de mer est de 0,1 ppb). Le méthyl mercure (Hg CH_3) est responsable de la contamination, sa teneur dans l'eau de mer de Minamata est de 0,1 à 1 ppb (UI, 1971). La toxicité de ce composé est essentiellement due à l'accumulation dans la chaîne alimentaire (CLARKSON, 1975) (FRIBERG et al., 1972). Les travaux entrepris sur les vertébrés marins ont montré des perturbations sanguines : variations de la concentration en protéines plasmatiques et en hémoglobine (CALÀBRESE et al., 1975). WOSEBER en 1975 a mis en évidence des altérations de l'épithélium des lamelles branchiales chez *Salmo gairdneri* pour une dose de 16 et 24 ppm après 105 jours d'exposition. DELARCHE et al. ont observé en 1978 chez *Salmo gairdneri* des accélérations des mouvements operculaires et une coloration sombre de la peau traduisant, l'hypoxie, pour une concentration de 1 ppb de $\text{CH}_3 \text{Hg}$.

La carence alimentaire et la pollution par le cadmium sont responsables de la grave intoxication dont les paysans de Tohama (Japon) furent les victimes. L'agent étiologique est une mine de Plomb, Zinc et Cadmium située à 50 km au Nord de la ville (NOMIYAMA, 1975). La plupart des individus touchés en 1947 sont des femmes âgées de

40 à 70 ans (FRIBERG, 1974). La maladie nommée "Itai-Itai" se manifeste par des troubles osseux très graves (déformations du squelette, fractures multiples, lumbagos) ainsi que par un accroissement du taux de la phosphatase alcaline et de la glucosurie (HASEGAWA, 1973 in DENNAI, 1984). L'injection de 0,1 % de Cd Cl₂ (dans 0,15 M NaCl pendant 2 heures à 25° C) sous forme d'aérosol provoque des lésions des alvéoles et des bronchioles 21 jours après l'exposition (SAMPSON, 1984). Le cadmium est un compétiteur du zinc, il modifie donc les activités des enzymes telles que déshydrogénase et carboxypeptidase. Il possède une affinité forte pour les groupements sulfhydriles (AUBERT, 1973).

L'intoxication par ce métal provoque chez l'insecte *Locusta migratoria* des altérations du corps adipeux consistant en une réduction des réserves énergétiques ; le fonctionnement de l'appareil génital femelle est altéré par l'inhibition des synthèses, au niveau du corps jaune (MARTOJA et al., 1983).

Argopecten irradians soumis à 0,7 ppm Cd pendant 5 jours présente une extrusion massive de concrétions calcifiées par la plupart des cellules épithéliales du rein. Des dommages morphologiques ne sont toutefois observés que dans une faible zone de cet organe. Le rein peut accumuler 200 ppm de Cd (par rapport au poids sec) dont 60% se retrouve dans les concrétions, 38 % dans le culot membranaire du foie et 2 % dans les fractions solubles. Les concrétions rénales jouent donc un rôle dans le contrôle de l'accumulation et dans l'excrétion du cadmium. LÅRSSON et al. en 1976, ont montré que l'intoxication par 10 mg/l de cadmium, dans l'eau de mer, provoquait une réduction de 10,3 % de la concentration en hémoglobine et de 14,4 % de l'hématocrite - des poissons marins -

5.2.3. Le titane

La pollution par le titane est responsable chez *Perca fluviatilis* d'une augmentation du taux de glucose dans le sang, d'une baisse de glycogène et de la formation d'un dépôt brun sur les branchies, responsable de l'asphyxie (LEHTINEN, 1980 in LÅRSSON, 1980).

Le chlorure de titane à 5‰ provoque chez les échinodermes des nécroses de la peau qui devient blanchâtre et ulcérée après 2 H 40 d'exposition (VIALE, 1974). Les rejets de l'usine Montedison de Scarlino

(LIVOURNE, Italie) contiennent du titane, du manganèse et du vanadium. Ils ont été incriminés* dans la génèse des ulcérations chez les mammifères marins de Méditerranée. En effet la composition élémentaire des granulations présentes dans le tégument lésé d'un bal nopt re, est analogue à celles des "Boues rouges". Les métaux ne sont pas les seuls agents néfastes relargués par les usines traitant le titane. Les rejets d'acide sulfurique en très grande quantité abaissent le pH de l'eau en mer à 0,2. Cette acidité constitue un stress pour les organismes marins et prédisposerait la peau des cétacés à une altération successive par les métaux (VIALE, 1973).

CONCLUSION

Les teneurs en métaux lourds des trois compartiments du milieu marin du littoral de Ault   Dunkerque se situent toujours dans la moyenne des données recensées dans la bibliographie. Dans l'eau de mer les seuils de toxicité sont dépassés pour le zinc et le cadmium. Les zones les plus contaminées sont les ports et les estuaires ainsi que la région de Calais   Dunkerque, particulièrement polluée par le cuivre, le zinc et le plomb dans les sédiments du large. Du fait de l'hydrodynamisme de la mer du Nord, nous situerons notre zone d'étude, caractérisée par ses rejets industriels, entre Calais et Gravelines. La zone d'Hardelot, dont la teneur en métaux lourds est faible constituera la zone de référence.

La pollution du littoral paraît être due à une multiplicité d'éléments métalliques plutôt qu'à un contaminant spécifique. L'augmentation de la teneur en cadmium et la présence de plomb et de mercure au niveau de Gravelines pose un grave problème. En effet, selon MARTOJA, les organismes marins sont capables d'accumuler de grandes quantités de métaux dans un milieu peu pollué. Ainsi, le Murex peut concentrer un million de fois le cadmium de l'eau de mer (MARTOJA, 1984b). La présence dans les organismes vivants de ces éléments n'ayant aucun rôle biologique donne lieu à des phénomènes de toxicité ; basés sur leur accumulation dans la chaîne alimentaire. Les pollutions par des composés métalliques peuvent entraîner des désordres physiologiques accompagnés d'accumulations de métaux. Ces perturbations peuvent susciter des réactions de défense et accroître la résistance des organismes qui procèdent eux-mêmes à leur détoxification. Les mécanismes de défense sont très variés et ils seront étudiés dans le chapitre IV.

* Lors d'un procès intenté par les pêcheurs de Corse

CHAPITRE III

ECOTOXICOLOGIE :
TENEURS EN METAUX DES FLETS DE LA MANCHE
ET DE LA MER DU NORD .
INTOXICATIONS EXPERIMENTALES.

CHAPITRE III

ECOTOXICOLOGIE : TENEURS EN METAUX DES FLETS DE LA MANCHE - MER DU NORD INTOXICATIONS EXPERIMENTALES

I - METHODES D'ETUDE ECOTOXICOLOGIQUE

On peut aborder la compréhension des processus de contamination des écosystèmes par des composés de faible biodégradabilité selon quatre méthodologies :

- Etudes "in situ" dans les écosystèmes naturels.
- Utilisation de tests écotoxicologiques.
- Elaboration de microsystemes.
- Réalisation de chaînes trophodynamiques expérimentales.

1.1. Etudes "in situ"

Les dosages du contaminant étudié sont effectués sur différents organismes prélevés au sein de l'écosystème. Ils permettent de préciser l'état de contamination et de suivre son évolution au cours du temps. Les mesures sur le littoral Nord - Pas-de-Calais, ont surtout été effectuées sur des lamellibranches (*Mytilus edulis* L. et *Cardium edule*) (L'HOPITAULT, 1982). Il nous a donc paru intéressant de préciser les teneurs en métaux de plusieurs organes de Poissons pour compléter cet inventaire.

1.2. Utilisation de tests écotoxicologiques

De nombreux tests ont été mis au point afin d'évaluer la toxicité de différentes substances. Ces tests sont basés sur différents critères biologiques.

Le critère le plus souvent utilisé est la dose létale 50 déterminée à partir de la relation entre le pourcentage de mortalité et la dose utilisée (ATTAR et al., 1982 - STORA, 1975). L'action de la substance toxique sur la croissance constitue le deuxième test utilisé très fréquemment (FARMER, 1979 - PICKERING et al., 1970 in CABRIDENC et al., 1977).

D'autres tests basés sur des aspects fonctionnels sont aussi très largement employés. On utilise spécialement pour les algues les échanges O_2 - CO_2 (WOOLERY, 1976). Les tests bactériens reposent sur l'assimilation du ^{14}C glucose (potentiel hétérotrophe). Les tests particuliers réalisés sur des poissons concernent l'étude de l'activité respiratoire de la réaction d'évitement (test de nage) ou de l'immobilisation (TIMES, 1972 in CABRIDENC et al., 1977).

Plusieurs autres critères biologiques sont retenus :

- la modification du volume moyen cellulaire, utilisé chez toutes les populations unicellulaires.
- les modifications morphologiques ou tératogénèse utilisées plus particulièrement chez les poissons.
- la mesure de l'activité enzymatique.
- la synthèse de macromolécules (acides nucléiques ou protéines).
- la synthèse des lipides.

L'examen des données bibliographiques ainsi que les conclusions apportées lors du symposium d'Ecotoxicologie de Gand du 12 au 14 novembre 1983, montrent que de nombreux tests présentent encore des déficiences de mise au point. Il apparaît urgent de développer une standardisation à l'échelle mondiale, tant du point de vue de l'espèce utilisée que de la méthodologie employée.

1.3. Microsystèmes expérimentaux

Le terme "microsystème expérimental" désigne la reconstitution d'un "écosystème naturel" à l'échelle du laboratoire. Les organismes étudiés sont des espèces caractéristiques des différents niveaux trophiques introduites simultanément ou progressivement. Les observations sont effectuées en fonction de plusieurs paramètres abiotiques (température, salinité, photopériode, forme chimique du contaminant, durée d'exposition et voie de contamination).

Ces écosystèmes expérimentaux permettent de limiter le nombre de variables et de suivre ainsi plus facilement leur évolution. (DELARCHE et al., 1978). Toutefois, ils possèdent une dynamique propre qui peut être très éloignée de celle du milieu naturel.

1.4. Chaînes trophiques expérimentales

Les chaînes alimentaires expérimentales sont constituées de plusieurs niveaux trophiques successifs. Elles peuvent désigner des chaînes courtes à deux maillons ou des chaînes longues comprenant un producteur primaire et des consommateurs de différents ordres. Le Centre d'Etudes et de Recherches en Biologie et en Océanographie Médicale de Nice (C.E.R.B.O.M.) préconise l'utilisation de cette méthodologie pour les organismes marins. L'élément suspect est introduit au niveau du maillon primaire de la chaîne choisie, puis on nourrit les échelons supérieurs par ces organismes contaminés. La mesure de la toxicité transmise ou induite traduit la menace que ferait peser l'élément sur l'homme. Quatre types de chaînes ont ainsi été proposées par AUBERT.

1) Chaîne pélagique

.....

Phytoplancton : *Asterionella japonica* et *Diogenes* sp.

Zooplancton : *Artemia salina*

Poisson : *Carassius auratus*

Mammifère : *Mus musculus*

2) Chaîne néritique à Mollusque

.....

Phytoplancton : *Asterionella japonica* et *Diogenes* sp.

Mollusque : *Mytilus edulis*

Mammifère : *Mus musculus*

3) Chaîne benthique à Crustacés

.....

Bactéries et plancton marin

Mollusque : *Mytilus edulis*

Crustacé : *Carcinus maenas*

Mammifère : *Mus musculus*

4) Chaîne benthique à Poisson

.....

Bactéries et plancton marin

Annélides polychètes : *Nereis* sp., *Nephtys* sp.

Poisson : *Labrus bergylta*

Mammifère : *Mus musculus*

La contamination s'effectue pour les différents maillons de la chaîne, par voie directe et par voie indirecte par l'intermédiaire du transfert trophique. AUBERT a obtenu pour le mercure un facteur de concentration de 3 000 au niveau du maillon terminal. Toutefois l'utilisation de la chaîne alimentaire ne permet pas de prévoir les modifications induites dans le milieu naturel. Ces modèles doivent être envisagés comme une approche des phénomènes naturels (AUBERT et al., 1972, 1974, 1975, 1976).

Les auteurs sont partagés sur la part prédominante de la contamination par voie directe ou par voie indirecte. LABAT a réalisé en 1977 des contaminations en eau douce. Il a démontré que dans le cas de métaux se présentant sous forme soluble, la contamination par voie alimentaire est minime par rapport à celle provoquée par l'eau ambiante contaminée. Pour d'autres auteurs, l'accumulation du plomb et du mercure chez les poissons est plus importante par la voie trophique (VIGHI, 1981, BOUDOU, 1979).

Le plomb accumulé par l'alimentation est relargué plus lentement que celui absorbé par les branchies (VIGHI, 1981) SCHULZ - BALDES a montré en 1974 chez *Mytilus edulis* L. une part de la contamination au plomb par l'eau de mer identique à celle résultant de l'alimentation.

Afin de déterminer l'impact de certains polluants métalliques sur les organismes marins, nous avons réalisé des contaminations expérimentales en laboratoire. La contamination s'effectue par voie directe, le polluant est introduit dans l'eau environnante. L'espèce utilisée est le flet. Des mesures de la teneur naturelle en métaux de ces poissons ont été effectués avant toute contamination. Nous avons pu préciser les variations induites par le sexe, la taille, la saison et le lieu de pêche. Les poissons utilisés dans les expériences de contamination ont donc été choisis en fonction de ces résultats.

II - MATERIEL BIOLOGIQUE

2.1. Choix du matériel d'étude

Plusieurs raisons ont déterminé le choix du matériel biologique : le flet (*Platichthys flesus* L.). La présence de nombreux spécimens porteurs d'ulcérations cutanées (cf. chapitre I) dans les zones polluées - prouve que ce poisson est très sensible aux atteintes du milieu extérieur -

Son régime alimentaire est basé sur des organismes suspensivores détritivores tels que le lamelibranche *Abra alba* et le polychète *Lanice conchilega* (DELVAL, 1982). Le flet apparaît donc comme un récepteur privilégié de la contamination par voie trophique. Son biotope est le sable envasé, particulièrement riche en métaux lourds (SMIGIELSKI, 1976). Ces polluants peuvent être relargués par le sédiment et absorbés par les poissons marins (KUDO, 1976). Néanmoins ce rôle de vecteur de polluant n'est pas reconnu par LABAT qui leur attribue essentiellement une fonction dans la fixation. Le sédiment contribue à l'épuration de l'eau sans pour autant déterminer la pollution des espèces qui vivent à son contact. Toutefois les expériences entreprises sur des poissons d'eau douce ont montré que les fouisseurs étaient plus contaminés que les omnivores, eux-mêmes plus que les carnivores (LABAT, 1977). Le flet apparaît donc comme un récepteur privilégié de la contamination par les métaux lourds tant par voie trophique que par voie directe.

2.2. Description et biologie du flet

Le flet est un poisson téléostéen, pleuronectidae de couleur gris - brun ou olivâtre pouvant atteindre une taille de 50 cm. Les yeux sont généralement situés sur le côté droit de la tête mais on rencontre souvent des exemplaires senestres. Le corps porte des tubercules osseux et rugueux à la base des nageoires dorsales et anales et de chaque côté de la ligne latérale. Le frai a lieu de janvier à mai, dans la partie méridionale de la mer du Nord sur des fonds de 20 à 40 m. Les oeufs sont petits (1 mm de diamètre) et donnent naissance à des larves pélagiques qui se dirigent vers la côte. Les jeunes flets passent leur première année en estuaire avant de redescendre en mer (POLL, 1947).

Cet animal est euryhalin, il peut remonter en effet dans les estuaires et les rivières. Mc CURDY a signalé l'existence de flets à plus de 70 km de l'embouchure d'une rivière irlandaise (in SMIGIELSKI, 1978). Il constitue donc un matériel particulièrement résistant pour une expérimentation en laboratoire.

III - METHODES

3.1. Echantillonnage

Les poissons ont été prélevés lors de chalutages effectués par le navire océanographique attaché à la Station Marine de Wimereux : le N/O "SEPIA II". La date, la position DECCA, la profondeur, la quantité et la répartition de poissons par espèce sont répertoriés pour chaque trait de chalut. Le tri de la pêche est rapidement effectué afin que les poissons, nécessaires à la réalisation des contaminations expérimentales, soient placés dans les viviers où ils seront maintenus jusqu'au port.

Les spécimens utilisés pour le dosage des métaux lourds présents dans le milieu naturel sont mesurés et disséqués à bord. La mort est provoquée par section de la tête au-dessus des ouïes. Les organes, considérés comme cibles de l'accumulation des métaux par BOUQUEGNEAU en 1975, sont ensuite prélevés.

- Les branchies constituent le premier organe touché par une contamination directe.
 - Le foie a été choisi pour son activité métabolique importante et pour son rôle de "détoxification" de l'organisme.
 - Le rein a été retenu en raison de son rôle d'excrétion et d'épuration.
- Ces différents organes sont rincés à l'eau bidistillée et placés dans des sacs en polyéthylène avant d'être stockés au congélateur à - 20° C.

3.2. Traitement des échantillons

3.2.1. Préparation

Le matériel utilisé dans la préparation des échantillons (verrerie, béciers en téflon...) est préalablement nettoyé puis conservé dans une solution d'acide nitrique 1 M. Avant toute utilisation, il est plongé dans deux bains successifs d'eau distillée et d'eau ultra pure (système de filtration Milli Q - Millipore). Les organes sont pesés et homogénéisés dans deux volumes de 0,5 M saccharose à l'aide d'un broyeur homogénéiseur (Ultraturrax). La minéralisation des branchies et des reins s'effectue directement après ce traitement.

Le foie subit un fractionnement supplémentaire afin de déterminer les quantités de métaux présentes dans les différentes fractions. Après homogénéisation, il est centrifugé à 37 000 g pendant deux heures à 4° C (I E C, International Centrifuge, Modèle PR 2). Une fraction aliquote du

surnageant est ensuite prélevée pour le dosage des métaux, l'autre partie étant conservée à - 20° C pour l'étude de la concentration métallique des différentes fractions protéiques obtenues par chromatographie (cf. chapitre IV). Le culot est repris et à nouveau homogénéisé dans 2 volumes d'eau bidistillée.

3.2.2. Minéralisation

Les homogénats, culots et surnageants aliquots sont minéralisés par voie humide selon la technique prescrite par BOUQUEGNEAU et MARTOJA en 1982. Les échantillons sont placés dans des réacteurs en téflon de 25 ml puis mis à l'étuve à 110° C pendant 12 heures afin de les sécher. On ajoute un volume de 2 ml d'un mélange d'acide nitrique 14N et d'acide chlorhydrique 12 N par gramme de tissu frais. Le surnageant, limpide est traité par 2 ml d'acide nitrique 12 N par gramme d'échantillon.

Le réacteur est ensuite fermé à l'aide d'un couvercle en téflon et placé au bain - marie à 60° C pendant 24 heures. Après refroidissement le contenu des réacteurs est dilué dans de l'eau bidistillée et filtrée sur membrane Whatman 2 V, jusqu'à obtention d'un volume final de 20 ml. Un réacteur témoin, comportant uniquement de l'eau régale (HNO_3 14 N + HCl 12 N) est réalisé pour chaque échantillon afin de quantifier l'apport de métaux dus à l'expérimentation. Les différentes étapes de la préparation des échantillons sont rassemblées dans le tableau 12.

3.3. Dosage des métaux

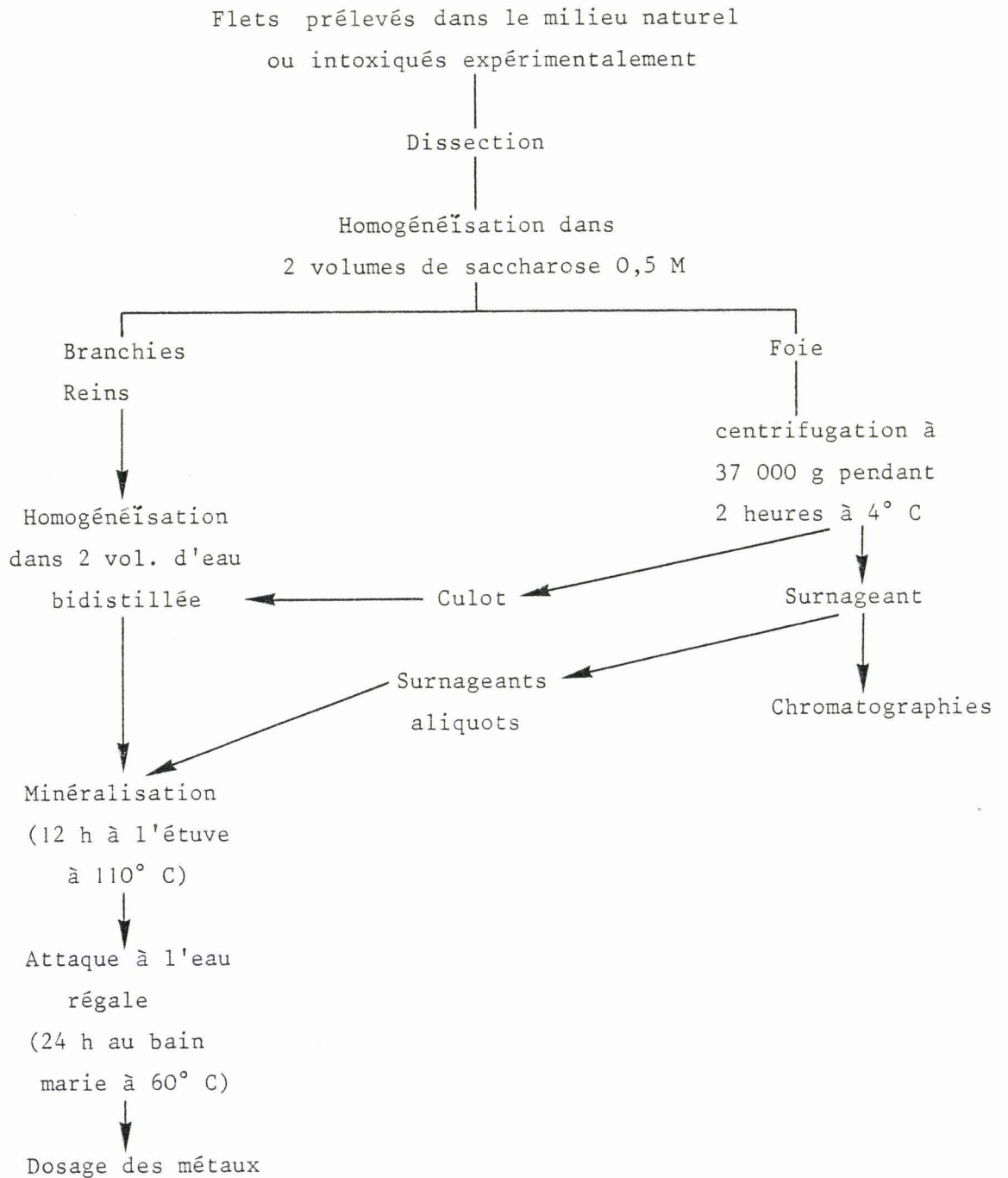
Les dosages des métaux ont été réalisés par spectrophotométrie d'absorption atomique (appareil PERKIN-ELMER, 2380).

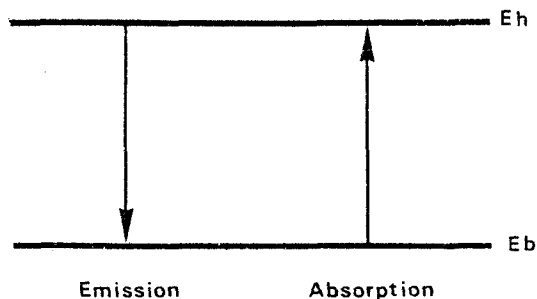
3.3.1. Principe

Quand un atome excité, change de niveau d'énergie E_h vers un niveau plus bas E_b , il émet une radiation spectrale de fréquence ν et la variation d'énergie $E_h - E_b$ est déterminée sous la forme d'une quantité d'énergie $h\nu$. Inversement, quand un atome est dans un état neutre E_b , et exposé à une radiation de fréquence ν , il peut absorber une quantité $h\nu$ et passer dans le stade

$$E_h = E_b + h\nu \quad - \text{(PINTA, 1978)}.$$

TABLEAU 12 : TRAITEMENT DES ECHANTILLONS :
ETAPES DE PREPARATION ET ANALYSES.





L'utilisation d'un spectre d'absorption plutôt qu'un spectre d'émission a été proposé et développé par WALSH (1955). Le spectre d'absorption atomique est formé par l'absorption de radiations de longueur d'onde connues par les atomes dont les électrons sont à l'état fondamental. En absorbant cette énergie, les atomes passent à l'état "excité". L'étendue de l'absorption dépend du nombre d'atomes à l'état stable présent sur le chemin du rayon de la radiation à tout moment. En pratique, une solution contenant l'élément à analyser est injectée dans une flamme relativement froide dans laquelle les atomes tendent à rester à l'état stable. Une radiation de longueur d'onde caractéristique provenant d'une lampe à cathode creuse est émise à travers la flamme. La baisse de l'intensité due à l'absorption d'énergie est ensuite mesurée par un spectrophotomètre (ALLEN, 1974).

3.3.2. Analyses

Les analyses du cadmium, zinc, cuivre et manganèse ont été réalisées à l'aide d'un appareil PERKIN-ELMER modèle 2380 équipé d'une flamme air-acétylène. Les concentrations métalliques sont obtenues directement en ppm. Deux mesures sont effectuées après prélèvement de l'échantillon durant 4 secondes. La valeur obtenue est donc la moyenne précisée par l'écart-type.

Compte-tenu des faibles teneurs en plomb des échantillons, non détectables à la flamme air-acétylène (limite de détection égale à 0,5 ppm) les analyses du plomb ont été réalisées avec le même appareil équipé d'un four à graphite (PERKIN-ELMER, HGA 500). La méthode est basée sur une calcination. L'utilisation d'un passeur d'échantillon automatique augmente la reproductibilité des résultats. Les conditions d'analyse sont résumées dans le tableau 13. Les résultats de la teneur en métaux seront exprimés en μg de métal par gramme de poids frais d'organe.

TABLEAU 13 : CONDITIONS D'UTILISATION DU SPECTROPHOTOMETRE
D'ABSORPTION ATOMIQUE

Flamme air-acétylène : (PERKIN-ELMER 2380)

	Longueur d'onde (nm)	Fente	Limite de détection 0,01 µg/ml	Domaine d'analyse µg/ml	Sensibilité pour 1 % d'absorption
Zn	213,9	0,7	0,01	0,1-10	0,018
Cd	228,8	0,7	0,1	0,5- 5	0,025
Cu	324,8	0,7	0,01	0,5-20	0,09
Mn	279,5	0,2	0,01	0,1-10	0,055
Pb	217	0,7	0,5	5 -50	0,5

Four au graphite : (PERKIN-ELMER HGA 500)

Plomb (217 nm, largeur de fente 0,7)



Etapas	Température O- C	Temps de montée en température (secondes)	Temps de mesure à température constante (secondes)
Séchage	120	20	20
Calcination			
1	500	30	25
2	500	0	5
Atomisation	2300	0	5
Nettoyage	2700	1	3

IV - ANALYSE DE LA TENEUR EN METAUX DES POISSONS DU MILIEU NATUREL

4.1. Introduction

Nous avons conduit cette analyse en fonction des données bibliographiques dont nous disposions. De nombreux auteurs ont montré que les variations de la teneur en métaux lourds dépendaient de plusieurs facteurs.

- L'âge et la taille : HAMANAKA et al., 1981 chez le requin bleu dans l'océan pacifique Nord ; METAYER et al., 1982 chez le flet dans l'estuaire de la Loire ; BOLLINGBERG et al., 1979 chez le loup, *Anarhichas minor*.
- Le sexe : FLETCHER et al., 1978 chez le flet dans un estuaire du Newfoundland. MAURI et al., 1983 chez *Donax trunculus* dans l'estuaire de l'Arna près de Livourne.
- La saison : BALKAS et al., 1982 chez *Mugil auratus* au Nord de la Méditerranée. BETZER et al., 1974 chez *Busycon canaliculatum* L. près de Rhode Island.

Nous avons voulu préciser si, dans la zone de Dunkerque, les flets présentaient des réactions semblables. Pour cela, nous avons effectué des prélèvements dans notre zone d'étude, le 7 novembre 1983 et le 17 avril 1984, en prenant des individus de taille et de sexe différents. Nous avons ensuite effectué les dosages dans trois organes ; le rein, le foie et les branchies ; choisis pour leur sensibilité face aux éléments métalliques (BOUQUEGNEAU, 1975).

4.2. Analyse des résultats

Nous avons regroupé les individus en groupe d'âge selon le classement établi par DESMARCHELIER, 1982, basé sur la lecture des otolithes des poissons. Les résultats des dosages (Annexe 3) sont regroupés en moyenne par classe. Pour comparer ces données, nous avons utilisé le test t de Student (cf. : Annexe 4) en prenant les moyennes deux à deux, le seuil de validité étant de 5 %.

Nous n'avons retenu que les teneurs en cuivre, zinc et manganèse, les teneurs en plomb et en cadmium étant inférieures au seuil de sensibilité de l'appareil d'absorption atomique de flamme.

4.2.1. Influence de la taille

a) Branchies

SEXE	AGE	n		Cu µg/g PF	Zn µg/g PF	Mn µg/g PF
F E M E L L E S	II	5	\bar{x}	0,992	19,62	3,628
			σ	0,589	6,552	2,229
	III	5	\bar{x}	1,139	21,74	6,302
			σ	0,374	5,004	3,672
	IV	4	\bar{x}	1,831	18,00	4,172
			σ	0,949	4,080	0,545
M A L E S	I	4	\bar{x}	2,243	20,57	4,628
			σ	1,882	13,15	2,814
	II	4	\bar{x}	0,965	29,70	7,032
			σ	0,817	15,60	4,027
	III	2	\bar{x}	0,424	26,71	3,164
			σ	0,438	11,00	1,152

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart type



Les teneurs en Zn sont les plus élevées des trois métaux testés. les écarts type parfois importants traduisent de grandes variations dans une même classe d'âge. Toutefois, aucune différence significative, au seuil de 5 %, n'a pu être mise en évidence.

b) Reins

SEXE	AGE	n		Cu µg/g PF	Zn µg/g PF	Mn µg/g PF
F E M E L L E S	II	5	\bar{x}	1,836	59,42	2,252
			σ	0,435	14,48	1,09
	III	5	\bar{x}	1,231	35,195	1,517
			σ	0,582	7,065	0,475
	IV	4	\bar{x}	1,722	46,305	1,114
			σ	0,804	13,752	0,349
M A L E S	I	4	\bar{x}	3,415	66,60	1,383
			σ	5,143	38,28	0,660
	II	4	\bar{x}	1,144	35,24	0,932
			σ	0,767	9,967	0,591
	III	2	\bar{x}	0,767	43,29	1,0015
			σ	0,889	28,16	0,917

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart type

Les teneurs en métaux sont plus importantes dans les reins que dans les branchies. Le zinc est toujours l'élément prédominant.

Les variations à l'intérieur de chaque classe d'âge sont importantes. Deux écarts significatifs ont pu être mis en évidence entre les groupes II et III pour le zinc chez les femelles, et entre les classes I et II pour le cuivre chez les mâles. Dans les deux cas, la teneur décroît entre 2 et 3 ans pour les femelles et entre 1 et 2 ans pour les mâles.

c) Foie

SEXE	AGE	n	Cu			Zn			Mn		
			\bar{x}	σ	$\mu\text{g/g PF}$	\bar{x}	σ	$\mu\text{g/g PF}$	\bar{x}	σ	$\mu\text{g/g PF}$
F E M E L L E S	II	5	\bar{x}		18,207	62,198	2,583				
			σ		4,402	11,62	1,164				
	III	5	\bar{x}		20,947	60,962	3,212				
			σ		9,515	21,659	1,462				
	IV	4	\bar{x}		24,257	88,67	4,186				
			σ		1,315	6,606	0,428				
M A L E S	I	4	\bar{x}		8,505	27,03	1,449				
			σ		0,597	5,105	0,584				
	II	4	\bar{x}		18,54	28,68	1,237				
			σ		14,05	11,246	0,249				
	III	2	\bar{x}		25,169	63,98	2,539				
			σ		13,725	54,95	3,162				

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type



Les teneurs en zinc du foie et les variations internes sont également très importantes autant chez les mâles que chez les femelles. Les différences sont significatives au seuil de 5 % pour les trois métaux analysés chez les femelles (groupe II - groupe IV), de même pour le zinc entre les classes III et IV. La concentration en métaux lourds augmente avec l'âge dans les foies, par contre, aucune différence significative n'est relevée entre les groupes d'âge chez les mâles.

d) Homogénéité

La disparité des concentrations observées dans les trois organes testés nous a conduit à vérifier si la concentration en métal différait significativement entre le foie, les reins, et les branchies et ce pour chaque élément métallique étudié.

Pour cela, nous avons utilisé le test de PEARSON (cf. Annexe n° 4) et nous l'avons appliqué pour les trois métaux aux poissons des deux sexes.

χ^2_4 calculé :

	Cu µg/g PF	Zn µg/g PF	Mn µg/g PF
♂	5,493	20,491	2,113
♀	0,310	8,766	1,340

χ^2_4 Table = 8,490

Seuls les χ^2_4 calculés pour le zinc sont significatifs au seuil de 5 %, pour les deux sexes. Les organes diffèrent donc pour ce métal en fonction de l'âge.

e) Synthèse

Les variations des teneurs moyennes en métaux sont importantes tant par organe (le foie présentant les concentrations les plus élevées) que par classe d'âge.

Il ne semble pas y avoir de liaison entre la teneur en métaux et l'âge dans les branchies. Chez les femelles, cette corrélation paraît positive entre 3 et 4 ans pour les trois métaux alors qu'entre 2 et 3 ans, seule la concentration en zinc dans le foie et les reins varie significativement. Les teneurs en zinc diffèrent également suivant les organes et les classes d'âges. On observe la même répartition chez les mâles. Pour ces derniers on ne relève aucune différence significative entre les teneurs moyennes suivant l'âge, par organe, excepté pour le cuivre dans le rein entre 1 et 2 ans.

4.2.2. Influence du sexe
.....

a) Branchies

AGE	SEXE	n		Cu μg/g PF	Zn μg/g PF	Mn μg/g PF
II	♂	4	\bar{x}	0,965	25,70	7,032
			σ	0,817	15,60	4,027
	♀	5	\bar{x}	0,992	19,62	3,628
			σ	0,589	6,552	2,229
III	♂	2	\bar{x}	0,424	26,71	3,164
			σ	0,438	11,00	1,152
	♀	5	\bar{x}	1,139	21,74	6,302
			σ	0,374	5,004	3,672

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type

Les concentrations sont très proches. Nous n'avons pu mettre en évidence aucune différence significative entre les deux sexes, par métal.

b) Reins

AGE	SEXE	n		Cu μg/g PF	Zn μg/g PF	Mn μg/g PF
II	♂	4	\bar{x}	1,144	35,24	0,932
			σ	0,767	9,967	0,591
	♀	5	\bar{x}	1,836	59,42	2,252
			σ	0,435	14,48	1,09
III	♂	2	\bar{x}	0,767	43,29	1,0015
			σ	0,889	28,16	0,917
	♀	5	\bar{x}	1,231	35,195	1,517
			σ	0,582	7,065	0,475



n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type

Les concentrations sont plus importantes que dans les branchies. On relève une différence significative dans le groupe des 2 ans entre mâles et femelles pour le zinc.

c) Foie

AGE	SEXE	n		Cu	Zn	Mn
				µg/g PF	µg/g PF	µg/g PF
II	♂	4	\bar{x}	18,54	28,68	1,237
			σ	14,05	11,246	0,249
	♀	5	\bar{x}	18,207	62,198	2,583
			σ	4,402	11,62	1,164
III	♂	2	\bar{x}	25,169	63,98	2,539
			σ	13,725	54,95	3,162
	♀	5	\bar{x}	20,947	60,962	3,212
			σ	9,515	21,659	1,462

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type

Le groupe II présente deux différences significatives entre mâles et femelles pour le zinc et le manganèse.

d) Synthèse

Il n'existe pas de liaison significative entre le sexe et la concentration métallique dans les branchies. Pour le rein et le foie, la teneur en zinc est toujours plus importante. Les femelles de deux ans présentent pour le zinc des teneurs plus importantes qui diffèrent de manière significative par rapport aux mâles pour le foie et le rein. La teneur en cuivre ne diffère pas significativement entre mâles et femelles, quel que soit l'organe considéré. Le manganèse ne diffère que dans le foie des animaux de deux ans.

4.2.3. Influence de la saison

Nous allons comparer les analyses des poissons provenant de la zone littorale de Dunkerque prélevés lors du chalutage du 7 novembre 1983 à ceux provenant d'un autre chalutage qui a eu lieu le 17 avril 1984.

a) Branchies

Seules des femelles du groupe IV figuraient dans ce prélèvement.

DATE	AGE	SEXE	n		Cu	Zn	Mn
					µg/g PF	µg/g PF	µg/g PF
7/11	IV	♀	4	\bar{x}	1,831	18,00	4,172
				σ	0,949	4,080	0,545
17/04	IV	♀	11	\bar{x}	0,893	13,11	2,984
				σ	0,803	6,295	0,598

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type

Les teneurs sont plus importantes en novembre, et ne diffèrent significativement que pour le manganèse.

b) Reins

DATE	AGE	SEXE	n		Cu	Zn	Mn
					µg/g PF	µg/g PF	µg/g PF
7/11	IV	♀	4	\bar{x}	1,722	46,305	1,114
				σ	0,804	13,752	0,349
17/04	IV	♀	11	\bar{x}	1,455	35,34	0,788
				σ	0,679	16,87	0,354

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type



Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence.

c) Foie

DATE	AGE	SEXE	n		Cu	Zn	Mn
					µg/g PF	µg/g PF	µg/g PF
7/11	IV	♀	4	\bar{x}	24,257	88,67	4,186
				σ	1,315	6,606	0,428
17/04	IV	♀	11	\bar{x}	20,399	45,102	1,104
				σ	8,070	7,275	0,445

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type

Les teneurs moyennées en zinc, en manganèse diffèrent de façon significative (au seuil de 5 %) selon les saisons.

d) Synthèse

Les teneurs en métaux enregistrées, sont généralement supérieures en novembre. Mais seuls, le manganèse pour les branchies, et le zinc et manganèse pour le foie semblent liés aux saisons quant à leur accumulation dans les organes.

4.2.4. Discussion

On constate en effectuant des revues bibliographiques que les résultats concernant l'accumulation des métaux dans les différents organes varient énormément.

Dans notre étude, nous avons montré que le foie était l'organe préférentiel d'accumulation du zinc, du cuivre et du manganèse. Ces résultats confirment ceux trouvés par KUREISHY en 1981, sur plusieurs poissons mais sont en contradiction avec ceux d'AMIARD-TRIQUET, 1982 qui considère que le rein est le principal organe d'accumulation du zinc.

Tableau 14 : Résumé des différences significatives obtenues

Influence de la taille :

Organe	SEXE	Métal	Différence significative au seuil de 5 %
Rein	Femelle	Zinc	Groupe II - Groupe III
	Mâle	Cuivre	Groupe I - Groupe II
Foie	Femelle	Zinc	Groupe II - Groupe IV Groupe III - Groupe IV
		Cuivre	Groupe II - Groupe IV
		Manganèse	Groupe II - Groupe IV

Influence du sexe :

Organe	Métal	Différence significative au seuil de 5 %
Rein	Zinc	Groupe II
Foie	Zinc	Groupe II
	Manganèse	Groupe II

Influence de la saison : (FEMELLES, GROUPE IV)

Organe	Métal
Branchies	Manganèse
Foie	Zinc
	Manganèse

Les résultats précédents montrent que pour le zinc, l'accumulation est dépendante de l'âge, les plus jeunes femelles (groupe II) ont une teneur plus importante dans les reins tandis que c'est le foie qui présente les teneurs les plus fortes chez les femelles âgées. BALKAS, en 1982 avait montré une variation semblable de la concentration avec la taille chez *Mugil auratus*.

La concentration en manganèse des poissons femelles augmente avec la taille. Peu de données bibliographiques concernent le métabolisme de ce métal chez les poissons. Par contre, des études ont été effectuées par BILECK et al. (1956) pour l'être humain ; elles ont montré une augmentation de la teneur en manganèse jusqu'à 40 ans (in MEARS, 1977). D'autres travaux menés sur le Tile-caméléon (*Lopholatilus chamaeleonticeps*) par MEARS en 1977 ont montré au contraire, une diminution de la teneur en manganèse des femelles. PENTREATH, en 1975 n'a pas signalé de variation de la teneur en manganèse en fonction de la taille des carrelets. HAMANAKA, (1981) ne trouve aucune corrélation entre les métaux, excepté le cadmium, et la taille du requin bleu. On remarque donc que les données concernant ces variations sont très diverses selon les auteurs et le matériel biologique utilisé.

On détecte également une variation liée au sexe. Les femelles ont en moyenne, des teneurs en métaux plus importantes. Chez celles du groupe II, les teneurs en zinc sont significativement différentes de celles enregistrées pour les mâles du même âge, dans les reins et le foie. Dans cet organe, on observe un résultat identique pour la teneur en manganèse. Ces résultats sont expliqués par les différences de métabolisme entre les poissons mâles et femelles. En effet FLETCHER en 1978, a observé une baisse de la teneur en zinc du foie des poissons femelles liée à une augmentation dans les gonades, qui n'est pas retrouvé chez les mâles. Le prélèvement de nos poissons a été effectué le 7 novembre 1983. Cette période correspond au développement maximal des gonades de flets femelles qui se poursuit jusqu'en mars. Les femelles nécessitent donc plus de Zn^{2+} que les mâles. (DESMARCHELIER, 1982) . Les variations de la teneur en zinc, observées pour les femelles du groupe IV , en fonction des saisons peuvent donc s'expliquer par une demande accrue en ce métal lors du développement des gonades.

Plusieurs variations ont également été mises en évidence pour le manganèse. On observe une différence significative entre la teneur en manganèse du foie des poissons femelles et des mâles. On note de même une augmentation de la concentration en ce métal, en novembre, dans les branchies et le foie des poissons femelles.

4.3. Comparaison Hardelot - Dunkerque

Un chalutage a été effectué dans la zone comprise entre Hardelot et Equihen, considérée comme zone témoin (cf. chapitre II) le 12/4/84. Nous avons récolté des poissons paraissant sains et quelques poissons présentant des ulcérations. Nous les avons comparé à des poissons récoltés à Dunkerque à la même période (11/3 et 17/04). Nous avons cherché si les différences entre poissons sains et "nécrosés" étaient significatives. Pour cela nous avons utilisé les comparaisons de moyennes par le test de Student, au seuil de 5 %.

4.3.1. Analyse des résultats

Seules les femelles du groupe IV ont été retenues pour l'analyse, étant donné le petit nombre de poissons pêchés à Hardelot.

a) Branchies

	Lieu	SEXE	AGE	n		Cu µg/g PF	Zn µg/gPF	Mn µg/gPF
S A I N S	DUNK	♀	IV	11	\bar{x}	0,893	13,11	2,984
					σ	0,803	6,295	0,598
	HARD	♀	IV	3	\bar{x}	0,347	11,961	1,579
					σ	0,122	4,551	0,043
N E C R O S E S	DUNK	♀	IV	3	\bar{x}	0,991	31,68	2,592
					σ	0,624	22,51	0,730
	HARD	♀	IV	3	\bar{x}	0,560	11,62	3,326
					σ	0,341	5,244	0,598

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type

L'analyse des résultats montre que les différences entre les poissons sains de Dunkerque et d'Hardelot sont significatives pour le cuivre et le manganèse.

Les différences entre les poissons sains et les poissons nécrosés pour les deux sites sont significatives pour le cuivre.

b) Reins

	Lieu	SEXE	AGE	n		Cu µg/gPF	Zn µg/gPF	Mn µg/gPF
S A I N S	DUNK	♀	IV	11	\bar{x}	1,455	35,34	0,788
					σ	0,679	16,87	0,354
	HARD	♀	IV	3	\bar{x}	1,054	41,15	0,609
					σ	0,875	28,70	0,126
N E C R O S E S	DUNK	♀	IV	3	\bar{x}	2,698	38,10	1,005
					σ	1,752	19,12	0,575
	HARD	♀	IV	3	\bar{x}	2,223	38,51	-
					σ	0,334	17,05	-



n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type

Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence concernant les poissons sains et nécrosés de Dunkerque et d'Hardelot pour cet organe.

c) Foie

	Lieu	SEXE	AGE	n		Cu µg/gPF	Zn µg/gPF	Mn µg/gPF
S A I N S	DUNK	♀	IV	11	\bar{x}	20,399	45,102	1,104
					σ	8,070	7,275	0,445
	HARD	♀	IV	3	\bar{x}	6,951	24,23	1,983
					σ	0,9008	0,863	0,032
N E C R O S E S	DUNK	♀	IV	3	\bar{x}	9,990	36,48	1,333
					σ	8,407	11,150	0,616
	HARD	♀	IV	3	\bar{x}	20,522	35,586	2,125
					σ	10,188	27,458	0,645

n : effectif

\bar{x} : moyenne

σ : écart-type

Les différences entre les poissons sains de Dunkerque et d'Hardelot sont significatives pour les trois métaux.

Par contre, aucune différence significative entre les poissons sains et nécrosés pour les deux sites n'a pu être mise en évidence pour cet organe.

4.3.2. Synthèse

Les teneurs en métaux sont significativement différentes dans les branchies pour le cuivre et le manganèse, ainsi que pour le zinc, dans le foie, entre les poissons sains des deux zones étudiées.

Sur notre échantillon, la présence de nécroses sur les flets de Dunkerque ou d'Hardelot se traduit par une augmentation de la teneur en cuivre des branchies des poissons nécrosés. Toutefois aucune valeur significative n'a pu être mise en évidence pour les autres métaux et les autres organes. Ces résultats confirment ceux obtenus par SMIGIELSKI en 1978 et par COLAS en 1980 sur les foies et les muscles de morues. La différence significative entre les poissons sains de Dunkerque et d'Hardelot permet de confirmer notre choix de la zone témoin.

4.4. Conclusion

On retrouve dans les comparaisons Dunkerque - Hardelot, des résultats proches de ceux obtenus dans chaque organe (paragraphe 2). Les teneurs en manganèse des branchies et celles en zinc du foie apportent des différences significatives entre les poissons des deux zones étudiées.

La différence obtenue quant aux dosages entre les poissons sains des deux zones, confirme l'hypothèse d'une zone témoin "saine" significativement différente de la zone de Dunkerque, ceci, pour les trois métaux étudiés dans le foie. C'est cet organe qui offre le plus de réponses significatives pour les trois métaux. Les concentrations élevées, que nous avons détectées, laissent supposer un rôle important quant à la réaction aux polluants métalliques.

En considérant les résultats obtenus, nous pouvons préciser que les poissons présentant les plus fortes concentrations métalliques sont des femelles de 2 ans environ (Groupe d'âge II) en période hivernale. Ce sont des animaux de cette catégorie que nous avons retenu pour les expérimentations.

V - INTOXICATIONS EXPERIMENTALES

5.1. Conditions expérimentales

Les poissons utilisés dans les expériences de contamination expérimentales sont maintenus en vivier lors des chalutages puis transportés à la Station dans des containers munis d'un système d'oxygénation. Préalablement à toute contamination, les spécimens sont acclimatés à l'eau de mer de Wimereux et soumis au jeûne pendant une période de 15 jours. Afin de réduire les variations dues aux différents paramètres, tels que sexe, taille, saison et lieu de pêche, les poissons ont été prélevés lors des mêmes chalutages. Nous n'avons retenu que des flets de sexe femelle, appartenant au groupe d'âge II (leur taille varie entre 24 et 30 cm).

Une fois acclimatés à la captivité et à leur nouveau milieu, les poissons sont intoxiqués dans des bacs en polyéthylène d'une contenance de 30 l. 6 poissons sont déposés dans chacun de ces bacs, soit, 5 l par animal.

C'est un volume d'eau comparable qu'a utilisé NOEL-LAMBOT (1980) pour les anguilles. L'eau de mer est aérée et changée tous les 5 jours, afin de limiter la présence de matières organiques due aux excréments des poissons et au mucus. En effet d'après VERTHE et al. (1981), la présence de particules en suspension baisse la vitesse d'incorporation du polluant mercure chez les *Leptomysis*. La solution de contaminant est introduite sous forme de chlorures et renouvelée tous les 5 jours ce qui permet de maintenir une teneur en polluant relativement constante. Un bac non contaminé contient des poissons témoins lors de chaque expérience.

5.1.1. Choix du contaminant

Trois métaux ont été utilisés lors de ces expériences :

- Le Zinc

Ce métal a été choisi en raison de sa présence en grande quantité à la fois dans l'eau de mer (cf. chapitre II) et les poissons sur le littoral étudié.

- Le Plomb

Les fortes teneurs en plomb des moules du littoral ont montré que ce métal pouvait s'accumuler en quantité importante dans la matière vivante (L'HOPITAULT, 1982). Il nous a donc paru intéressant d'étudier la cinétique de ce métal chez le flet.

- Le Cadmium

Ce métal a été retenu en raison de sa toxicité, sachant que sa teneur dans l'eau de mer et sa présence dans les moules et coques sont en hausse en de nombreux points du littoral (cf. paragraphe II).

La forme chimique du composé influe sur la toxicité, les composés les plus solubles sont les plus toxiques (nitrates > chlorures > bromures > iodures > acétates > sulfates > carbonates > fluorures > oxydes) (VENUGOPAL et al., 1975). La contamination sera donc effectuée par des chlorures.

5.1.2. Concentration du contaminant dans le milieu
.....

Le choix de la concentration des polluants, a été effectué par référence aux doses trouvées dans la bibliographie. Les doses sont sublétales mais assez importantes pour provoquer des effets toxicologiques.

Les doses relevées pour le plomb dans la bibliographie sont basées sur la dose létale 50 (concentration de polluant tuant 50 % des organismes en un temps donné). Elles s'échelonnent entre 4 et 45,2 mg/l de Pb^{2+} pour des poissons d'eau douce (PICKERING et al., 1966 in WONG et al., 1978). Peu de données concernent les poissons marins - JOHNSON, B.T. (1975) préconise l'introduction du polluant dans le milieu à des doses correspondant au dixième de la concentration létale (DL 50) de l'espèce la plus sensible (in DELARCHE, 1978). La concentration choisie est donc de 10 ppm de $PbCl_2$ ce qui correspond à 7,44 ppm de Pb^{2+} .

Les concentrations relevées dans la bibliographie pour les expériences de contamination par le zinc sont en moyenne de 15 ppm. Ainsi FLOS en 1979 a utilisé une concentration de 15 ppm $ZnSO_4$ lors des études de contaminations par le zinc de *Scylliorhinus canicula* L.

Les sulfates étant moins solubles que les chlorures et ne connaissant pas la dose létale du zinc pour le flet, nous avons réduit la teneur du polluant ($ZnCl_2$) à 10 ppm (ce qui équivaut à 4,79 ppm Zn^{2+}).

Le seuil de mortalité observé par NOEL-LAMBOT en 1980 pour les anguilles, lors d'une contamination au cadmium est de 30 ppm. Cet auteur considère la dose de polluant de 13 ppm comme sublétale. BOUQUEGNEAU a montré en 1975 que la dose 5 ppm était létale pour *Myoxocephalus scorpius*. HIDEAKI n'observe pas de mortalité pour le poisson, *Carassius auratus* lors d'une intoxication par 30 ppm de $CdCl_2$.

Les seuils de sensibilité pour ce polluant sont donc très différents selon l'espèce étudiée. Nous avons choisi une dose de polluant, intermédiaire entre celles utilisées pour les deux poissons marins cités (*Anguilla anguilla* et *Myoxocephalus scorpius*) de 10 ppm de $CdCl_2$. Cette dose correspond à 6,11 ppm de Cd^{2+} . Nous n'avons pas observé de mortalité lors des trois expériences (Pb, Zn et Cd) de contamination.

5.1.3. Durée d'intoxication

Les durées d'intoxications ont été choisies afin de mettre en évidence un processus de bioaccumulation tout en prenant en considération les limites imposées par les contraintes d'élevage.

Pour les poissons, les valeurs trouvées dans la bibliographie sont les suivantes :

- pour le zinc : de 30 mn à 31 jours pour *Carassius auratus* (KITO, 1982)
de 2 à 25 jours pour *Scyliorhinus canicula* L. (FLOS, 1978)
- pour le cadmium : de 30 mn à 31 jours pour *Carassius auratus* (KITO, 1982)
de 1 à 180 jours pour *Anguilla anguilla* (NOEL-LAMBOT, 1980)
- pour le plomb : 15 jours pour *Oncorhynchus kisutch* (REICHERT, 1979)

Les durées d'intoxication choisies afin d'étudier la cinétique des différents métaux sont de :

- . 1, 4, 24 heures ; 2, 4, 8, 18, 20, 27, 43 jours pour le plomb
- . 1, 2, 10, 20, 28, 30, 40 jours pour le cadmium
- . 1, 5, 18, 48 heures ; 4, 9, 18, 27, 43 jours pour le zinc.

Le nombre de poissons intoxiqués ou témoins pour chaque prélèvement était initialement prévu égal à 3. Les contraintes matérielles de sorties à la mer et d'échantillonnage (femelle, groupe II), nous ont amené à le réduire à 1 ou 2. Ceci entraîne des difficultés d'analyse statistique et des calculs d'écart-type en faible nombre (cf. figures 12, 18, 22), lors des analyses de cinétiques.

5.2. Dosage de l'eau de mer

Des dosages de l'eau de mer des bacs d'intoxication ont été envisagés afin de vérifier la teneur en polluant soluble effectivement en contact avec le poisson. En effet, lorsque l'on ajoute le $PbCl_2$ dans l'eau de mer, on observe la formation d'un nuage blanc dénotant une réaction chimique. Ce précipité doit être du carbonate de plomb dont la solubilité est très faible. Les échantillons d'eau de mer ont été dosés par polarographie. Les conditions matérielles ne nous ont pas permis de réaliser les dosages de la teneur en zinc et en cadmium, initialement prévus.

5.2.1. Principe

L'analyse polarographique classique, étudiée pour la première fois par HEYROVSKY en 1922 à Prague, est basée sur le tracé de courbes intensité - potentiel sur une électrode à goutte de mercure tombante, plongeant dans la solution à analyser ; les courbes obtenues se présentent sous la forme de "vagues", dont le potentiel de demi-vagues est caractéristique de la nature de l'espèce réduite (ou oxydée) électrochimiquement, et la hauteur (courant de diffusion) proportionnelle à sa concentration.

Les solutions de mesure doivent présenter une certaine conductivité. L'eau de mer constitue un électrolyte de choix. Les mesures peuvent donc être effectuées sur les échantillons bruts sans traitement chimique ou séparation préalable.

Le principe de la polarographie à impulsions consiste à appliquer à une électrode un signal de tension de forme rectangulaire (impulsion). On obtient ainsi des pics dont la position est caractéristique d'une espèce en solution, et la hauteur proportionnelle à la concentration de cette espèce. La redissolution anodique est principalement utilisée pour la détermination quantitative des traces de cations dont le métal peut former un amalgame avec le mercure. La technique consiste à utiliser une électrode à goutte pendante de mercure. On effectue pendant un temps déterminé, et sous agitation une pré-électrolyse à un potentiel suffisamment négatif, pour qu'il y ait réduction des cations présents dans la solution. On laisse ensuite reposer la solution puis les métaux sont redissous par oxydation en utilisant la technique impulsienne. La méthode utilisée pour le dosage est celle des ajouts dosés (CHARLOU, 1983).

5.2.2. Mode opératoire

L'eau de mer est prélevée dans les bacs d'intoxication (20 ml) à l'aide d'une pipette préalablement conservée dans de l'acide nitrique 1 M et rincée à l'eau bidistillée. L'échantillon est alors additionné de 1 % d'HNO₃ et conservé dans des sacs en polyéthylène, soudés, au congélateur à - 20° C.

- 1 ml de cette solution décongelée est prélevé pour l'analyse et placé dans la cellule avec 9 ml d'eau bidistillée.

L'appareil utilisé est un polarographe EG et G Princeton Applied Research modèle 384.

Le dosage peut ensuite être effectué selon les conditions ci-dessous :

MODEL 384 POLAROGRAPHIC ANALYZER

DPS
INITIAL E -0.800 V
FINAL E -0.150 V
PURGE 240 SECONDS
DROP TIME 0.5 SECONDS
SCAN INCREMENT 5 MV
CONDITION 0 SECONDS
CONDITION 0.000 V
DEPOSITION 40 SECONDS
EQUILIBRATE 30 SECONDS
PULSE HEIGHT 0.050 V
REPLICATIONS 1

SAMPLE _____
ANALYTE _____
SUPP. ELEC. _____
SAMPLE PREP. _____

STANDARD ADDITION
BLANK SUBTRACTION: YES
TANGENT FIT: YES
PEAK LOCATION: YES
DERIVATIVE: NO
FORCE LINEAR FIT: NO

10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
OVERRIDE Y N Y Y N N Y N N Y Y

PEAK POT STD 1 STD 2 STD 3



Les teneurs en plomb sont obtenues dans les échantillons par référence à 3 ajouts de quantité connue de Plomb (figure 10). Une courbe d'étalonnage est effectuée pour chaque échantillon (figure 11).

5.2.3. Résultats de la teneur en plomb de l'eau de mer lors de la contamination

La valeur initiale ajoutée de plomb Pb²⁺ sous forme de chlorure PbCl₂ est de 7,44 ppm.

Fig. 10 : Intensité du courant obtenu pour l'échantillon de Pb
et les 3 ajouts par polarographie

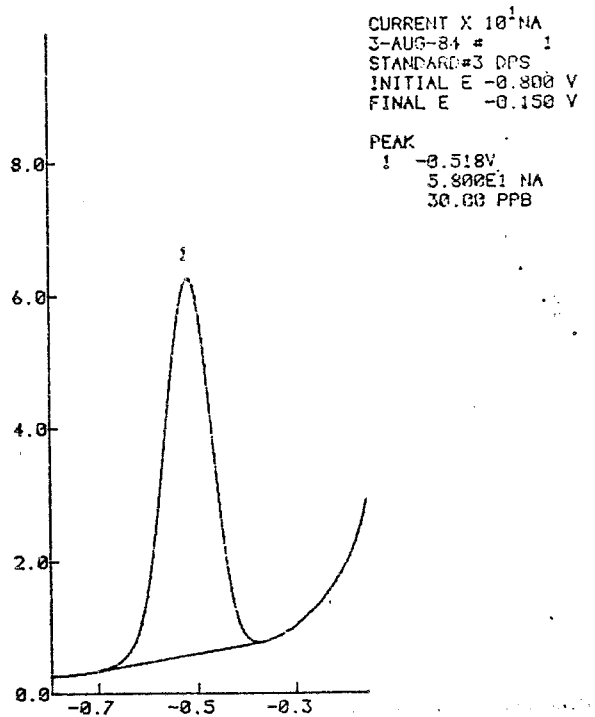
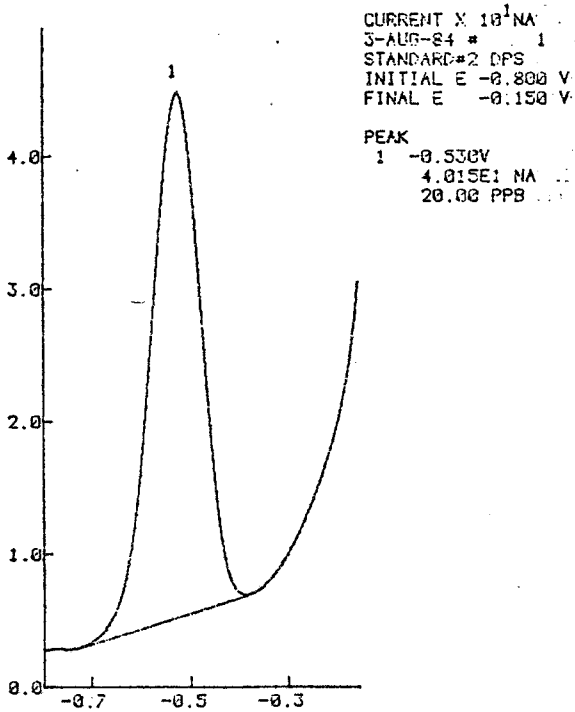
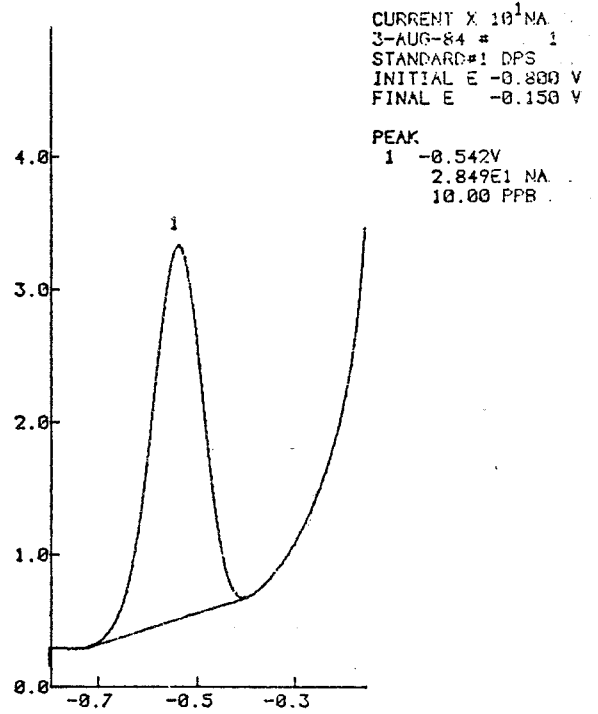
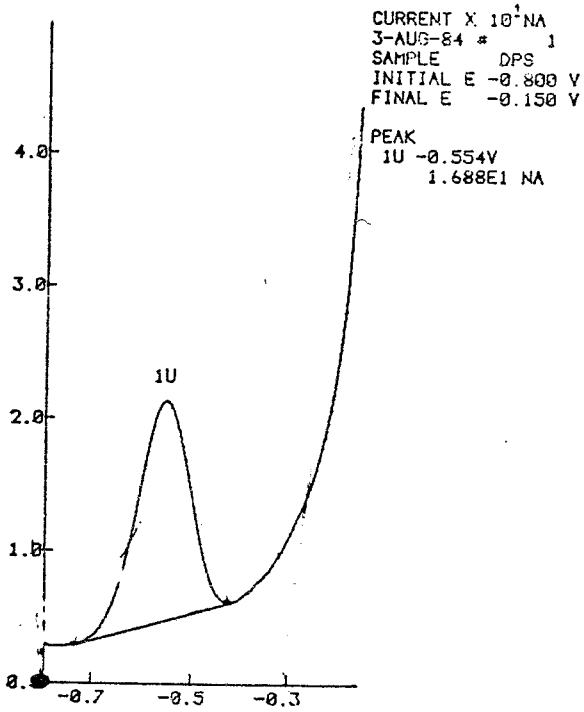
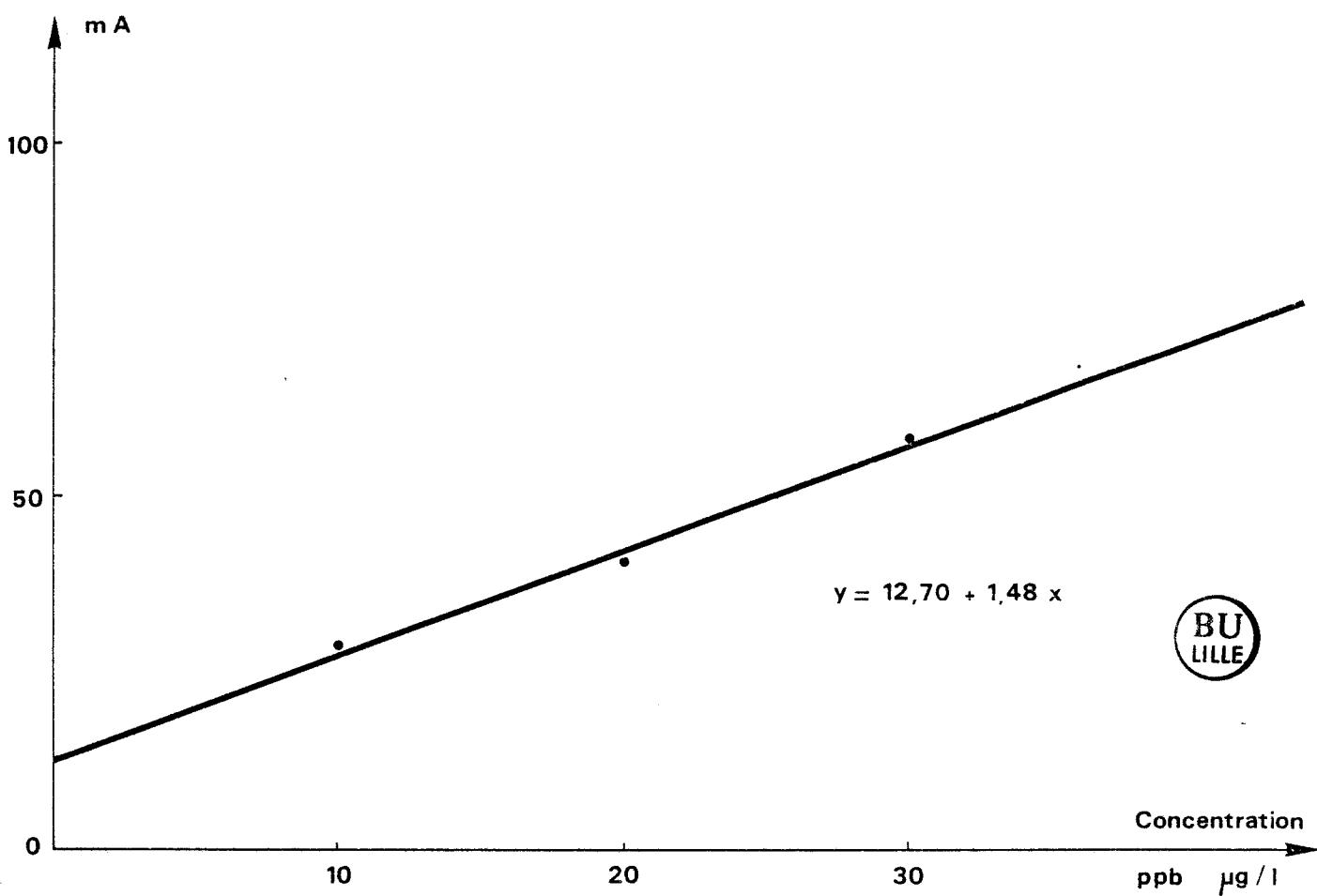


Fig.11 : Courbe d'étalonnage pour le plomb



- Après 5 minutes on ne retrouve dans le bac dépourvu de poissons que 0,114 ppm \pm 0,010 de Pb^{2+} . La teneur en Pb^{2+} du bac contenant les poissons est de : 0,115 ppm \pm 0,013 après 5 minutes ; elle devient 0,015 ppm \pm 0,014 après 5 jours de contamination. La teneur du bac témoin est de : 0,003 ppm \pm 0,001.

5.2.4. Evaluation de la quantité de plomb disponible pour les poissons

Les réactions de précipitation des composés du plomb ont abaissé la teneur en Pb^{2+} de l'eau de mer des bacs de contamination de 7,326 ppm. La quantité de Pb^{2+} effectivement contaminante pour les poissons est de 0,115 ppm \pm 0,013. Au bout de 5 jours, elle est diminuée de 0,100 ppm. Ceci constitue donc la teneur effective en Pb^{2+} prise par les poissons. Toutefois, les éléments précipités comportant du Pb^{2+} peuvent aussi agir sur l'intoxication du poisson par l'intermédiaire des branchies ou par ingestion. Une mise en suspension de ces composés ainsi que des traitements chimiques appropriés auraient pu permettre l'évaluation de la quantité totale effectivement contaminante.

5.3. Résultats de la contamination par le zinc

5.3.1. Comparaison avec la teneur des poissons témoins

Les teneurs en cuivre et en zinc mesurées dans les différents organes lors de l'intoxication sont données en annexe 5. On remarque que les teneurs en zinc des branchies de poissons intoxiqués sont toujours supérieures à celles des poissons témoins. Par contre, pour les autres organes, ces teneurs sont toujours de même ordre que la moyenne des poissons témoins. Les teneurs en cuivre, se situent toujours dans la moyenne des poissons témoins, quel que soit l'organe considéré. (Tableau 15). Nous avons voulu vérifier par un test de comparaison de moyenne si ces différences étaient significatives au seuil de 5 %.

Tableau 15 : Teneurs moyennes en cuivre et zinc des organes de flets témoins et intoxiqués par 10 ppm de $ZnCl_2$

		Foies			
		• Branchies	Reins	Surnageants	Culots
Teneur en Cuivre (ppm)	Intoxiqués	2,306 ± 0,505 n = 6	2,978 ± 1,225 n = 6	15,426 ± 15,215 n = 7	2,396 ± 1,667 n = 9
	Témoins	3,379 ± 4,289 n = 3	4,677 ± 2,690 n = 4	11,92 ± 4,957 n = 3	2,015 ± 0,826 n = 7
Teneur en Zinc (ppm)	Intoxiqués	60,15 ± 26,74 n = 6	73,81 ± 34,31 n = 6	34,97 ± 32,226 n = 7	8,519 ± 4,006 n = 9
	Témoins	43,36 ± 27,99 n = 3	98,6 ± 39,8 n = 4	15,93 ± 5,695 n = 4	5,751 ± 1,7 n = 7



D'après les résultats obtenus sur notre échantillon, aucune différence n'est significative entre les poissons témoins et intoxiqués pour tous les organes étudiés.

5.3.2. Cinétique d'accumulation du zinc

La teneur du zinc dans le surnageant du foie, devient supérieure à celles des poissons témoins après 4 jours d'intoxication et augmente dans le culot après 18 jours. Une augmentation de la teneur en cuivre apparaît également après 27 jours d'intoxication dans le foie (surnageant et culot) (Fig. 12). Nous avons voulu vérifier si ces variations étaient significatives par l'estimation de la droite de régression ou droite des moindres carrés. Le test r permet de préciser la signification de la corrélation observée. Il sera utilisé au seuil de 5 %.

Deux organes présentent une corrélation significative pour notre échantillon, il s'agit du foie et du rein. L'augmentation de la teneur en zinc varie selon le temps d'intoxication. Les figures 13 (a, b, c) représentent les résultats obtenus. Les résultats sont basés sur une intoxication de 9 jours, pour le rein et de 43 jours pour le foie.

Fig. 12 : Teneur en zinc des organes de flets intoxiqués

dans 10 ppm de $ZnCl_2$

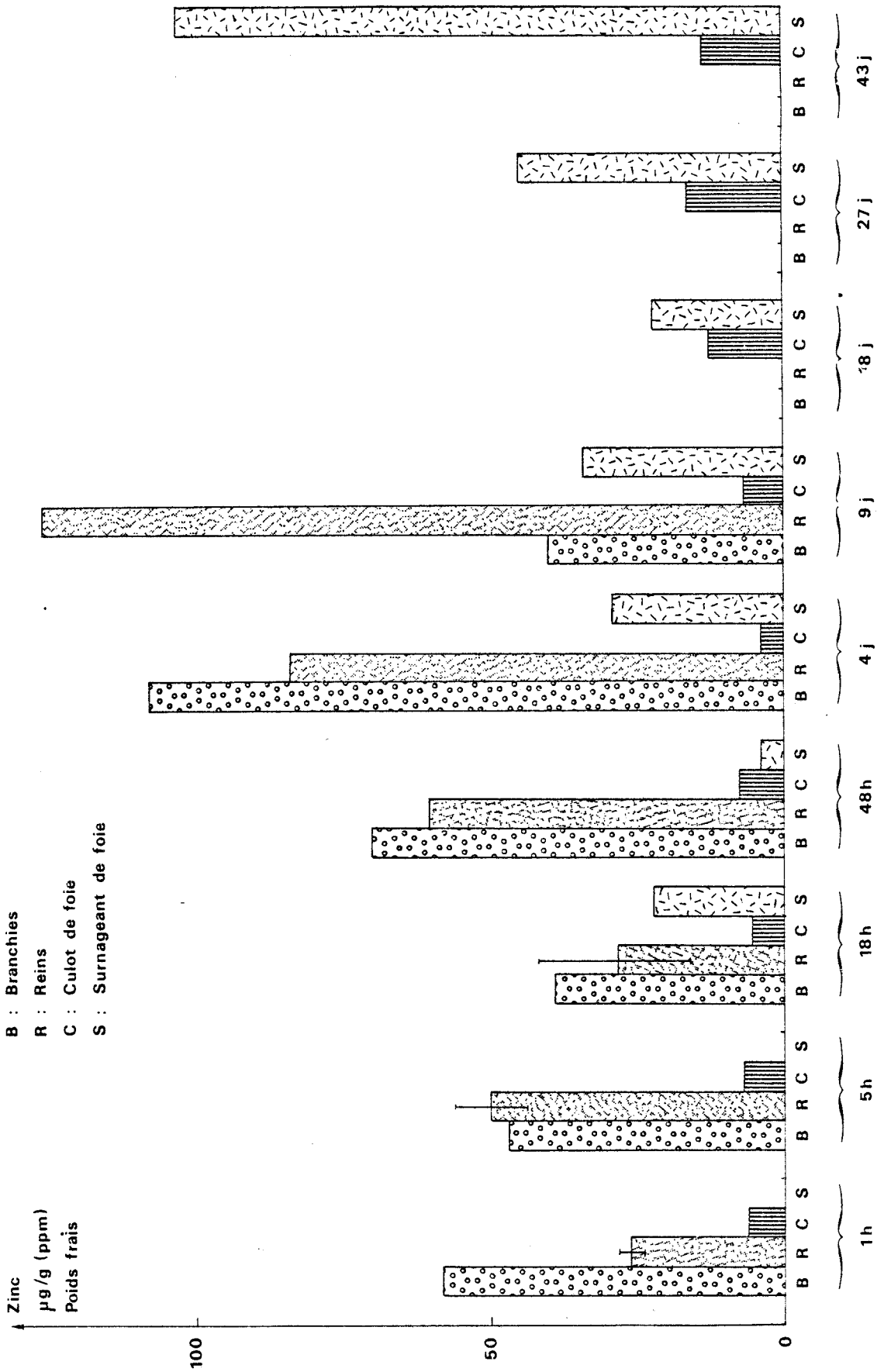


Fig. 13 : Cinétique du zinc lors de l'intoxication par le zinc

Fig. 13 a : Culot de foie

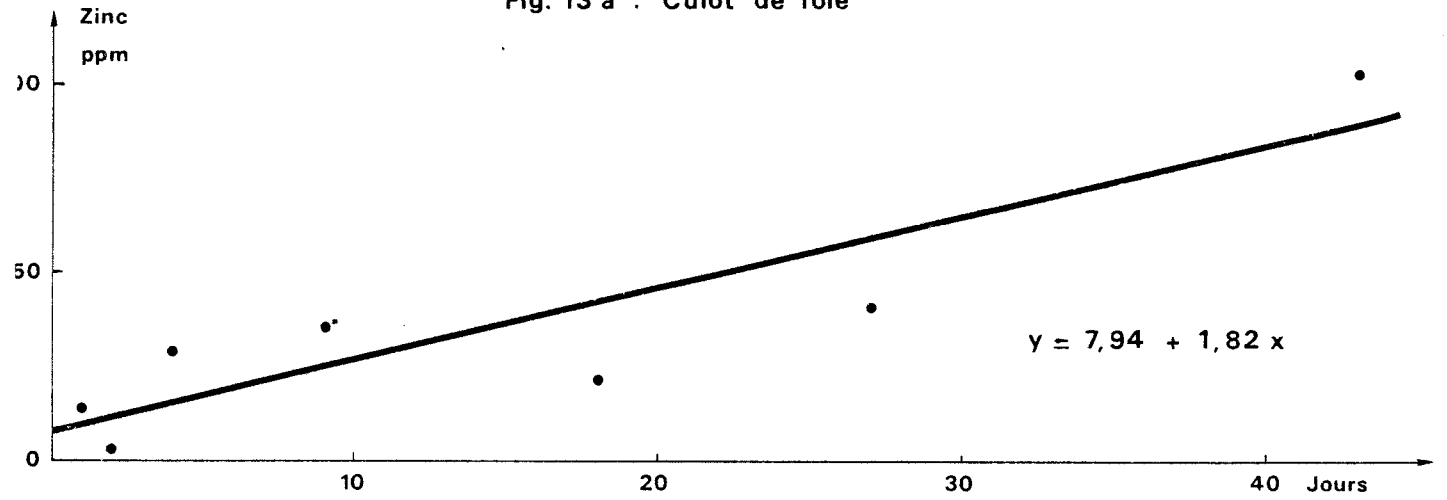


Fig. 13 b : Surnageant de foie

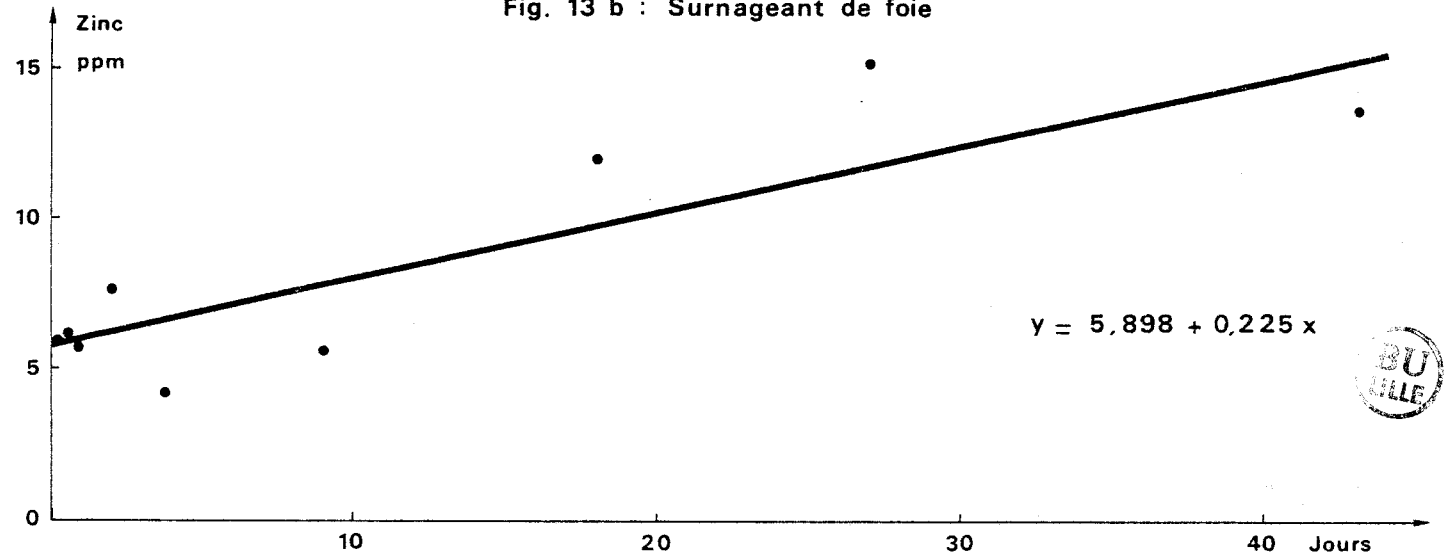


Fig. 13 c : Rein

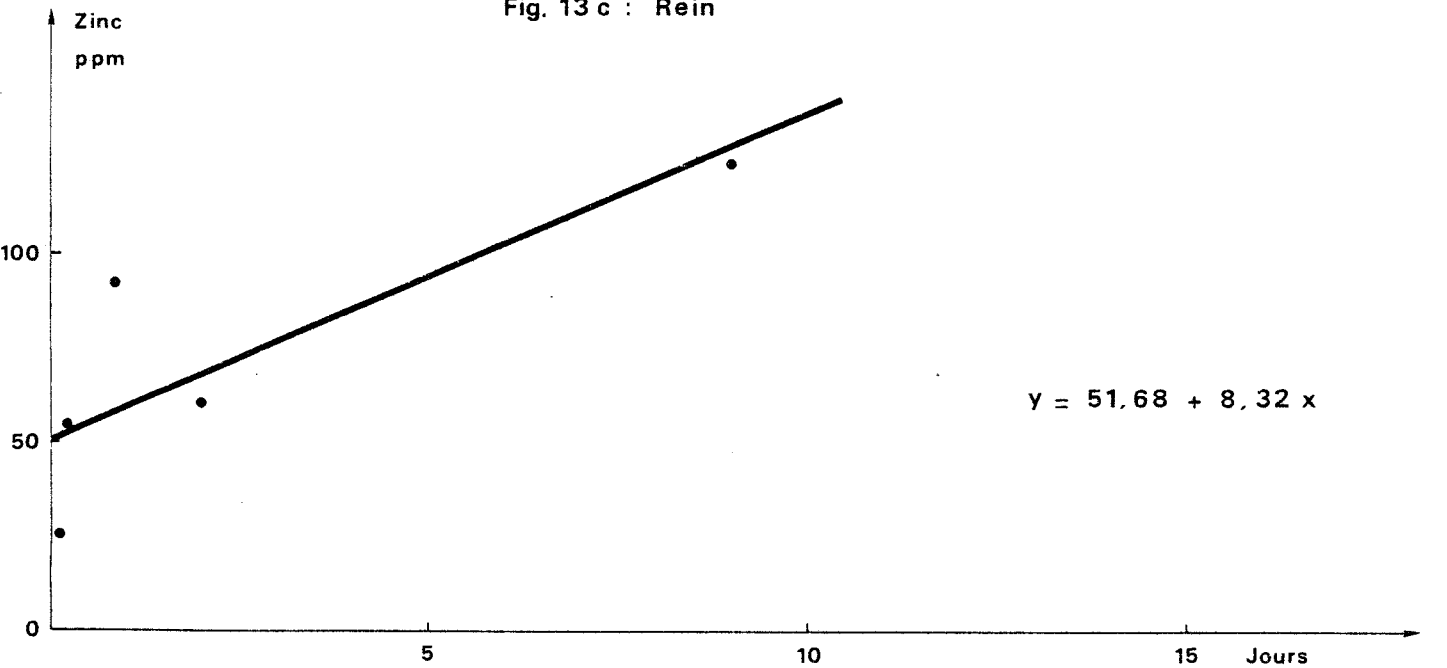


Fig. 14 : Cinétique du cuivre lors de l'intoxication par le zinc

Fig. 14 a : Culot de foie

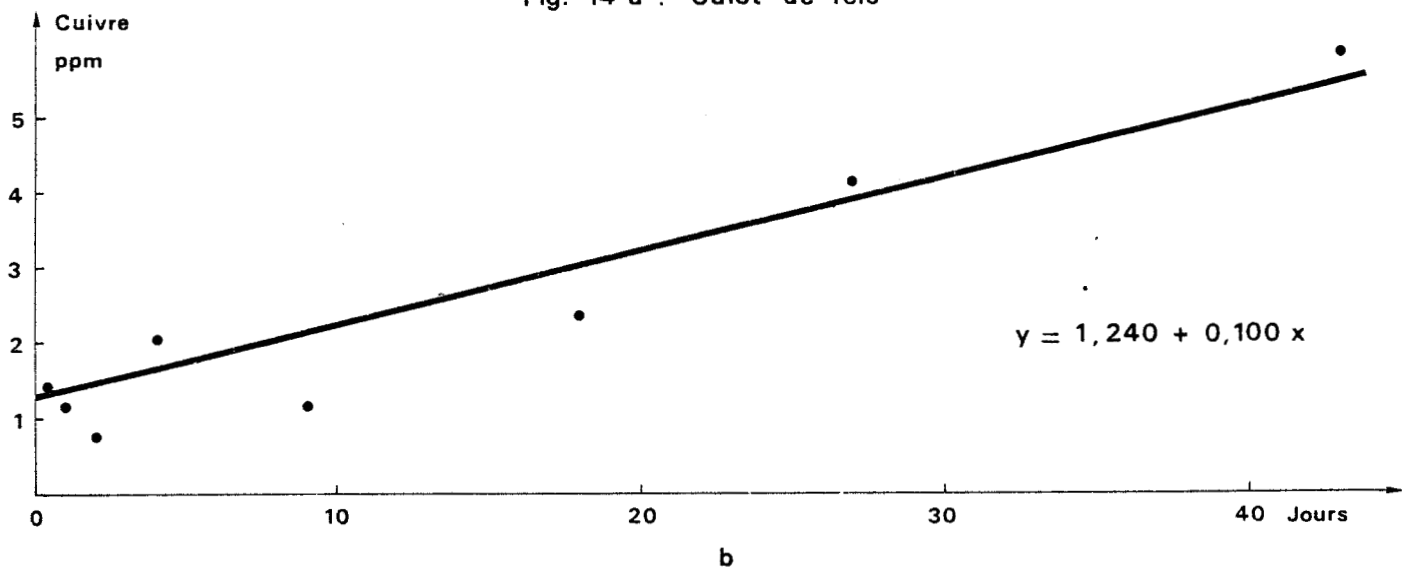


Fig. 14 b : Surnageant de foie

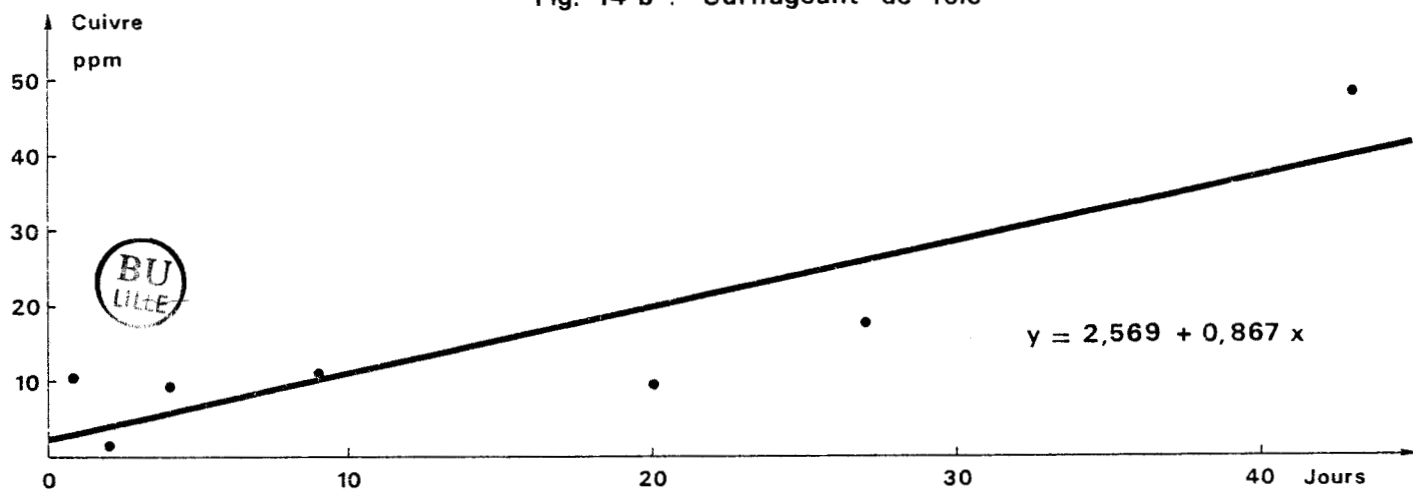
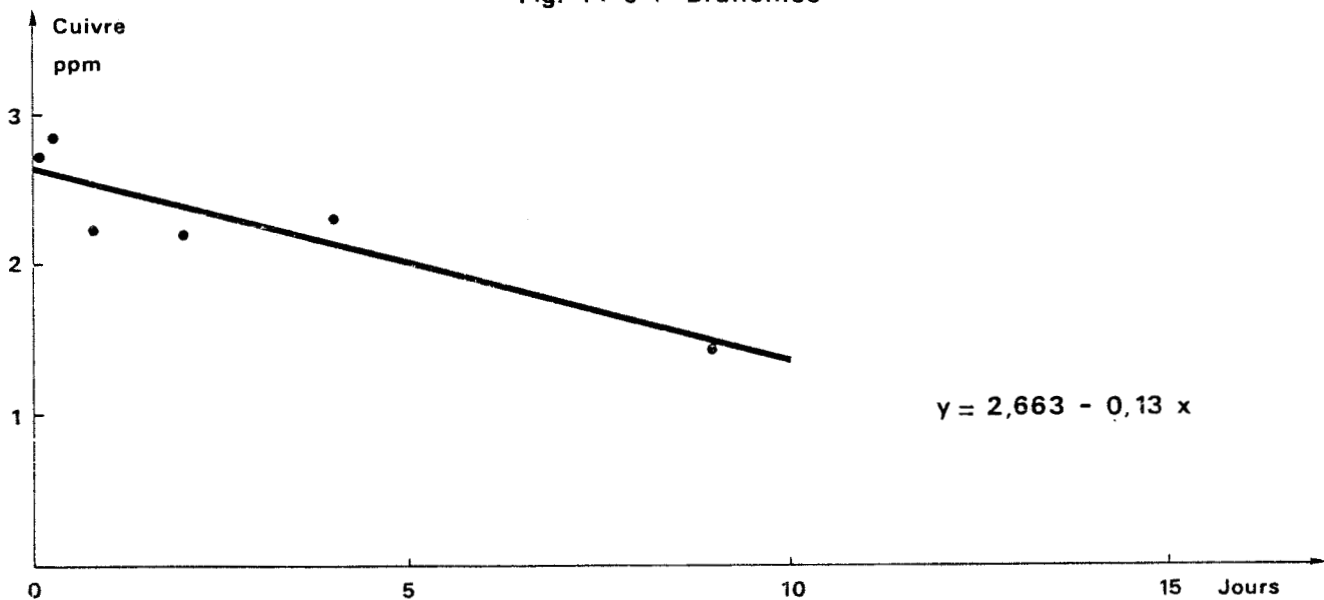


Fig. 14 c : Branchies



5.3.3. Cinétique du cuivre lors de l'intoxication par le zinc

Le métabolisme du cuivre est très important chez les poissons (cf. chapitre 2). Il est donc intéressant de préciser sa cinétique dans le cas de l'intoxication par le zinc. Les résultats obtenus montrent une corrélation significative pour deux organes, positive pour le foie et négative pour les branchies. L'accumulation de cuivre dans le foie lors de l'intoxication par le zinc paraît être dépendante de la durée de contamination pour notre échantillon. Les figures 14 (a, b, c) représentent les résultats obtenus.

5.3.4. Relations entre la teneur en cuivre et la teneur en zinc des différents organes

Le métabolisme du cuivre est souvent lié au métabolisme du zinc, nous avons voulu vérifier s'il existait des corrélations significatives entre la teneur en cuivre et en zinc des différents organes. Seul le foie montre une variation significative au seuil de 5 % entre la teneur en cuivre et en zinc (Fig. 15 et 16). Une augmentation de la teneur en zinc se traduit donc également par une augmentation du cuivre dans le foie.

5.3.5. Relations entre les organes

Les variations de la teneur en cuivre et en zinc ont été évaluées pour les différents organes, pris deux à deux. Il apparaît une relation significative entre la concentration en cuivre du surnageant et celle du rein. (Fig. 17). D'autres données seraient nécessaires afin d'argumenter cette corrélation, le nombre d'échantillons étant très réduit pour le rein. Aucune relation entre les différents organes n'a été mise en évidence pour le zinc dans cette expérience.

5.3.6. Discussion

La différence entre les données obtenues pour le cuivre et le zinc lors de cette expérience n'est pas significative pour les poissons témoins et les intoxiqués. La réaction des poissons apparaît donc semblable et ne semble pas due à la contamination. La dose de polluant introduite dans le milieu ne provoque donc pas de réactions particulières chez les poissons intoxiqués. Il faut néanmoins tenir compte du petit nombre d'indi-

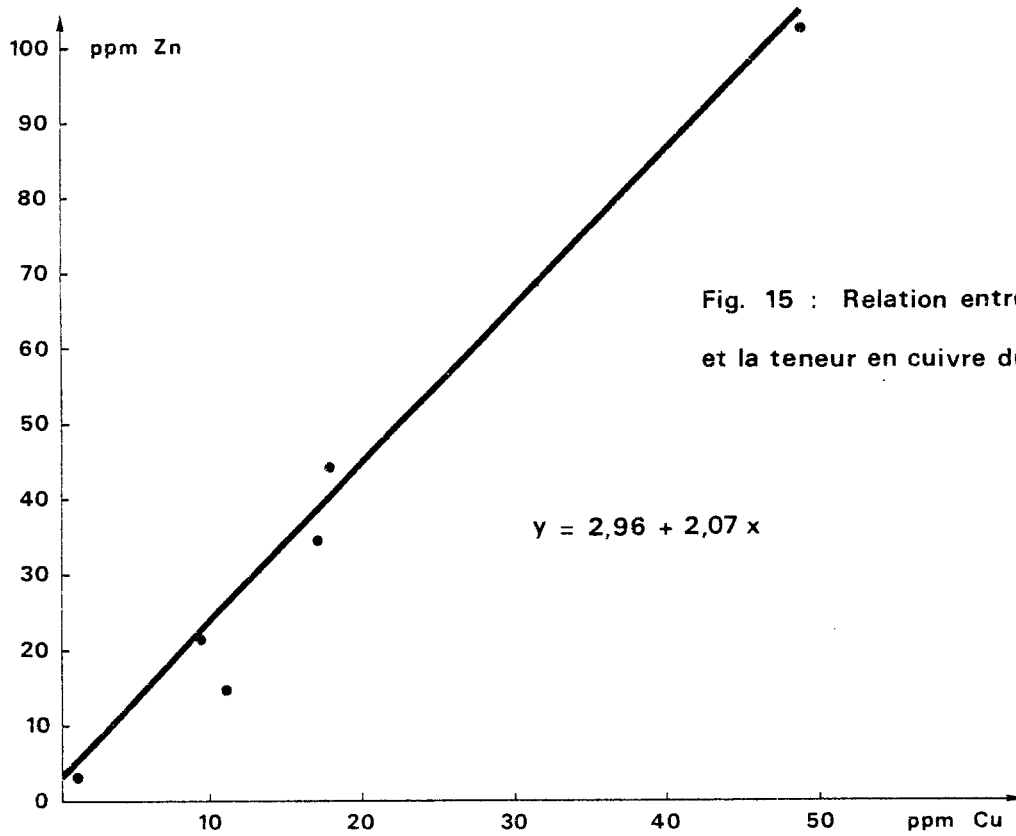


Fig. 15 : Relation entre la teneur en zinc et la teneur en cuivre du surnageant de foie

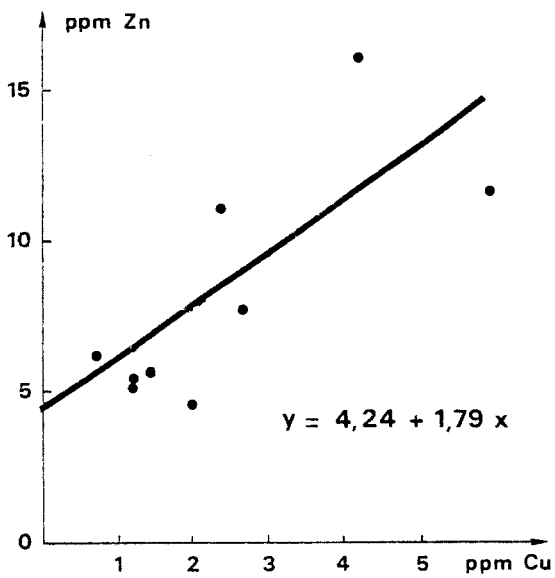


Fig. 16 : Relation entre la teneur en zinc et la teneur en cuivre du culot de foie

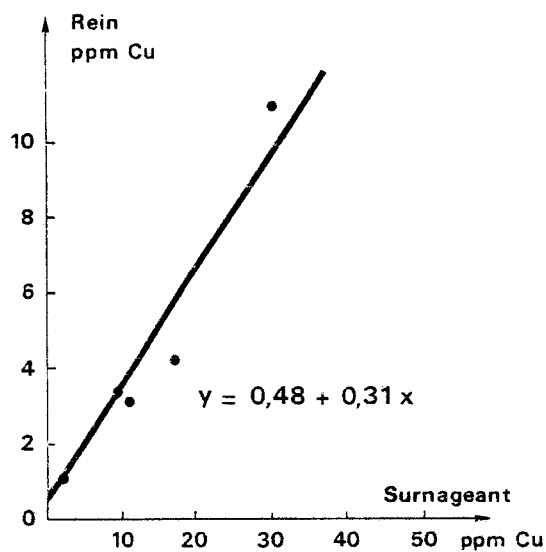


Fig. 17 : Relation entre la teneur en cuivre du surnageant de foie et du rein

vidus que nous avons dosé. On note toutefois une augmentation de la teneur en cuivre et en zinc dans le foie, ainsi que du zinc dans les reins. Ces résultats confirment ceux obtenus par BREMNER et al. en 1975. Ces auteurs ont en effet montré que le jeûne chez les mammifères entraînait une augmentation de la concentration en zinc dans le foie. Ce phénomène a été observé en 1979, par FLOS avec *Scyliorhinus canicula* L.

Les conditions d'expérimentation (jeûne, captivité) semblent donc provoquer une réaction physiologique du poisson quant au métabolisme du zinc et du cuivre.

Nous avons observé également une diminution de la teneur en cuivre des branchies. Néanmoins la concentration de cet organe n'apparaît pas corrélée avec le foie ou les reins. L'étude d'autres organes, ou du sang auraient peut-être pu expliquer la disparition de cet élément. Nous avons mis en évidence une relation entre la teneur en cuivre et la teneur en zinc du foie. Ceci semble indiquer une liaison entre le métabolisme de ces deux éléments déjà citée par plusieurs auteurs (MASON et al., 1981 ; O. BRADY et al., 1981).

5.4. Résultats de la contamination par le plomb

5.4.1. Comparaison avec la teneur des poissons témoins.

.....

Les teneurs en cuivre, plomb et zinc mesurées dans les différents organes lors de l'intoxication sont données en annexe 6. La figure 18 les représente sous forme d'histogrammes. On remarque d'après ces résultats qu'il ne semble pas exister d'accumulation privilégiée dans un organe. Les teneurs sont en effet très variables. Des comparaisons de la concentration des trois métaux pour les différents organes (Tableau 16) ont été effectuées entre les poissons témoins et intoxiqués. Nous avons utilisé le test t de Student en prenant les moyennes deux à deux, le seuil de validité étant de 5 %.



Fig. 18 : Teneur en plomb des organes de flets intoxiqués dans 10 ppm de PbCl₂

B : Branchies
R : Reins
C : Culot de foie
S : Surnageant de foie

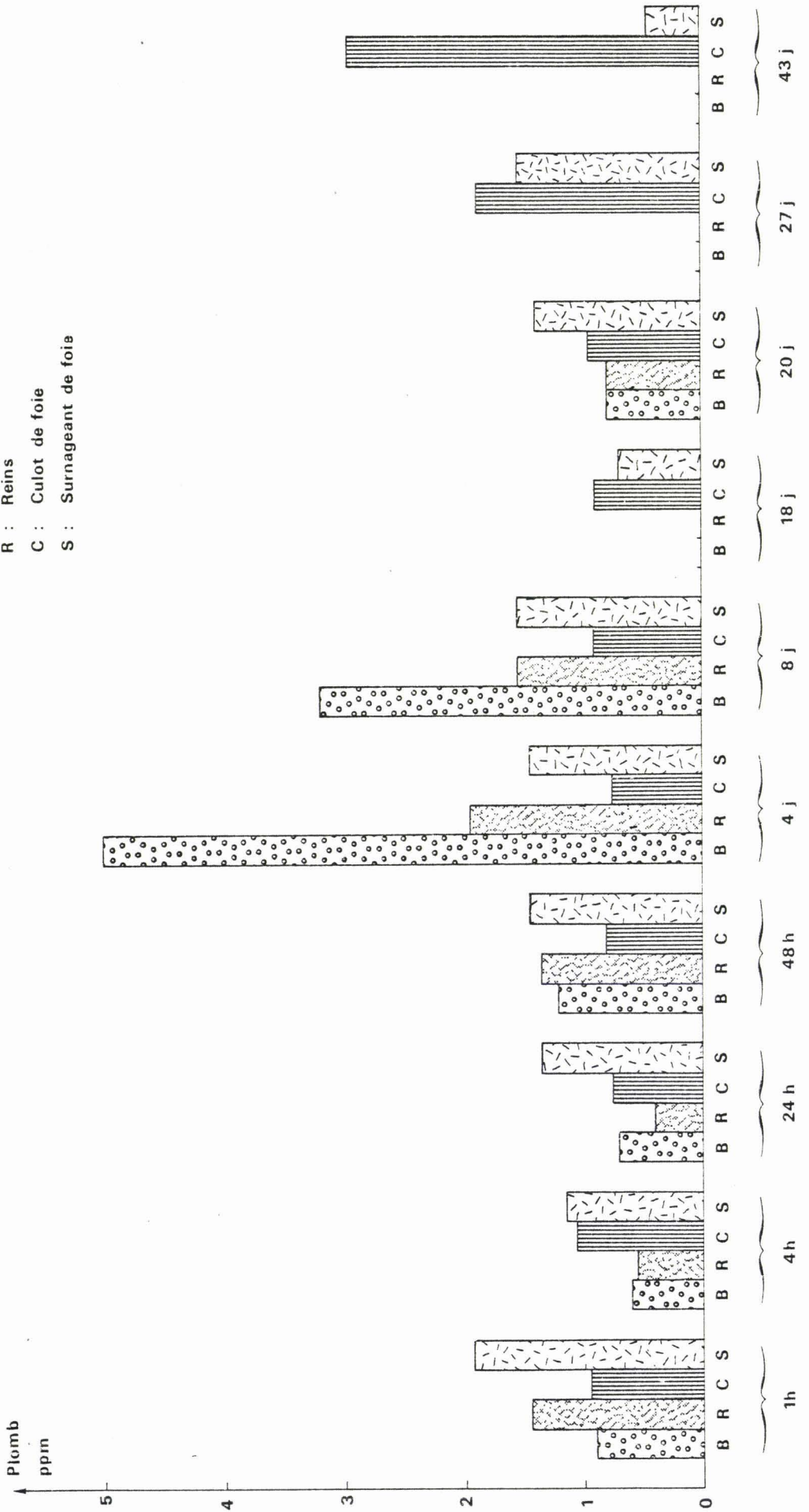


Tableau 16 : Teneurs moyennes des organes de flets témoins et intoxiqués par 10 ppm de PbCl₂ (Cu,Zn,Pb)

		Foies			
		Branchies	Reins	Culots	Surnageants
Teneur en Cuivre (ppm)	Intoxiqués	1,489 ± 0,971 n = 6	1,873 ± 0,775 n = 6	3,08 ± 1,341 n = 10	14,38 ± 7,925 n = 9
	Témoins	0,611 ± 0,385 n = 5	0,682 ± 0,231 n = 4	2,863 ± 1,625 n = 8	12,94 ± 6,183 n = 8
Teneur en Zinc (ppm)	Intoxiqués	24,53 ± 19,31 n = 5	76,64 ± 39,51 n = 6	18,11 ± 23,07 n = 10	32,22 ± 22,21 n = 9
	Témoins	3,718 ± 3,461 n = 4	30,65 ± 9,366 n = 4	18,75 ± 19,59 n = 8	32,57 ± 18,206 n = 8
Teneur en plomb (ppm)	Intoxiqués	1,874 ± 1,786 n = 6	1,219 ± 0,568 n = 6	1,200 ± 0,713 n = 10	1,3361 ± 0,439 n = 10
	Témoins	0,845 ± 0,655 n = 5	0,298 ± 0,107 n = 4	0,105 ± 0,072 n = 8	0,071 ± 0,034 n = 8

Des différences significatives apparaissent concernant la teneur en plomb des reins et du foie. Les branchies ne présentent pas de variation pour ce métal, par contre cet organe possède des teneurs en zinc, plus élevées chez les poissons intoxiqués, de même que le rein. Les différences de la teneur en zinc pour le foie ne sont pas significatives pour notre échantillon. Seul le rein présente une variation de la concentration en cuivre après intoxication.

5.4.2 Cinétique d'accumulation du plomb

- Branchies - rein - foie

Nous avons étudié la cinétique d'accumulation du plomb dans les différents organes lors de l'intoxication par 10 ppm de PbCl₂ (Fig. 18). Nous avons vérifié la signification de ces variations pour les trois organes étudiés. Le culot présente une augmentation significative de la teneur en plomb au seuil de 5 % (Fig. 19). Les données bibliographiques concernant les intoxications par le plomb incriminent le sang comme principal agent de transport jusqu'aux os (cf. chapitre II). Nous avons voulu préciser les variations des teneurs en plomb lors de l'intoxication du poisson.

- Sang

• Prélèvement et préparation des échantillons

Le dosage du plomb s'effectue dans le sang total après prélèvement par ponction dans le ventricule à l'aide d'une pipette héparinée (TOURNAMILLE, 1975). Le traitement de l'échantillon est réalisé selon une technique communi-

Fig. 19 : Cinétique du plomb lors de l'intoxication par le plomb

Fig. 19 ; Culot de foie

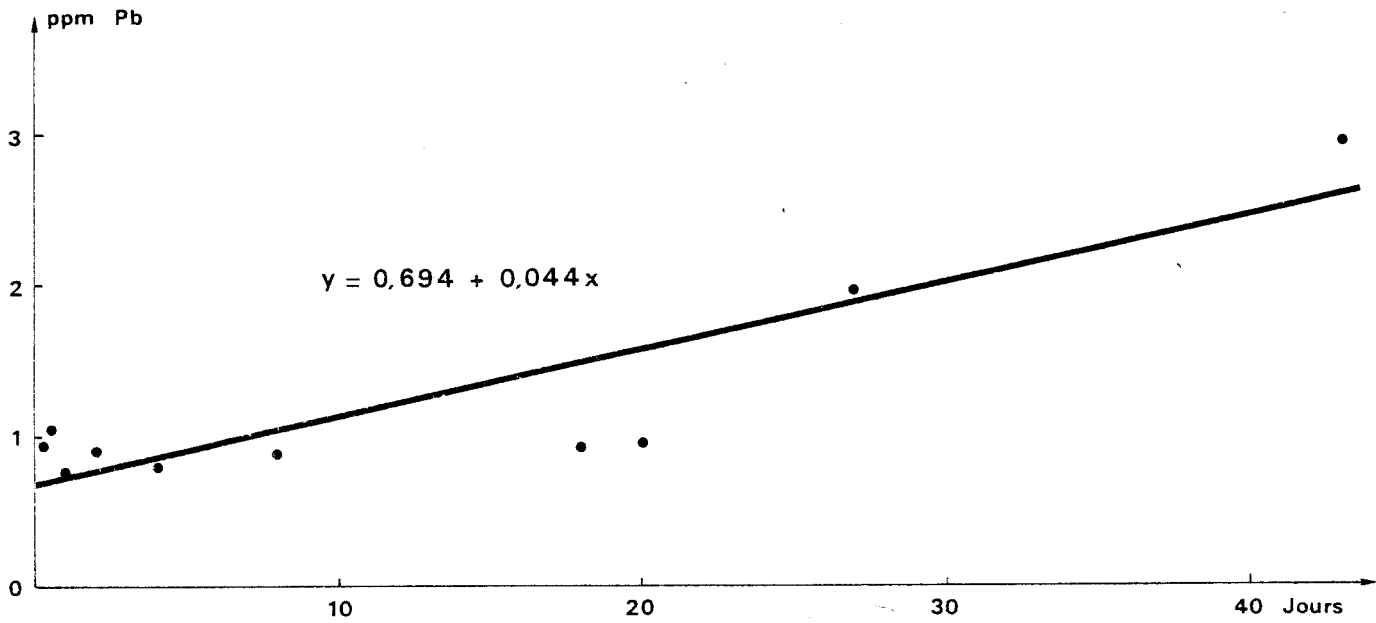
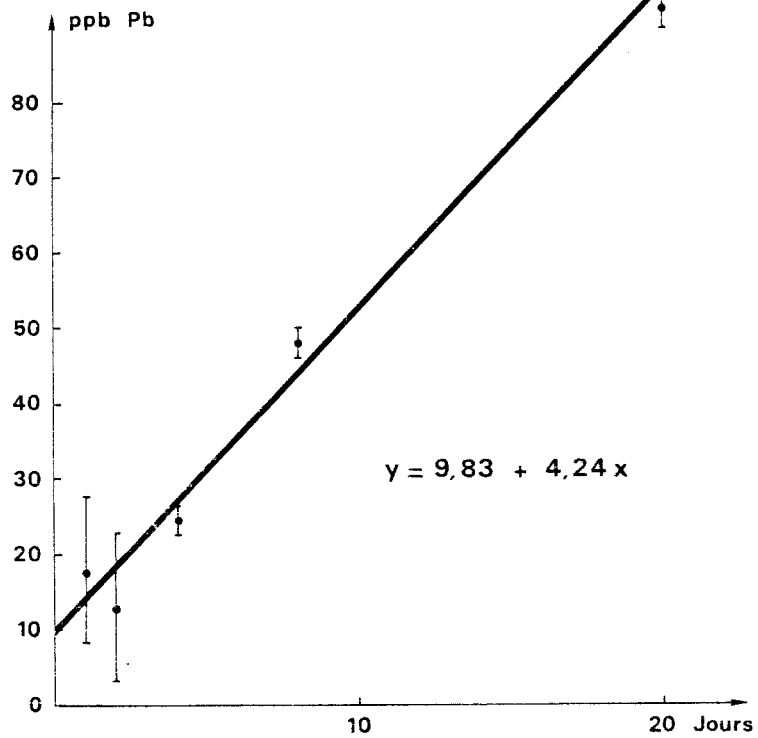


Fig. 20 : Sang total



quée par le service d'analyse biologique du Centre Hospitalier Régional de Lille. 0,5 ml de sang sont prélevés et dilués jusqu'à 5 ml dans du triton X₁₀₀, à une concentration de 5‰. L'analyse de l'échantillon est effectuée directement par spectrophotométrie d'absorption atomique au four à graphite.

• Résultats

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau 17

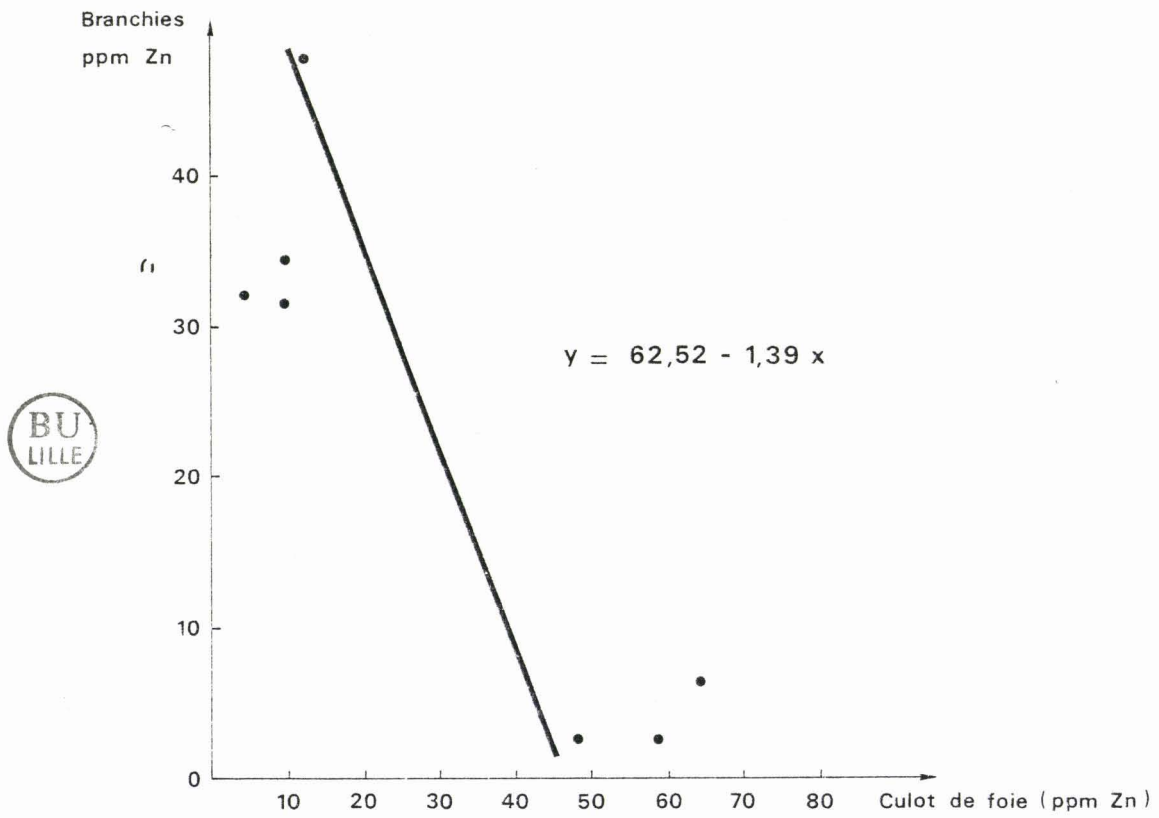
Tableau 17 : Teneur en plomb du sang total des flets intoxiqués dans 10ppm de PbCl₂.

Durée de l'intoxication	1 h	4 h	1 j	2 j	4 j	8 j	20 j
Poissons intoxiqués Plomb (ppb)	< S	< S	18,4 ± 10	12,9 ± 10	24,5 ± 2	48 ± 2	93,8 ± 5
Poissons témoins Plomb (ppb)	< S	< S	< S	< S	< S	16 ± 8,1	17 ± 5,3

< S = inférieur au seuil de détection de l'appareil.

La figure 20 représente la cinétique d'accumulation du plomb dans le sang total des flets intoxiqués par 10 ppm de PbCl₂. Une corrélation très significative (p > 0,01) a été mise en évidence. La teneur en plomb des poissons témoins est inférieure à la sensibilité de l'appareil jusqu'au 8ème jour. Les deux poissons témoins dosés le 8ème et le 20ème jour présentent une faible teneur en plomb, équivalente à celle trouvée pour les poissons intoxiqués le 1er et le 2ème jour. Il apparaît donc que l'augmentation du plomb dans le sang des poissons intoxiqués ne soit réalisée qu'à partir du 2ème jour d'intoxication. Quelques dosages ont été effectués sur les poissons provenant du milieu naturel. Les teneurs mesurées sont toujours inférieures à la sensibilité de l'appareil (< 1 ppb).

Fig. 21 : Relation entre la teneur en zinc des branchies et du culot de foie lors de l'intoxication au plomb



5.4.3. Relations entre les organes selon leur teneur en cuivre,
.....
en zinc et en plomb
.....

Nous avons, en premier lieu, recherché les relations pouvant exister dans chaque organe entre les différents métaux pris deux à deux. Aucun organe n'a présenté de corrélations significatives. Les variations des différents métaux entre deux organes ont ensuite été évaluées. Une corrélation négative, significative au seuil de 5 %, est apparue entre les branchies et le culot de foie pour le zinc (Fig. 21). Les autres variations entre organes pour le zinc, cuivre et plomb n'ont pas montré de corrélations significatives.

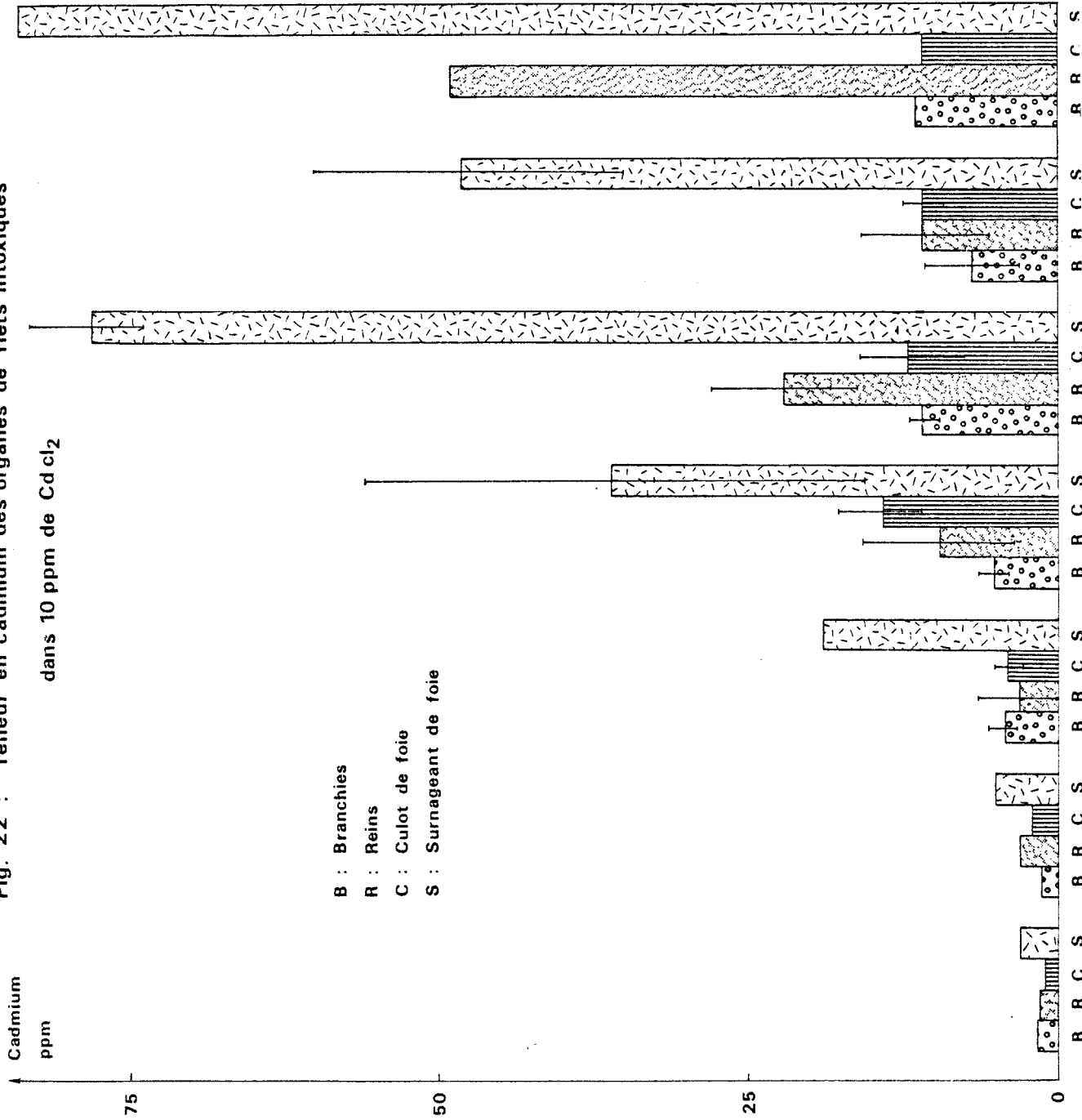
5.4.4. Discussion
.....

Les branchies pour notre expérience, présentent la plus forte teneur en plomb, néanmoins la différence entre les poissons témoins et intoxiqués n'est pas significative. Les poissons utilisés lors de cette expérience et tués le 4ème et 8ème jour possédaient déjà de fortes teneurs en plomb avant l'intoxication. Le foie et le rein présentent des variations significatives mais aucun organe ne peut être considéré comme site d'accumulation du plomb. Ces résultats sont en contradiction avec ceux cités par REICHERT, en 1979, qui a montré une concentration préférentielle du plomb dans le rein postérieur du saumon Coho. De même, SCHULZ-BALDES en 1974, avait décelé une accumulation du plomb dans le rein et les branchies des moules. D'autres variations apparaissent entre les poissons témoins et intoxiqués. On observe une concentration plus forte du cuivre et du zinc dans le rein, néanmoins aucune relation entre les organes n'a pu être mise en évidence pour ces métaux. Le cuivre et le zinc des reins ne semblent donc pas provenir d'une redistribution tissulaire issue des branchies ou du foie. La concentration en zinc des branchies des poissons contaminés est plus élevée que celle des poissons témoins. Cette augmentation correspond certainement à une réaction du poisson face à l'intoxication ; on observe également une relation entre la teneur en zinc des branchies et du culot de foie. L'augmentation de la teneur en zinc dans le culot est liée à une baisse de celle des branchies.

Les deux sites d'accumulation du plomb en fonction du temps d'intoxication sont le culot de foie et le sang. Ceci confirme les données recensées dans la bibliographie. Le foie sera étudié de façon plus approfondie quant à ses variations de teneurs en métaux dans le chapitre IV .



Fig. 22 : Teneur en cadmium des organes de flets intoxiqués



5.5. Résultats de la contamination par le cadmium

5.5.1. Comparaison avec les poissons témoins

Les résultats de la teneur en métaux des poissons lors de l'intoxication au cadmium sont présentés en annexe 7. Une comparaison de la concentration entre les poissons témoins et intoxiqués est effectuée au moyen du test t de Student (Tableau 18).

Tableau 18 : Teneurs moyennes des organes de flets témoins et intoxiqués par 10 ppm de CdCl₂ (Cu,Zn,Cd)

		Foies			
		Branchies	Reins	Culots	Surnageants
Teneur en Cuivre (ppm)	Intoxiqués	0,829 ± 0,276 n = 7	1,785 ± 0,470 n = 7	3,58 ± 0,934 n = 7	10,452 ± 4,987 n = 7
	Témoins	0,658 ± 0,184 n = 5	1,247 ± 0,192 n = 5	4,341 ± 5,335 n = 5	5,255 ± 2,446 n = 5
Teneur en Zinc (ppm)	Intoxiqués	23,63 ± 7,21 n = 7	39,33 ± 28,47 n = 7	11,05 ± 4,089 n = 6	22,30 ± 3,858 n = 7
	Témoins	24,36 ± 3,010 n = 5	38,57 ± 19,71 n = 5	11,867 ± 10,289 n = 5	20,15 ± 7,839 n = 5
Teneur en Cadmium (ppm)	Intoxiqués	5,90 ± 4,21 n = 7	17,15 ± 23,10 n = 7	7,757 ± 5,121 n = 7	38,79 ± 33,16 n = 7
	Témoins	0,229 ± 0,130 n = 5	0,131 ± 0,075 n = 5	0,149 ± 0,116 n = 5	0,343 ± 0,212 n = 5



Les concentrations en cadmium sont toujours supérieures chez les poissons intoxiqués quel que soit l'organe étudié. Ces variations sont significatives au seuil de 5 %. Seul le surnageant de foie présente une différence significative de la teneur en cuivre des poissons intoxiqués. La quantité de cuivre pour les autres organes, ainsi que la quantité de zinc ne sont pas différentes significativement dans notre échantillon.

5.5.2. Cinétique d'accumulation du cadmium

Il apparaît une augmentation importante de la teneur en cadmium au niveau du surnageant et du rein lors de l'intoxication (Fig. 22). La teneur du cadmium dans le culot et les branchies varie également mais de façon moins prononcée. Afin de vérifier ces variations, nous avons effectué un calcul de la droite de régression, caractérisée par le test r, utilisé au seuil de validité de 5 % (Fig. 23 a, b, c). Tous les organes étudiés présentent une augmentation significative de la teneur en cadmium en fonction du temps d'intoxication.

Fig. 23 : Cinétique du cadmium lors de l'intoxication par le cadmium

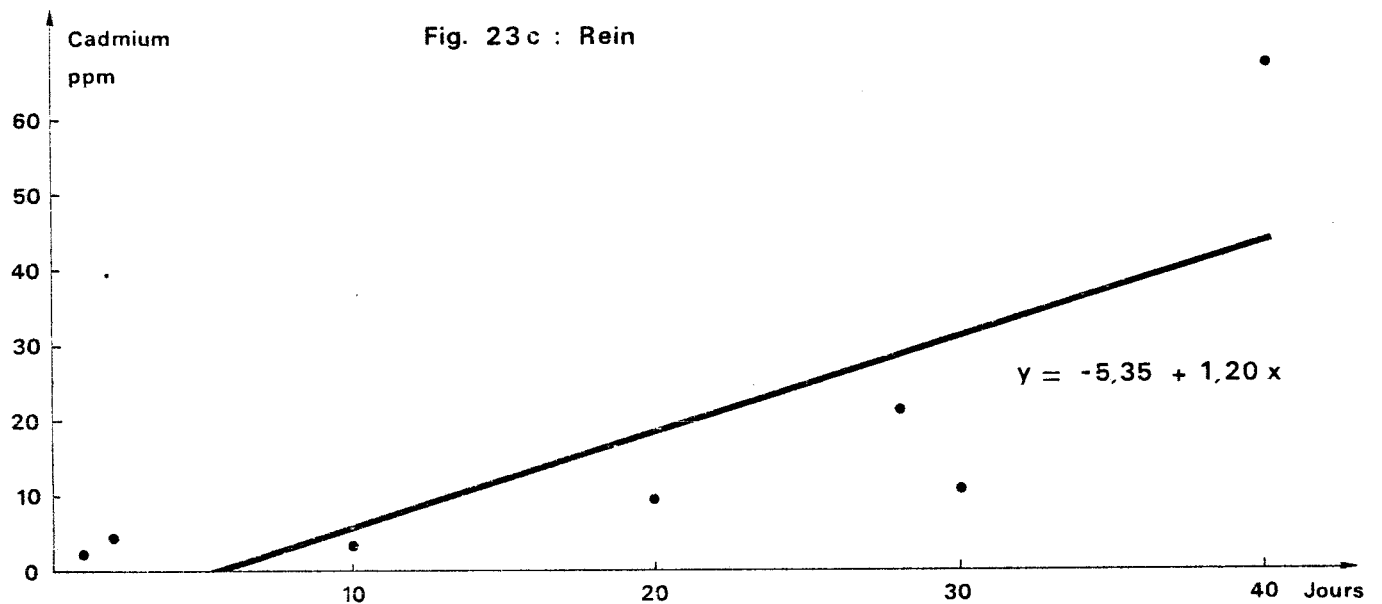
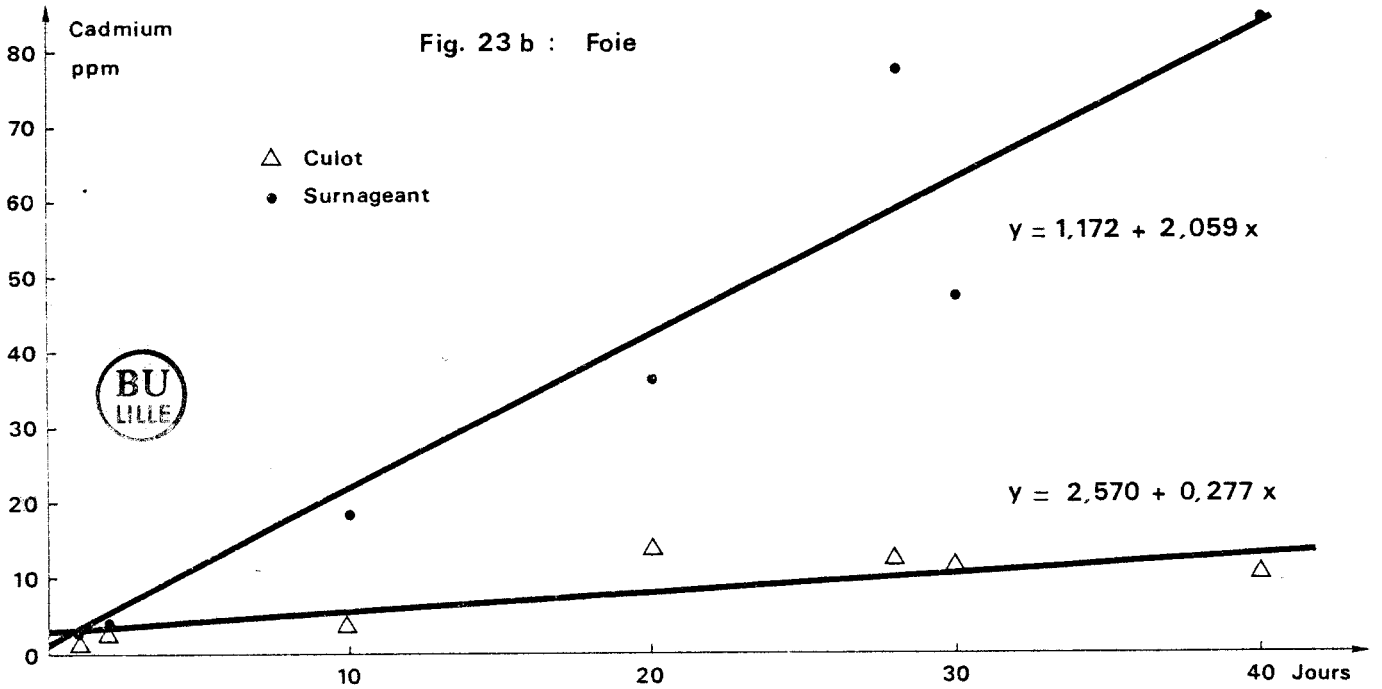
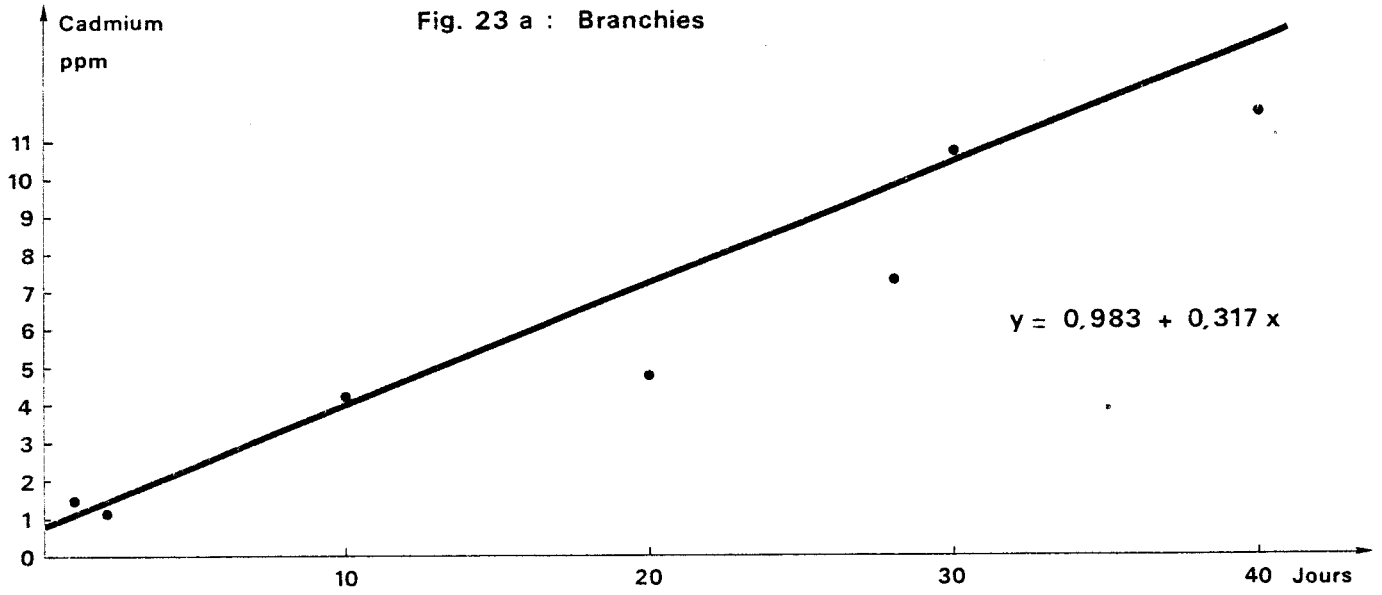


Fig. 24 : Cinétique du zinc dans le culot

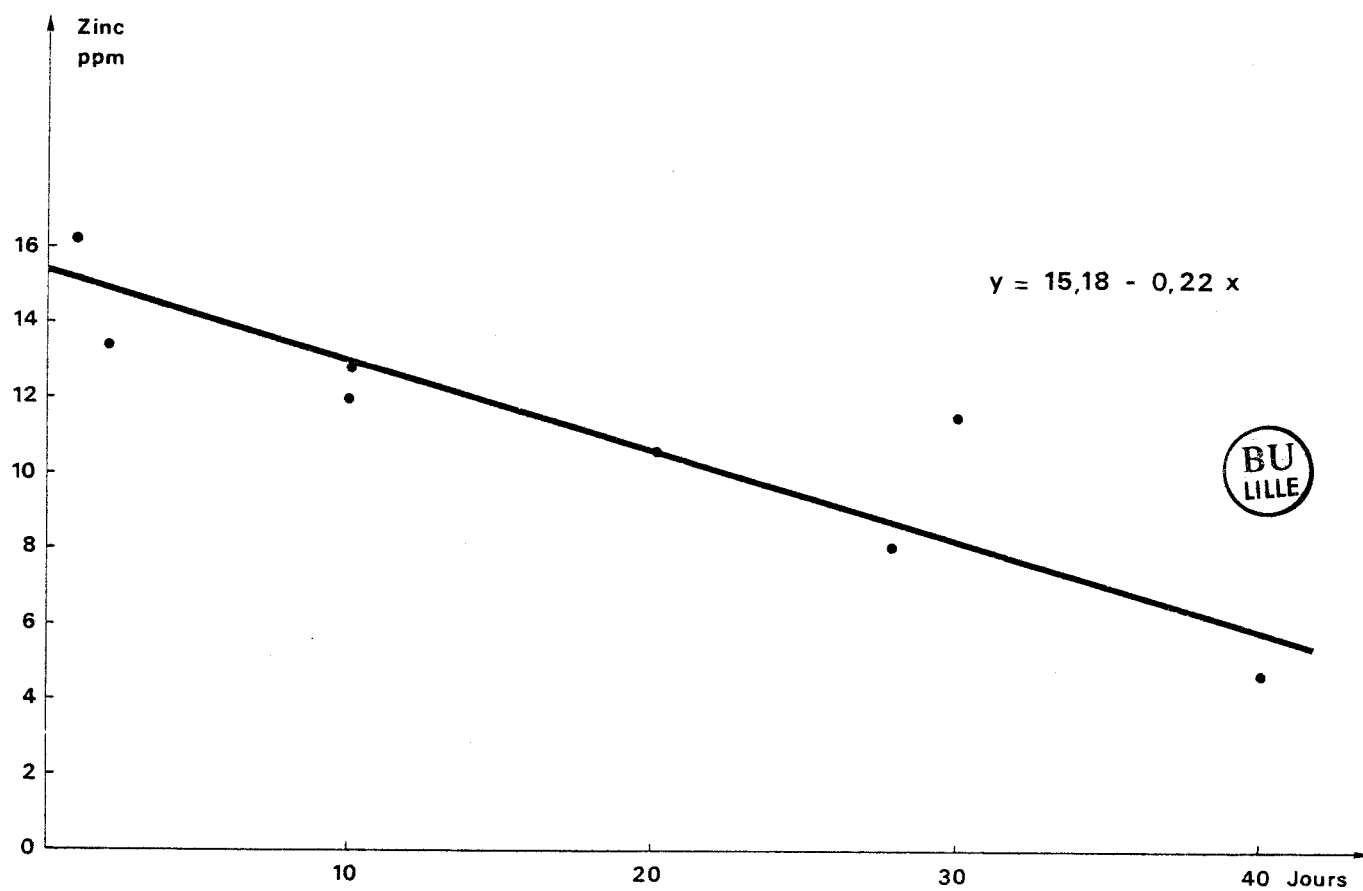


Fig. 25 : Relation entre la teneur en cadmium et la teneur en cuivre dans les reins

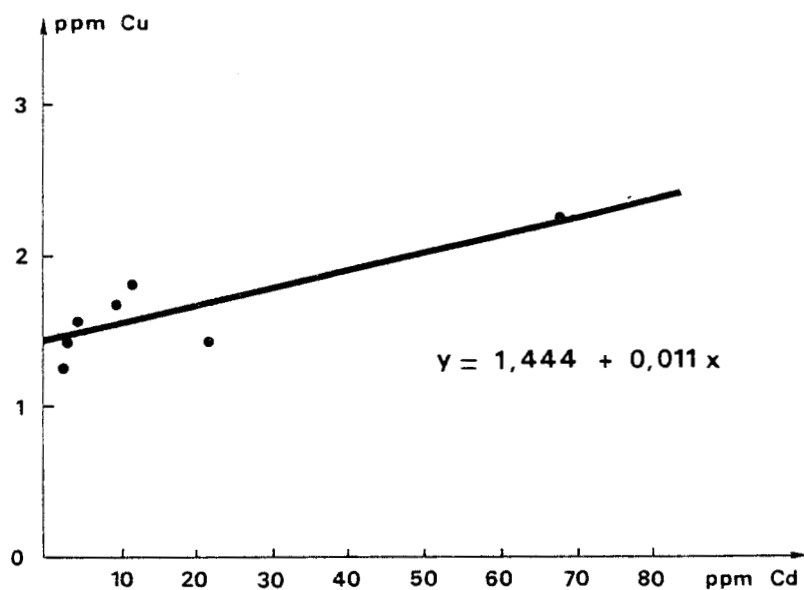
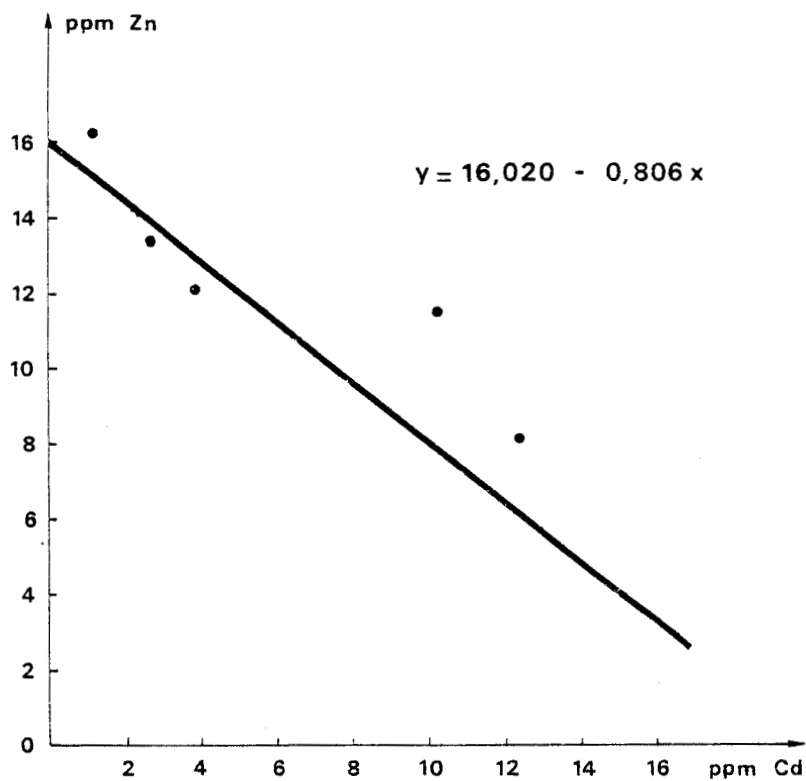


Fig. 26 : Relation entre la teneur en cadmium et la teneur en Zinc du culot de foie



5.5.3. Cinétique d'accumulation du zinc et du cuivre lors de
l'intoxication par le cadmium

Le culot de foie présente une variation significative négative pour le zinc lors de l'intoxication par le cadmium. La teneur du zinc dans le culot baisse donc en fonction de la durée d'intoxication (Fig. 24). Les autres organes n'ont pas montré de variations significatives en zinc et cuivre au cours de l'intoxication par le Cadmium.

5.5.4. Relations entre la teneur en cuivre, zinc et cadmium des
différents organes

Les métaux sont étudiés deux par deux pour chaque organe. Des variations significatives de la teneur en cadmium avec le cuivre dans les reins et avec le zinc dans le culot de foie apparaissent après intoxication par le cadmium. Ce métal semble donc induire une augmentation de la teneur en cuivre des reins (Fig. 25) et une diminution de la teneur en zinc du culot de foie (Fig. 26).

5.5.5. Relation entre les organes

Il n'existe pas de relations entre les organes quant à l'accumulation ou à la diminution du cuivre et du zinc. Par contre, nous avons mis en évidence trois corrélations significatives pour le cadmium entre le surnageant de foie et les trois autres organes étudiés. L'augmentation de la teneur en cadmium des branchies est liée à une augmentation de la teneur du surnageant de foie (Fig. 27). L'augmentation de la teneur en cadmium du surnageant est aussi liée à une augmentation dans le culot et le rein (Fig. 28 et 29).

5.5.6. Discussion

Les poissons intoxiqués présentent toujours une différence significative avec les poissons témoins quant à la teneur en cadmium. Pour le cuivre et le zinc, une seule variation a été mise en évidence, concernant la teneur du surnageant et ceci exclusivement dans le cas du cuivre. L'augmentation du cadmium est proportionnelle au temps d'intoxication pour les trois organes étudiés. Ce résultat concorde avec les données bibliographiques et confirme la toxicité très importante du cadmium envers les organismes vivants. Certains résultats obtenus lors de cette contamination coïncident

Fig. 27 : Relation entre la teneur en cadmium des branchies et du surnageant de foie

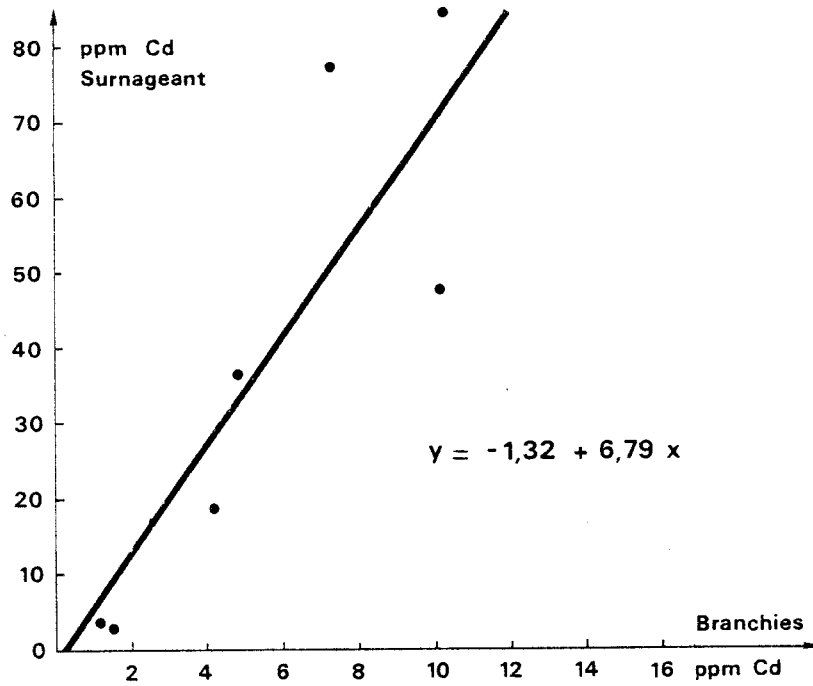


Fig. 28 : Relation entre la teneur en cadmium du surnageant et du culot de foie

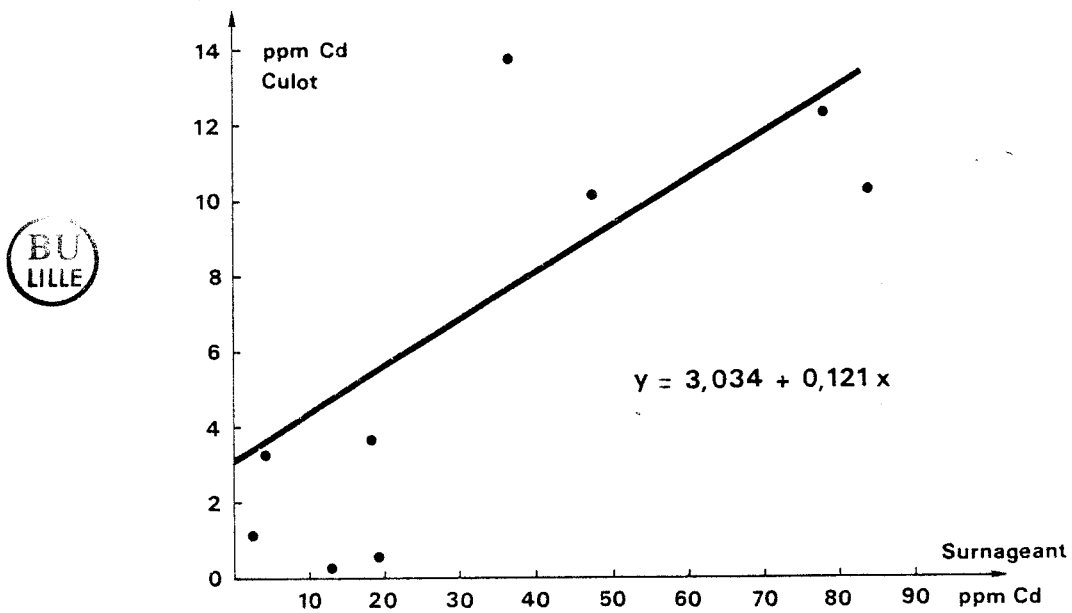
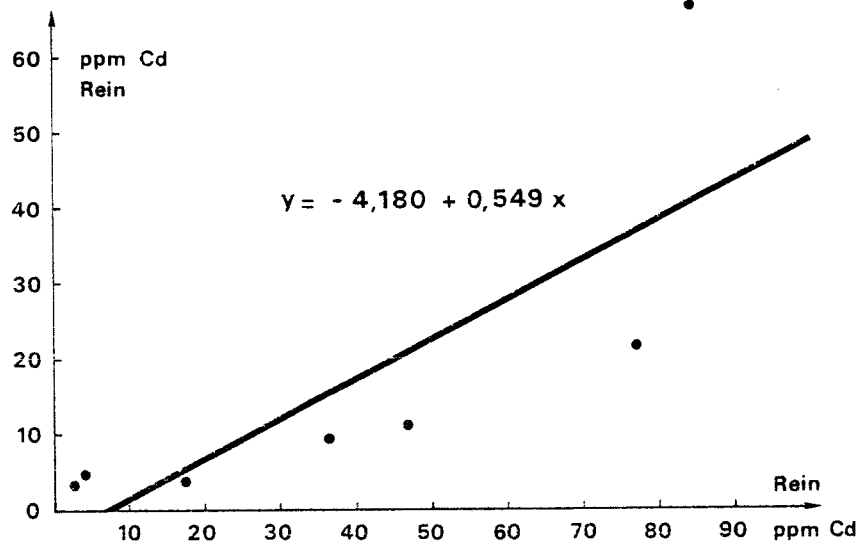


Fig. 29 : Relation entre la teneur en cadmium du surnageant de foie et du rein



avec ceux de NOEL-LAMBOT (1980) lors de ses travaux sur l'anguille. Le foie présente les plus fortes teneurs en cadmium, puis le rein et ensuite les branchies. Nous avons également montré que l'augmentation de la teneur en cuivre des reins est proportionnelle à la teneur en cadmium de ces organes. Nous observons également une baisse de la concentration en zinc du culot de foie en fonction du temps d'intoxication. Ce résultat est en contradiction avec ceux de WEBB en 1972 obtenus sur le rat et ceux de NOEL-LAMBOT sur l'anguille. Ces deux auteurs ont en effet montré qu'il existait une augmentation significative de la concentration en zinc du foie total lors d'une intoxication par le cadmium. Néanmoins les travaux de HILL et al., en 1963 avaient signalé une déficience en zinc et en cuivre. Le cadmium perturberait donc la répartition de ces métaux entre les organes (FOX, 1974).

5.6. Conclusion

Les trois intoxications expérimentales que nous avons réalisées montrent qu'il existe une accumulation privilégiée des polluants dans le foie et le rein, et que celle-ci dépend du temps de contamination. Des interférences entre le métabolisme du cuivre, du zinc et du cadmium ont été mises en évidence. Nous avons également montré dans le paragraphe 4 que le foie présentait les concentrations les plus élevées en métaux dans le milieu naturel. Nous allons donc étudier cet organe plus particulièrement dans le chapitre IV, quant à ses variations sur les différentes fractions protéiques, induites par les polluants, lors des intoxications. Une attention particulière sera portée au cuivre et au zinc, constituants naturels des métallothionéïnes du foie. En effet les Zn et Cu - thionéïnes sont présentes dans le foie en concentrations variables et elles sont susceptibles de jouer un rôle dans le stockage, l'absorption et le transport de ces cations. (RICHARDS et al., 1976). La recherche de ces protéïnes sera effectuée sur les poissons intoxiqués expérimentalement ainsi que sur les poissons provenant du milieu naturel.

CHAPITRE IV

METALLOTHIONEINES
ROLE - MISE EN EVIDENCE

CHAPITRE IV

METALLOTHIONEINES : ROLE - MISE EN EVIDENCE

Nous avons pu constater (voir chapitre III) que l'intoxication par des métaux lourds tels que le plomb ou le cadmium provoquait une accumulation de ces métaux dans les organes du flet. Il existe donc des systèmes d'adaptation et de régulation mis en oeuvre par les organismes vivants pour lutter contre ces agressions. Nous exposerons dans ce chapitre ces différentes possibilités en portant une attention particulière aux métallothionéïnes. Ces protéïnes de faible poids moléculaire ont été mises en évidence par MARGOSHES et VALLEE en 1957. Ces auteurs recherchaient une protéïne pouvant expliquer l'accumulation naturelle du cadmium dans le rein de cheval. Elles ont également été décelées lors d'intoxications par le cadmium et le mercure. Elles ont un rôle de détoxification. Nous exposerons les méthodes employées pour leur caractérisation, chez le flet, lors d'une intoxication expérimentale par le cadmium. Nous envisagerons en dernier lieu, leur recherche dans le milieu naturel à Dunkerque et à Hardelot.

I - MECANISMES DE DETOXIFICATION

1.1. Rappels

1.1.1. Invertébrés

Des concrétions minérales, appelées sphérocristaux ont été mises en évidence par MARTOJA en 1984 chez les invertébrés. Elles sont insolubles, à base de phosphates et de pyrophosphates et sont situées dans des vésicules attachées à la membrane plasmique. Elles seraient élaborées par le réticulum endoplasmique. SIMKISS, en 1982, a montré, chez la moule, à l'aide de radio-isotopes, que la plupart des polluants métalliques étaient incorporés dans ces formations. Une intoxication pour le manganèse provoque chez ce mollusque, la formation de concrétions rénales (MAURI, 1982). Ces formations jouent un rôle important dans l'accumulation, l'excrétion et la toxicité du cadmium chez *Argopecten irradians* placé en enceintes d'élevages expérimentaux polluées (CARMICHAEL et al., 1981).

Le stockage et la détoxification des métaux sont donc effectués par un mécanisme de compartimentage dans des vésicules liées à la membrane (COOMBS, 1977 ; GEORGE et al., 1979a).

D'autres phénomènes de détoxification existent chez les invertébrés : tels que, la fixation des métaux sur l'exosquelette des crustacés qui permet une détoxification régulière lors de chaque mue (POIRIER et al., 1981) ; ou le stockage temporaire du cadmium par immobilisation dans les phagolysosomes (JANSSEN et al., 1979). Des mécanismes d'adaptation cellulaires sont aussi mis en jeu dans la lutte contre les métaux toxiques. Un certain nombre de métaux tels que le plomb, le bismuth, le mercure, l'aluminium et le cuivre sont accumulés dans le noyau. Ces métaux sont liés à des protéines qui ne sont pas des histones (CHERIAN et al., 1983). Cette accumulation est considérée comme un mécanisme de réaction cellulaire.

La complexation des métaux par des ligands organiques, les métallothionéïnes, les rend chimiquement et biologiquement moins réactifs. L'encapsulation des métaux produit un isolement et une élimination en tant que particules discrètes sous forme de granules ou de concrétions dans les tissus des mollusques. La formation de ces concrétions n'est pas connue. Il a été suggéré que les concentrations sont synthétisées, en totalité ou en partie, dans le système lysosomal des cellules épithéliales du rein. Néanmoins, ce modèle n'explique pas le transport des métaux lourds de cet organe jusqu'à une incorporation dans les granules. (KUSTIN et al, 1983). GEORGE, en 1983 a montré, lors d'une intoxication par le cadmium de *Mytilus edulis* que 30 % de ce métal était situé dans les lysosomes. Les 70 % restants sont concentrés sur des protéines appelées métallothionéïnes. Ce mécanisme a été découvert chez de nombreux invertébrés.

1.1.2. Vertébrés

Un processus de détoxification a été mis en évidence par MARTOJA et al., en 1977, chez les mammifères marins. Le sélénium apparaît comme un inhibiteur de la toxicité du mercure. Des granules de séléniure mercurique sous forme de tiemanite ont été découverts dans le foie, le rein et la peau des odontocètes.

Les poissons semblent posséder plusieurs types de protection face aux pollutions métalliques.

Une augmentation de la production du mucus après une intoxication par le $HgCl_2$, limite l'absorption de Hg^{2+} chez *Serranus cabrilla* (RADOUX et al. , 1979). La complexation des sels métalliques avec les muco-polysaccharides

du mucus a été mise en évidence par LABAT en 1977. La présence de corpuscules intestinaux, très chargés en métaux, a été décelée par NOEL-LAMBOT en 1980 chez l'anguille. Bien qu'étant de très petite taille, ces corpuscules semblent limiter l'entrée de métaux lourds dans la barrière intestinale et protègent ainsi le poisson contre les polluants.

L'excrétion constitue également un processus de détoxification. Il peut y avoir perte de métal à travers le corps ou les branchies. Chez *Salmo gairdneri*, le zinc est excrété à travers le tube digestif ou par les urines (LABAT, 1977). Toutefois, les avis des auteurs divergent, pour certains, l'excrétion par les urines est limitée chez les poissons (AUBERT, 1975).

Une certaine tolérance vis à vis des métaux à des doses létales se manifeste après un pré-traitement avec des concentrations sublétales (LYODD, 1960 in KATZ, 1975 ; SPRAGUE, 1969). Les métallothionéïnes constituent un autre mécanisme de détoxification que de nombreux auteurs ont mis en évidence dans le cas d'intoxications chroniques par le cadmium et par le mercure (NOEL-LAMBOT, 1980 ; BOUQUEGNEAU, 1975). Une exposition au cadmium provoque de mauvais fonctionnements du rein chez les ouvriers (FRIBERG, 1974). Ces personnes soumises à un environnement pollué excrètent beaucoup de métallothionéïnes dans leurs urines par rapport aux personnes non intoxiquées. Cette élaboration de métallothionéïnes est telle que TOHYAMA (1982), préconise l'utilisation de leur dosage dans les urines, dans les tests de routine pour l'étude des fonctionnements rénaux défectueux. La présence de métallothionéïnes apparaît donc comme un indicateur de pollution.

1.2. Métallothionéïnes

Ces protéïnes se distinguent des autres par un ensemble de caractères inhabituels, qui ont été caractérisés par KÄGI et VALLEE en 1960. Il s'agit essentiellement de leur teneur en métaux lourds, de la composition en acides aminés et de leur spectre d'absorption dans l'ultra-violet.

1.2.1. Poids moléculaire

Les déterminations du poids moléculaire de ces protéïnes sur des colonnes calibrées conduisent à des résultats assez homogènes. Le poids moléculaire varie de 9 000 à 12 000 d, quels que soient l'espèce et l'organe à partir duquel elle est isolée. (PULIDO et al., 1966 ; NORDBERG et al., 1972) ; OLAFSON et al., 1974 ; BREMNER et al., 1975). Cependant, des chroma-

tographies réalisées sur des protéines dénaturées lui attribuent un poids moléculaire de 6 000. (KÄGI et al., 1974 ; BUHLER et al., 1974). Le calcul du poids moléculaire à partir de la composition en acides aminés donne une valeur comprise entre 6 000 et 7 000 (NORDBERG et al., 1972 ; RICHARDS et al., 1977).

1.2.2. Composition en acides aminés

La composition en acides aminés montre une forte proportion de cystéine (de l'ordre de 30 %) ce qui leur confère un contenu en soufre voisin de 8 %, dépassant la protéine riche en soufre de la laine (7,5 %) (KÄGI et al., 1979). On remarque également l'absence de résidus aromatiques (tyrosine, phénylalanine et tryptophane). L'absorption sera donc minimale à 280 nm tandis que la liaison métal-mercaptan est responsable d'un épaulement du pic de densité optique pour le cadmium à 250 nm. Cette absorption diminue quand le cadmium est remplacé par le zinc, le mercure ou le cuivre dans la métallothionéine. Elles sont également stables à la chaleur et ne sont pas détruites par chauffage à + 80°C pendant 10 minutes (CHERIAN et al., 1978).

1.2.3. Métallothionéines chez les mammifères

Des protéines semblables à la métallothionéine du rein de cheval ont été identifiées dans le foie et le rein de nombreux mammifères dont l'homme (BUHLER et al., 1974 ; FALCK, 1983 ; NOMIYAMA, 1975), chez le lapin (NORDBERG et al., 1974 ; PISCATOR, 1964 in BOUQUEGNEAU, 1980) chez la chèvre (MJÖR-GRIMSRUD, 1979) chez le veau (BRIGGS et al., 1982) et chez le cochon (BREMNER et al., 1976a).

La recherche de ces protéines est surtout réalisée pour des animaux intoxiqués artificiellement par du cadmium, du zinc et du cuivre et essentiellement sur des animaux de laboratoire tels que le rat ou le lapin (BREMNER et al., 1976b).

1.2.4. Caractéristiques métalliques

En absence de toute intoxication, les métallothionéines du rein contiennent généralement des quantités égales de zinc et de cadmium avec peu de cuivre, tandis que dans le foie elles fixent principalement du zinc et une quantité plus importante de cuivre.

Lorsque les animaux sont intoxiqués par les métaux tels que Cd, Hg, Zn, Cu, Ag, les métallothionéïnes comportent une part importante de ces ions métalliques (KOJIMA et al., 1978). On peut alors les détecter dans presque tous les tissus capables d'accumuler les métaux : le foie et les reins (PISCATOR, 1964 in BOUQUEGNEAU, 1978), (FELDMAN et al., 1978), le pancréas, la rate (SHAIKH, 1971) ; les testicules (O. BRADY et al., 1981) ; l'intestin (FLANAGAN et al., 1983) ; les globules rouges (MEHRA et al., 1984). Mais jusqu'à présent leur recherche dans les muscles squelettiques est restée vaine.

Les métaux qui peuvent induire la synthèse des métallothionéïnes appartiennent aux groupes I B et II B de la classification de Meendeliev (MARTOJA, 1984). Le cadmium possède l'action la plus puissante suivi par le mercure organique, le zinc, le cuivre (BREMNER et al., 1976b), l'argent, le bismuth, le cobalt et peut-être le fer. D'autres ions métalliques induisent la synthèse mais ne se fixent pas sur les métallothionéïnes, il s'agit de Cr^{3+} , Cr^{6+} , Mn^{2+} , In^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sn^{4+} (YOSHIKAWA et al., 1982). L'étude cinétique de l'apparition des métallothionéïnes a montré qu'il existait un délai de deux à cinq heures entre l'injection de métal et l'apparition de la protéine et que la synthèse était maximale 10 heures après l'intoxication (CHEN et al., 1975 in BOUQUEGNEAU, 1980).

1.2.5. Polymorphisme

Par des techniques de séparation basées sur les différences de charges électriques des molécules, on a pu établir qu'au sein d'un même organe, il pouvait exister deux ou trois formes de métallothionéïnes (SUZUKI et al., 1983b ; NOEL-LAMBOT, 1980 ; NORDBERG et al., 1978). Ces composés possèdent le même poids moléculaire et diffèrent très peu par la composition en acides aminés (RICHARDS et al., 1977) mais peuvent varier par la nature des métaux liés (PULIDO et al. 1966). Le tableau 19 résume les caractéristiques des métallothionéïnes.

1.2.6. Rôle des métallothionéïnes

Le rôle des métallothionéïnes est double. Ces protéines ne possèdent pas d'activité enzymatique connue et ne semblent pas participer à des processus d'oxydo-réduction (KOJIMA et al., 1978). Elles constitueraient

TABLEAU 19 : PROPRIETES DES METALLOTHIONEINES
(CHERIAN, 1978)

- (1) Synthèse des thionéïnes induite par de nombreux métaux.
- (2) Petit poids moléculaire (6 000 - 10 000)
- (3) Forte proportion de cystéïne (30 %) et affinité des thionéïnes pour les métaux.
- (4) Absence de ponts disulfures et d'acides aminés aromatiques.
- (5) Absorption maximale à 250 nm pour la cadmium-thionéïne.
- (6) Stabilité à la chaleur.
- (7) Localisation cytoplasmique
- (8) Présence en tant que protéïne intracellulaire et absence dans les fluides biologiques (Plasma, bile...).

ainsi un réservoir de Zn et de Cu. En dehors de toute intoxication, elles pourraient fournir les métaux nécessaires à la synthèse des enzymes métalliques (RICHARDS et al., 1976 ; O'BRADY et al., 1979) et assurer ainsi l'homéostasie de la teneur en métaux des cellules. Néanmoins CHEN et al., en 1977 suggèrent que la métallothionéïne serait mise en jeu dans l'accumulation du zinc excessif plutôt que dans le stockage pour une utilisation ultérieure. L'apparition de ces composés en réponse aux intoxications par les métaux lourds a conduit les auteurs à lui attribuer un rôle de détoxification (CHERIAN et al., 1978 ; NORDBERG et al., 1972 ; O. BRADY et al., 1979 ; VALLEE, 1979). Un prétraitement des animaux d'expérimentation par de petites doses de cadmium et de métallothionéïnes provoque une réduction des effets nocifs d'une grande quantité de cadmium (YOSHIKAWA, 1970 in KITO, 1982). Un prétraitement par un métal induit donc une "réponse biologique" et ceci modifie probablement la létalité du métal utilisé dans l'intoxication ultérieure. La synthèse de métallothionéïne est considérée comme une réponse biologique : si un métal administré est capable d'induire la synthèse de métallothionéïnes, le deuxième métal capable de se fixer sur ces protéïnes verra sa toxicité réduite.

Néanmoins, le mécanisme de tolérance par un prétraitement ne peut être expliqué exclusivement par la formation de métallothionéïnes, en effet, il existe certains métaux qui ne se lient pas ou n'induisent pas la synthèse de ces protéïnes mais qui peuvent influencer également sur la toxicité d'un métal utilisé dans une contamination ultérieure (CHERIAN et al., 1983).

1.2.7. Critères de détermination des métallothionéïnes

Les critères d'identification des métallothionéïnes ont été résumés par VALLEE en 1979 :

- Contenu en métal très élevé (Cd, Zn, Cu).
- Potentiel de cystéïne : 30 % de la composition totale en acides aminés.
- La quantité d'ions métalliques liée aux groupements S-H est de 1/3.
- Généralement, il existe 7 atom. g de Me^{2+} pour 20 à 21 groupements -SH des métallothionéïnes.
- Les acides aminés aromatiques, l'histidine et les ponts disulfures sont normalement absents. La protéïne de mammifère contient une seule méthionine.
- La métallothionéïne ne présente pas d'absorption à 280 nm.
- La cadmium-thionéïne absorbe à 250 nm.
- Le poids moléculaire de ces protéïnes est situé entre 6000-7000.

- La chromatographie d'exclusion sur gel et le volume d'élution correspondant à un poids moléculaire voisin de celui de métallothionéïnes, sont insuffisants pour identifier cette protéïne. D'autres caractéristiques sont nécessaires ; l'absorption U.V. et surtout la composition en acides aminés.

D'autres protéïnes de poids moléculaire semblable ont été isolées. Il peut donc y avoir confusion avec les métallothionéïnes dont elles diffèrent par leur composition en acides aminés et leurs propriétés électrophorétiques. Ces protéïnes contenant du cuivre ont été appelées "Cuivre-chélatine" (WINGE et al., 1975 in KÄGI et al., 1979).

D'autres protéïnes, telles que celle "liant" le zinc qui a été isolée du lait de rat et de l'homme, ou la "renalchromochelatin" isolée à partir d'une administration de sels de bismuth dans le rein du rat, possèdent des poids moléculaires voisins des méthallothionéïnes mais diffèrent par leur composition en acides aminés.

1.2.8. Présence des métallothionéïnes dans les organismes vivants

La littérature concernant les métallothionéïnes était jusqu'en 1978, essentiellement basée sur des mammifères. Elle se bornait à mettre en évidence les protéïnes complexant le cadmium ou le mercure lors d'intoxications expérimentales. La recherche s'est considérablement développée en ce domaine, ces cinq dernières années.

La structure des métallothionéïnes est actuellement connue chez de nombreux vertébrés et invertébrés :

- Poissons : *Pleuronectes platessa* (le carrelet) : OVERNELL et al., 1977
Anguilla anguilla (l'anguille) : BOUQUEGNEAU, 1975 ;
NOEL-LAMBOT, 1980
Salmo gairdneri (la truite) : LEY et al., 1983
- Crustacés : *Scylla serrata* LERCH et al., 1981
Carcinus maenas JENNINGS et al., 1979
Cancer pagurus OVERNELL, 1982a
- Mollusques : *Patella vulgata* NOEL-LAMBOT, 1980
Mytilus edulis NOEL-LAMBOT, 1980 ; CARPENE et al., 1983.

D'autres travaux ont été effectués sur la recherche de ces protéïnes, sans caractérisation de la composition en acides aminés. Les

auteurs les considèrent donc comme des protéines "liant" le cadmium, ou d'autres métaux ou les appellent des métallothionéïnes "like" protéines. Elles ont été mises en évidence dans de nombreux taxons : les amphibiens (SUZUKI et al., 1983a) ; les polyplacophores ; (OLAFSON et al., 1979a), les lamellibranches (NOLAN et al., 1983 ; ROESIJADI et al., 1982 ; GEORGE et al., 1979b), les poissons (ROCH et al., 1982 ; YAMAMURA et al., 1983 ; BEATTIE et al., 1979), les crustacés (OLAFSON et al., 1979 ; LYON et al., 1983 ; RAY et al., 1981) et même sur des champignons (BELTRAMINI et al., 1983).

On pourrait étendre cette revue bibliographique concernant les intoxications expérimentales qui ont été réalisées sur de nombreux organismes vivants. La caractérisation des protéines liant les métaux n'est effectuée cependant que dans un très petit nombre de travaux. Nous pouvons néanmoins remarquer que les métallothionéïnes sont présentes dans de nombreux taxons et que les organismes vivants sont tous capables d'accumuler les polluants dans des systèmes protéïques, qu'il s'agisse de métallothionéïnes ou de métallothionéïnes "like" protéines.

1.3. Méthodes d'études pour la caractérisation des métallothionéïnes

Les méthodes utilisées pour la purification des métallothionéïnes varient. Elles sont toutes basées sur une extraction par homogénéisation et centrifugation, suivie, ensuite par une chromatographie de gel filtration. Il faut distinguer deux types de travaux. Le premier travail consiste en une caractérisation banale par profil chromatographique des protéines complexant les métaux et ne nécessite pas de méthode particulière. Le deuxième est basé sur l'obtention d'un extrait très pur, nécessaire pour la caractérisation fine : il nécessite des méthodes de purifications successives.

1.3.1. Extraction

Les métallothionéïnes sont des protéines cytoplasmiques. Les méthodes d'extraction sont basées sur une homogénéisation de l'organe que l'on veut étudier, généralement dans 3 volumes (V/W) de solution saline isotonique (OLAFSON et al., 1979) ou dans du saccharose (NOEL-LAMBOT, 1980). L'extrait est ensuite centrifugé, pendant 1 heure à 100 000 g (NOEL-LAMBOT, 1980) ou lorsqu'il s'agit d'échantillons riches en composés lipidiques comme le foie, centrifugé une première fois à 20 000 g pendant 15' à + 4°C

(la couche lipidique est alors aspirée) et le surnageant est à nouveau soumis à une centrifugation à 80 000 g pendant 1 heure (ROESIJADI et al., 1981).

Quelques techniques de purification supplémentaires ont été utilisées afin de réduire la part des protéines de poids moléculaire élevé.

1.3.2. Fractionnement

Le premier type de fractionnement utilisé est basé sur la résistance à la chaleur des métallothionéïnes. Les homogénats sont dénaturés à 90° C pendant 10 minutes et ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 10 minutes. OLAFSON et al., en 1979 ont montré que la dénaturation par la chaleur, éliminait la plupart des activités protéolytiques, autre que les métallothionéïnes. Cette technique présente l'inconvénient d'exclure ensuite les procédures d'isolation par chromatographie d'échange d'ions et l'électrophorèse, qui doivent être réalisées sur du matériel non dénaturé.

NOEL-LAMBOT en 1980 a utilisé une méthode dérivée de celle de CHERIAN en 1974. L'extraction habituelle de la phase soluble du foie, par homogénéisation et double centrifugation, est suivie d'une étape de chauffage puis d'un fractionnement au sulfate ammonique. Ce procédé a cependant été abandonné par la suite car il altère les métallothionéïnes. En effet, cet auteur a observé un dédoublement du pic protéique fixant le cadmium, ce qui ne se produit pas pour des extraits non purifiés.

La purification des métallothionéïnes peut être obtenue également par des précipitations et des centrifugations successives de la fraction soluble du foie.

- précipitation par 95 % d'Ethanol à - 20° C de la fraction des métalloprotéïnes. Le précipité blanc est récupéré par centrifugation à 3 000 g pendant 20 mn et extrait par 200 ml d'H₂O durant 10 mn. Une nouvelle centrifugation est ensuite réalisée pendant 2 heures à 20 000 g. Le dernier surnageant contient les métallothionéïnes (BÜHLER et al., 1974).

- précipitations par 45 et 80 % d'acétone (NOEL-LAMBOT, 1980) selon une technique dérivée de la précédente.

- précipitations par du RIVANOL 5 %, puis du KBr et enfin un mélange d'Ethanol-Chloroforme (1,05 : 0,008 ; V/V) (NORDBERG et al., 1972).

1.3.3. Chromatographies

La séparation des protéines de la fraction soluble des différents organes est réalisée en premier lieu par une chromatographie de gel filtration. Deux types de gels sont utilisés par les différents auteurs : l'ACA 54 (I.B.F. Pharmindustrie) (NOEL-LAMBOT, 1980) et le SEPHADEX G 75 (Pharmacia) (SIEWICKI et al., 1983 ; CHERIAN et al., 1977 ; BOUQUEGNEAU et al., 1975). Les fractions correspondant au volume d'élution des protéines de poids moléculaire voisin des métallothionéïnes sont ensuite récupérées et concentrées par lyophilisation ou sur des membranes de type AMICON UM.2 (FRANKENNE et al., 1980). Elles sont ensuite chromatographiées sur des résines échangeuses d'ions, principalement la DEAE-Cellulose (ROESIJADI et al. en 1981 préconisent l'utilisation d'une colonne Whatman C.M 52 car ils ont remarqué l'adsorption des Hg-thionéïnes sur les colonnes de DEAE cellulose). Ces techniques permettent de séparer les protéines de poids moléculaire voisin, selon leur charge électrique (SUZUKI et al., 1979 ; LEY et al., 1983). SUZUKI et al., en 1983(b) ont étudié trois méthodes de séparation sur colonnes en H.P.L.C. : la gel filtration, l'échange d'ions, et la phase inverse. La technique d'H.P.L.C. permet une résolution supérieure et l'utilisation de quantités réduites de matériel. La phase inverse présente la meilleure résolution car les colonnes en principe ne possèdent pas de ligands pour les métaux. Cet auteur a montré également que la séparation était supérieure par utilisation de colonnes en C1 plutôt qu'en C5 ou C8. Les résultats obtenus pour le foie de poisson présentent trois isoprotéïnes, alors que dans le cas de gel filtration ou de chromatographie d'échange d'ions on ne détectait que deux composés.

1.3.4. Caractérisation des métallothionéïnes

- La caractérisation des métallothionéïnes est effectuée en premier lieu par leur absorption en spectrophotométrie U.V. Elles présentent en effet une absorption réduite à 280 nm et dans le cas de la cadmium-thionéïne, un pic à 254 nm. La purification de ces protéïnes est vérifiée à l'aide d'électrophorèses en gel de polyacrylamide non dénaturant (RIBAS, 1983 ; FRANKENNE et al., 1980 ; BÜHLER et al, 1974). Leur poids moléculaire est estimé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant, c'est-à-dire en présence de sodium dodécyl sulfate-(SDS) (LEY et al., 1983 ; Mc CARTER et al., 1982).

- Les teneurs en métaux des protéines sont mesurées par spectrophotométrie d'absorption atomique de flamme.

Un des obstacles majeurs dans la recherche concernant les métallothionéïnes est la quantité de méthodes utilisées pour la purification qui induit des pertes importantes de matériel. En 1979(b), OLAFSON et SIM ont mis au point une technique électrochimique permettant leur caractérisation (avec une électrode PAR 303) et la quantification (avec une électrode classique au mercure) par polarographie. Ces travaux ont été effectués sur *Scylla serrata*. D'autres travaux concernant la palourde *Tresus capax* et l'huître *Crassostrea gigas* ont été réalisés par COSSON et al., en 1983. Cette méthode permet une détermination qualitative et quantitative des métallothionéïnes présentes dans un échantillon. Cette méthode a été utilisée par Olivier HACHE en 1984 dans le cadre d'un stage de fin d'études de l'Ecole Nationale de Chimie Supérieure de Lille, effectué au laboratoire de chimie marine de la Station Marine de Wimereux. Les quelques résultats, réduits à cause de problèmes techniques, ont montré que le protocole utilisé jusqu'à présent pour des protéines courantes était adéquat à l'étude de nos échantillons.

- La composition en acides aminés constitue le stade ultime de la caractérisation de ces protéines. Elle est réalisée par oxydation à l'acide performique de l'échantillon. La cystéïne est dosée en tant qu'acide cystéïque (NOEL-LAMBOT, 1980 ; BUHLER et al., 1974 ; FRANKENNE et al., 1980). L'échantillon est ensuite hydrolysé puis passé dans un analyseur automatique d'acides aminés.

La séquence des acides aminés des métallothionéïnes a été déterminée pour le foie et le rein de cheval (KOJIMA et al., 1976), pour le foie humain (KISSLING et al., 1977), pour le *Neurospora crassa* (LERCH, 1980) et pour *Scylla serrata* (LERCH et al., 1982).

La structure primaire de la métallothionéïne humaine est similaire à celle du cheval. La caractéristique essentielle est la distribution des 20 résidus de cystéïne, le long de la chaîne. Il a été suggéré que les 7 séquences Cys - X - Cys constituent le premier site de liaison pour 7 ions métalliques. Il n'existe cependant chez le crabe, *Scylla serrata*, que 5 séquences Cys - X - Cys (LERCH et al., 1982).

L'étude des métallothionéïnes peut également être réalisée par spectroscopie de rayons X (SOKOLOUWSKI, 1974) ou encore depuis quelques années par résonance magnétique nucléaire (VASAK et al., 1980 ; DEAN et al., 1983).

Les analyses spectroscopiques ont montré que les résidus de cystéine se liaient aux ions métalliques, que chaque métal était lié à quatre ligands thiols, que la symétrie de chaque complexe était tétraédrale, et que, pour satisfaire la stoechiométrie $Me_7 - (Cys)_{20}$ ces complexes étaient combinés pour former des groupes de métaux-thiols (BERNHARD et al., 1983).

1.3.5. Bilan des techniques séparatives utilisées

L'étude des métallothionéines met en jeu de nombreuses méthodes très diversifiées. Lors de notre étude, nous avons utilisé les techniques de séparation préliminaire basées sur l'extraction, la chromatographie et l'électrophorèse. Notre protocole expérimental est résumé dans le tableau 20. La composition en acides aminés a été envisagée mais au moment de la rédaction, les résultats sont encore insatisfaisants en raison des impuretés probables de fractions soumises à l'analyseur d'acides aminés.

II - CARACTERISATION DES METALLOPROTEINES : PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

2.1. Préparation des extraits

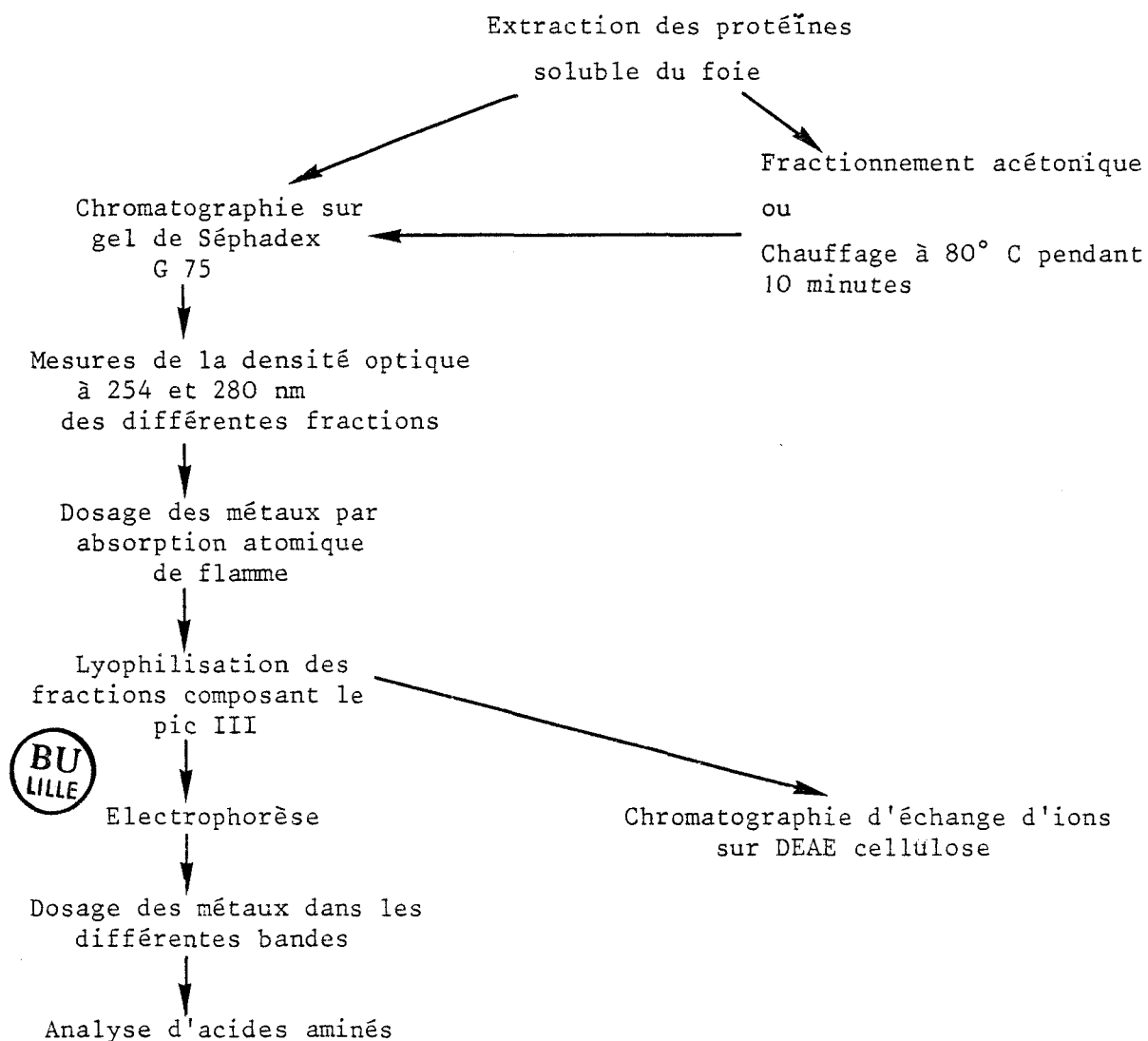
Le foie est homogénéisé dans 2 volumes de saccharose 0,5 M au moyen d'un homogénéiseur Ultra-turrax. Les extraits sont centrifugés à 37 000 g pendant 2 heures à + 4°C. Les surnageants, limpides sont chromatographiés immédiatement ou gardés au congélateur à - 20°C (cf. chapitre III).

2.2. Chromatographie de filtration sur gel

2.2.1. Conditions expérimentales

Les conditions de séparation des protéines métalliques ont été définies par SUZUKI, en 1983. La colonne utilisée ne doit pas adsorber les métaux, les tampons ne doivent pas comporter de ligands pour les différents métaux étudiés, leur pH doit être neutre ou légèrement basique afin d'éviter la dissociation des métaux, leur composition en sels doit être réduite pour ne pas obstruer la tête du brûleur lors de la détection. Enfin, la composition de l'éluant doit être constante dans l'élution et la détection.

TABLEAU 20 : PROTOCOLE EXPERIMENTAL UTILISE POUR LA CARACTERISATION
DES METALLOTHIONEINES



La chromatographie de filtration sur gel permet la séparation des protéines selon leur poids moléculaire. Nous avons testé trois types de gel : le Biogel P 10, l'Aca 54 et le Séphadex G 75. Les deux premiers n'ayant pas donné de résultats plus satisfaisants, nous avons utilisé le Séphadex G 75 (Pharmacia - Uppsala). Ce type de gel exclut les macromolécules de poids moléculaire > 70 000 daltons et permet une séparation maximale des protéines de poids moléculaire compris entre 60 000 et 3 000. Deux colonnes ont été utilisées (95 x 2,6 cm ; 40 x 2,6 cm).

Avant toute utilisation, elles sont lavées à l'acide chlorohydrique 1N et rincées à l'eau bidistillée. Les accessoires de la colonne sont conservés dans de l'eau déminéralisée pendant plusieurs jours avant d'être utilisés. Le gel est ensuite déposé dans la colonne par sédimentation et équilibré par 3 volumes de solution tampon.

En premier lieu, nous avons utilisé, lors de l'expérience de contamination en zinc, le tampon Tris HCl 0,01 M pH : 8,6. Par la suite, nous lui avons préféré le formiate d'ammonium 0,01 M à pH : 7,4 composé plus volatile qui s'élimine plus facilement lors des lyophilisations. La sortie de la colonne est reliée au collecteur de fractions. L'ensemble du dispositif colonnes-collecteur est maintenu en enceinte réfrigérée à + 4°C pour la réalisation de chromatographies.

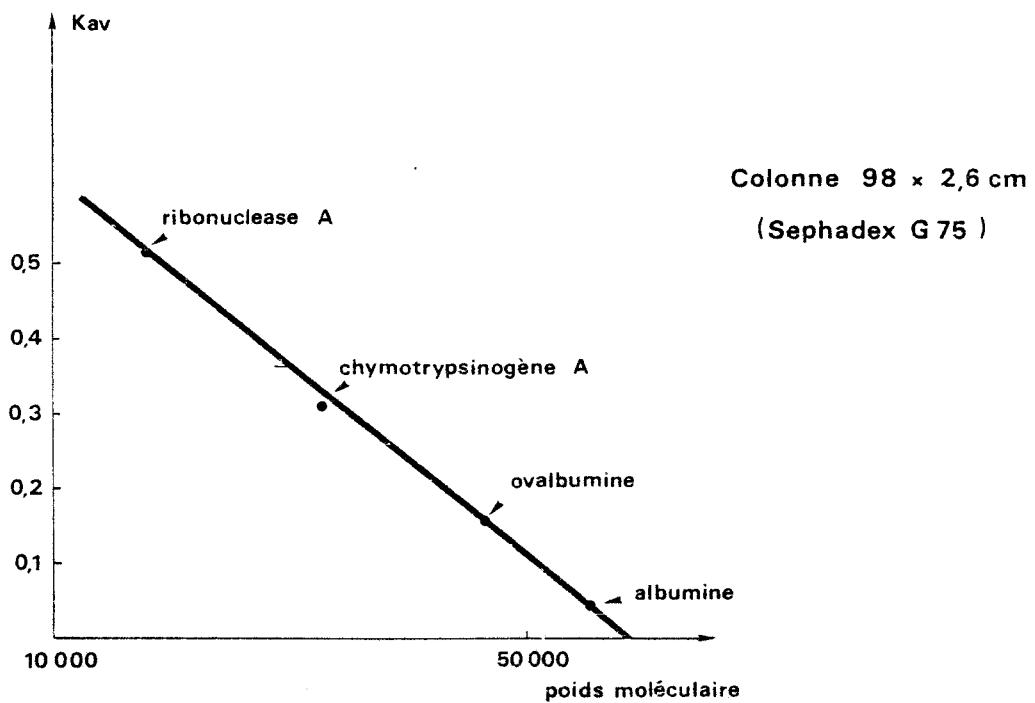
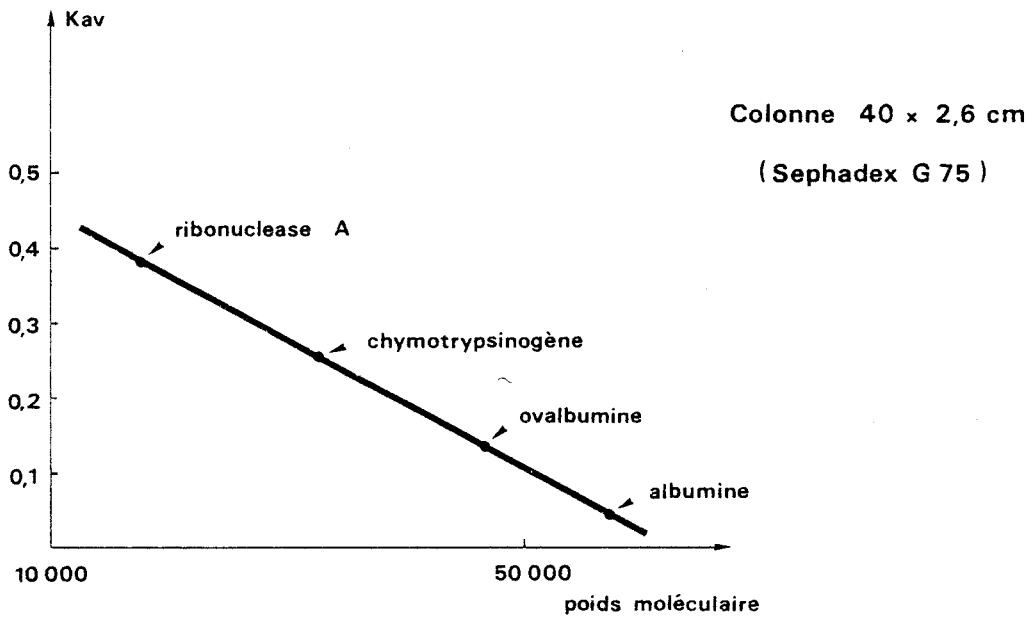
2.2.2. Calibration des colonnes

Les colonnes ont été calibrées à l'aide de standards de poids moléculaire connus selon la méthode décrite par ANDREWS en 1964. En premier lieu, le volume mort de la colonne est déterminé avec du bleu DEXTRAN. Quatre protéines standards sont ensuite utilisées pour la calibration : l'albumine sérique bovine (PM = 67 000), l'α-chymotrypsinogène (PM = 25 000), la ribonucléase A (PM = 13 700), l'ovalbumine (PM = 43 000).

La relation entre le logarithme du poids moléculaire d'une protéine et sa constante d'élution (K_{av}) étant linéaire, il est possible d'établir une courbe de standardisation propre à chaque colonne (fig. 30). Le calcul de la constante d'élution pour chaque protéine standard est le suivant :

$$K_{av} = \frac{\text{Volume d'élution de l'échantillon (Ve) - Volume mort (Vo)}}{\text{Volume total de la colonne (Vt) - Volume mort (Vo)}}$$

Fig. 30 : Calibration des colonnes suivant la relation log du poids moléculaire
— constante d'élution



2.2.3. Mesure de l'absorption dans l'U.V des protéines isolées
.....
par chromatographie
.....

L'évaluation de la concentration en protéines dans les fractions est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman modèle 24. La lecture à 280 nm correspond à la longueur d'onde d'absorption des acides aminés aromatiques, tandis que la lecture à 254 nm correspond, entre autres, à l'absorption due à la liaison cadmium-cystéine des métallothionéines (KÄGI et al., 1960). Des lectures de la densité optique ont également été effectuées à 215 nm. Des balayages ont été réalisés entre 215 et 300 nm sur les fractions les plus significatives des chromatogrammes.

2.2.4. Dosage des métaux
.....

Les dosages ont été réalisés au laboratoire de chimie analytique et marine que dirige Monsieur le Professeur WARTEL à Villeneuve d'Ascq. Les dosages de cuivre, zinc et cadmium ont été effectués à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'une flamme air-acétylène (PERKIN-ELMER, modèle 2380). Les fractions obtenues après la chromatographie sont mesurées directement, sans traitement préalable, le tampon ayant été choisi pour sa faible teneur en sels. La concentration en métal est exprimée en µg/g de poids frais d'organe.

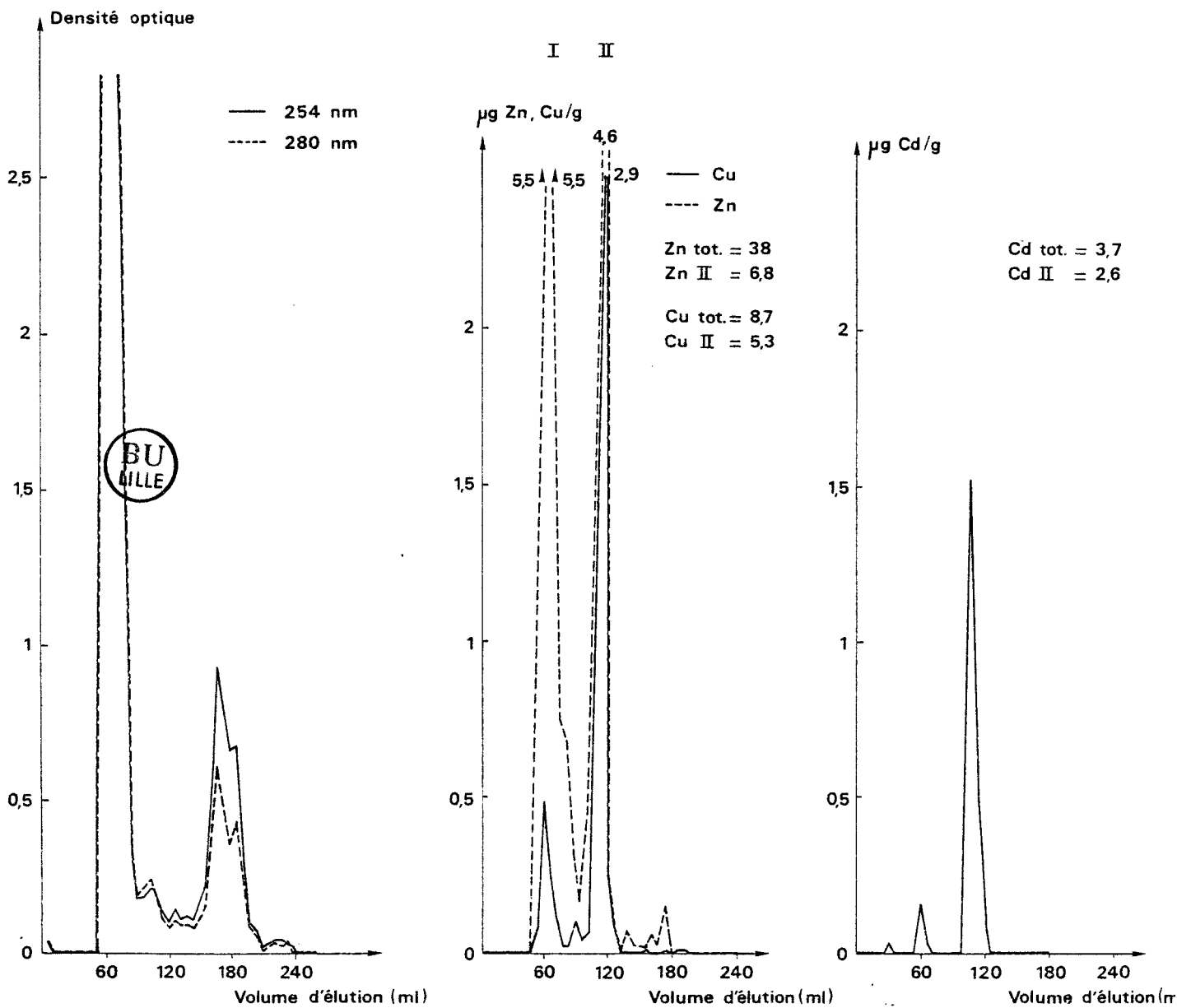
Expression des résultats

Sur les profils chromatographiques présentés dans ce chapitre, figurent la densité optique des fractions à 254 et 280 nm ainsi que les contenus en métaux zinc, cuivre, cadmium et plomb (la concentration en métaux est exprimée en µg par g de poids frais d'organe). Comme les volumes des fractions ne sont pas identiques et ont été mesurés pour chaque chromatographie de façon précise, nous avons indiqué les volumes d'élution correspondants pour chaque chromatographie.

La concentration de cadmium, zinc et cuivre a été déterminée dans chaque fraction. L'ensemble des fractions éluées par un volume correspondant aux protéines de poids moléculaire voisin de 12 000 a été caractérisé sous le vocable : Pic II. Nous mentionnerons également sur les profils chromatographiques la quantité de métaux de l'organe entier ainsi que la quantité contenue dans le Pic II (obtenue en additionnant les contenus en métaux des différentes fractions) (CHERIAN, 1981 ; NOEL-LAMBOT, 1980)

Fig . 31: Profils d'élution sur Séphadex G 75 (40 x 2,6 cm) de la fraction soluble du foie de flets intoxiqués pendant 1 jour dans 10 ppm de CdCl_2 .

Conditions de chromatographie : débit: 12 ml/h
éluant : Formiate d'ammonium
0,01 M pH:7,4



2.2.5. Résultats

Le profil chromatographique obtenu après filtration sur gel de Séphadex G 75 de la fraction soluble du foie de flets intoxiqués pendant 1 jour dans 10 ppm de cadmium montre 3 pics d'absorption à 254 et 280 nm (Fig. 31). Le premier pic correspond au volume d'élution des protéines de poids moléculaire supérieur à 60 000. Le deuxième à des protéines de poids moléculaire compris entre 10 000 et 13 000. Le troisième pic correspond aux protéines de poids moléculaire < 5000 composé d'un mélange de polypeptides, de fragments d'acides nucléiques et de molécules biologiques de petite taille (BROWN et al., 1977 in PAQUET, 1983).

Sur ces profils apparaît également un pic de cadmium dont le volume d'élution est comparable à celui trouvé pour la cadmium-thionéine des différents tissus de l'anguille (NOEL-LAMBOT, 1980). Ce pic de cadmium coïncide avec un pic de zinc et de cuivre ainsi qu'un pic à 250 nm (déplacé par rapport à celui de 280 nm), longueur d'onde à laquelle les métallothionéines sont réputées présenter une forte absorption, au contraire des autres protéines.

Nous avons réalisé un spectre d'absorption en ultra-violet de la fraction A du pic II (Fig. 32). Ce spectre présente une faible absorption à 280 nm et un épaulement à 250 nm. Les protéines en solution dans cette fraction contiennent donc peu d'acides aminés aromatiques. Ce spectre est caractéristique des métallothionéines (LEY et al., 1983) il est identique à ceux publiés pour des cadmium-thionéines isolées à partir du foie de divers mammifères (NORDBERG et al., 1974) ou d'invertébrés (OLAFSON et al., 1979b)

Afin de réaliser la purification du pic II, il était nécessaire de partir d'une plus grande quantité de matériel. Néanmoins, pour obtenir une bonne résolution de grands échantillons en chromatographie sur gel, il faut utiliser des colonnes de très grande taille. Nous avons donc cherché à purifier les échantillons avant la filtration sur gel en essayant d'éliminer les protéines de haut poids moléculaire.

2.3. Purifications supplémentaires

2.3. 1. Fractionnement acétonique

2.3.1.1. Méthode

La méthode de fractionnement utilisée est apparentée à celle de BÜHLER et KÄGI (1974) mais comprend un nombre d'étapes réduit tel que l'avait réalisé NOEL-LAMBOT (1980).

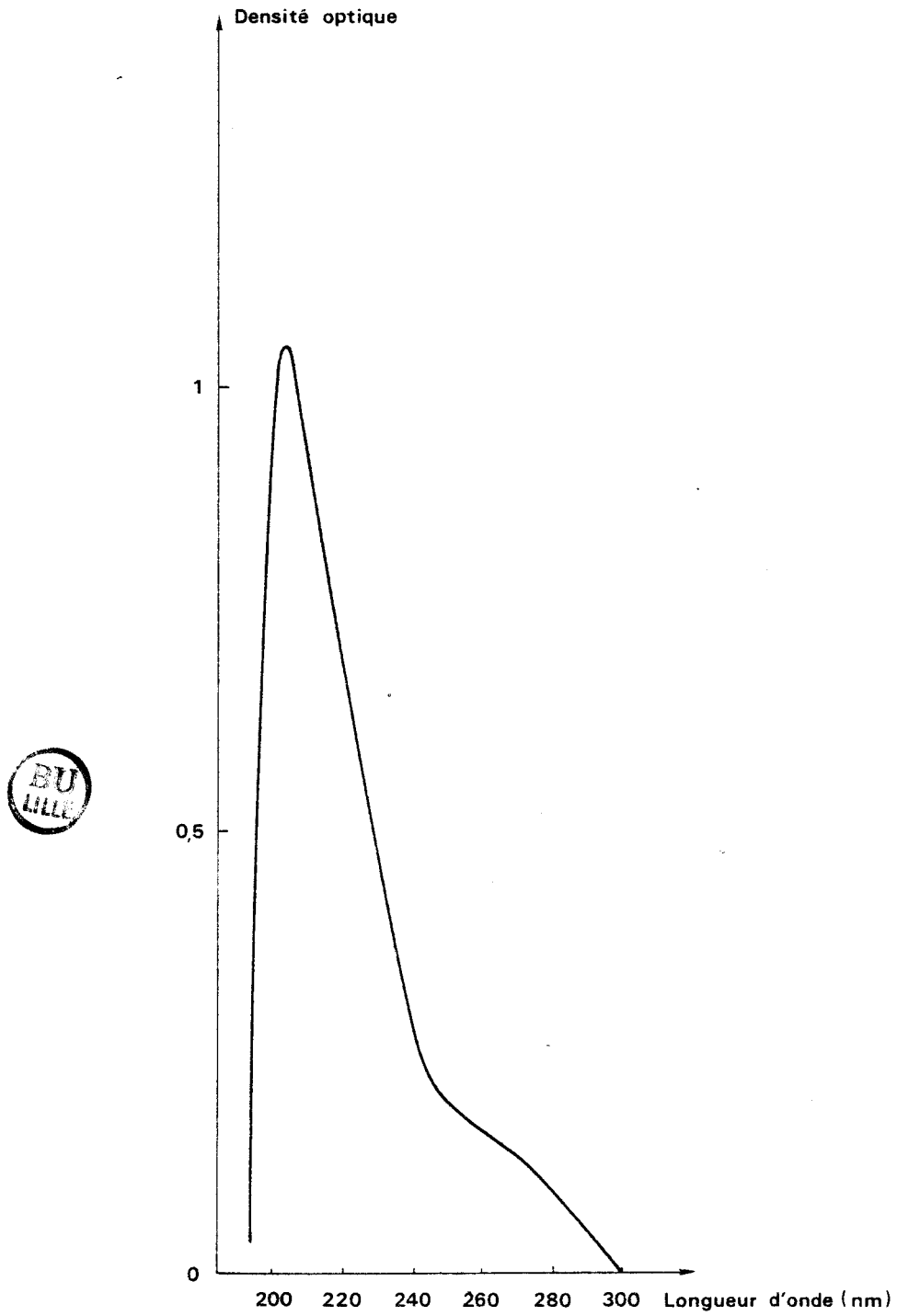


Fig. 32 : Spectre ultra-violet de la fraction A du pic II obtenu par chromatographie (fig.31)

L'acétone est refroidi à $- 20^{\circ}$ C au congélateur ; il est ensuite ajouté au surnageant jusqu'à obtention d'une concentration de 45 %. Après élimination du premier précipité par centrifugation, après 24 heures à 4° C, un second précipité est produit par un nouvel ajout d'acétone jusqu'à une concentration de 80 %. Ce second précipité est ensuite récupéré et redissous dans 1 ml de bicarbonate d'ammonium 0,05 M. C'est ce précipité qui est susceptible de contenir les métallothionéïnes.

Afin de vérifier la purification obtenue grâce à cette méthode, nous avons réalisé une chromatographie sur chacun des deux culots, redissous dans 1 ml de bicarbonate d'ammonium, 0,5 M.

2.3.1.2. Résultats

La purification par fractionnement acétonique a été réalisée sur un extrait de surnageant de foie de flets non intoxiqués. Ce fractionnement permet une élimination des protéïnes de poids moléculaire élevé. On remarque sur les profils chromatographiques obtenus pour le deuxième culot, une quasi-absence de ces protéïnes (Fig. 33-b). Seul subsiste le pic II caractérisé par la densité optique à 254 et 280 nm et par un contenu important de zinc et correspondant au volume d'élution des protéïnes de poids moléculaire voisin de 12 000.

L'observation des profils chromatographiques obtenus pour le premier culot, nous montre la présence d'un deuxième pic d'élution, absorbant à 254 et 280 nm, ainsi que la présence de pics de cuivre et de zinc (Fig. 33 a). Le premier culot obtenu par précipitation avec 45 % d'acétone contient donc des protéïnes de petit poids moléculaire. Il en résulte une perte pour la deuxième chromatographie qui se traduit par la disparition du pic de cuivre.

Les quantités de protéïnes obtenues par ce procédé sont très faibles. Nous avons donc utilisé cette méthode pour obtenir un extrait pur, susceptible d'être analysé pour la composition en acides aminés. Pour les études entreprises sur la recherche des métallothionéïnes, lors d'une intoxication par le cadmium du flet, ou dans le milieu naturel nous nous sommes limités à deux étapes d'extraction et de filtration sur gel de Séphadex G 75.

Fig . 33: Profils chromatographiques des différentes fractions obtenues par fractionnement acétonique.

Conditions de chromatographie : Colonne de Sephadex G 75 (85 x 1,4 cm) éluée par du Formiate d'ammonium, 0,01 M , pH 7,4 ; débit : 12 ml/H.

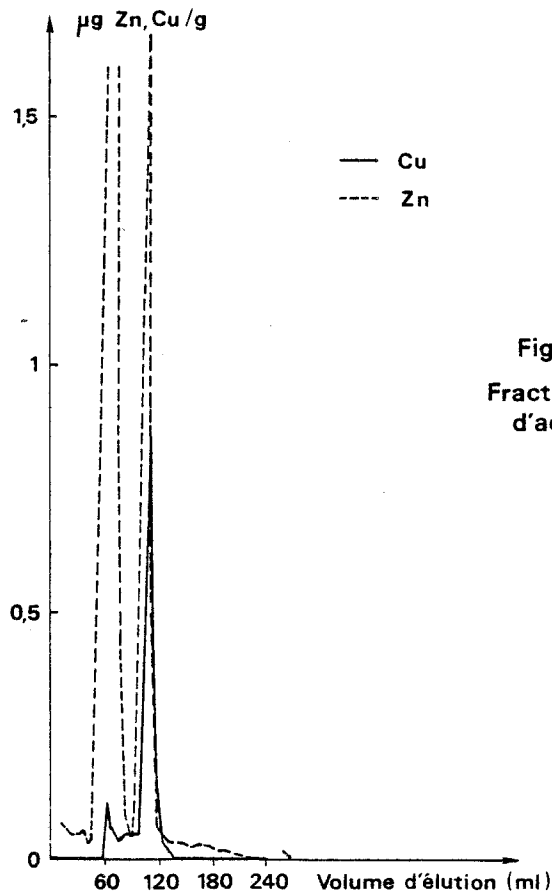
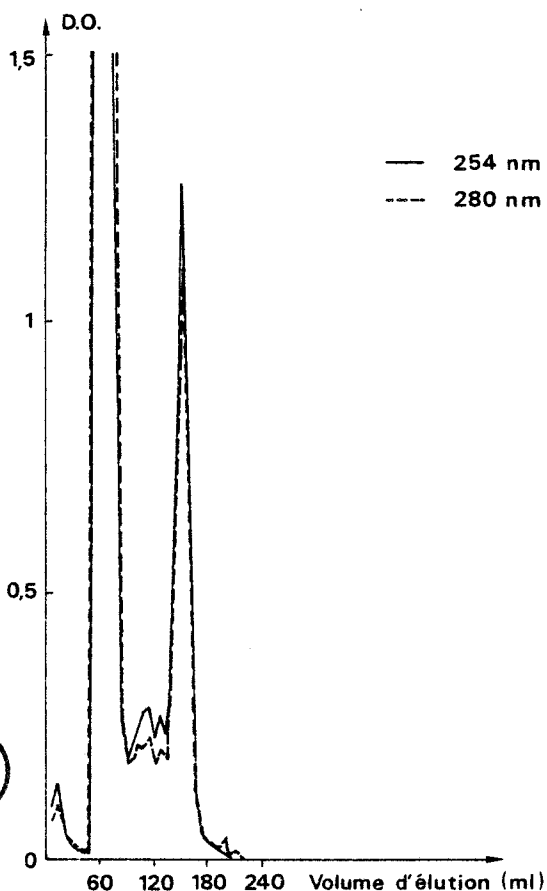


Fig. 33 a :
Fraction 45 %
d'acétone

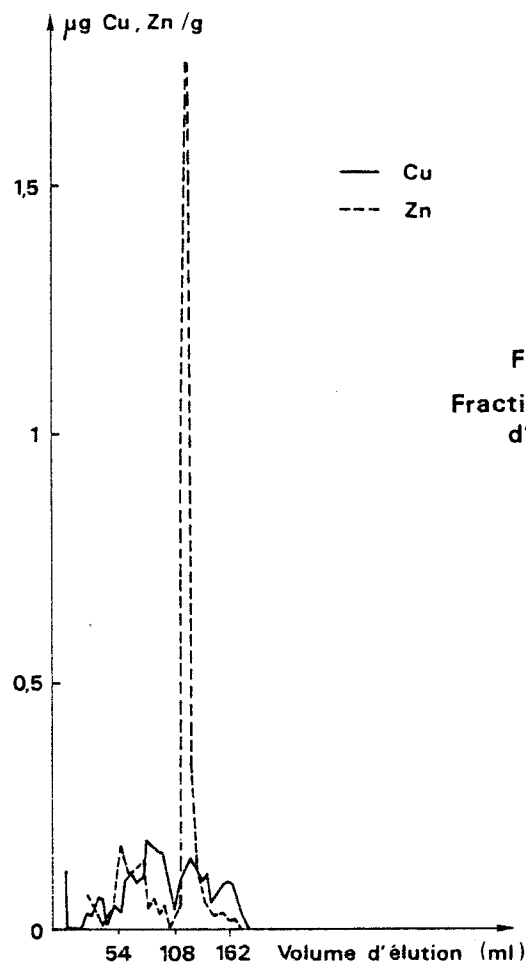
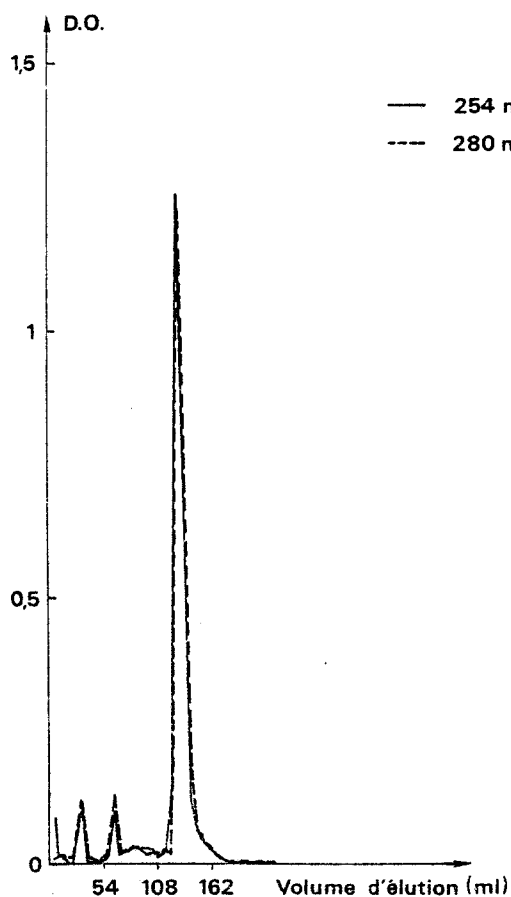


Fig. 33 b :
Fraction 45-80 %
d'acétone

2.3.2. Purification par chauffage

2.3.2.1. Méthode

Nous avons utilisé une méthode qui tient compte des caractéristiques des métallothionéïnes, basée sur leur résistance à la chaleur (CHERIAN, 1978). L'extraction de la phase soluble du foie est réalisée par homogénéisation et centrifugation comme tout autre extrait. L'échantillon est ensuite chauffé à 80° C pendant 10 minutes et chromatographié sur colonne de Séphadex G 75 (48 x 3 cm).

2.3.2.2. Résultats

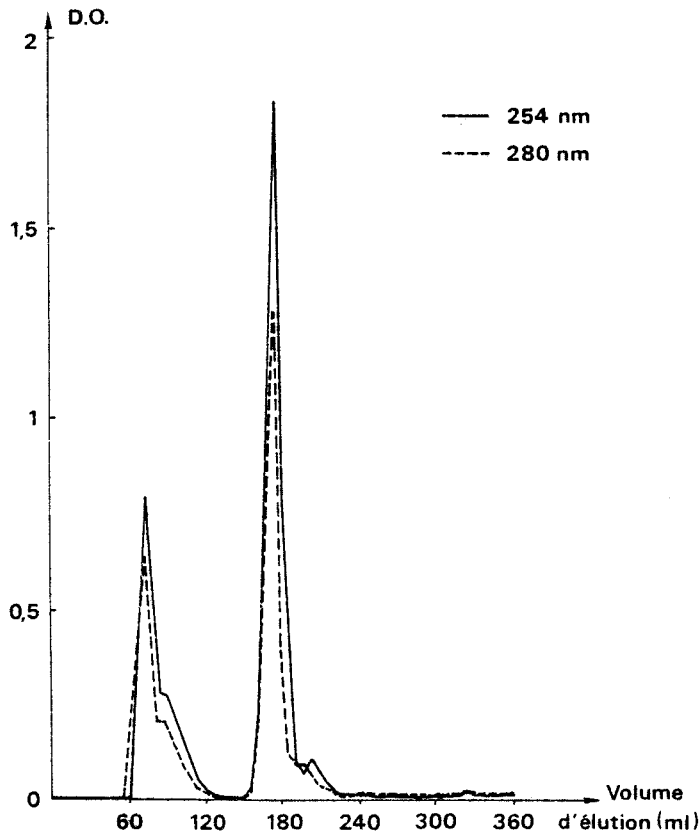
L'échantillon utilisé est un foie de flet non intoxiqué. Le profil chromatographique obtenu montre une altération des protéïnes de poids moléculaire élevé, ce qui était le but recherché (Fig. 34). Le deuxième pic est prédominant. Les concentrations métalliques sont très variables. Il n'existe pas de pic dominant de cuivre. Par contre, un pic très important de zinc est mis en évidence au niveau du pic II.

2.3.2.3. Discussion

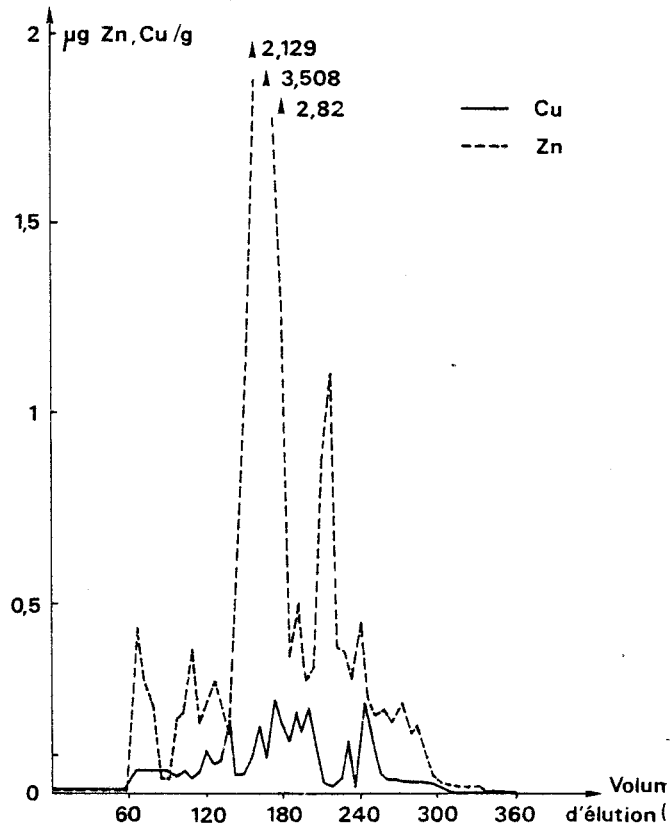
La méthode de fractionnement par chauffage du surnageant est utilisée par de nombreux auteurs (VIARENGO et al., 1980). Cependant des critiques concernant cette technique, ont été émises par NOEL-LAMBOT, 1980 et OLAFSON et al., 1979. Les résultats que nous avons obtenus, ne nous paraissent pas satisfaisants car les variations de la teneur en métaux des différentes fractions sont très importantes. Ces résultats peuvent être dus à une contamination lors de la détection, mais ceci paraît peu probable car les autres foies étudiés présentaient également ce type de variation.

OVERNELL, 1982(b), suggère de ne pas utiliser la méthode de fractionnement par la chaleur. Les métallothionéïnes sont en effet bien séparées des autres protéïnes par ce traitement, mais celui-ci a également pour effet d'augmenter la proportion d'enzymes digestives telles que la trypsine et la chymotrypsine. Ces protéïnes sont également thermo-résistantes et possèdent des poids moléculaires relativement faibles. D'autre part, les résultats des procédures de purification supplémentaires ont montré que les métallothionéïnes pouvaient être modifiées par ce traitement.

Fig. 34 : Chromatographie d'un extrait de foie de flet non intoxiqué traité par chauffage à 80°C pendant 10 minutes. Colonne de Sephadex G 75 , (48 x 3 cm) éluée par du Tris HCl 0,01 M pH 7,4 . Débit: 12 ml/h.



Profil chromatographique



Profils de la concentration en Cu et Zn

2.4. Lyophilisation

Les fractions obtenues par chromatographie de filtration sur gel ont été lyophilisées et étudiées par électrophorèse. (Laboratoire du Professeur SAUTIERE, Unité associée au CNRS 409 - Institut de Recherches sur le Cancer - Lille).

2.5. Electrophorèse

L'électrophorèse a été utilisée comme méthode de contrôle des différentes purifications réalisées sur les extraits de foies. Plusieurs systèmes séparatifs sont utilisables :

- la pureté des fractions est estimée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide non dénaturant
- l'estimation du poids moléculaire est effectuée grâce à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide avec du S.D.S.
- la caractérisation des protéines peut aussi être effectuée par Isoelectric focusing (NORDBERG et al., 1972 ; LEY et al., 1983).

2.5.1. Méthode

L'électrophorèse utilisée dans cette étude a été réalisée sur gel de polyacrylamide de gradient croissant de 5 à 30 % avec 0,1 % de sodium dodécyl sulfate (S.D.S.).

Les protéines sont solubilisées en présence de β mercaptoéthanol, qui les dénature en rompant les ponts S-S unissant entre elles les chaînes polypeptidiques, et de dodécyl sulfate de sodium. Le S.D.S. a deux effets : il "déplisse" les chaînes polypeptidiques et les rend linéaires, d'autre part il se fixe aux protéines, en masquant leur charge d'origine par une charge négative.

Conditions de l'électrophorèse :

Réactifs

Solution 1 A : 36,3 g de Tris 3 M
48 ml de HCl 1 N q s q 100 ml H₂O

Solution 2 A : 48 g d'acrylamide
1,28 g de bisacrylamide q s p 100 ml H₂O

Solution 3 A : 0,5 g persulfate d'ammonium + 4,5 ml H₂O

A préparer extemporanément.

Préparation des gels :

Solution	Gel supérieur	Gel inférieur	
		Gel à 5 %	Gel à 30 %
1 A	1,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
2 A	1 ml	1 ml	6 ml
H ₂ O	7,4 ml	6,4 ml	0
Glycérol	0	0	1,5 ml
SDS 10 %	100 µl	100 µl	100 µl
Temed	5 µl	5 µl	3 µl
3 A	100 µl	100 µl	100 µl

Tampon échantillon :

Solution 1 A	1 ml
SDS 10 %	5 ml
β mercaptoethanol	0,5 ml
Glycerol	2 ml
H ₂ O	2,5 ml
+ bleu de bromophénol	



Tampon électrode :

10 g de Tris	
48 g de Glycine	pH : 8,6 qsp 5 000 ml H ₂ O
5 g de SDS	

Colorant :

Coomassie R	2,5 g
Ethanol	100 ml (pendant une nuit)
acide acétique	50 ml
H ₂ O	350 ml

Décolorant :

Ethanol	1250 ml
Acide acétique	1000 ml qsp 10 l H ₂ O

La migration est suivie par progression du bleu de bromophénol dans l'électrophorèse. Elle s'effectue de la cathode (-) vers l'anode (+) pendant 3 heures à une intensité de 20 mA par plaque.

Les électrophorèses ont été effectuées sur les fractions lyophilisées I et II des chromatogrammes, issus de la filtration sur gels de Séphadex G 75, des foies de filets intoxiqués et non intoxiqués. Les protéines utilisées pour la calibration des gels sont : la phosphorylase b (PM = 94 000) ; l'albumine (PM = 67 000) ; l'ovalbumine (PM = 43 000) ; l'anhydrase carbonique (PM = 30 000) ; l'inhibiteur de la trypsine (PM = 20 100) ; et l' α lactalbumine (PM = 14 400).

2.5.2. Résultats

Les électrophorèses réalisées sur les pics I montrent de nombreuses bandes migrant jusqu'au niveau de l'anhydrase carbonique (PM = 30 000). On ne détecte pas de bandes de poids moléculaire inférieur. Nous avons réalisé plusieurs électrophorèses sur les lyophilisats de pic II, issus de poissons châtés, témoins du milieu naturel ainsi que de poissons intoxiqués par le plomb, le cadmium et le zinc (Fig. 35). Nous remarquons dans tous les cas la présence de 5 bandes migrant au niveau de la protéine de poids moléculaire voisin de 14 400. Les 3 bandes centrales sont plus importantes. Les deux autres composés ont un poids moléculaire "relatif" compris entre 20 100 et 14 400 pour le premier et inférieur à 14 400 pour le deuxième. L'intensité de ces 5 bandes est variable. Nous observons également la présence de nombreuses bandes correspondant à des protéines de poids moléculaire élevé toutefois moins importantes en concentration.

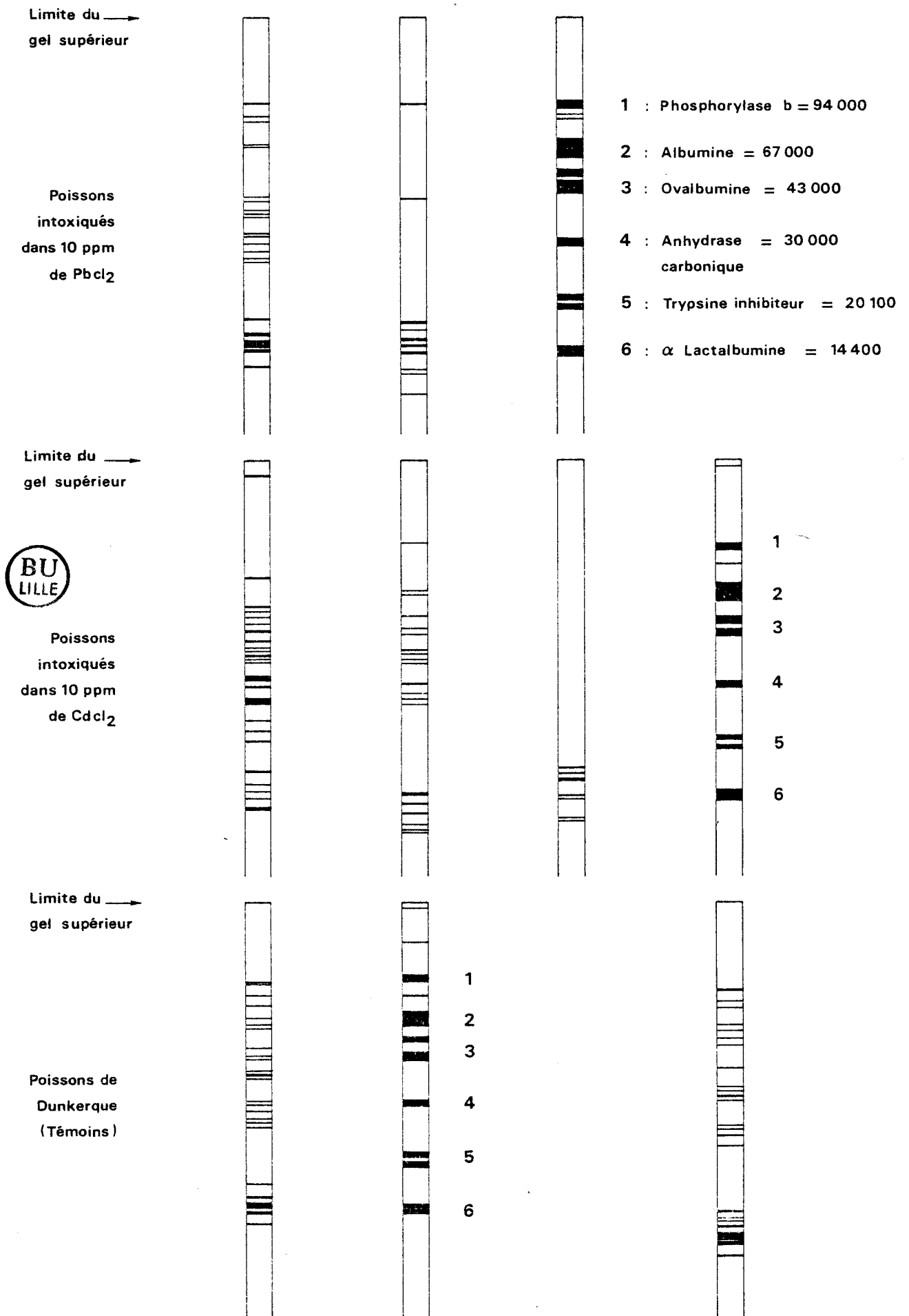
2.5.3. Discussion

Le calcul de la "mobilité relative" des protéines exprimé par :

$$R_f = \frac{\text{distance parcourue par la protéine}}{\text{distance parcourue par le front}} \\ \text{(mesuré à l'aide du bleu de bromophénol)}$$

aurait pu nous fournir l'estimation relative du poids moléculaire par comparaison avec des standards mais cela n'a pas été réalisé lors de cette étude. La présence de protéines contaminantes, de poids moléculaire élevé, nous prouve que la séparation par chromatographie de filtration sur gel n'est pas suffisante. Néanmoins, la présence des bandes correspondant à des protéines de poids moléculaire voisin et inférieur à 14 400 est un résultat satisfaisant. FRANKENNE et al., 1980 ont réalisé une électrophorèse

Fig. 35 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de la fraction II de foies de filets séparée par filtration sur Sephadex G 75



sur gel de polyacrylamide de la fraction soluble de moule *Mytilus edulis* de poids moléculaire compris entre 6 000 et 10 000. Ils ont obtenu 8 bandes. La caractérisation de ces bandes est réalisée par leur dissolution durant 48 heures dans 30 % H₂O à 50° C puis par la mesure de leur teneur en métaux par spectrophotométrie d'absorption atomique. Le résultat montre que 5 bandes sur 8 contiennent une quantité importante de cadmium. Nous avons utilisé cette technique pour nos échantillons. Les bandes de gels ont donc été découpées et traitées comme précédemment. Néanmoins les résultats ont été décevants. Nous pensons que cela est dû à l'utilisation de bandes de gels colorés. NOEL-LAMBOT (1980) préconise en effet, l'utilisation de gels non colorés, les métaux disparaissant des gels au cours de l'étape de coloration, vraisemblablement lors du traitement à l'acide acétique.

2.6. Chromatographie d'échange d'ions

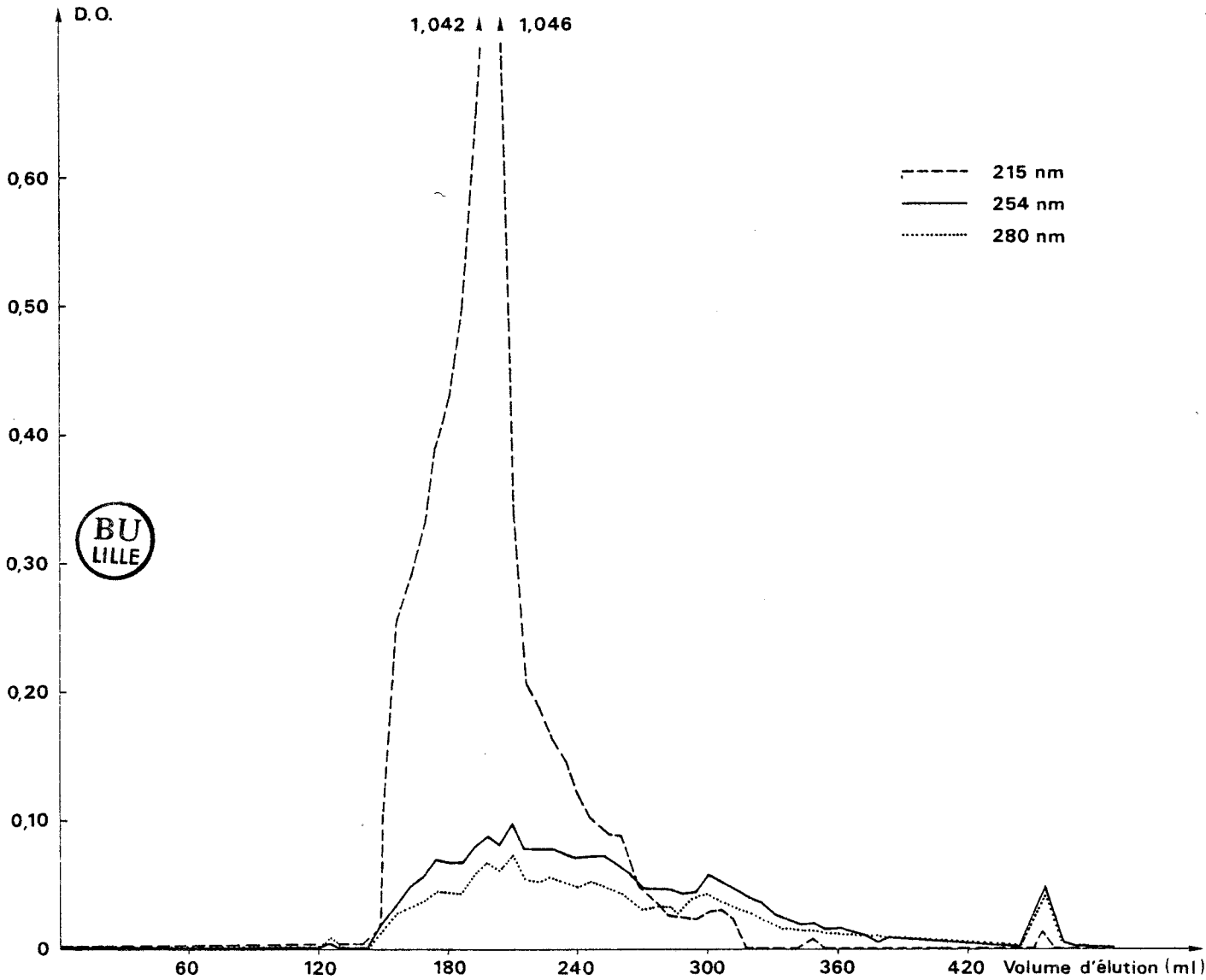
2.6.1. Méthode

La résine de DEAE-cellulose (Trisacryl M, IBF) a été mise sous forme ionique convenable par plusieurs rinçages dans le tampon de chromatographie, Tris HCl 0,015 M, pH : 8,5 enrichi de NaCl à 20 % . Elle est ensuite équilibrée par rinçages successifs dans le tampon de chromatographie puis sur la colonne 1,5 x 20 cm. L'échantillon est alors introduit dans la colonne au moyen d'une pompe péristaltique délivrant 20 ml/h. La colonne est éluée par 130 ml de tampon (Tris HCl 0,015 M, pH : 8,5) et ensuite par un gradient croissant de concentration en NaCl obtenu au moyen d'un formeur de gradient (Pharmacia, GM1) dont le premier compartiment contient 200 ml de tampon et le deuxième 200 ml de tampon plus 0,6 M de NaCl:

2.6.2. Résultats

Le profil chromatographique sur DEAE - cellulose de la fraction II du foie de flets non intoxiqués obtenue par gel filtration (fig 36) montre la présence d'un pic d'absorption à 215 nm. L'absorption à 254 nm est très faible mais supérieure à celle de 280 nm. On distingue plusieurs autres petits pics mais la séparation n'est pas correcte. Nous avons donc cherché à savoir si ces pics correspondaient bien à des protéines par un test de précipitation.

Fig . 36 :Chromatographie sur DEAE-cellulose (colonne de 1,5 x 20 cm) de la fraction II obtenue par Gel filtration sur Sephadex G 75 d'un foie de flet non intoxiqué.



◀ 130 ml de tampon Tris Hcl 0,015 M pH : 8,5 ▶

◀ 400 ml de tampon Tris Hcl 0,015 pH : 8,5 avec un gradient de 0 à 0,6 M de Nacl ▶

Test de précipitation des protéines

- 150 μ l sont prélevés dans chaque fraction obtenue par chromatographie sur DEAE - cellulose auxquels on ajoute 1 050 μ l d'eau distillée. Le volume est ainsi de 1 200 μ l. La précipitation des protéines est obtenue par ajout de 600 μ l d'acide trichloracétique 3,3 M. La lecture au spectrophotomètre est ensuite effectuée à 400 nm, 15 minutes après l'addition. Un échantillon "blanc" est réalisé avec 1 050 μ l de tampon utilisé pour la chromatographie.
- Le profil de l'absorption à 400 nm montre la présence de 3 pics importants correspondants à des volumes d'élution sur la DEAE - cellulose de 150, 220 et 335 ml (Fig. 37). On remarque également la présence de "dents de scie", de faible absorption. Le profil ne montre pas de retour à la ligne de base. En le superposant aux courbes obtenues pour la filtration sur DEAE - cellulose (Fig. 36), on remarque que les deux premiers pics correspondent aux limites du pic d'absorption que ce soit à 215, 254 ou 280 nm. Ces résultats montrent la nécessité d'une modification de la technique. Nous avons néanmoins essayé de caractériser cette chromatographie par l'étude de la teneur en cuivre et en zinc des différentes fractions. Les résultats confirment les précédents (Fig. 38).
- Les variations de la teneur métallique des différentes fractions sont peu importantes. Le profil de cuivre montre néanmoins un pic assez étalé qui se superpose au pic d'absorption à 215 nm. Un seul pic de zinc important s'individualise, correspondant au début de l'élution par le gradient de NaCl et coïncidant au premier mis en évidence dans le test de précipitation.

2.6.3. Discussion

La chromatographie sur colonne échangeuse d'ions ne nous a pas donné de résultats satisfaisants. Nous pensons que la faible résolution obtenue, est due à une trop petite quantité d'échantillon. En effet, nous ne disposions que de 2 mg de protéines. La taille de la colonne apparaît donc démesurée. La réalisation de chromatographies sur des colonnes plus petites (pipettes de 5 ml) ou l'utilisation de l'H.P.L.C., ont donc été envisagées pour augmenter la qualité de la séparation.

Fig. 37 : Test de précipitation des protéines par l'acide trichloracétique

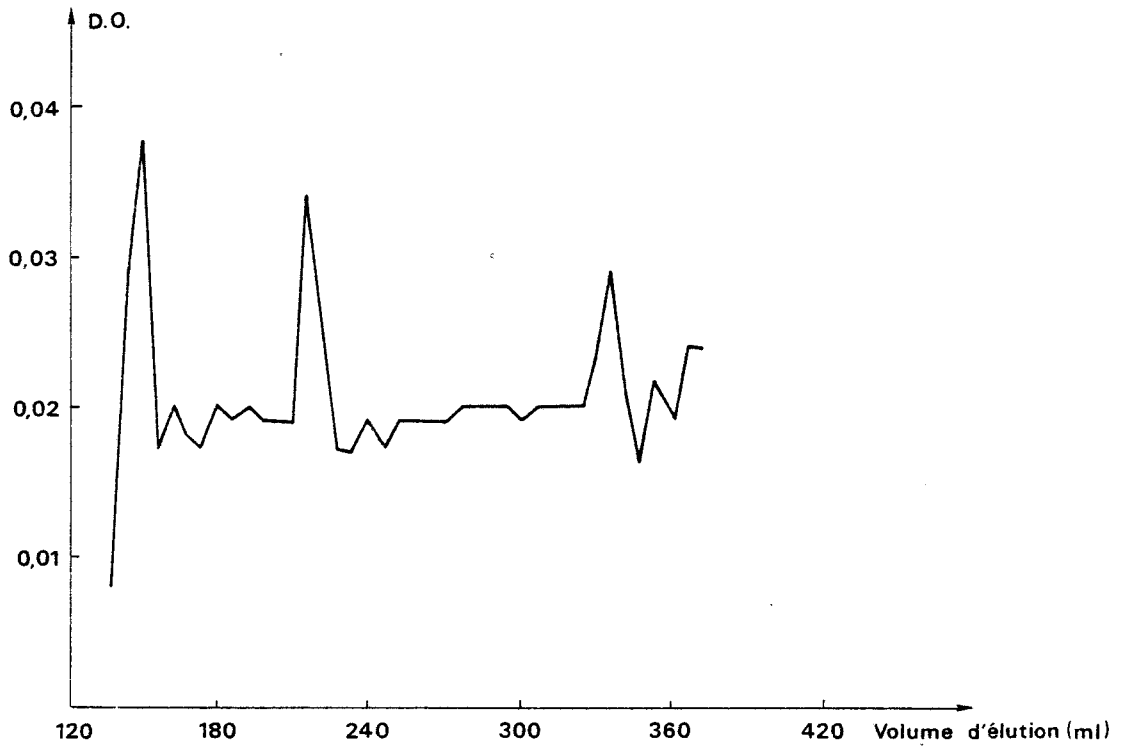
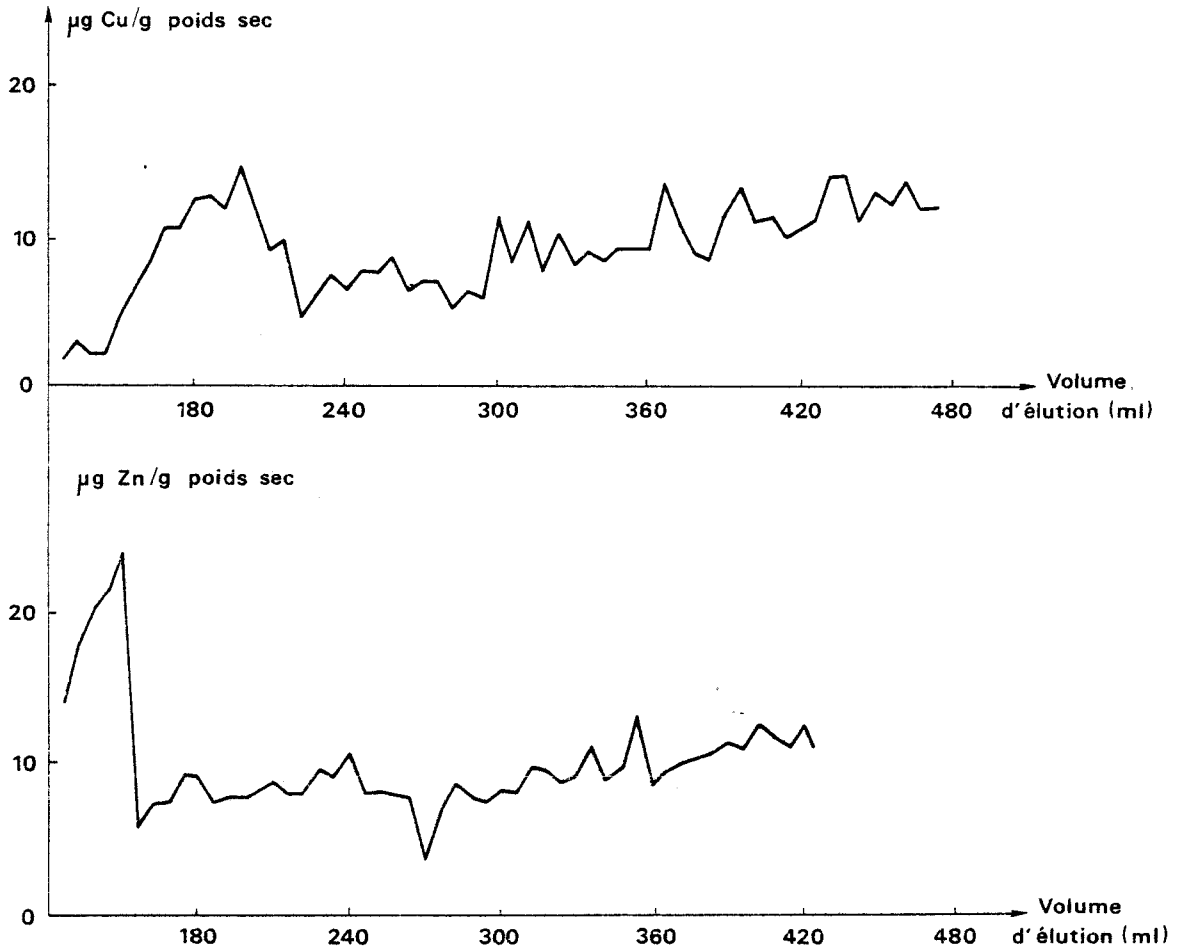


Fig. 38 : Profil de la teneur en cuivre et zinc des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE-cellulose



Néanmoins nous avons remarqué la présence de trois pics protéïques, mais d'un seul pic de zinc et de cuivre. Il semblerait donc qu'il n'existe qu'une protéïne liant ces métaux. Celle-ci est éluée au début du gradient de NaCl, sa charge ionique est donc très faible. Ce résultat est similaire à celui obtenu par LEY et al. en 1983 sur le foie de la truite arc en ciel. L'électrophorèse de cette fraction apparaît nécessaire afin de déterminer sa pureté.

2.7. Analyse d'acides aminés

Les résultats de l'analyse d'acides aminés réalisée sur la fraction II contenant le cadmium, isolée à partir d'un foie de flet contaminé pendant 10 jours dans 10 ppm de CdCl₂, sur gel de Séphadex G 75 sont reportés dans le tableau 21. Nous remarquons que la composition en acides aminés n'est pas typique des métallothionéïnes. Elle ne présente pas, en effet, les caractéristiques données par KÄGI et al., 1979 : 33 % de cystéïne, 14 % de sérine, 13 % d'acides aminés basiques (Lysine et Arginine), et présence d'un seul résidu de méthionine.

Le contenu en cystéïne apparaît très faible, comparé à des résultats provenant d'autres sources. Ceci est dû certainement à des contaminants protéïques qui masquent la composition typique des métallothionéïnes.

2.8. Bilan général

Les résultats présentés dans ce paragraphe proviennent de l'utilisation de diverses techniques de séparation et de purification des protéïnes de la fraction soluble du foie de flet. Nous avons pu mettre en évidence par chromatographie de filtration sur gel un pic de cadmium élué par un volume correspondant aux protéïnes de poids moléculaire voisin de 12 000. Les résultats issus de l'électrophorèse et de la chromatographie d'échange d'ions montrent la nécessité de purifications supplémentaires afin de caractériser ces protéïnes. Il apparaît donc nécessaire de réaliser d'autres chromatographies d'échanges d'ions, ainsi que des électrophorèses de contrôle à chaque stade de la purification.

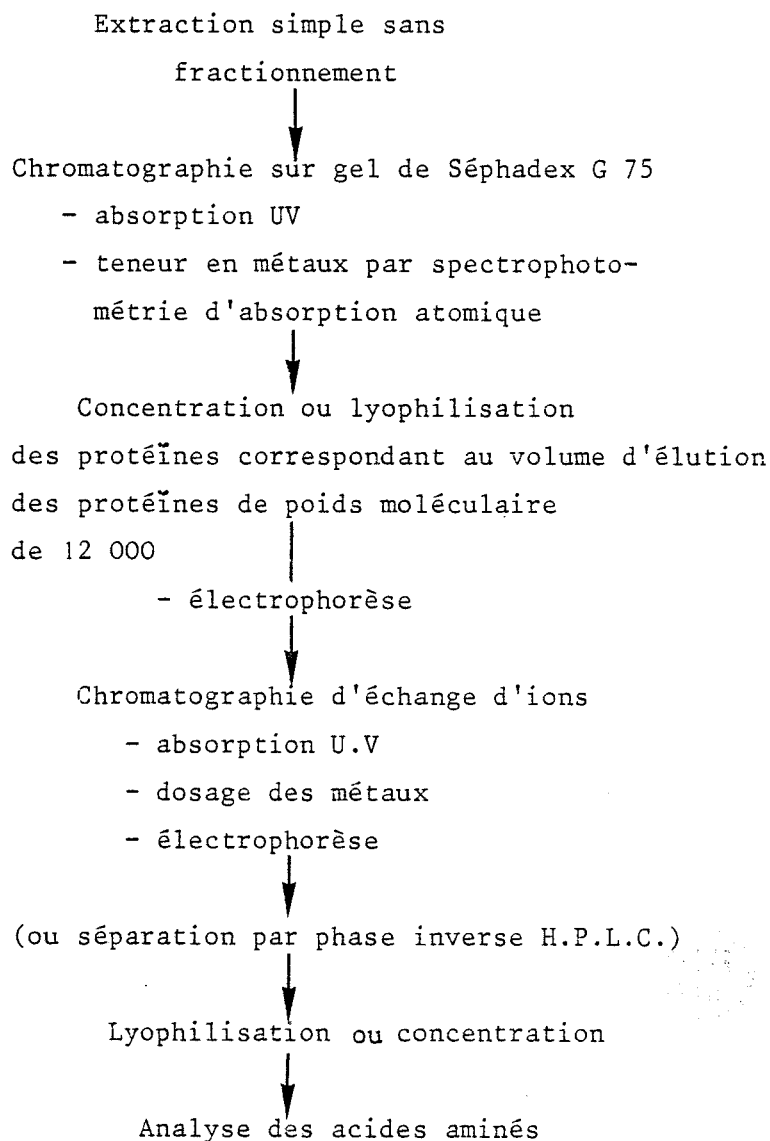
TABLEAU 21 : COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE LA PROTEINE DU FOIE DE FLET LIANT
LE CADMIUM (OBTENUE PAR GEL FILTRATION SUR SEPHADEX G 75) COMPAREE
A LA COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DE QUELQUES METALLOTHIONEINES CONNUES.

Acides Aminés	Foie d' Anguille (1)	Foie de Flet Fraction II	Rein de cheval (2)	Foie d' Anguille Mt-I (3)	Moule Mt-I (4)	Mouton (5)
Lys	6,71	9,60	11,1	11	7,7	9,83
Arg	2,94	1,70	1,9	-	1,8	1,64
His	2,42	1,10	-	-	-	-
Asp	10,21	8,08	5	8,8	8,1	4,92
Thr	6,65	6,50	1,8	14,6	6,4	3,28
Ser	6,40	7,60	11,9	11,8	7,9	14,75
Glu	8,57	10,20	4,7	2,1	4,5	1,64
Pro	4,76	10,20	2,9	3,4	6,8	6,56
Gly	8,53	11,10	9,1	8,8	15,8	9,83
Ala	9,18	11,20	11,6	5,3	5,2	9,83
Cys	6,06	8,60	33,8 a)	30,4 a)	25,5 a)	32,78
Val	6,08	4,80	4,5	2,2	3,8	3,28
Met	4,37	0,83	1,5	1,6	0	1,64
Ile	4,08	3,10	0	-	4	-
Leu	6,72	4,60	0	-	1,3	-
Tyr	2,91	0	0	-	-	-
Phe	3,38	1,06	0	-	1,3	-
Trp	-	-	-	-	-	-

a) Cys. dosée en tant qu'acide cystéique

- 1) BOUQUEGNEAU et al., 1975 : Composition en acides aminés de la fraction contenant le mercure isolée à partir de foie d'anguilles contaminées, sur colonne de Séphadex G 75.
- 2) KOJIMA et al., 1976.
- 3) - 4) NOEL-LAMBOT, 1980
- 5) PETERSON et al., 1984.

Il a été envisagé d'utiliser la technique par H.P.L.C. plus adaptée, étant donné la petite quantité d'échantillon dont nous disposons, au moyen d'une colonne de phase inverse CN. Ces études n'ont pu être réalisées dans le cadre de ce travail*. Il apparaît donc que le protocole le plus employé pour la caractérisation des métallothionéïnes est le suivant :



Lors de cette étude préliminaire, nous n'avons pu effectuer que les quatre premières caractérisations, qui nécessitent toutefois de nombreuses améliorations au niveau des chromatographies d'échanges d'ions et de l'électrophorèse.

* La colonne μ BONDAPAK-CN, spécifique pour ce travail n'a pu nous être fournie par la maison Waters, en rupture de stock.

III - SUIVI EXPERIMENTAL DE L'INTOXICATION PAR LE CADMIUM

Nous avons réalisé un suivi expérimental d'une intoxication par le cadmium de flets en comparant un lot de poissons soumis en élevage, à la station, à une charge en cadmium sous forme de CdCl_2 à 10 mg/litre, pendant un temps variant de 1 à 40 jours avec un lot témoin maintenu dans la même eau provenant du système d'alimentation de la station.

3.1. Chromatogrammes

Les profils d'élution représentent l'absorption U.V à 54 nm et 280 nm ainsi que les concentrations en zinc, cuivre et cadmium des extraits de foie, de flets intoxiqués dans 10 ppm de CdCl_2 (Fig. 39). L'étude de ces chromatographies a également été effectuée pour des poissons non contaminés. Nous n'avons pour simplifier, fait figurer qu'un seul chromatogramme de poissons témoins (Fig. 40).

Les différents chromatogrammes montrent 3 pics de densité optique de protéines à 254 nm et 280 nm dont l'importance varie selon les quantités d'échantillons utilisées. Nous observons la présence de deux pics de protéines dont les concentrations en zinc et en cuivre diffèrent suivant les échantillons. On note que le foie de poissons témoins, provenant de la même zone de Dunkerque, présente également ces deux pics de protéines liées au zinc et au Cuivre.

La concentration de cadmium dans les profils chromatographiques provenant de poissons contaminés est décelée essentiellement au niveau des fractions de poids moléculaire voisin de 12 000 (PPPM) (Fig. 39). On observe néanmoins pour le temps $t = 1$ jour, une petite quantité de ce métal dans les protéines de haut poids moléculaire (PHPM) qui semble stable jusqu'au 30ème jour et augmente fortement le 40ème jour d'intoxication. Par contre, la concentration de cadmium correspondant au pic II augmente régulièrement en fonction du temps d'intoxication.

Le foie de poisson témoin présente également une faible teneur en cadmium, légèrement supérieure au niveau de la fraction II (Fig. 40). Nous remarquons donc la présence de zinc, cuivre et cadmium simultanément au niveau de la fraction II. Nous avons quantifié ces résultats en calculant la teneur en métaux des deux pics plus importants (les variations correspondant au 3ème pic étant négligeables par rapport à l'ensemble de la concentration métallique).

Fig ; 39 : Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets intoxiqués dans 10 ppm de $CdCl_2$. Colonne de sephadex G 75 ($40 \times 2,6 \text{ cm}$)². Débit: 12ml/h. eluant: Formiate d'Ammonium 0,01 M pH 7,4.

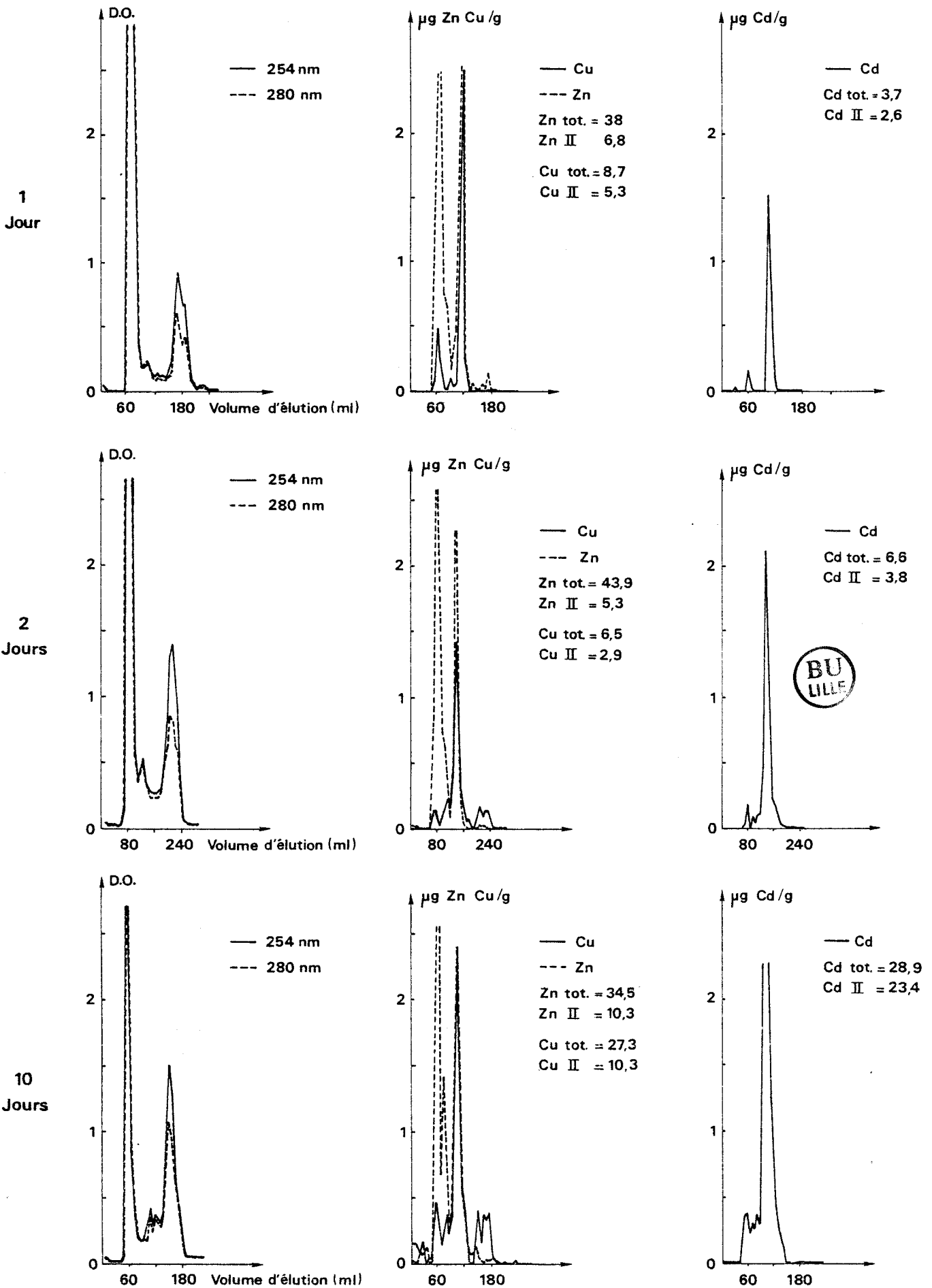
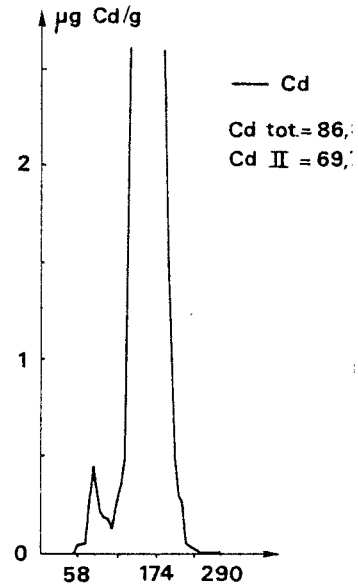
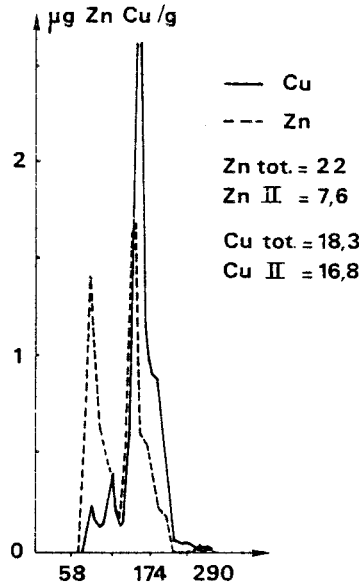
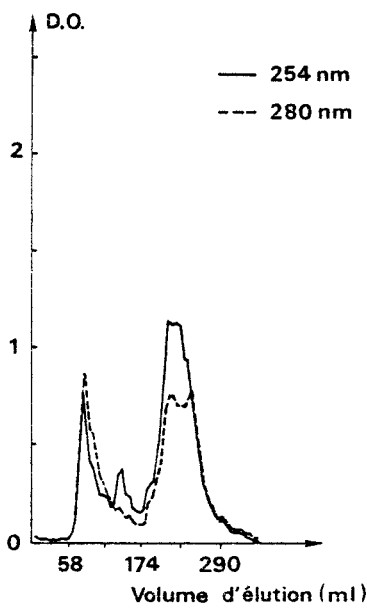
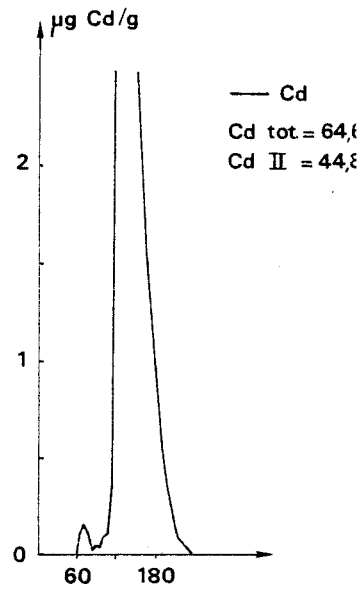
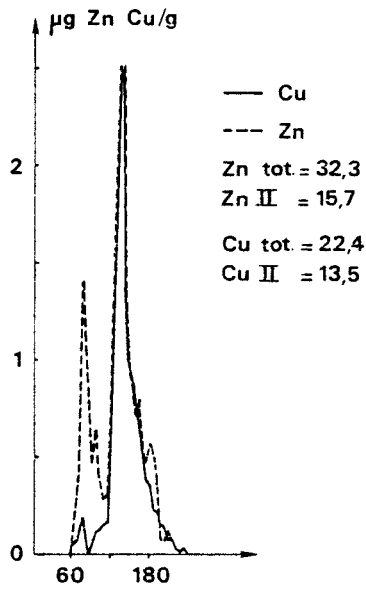
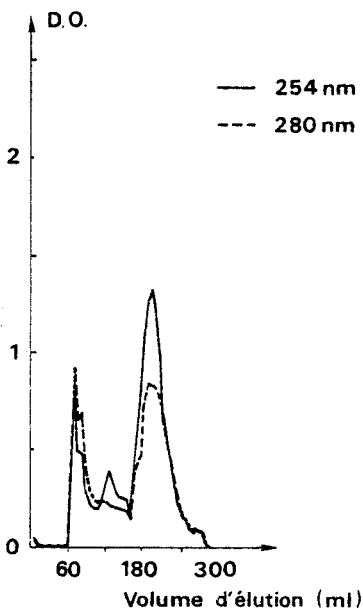


Fig . 39 : (Suite)

28
Jours



30
Jours



40
Jours

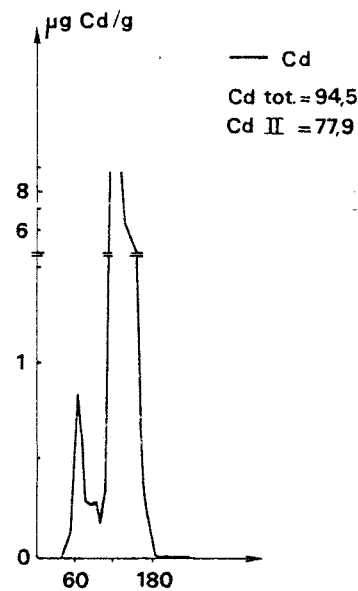
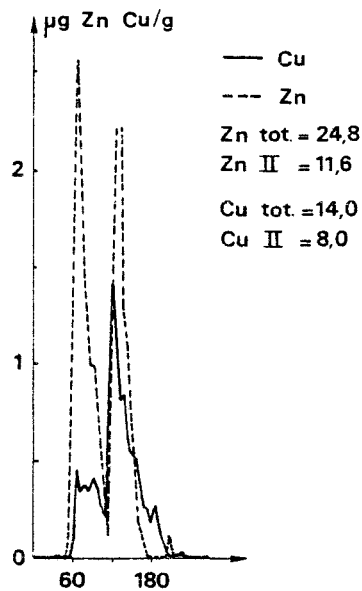
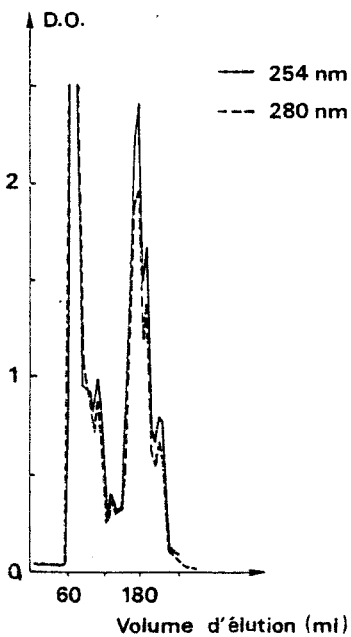


Fig . 40: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foie de flets non intoxiqués.

Conditions de chromatographie:

Colonne de séphadex G 75 :(40 x 2,6 cm)

débit : 12 ml/h.

éluant : Formiate d'Ammonium, 0,01 M pH 7,4.

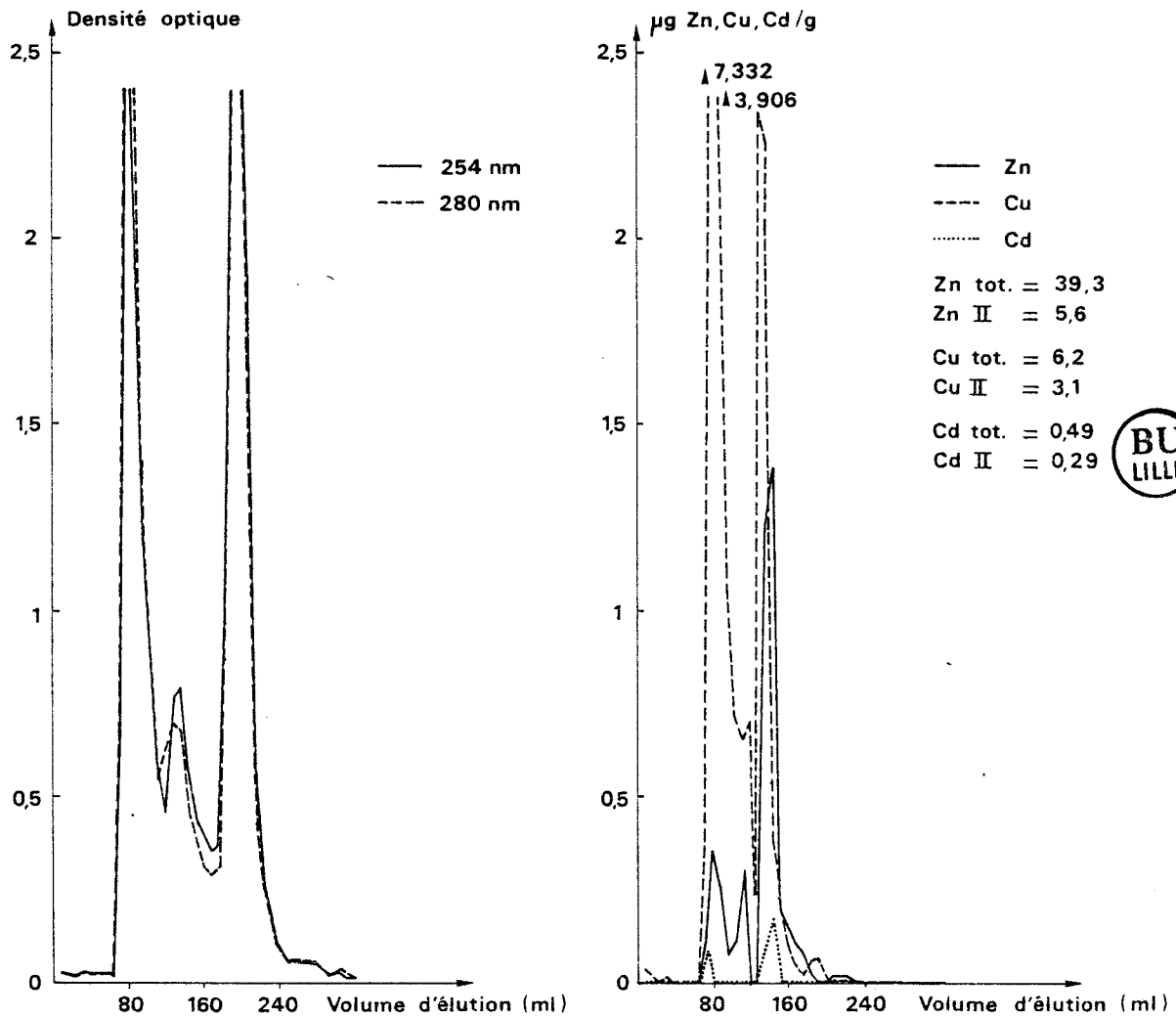
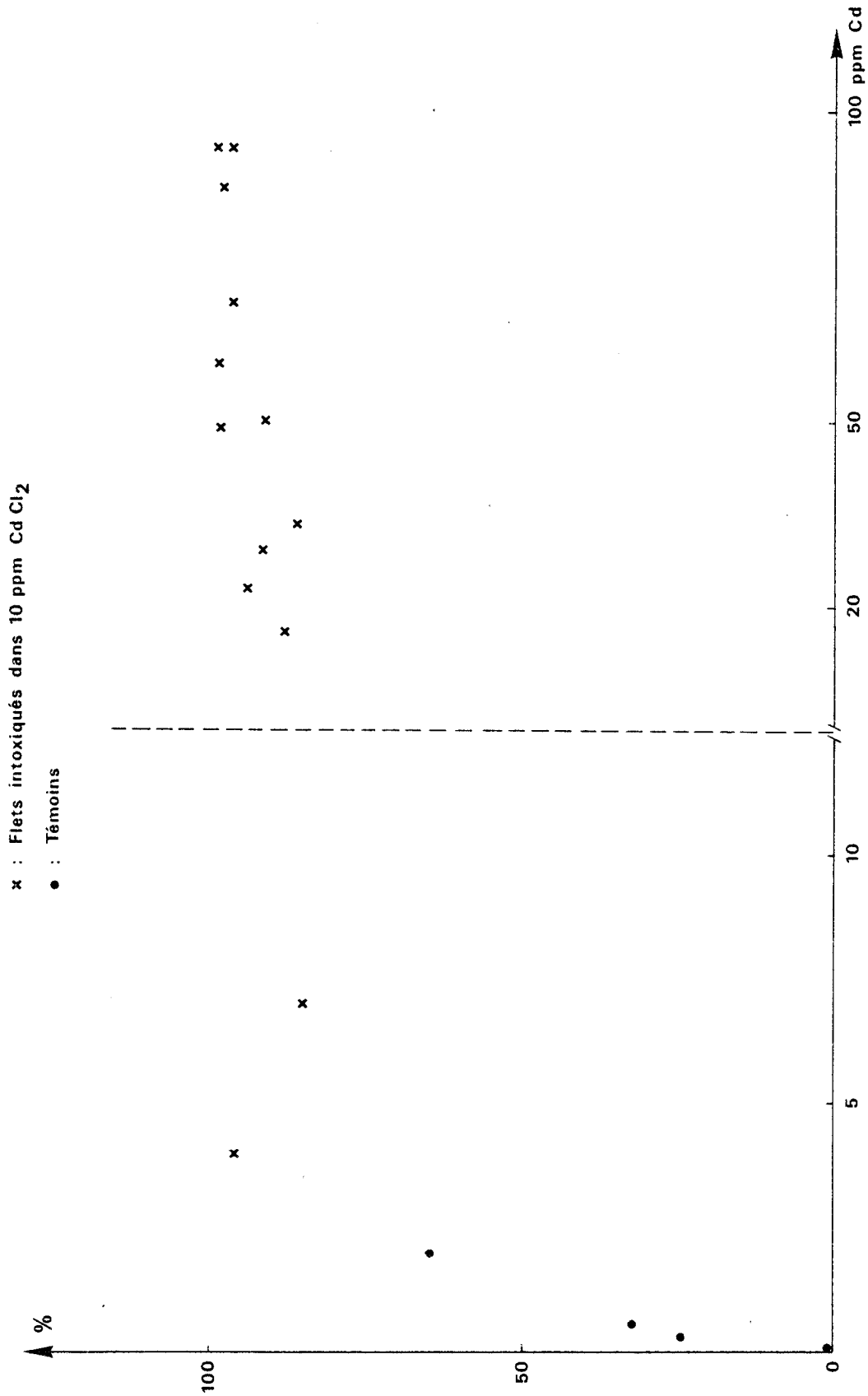




Fig . 41: Relation entre la proportion du cadmium associé au pic II (en % du cadmium de l'extrait soluble de foie) et la teneur en cadmium de cet organe .
(valeurs individuelles)



3.2. Distribution du zinc, du cadmium et du cuivre dans la fraction soluble des foies de flets dans l'expérience d'intoxication par le cadmium

3.2.1. Poissons témoins

La teneur en métaux des poissons présente une grande variabilité : nous avons donc établi une moyenne des résultats obtenus pour 3 échantillons.

Tableau 22 : Distribution du cadmium, du zinc et du cuivre dans le foie de flets non intoxiqués (témoins)

Métal	Métal dans le foie entier (µg/g)	Métal dans la fraction soluble du foie (µg/g)	Métal contenu dans le pic II		
			µg/g Foie	% relatif au contenu en métal soluble de l'extrait soluble	µatg métal/g de Foie
Cd	0,53 ± 0,37	0,31 ± 0,26	0,11 ± 0,10	35,1 %	0,0009
Zn	31,02 ± 10,22	20,50 ± 1,27	7,03 ± 1,32	34,3 %	0,107
Cu	6,52 ± 2,23	4,30 ± 1,91	3,01 ± 1,53	69,8 %	0,047
Cd + Zn + Cu	38,9	25,11	10,15	40,6 %	0,155

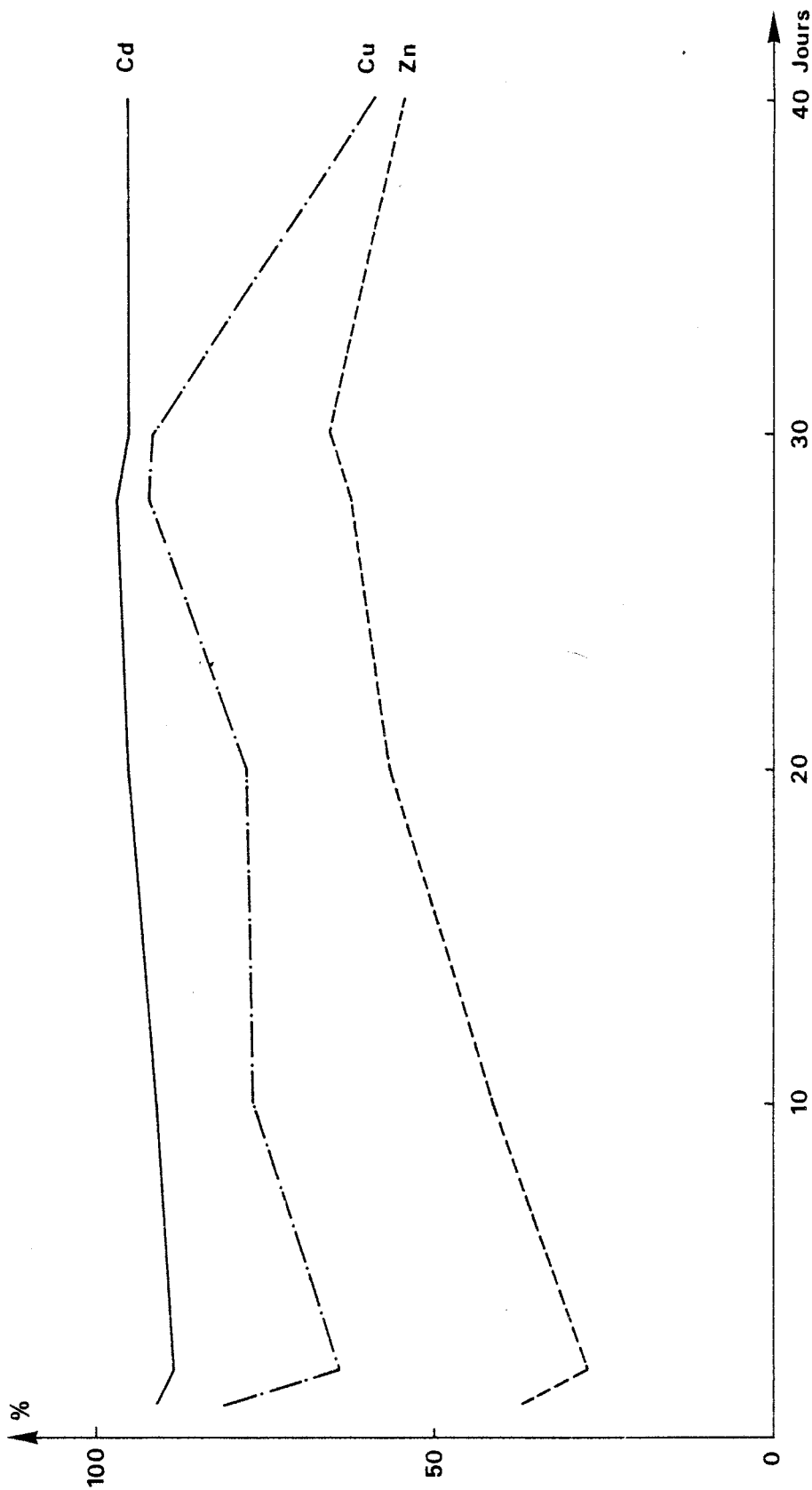
Nous remarquons que 35,1 % du cadmium est présent dans la fraction II du foie de flets nonintoxiqués. Les 64,9 % restants sont donc fixés sur des protéines de poids moléculaire élevé (PHPM). L'étude des chromatogrammes montre que le pic élué à un volume de 150 ml, comporte également une quantité importante de cuivre, respectivement 69,8 % et 34,3 % par rapport à la teneur totale en métaux de la fraction soluble du foie.

Les protéines de masse moléculaire voisine de 12 000 (PPPM) fixeraient donc principalement du cuivre et un peu de zinc en absence de toute intoxication expérimentale.

La concentration en µatg de métal par gramme d'organe est de 0,155 dans un rapport de 0,9 - 107 - 47 µatg/g respectivement pour le cadmium, le zinc et le cuivre. On observe également que la quantité de cadmium liée aux protéines du pic II chez les poissons témoins est d'autant plus grande que sa concentration dans le foie est élevée (Fig. 41).



Fig . 42: Proportion de métaux associés au pic II
(en % de métaux de l'extrait soluble de foie)
en fonction du temps d'intoxication.



3.2.2. Poissons intoxiqués

3.2.2.1. Fraction soluble totale

La concentration des métaux présents dans le pic II des protéines du chromatogramme varie avec l'intoxication. Le cadmium est toujours en quantité supérieure à celle du cuivre, elle même supérieure à celle du zinc (Fig. 42). On note la présence de 92 % de cadmium dès le 1er jour (quantité exprimée en pourcentage relatif au contenu en métal de l'extrait soluble). Les valeurs sont très nettement supérieures à celle des poissons témoins (Tableau 23).

Ce pourcentage est relativement constant durant le temps d'intoxication ; il atteint 97 % le 40ème jour. Par contre celui de zinc dans le pic II montre une nette augmentation à partir du 10ème jour de contamination. Nous avons cherché à vérifier si cette hausse était significative. Le coefficient de corrélation r , est égal à 0,846 pour un nombre de degrés de liberté $n = 5$. La variation est donc significative au seuil de 5 %. Le rapport entre la quantité de zinc présente dans la fraction II et la teneur en ce métal de l'extrait soluble augmente donc en fonction du temps d'intoxication.

Le pourcentage de cuivre est variable mais toujours très élevé (78 % en moyenne) et supérieur à celui des poissons témoins. Néanmoins nous n'avons pas observé de variations significatives lors des contaminations expérimentales pour ce métal.

3.2.2.2. Fractions correspondant aux protéines de poids moléculaires voisin de 12000

La quantité de métaux en $\mu\text{atg/g}$ a été calculée pour les fractions correspondants au volume d'élution des protéines de poids moléculaire voisin de 12 000 (Tableau 23).

Le premier jour d'intoxication, la concentration en zinc et cuivre est supérieure à celle du cadmium (Fig. 43). Dès le deuxième jour de la contamination, on note une augmentation de la quantité en cadmium. La concentration totale des métaux présents à ce moment dans cette fraction est de 0,141 $\mu\text{atg/g}$, ce qui est semblable à la valeur trouvée pour les témoins (Tableau 22). Néanmoins, la relation entre les trois métaux est différente puisque, dans le cas de l'intoxication, on retrouve des quantités approximativement égales en cuivre, zinc et cadmium alors que dans le cas de poissons témoins, le cuivre était prépondérant. On remarque ensuite, que la quantité de cadmium dans la fraction II augmente très fortement en fonction du temps d'intoxication.

TABLEAU 23 : DISTRIBUTION DU CADMIUM, DU ZINC ET DU CUIVRE DANS LE FOIE DE FLETS INTOXIQUES
DANS 10 PPM DE CdCl₂ EN FONCTION DU TEMPS D'INTOXICATION

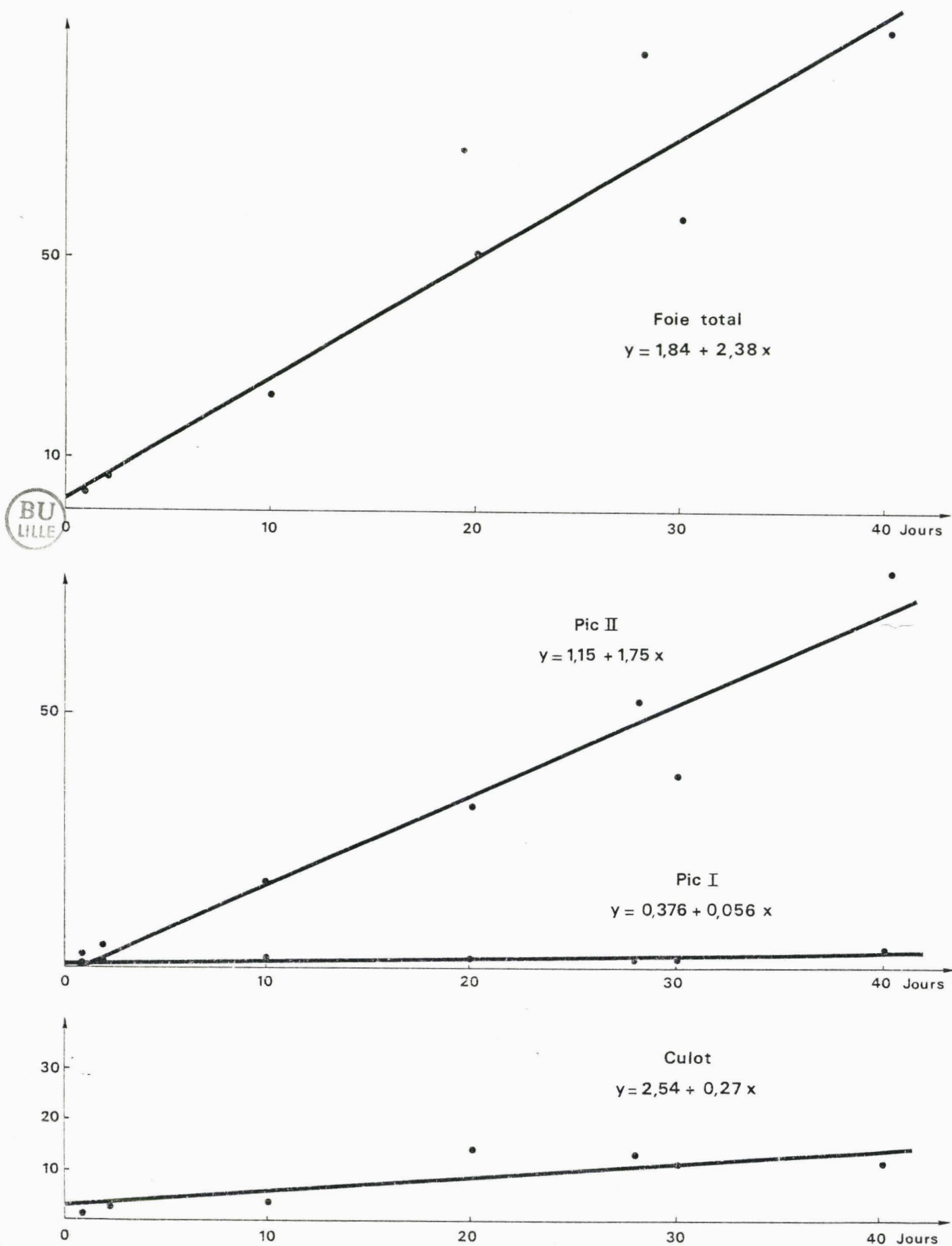
BU
LILLE

Temps d'intoxication	Métal dans le foie entier (µg/g)	Métal dans l'extrait soluble du foie (µg/g)	Métal contenu dans la fraction II			
			µg/g Foie	% relatif au contenu en métal soluble de l'extrait soluble	µatg/g de foie	
t = 1 jour n = 1	Cd	3,71	2,82	2,59	91,8	0,023
	Zn	37,99	18,57	6,82	36,7	0,104
	Cu	8,72	6,42	5,26		0,082
	Cd + Cu + Zn					0,209
t = 2 jours n = 1	Cd	6,59	4,28	3,83	89,4	0,034
	Zn	43,89	14,50	4,04	27,8	0,061
	Cu	6,49	4,57	2,94	64,2	0,046
	Cd + Zn + Cu					0,141
t = 10 jours n = 3	Cd	22,55	18,48 ± 6,84	16,90 ± 6,55	91,5	0,150
	Zn	35,64	23,22 ± 2,66	9,55 ± 1,19	41,1	0,145
	Cu	18,52	10,35 ± 5,46	7,96 ± 3,80	76,9	0,125
	Cd + Zn + Cu					0,420
t = 20 jours n = 3	Cd	50,30	32,60 ± 24,58	31,06 ± 25,45	95,3	0,276
	Zn	44,37	12,66 ± 7,80	7,193 ± 2,69	56,8	0,110
	Cu	12,04	7,47 ± 7,74	5,76 ± 6,94	77,1	0,090
	Cd + Zn + Cu					0,476
t = 20 jours n = 2	Cd	90,37	53,39 ± 25,66	52,14 ± 24,83	97,6	0,463
	Zn	30,89	21,62 ± 12,40	13,47 ± 8,44	62,2	0,205
	Cu	19,02	11,14 ± 9,06	10,411 ± 9,08	93,4	0,163
	Cd + Zn + Cu					0,831
t = 30 jours n = 2	Cd	57,53	39,39 ± 8,71	37,51 ± 10,34	95,2	0,333
	Zn	30,63	27,08 ± 8,83	17,65 ± 2,75	65,1	0,269
	Cu	22,64	15,82 ± 1,93	14,60 ± 1,55	92,3	0,229
	Cd + Zn + Cu					0,831
t = 40 jours n = 1	Cd	94,47	80,99	77,90	96,2	0,693
	Zn	24,87	21,42	11,61	54,2	0,177
	Cu	14,10	13,72	8,05	58,7	0,126
	Cd + Zn + Cu					0,990

Fig . 43 : Teneur en Cuivre, Zinc et Cadmium du pic II obtenu par chromatographie sur gel de Sephadex G 75, de la fraction soluble de foies de rats intoxiqués dans 10 ppm de CdCl₂.



Fig. 44 : Evolution de la teneur en cadmium (en $\mu\text{g/g}$ de poids frais) des différentes fractions cellulaires du foie du flet au cours de l'intoxication dans 10 ppm de CdCl_2



Jusqu'au 10^{ème} jour, la proportion de la teneur des trois métaux est encore identique, toutefois la quantité totale de Cu, Zn et Cd est supérieure à celle des témoins : 0,420 µatg/g. Le comportement des trois métaux semble donc évoluer vers un renforcement de leur fixation sur ces protéines.

A partir du 10^{ème} jour, leur proportion varie. Le zinc et le cuivre augmentent faiblement et leurs variations sont semblables, tandis que le cadmium atteint après 40 jours d'intoxications une teneur 7 fois supérieure à celle des deux autres métaux. Les profils obtenus (Fig. 43) montrent, en général, des variations opposées de la teneur en cuivre et en zinc par rapport à celles du cadmium. Après 30 jours de contamination, on remarque en effet qu'à une augmentation de la concentration en cadmium se superpose une baisse de la teneur en zinc et cuivre. Ceci semble prouver que le métabolisme de ces trois métaux est lié dans le foie.

3.3. Importance de la fraction de poids moléculaire voisin de 12 000 vis à vis des autres sites cellulaires de la fixation du cadmium

On a représenté (Fig. 44) l'accumulation du cadmium dans les différents sites cellulaires du foie. On veut vérifier que la quantité en ce métal dans le foie total augmente en fonction du temps d'intoxication (cf. Chapitre III). La teneur en cadmium de la fraction contenant les protéines de masse moléculaire 12 000 croît également de manière considérable alors que celle fixée par les autres protéines solubles reste très faible. On constate une augmentation comparable dans le surnageant et dans le culot de foie ; elle est néanmoins moins importante dans le culot que dans les protéines de petit poids moléculaire (PPPM).

3.4. Commentaires et Discussion

La caractérisation des protéines de poids moléculaire voisin de 12 000 n'ayant pu être réalisée complètement au moment de cette rédaction, nous dénommerons ces protéines : protéines "liant" le cadmium. Nous comparerons nos résultats avec ceux d'autres auteurs ayant mis en évidence ces protéines ou ces métallothionéines "like" protéines. Nous les intitulerons protéines de petit poids moléculaire (PPPM) par rapport aux protéines de haut poids moléculaire (PHPM).

Les PPPM constituent lors de notre expérimentation sur le cadmium le principal site d'accumulation de ce métal. Elles contiennent également une quantité importante de zinc et de cuivre. BUCKLEY et al., 1982 considèrent que le foie est un important lieu de stockage du cuivre. Les mollusques et les poissons montrent une relation directe entre le contenu en cadmium de la fraction métallothionéïne en fonction du temps d'exposition (KÖHLER et al., 1982 ; BEATTIE et al., 1979). Ce cadmium apparaît persistant même lorsque la cause de l'intoxication a disparu.

Ceci entraîne une accumulation rémanente qui peut présenter un danger pour la santé. Les métallothionéïnes seraient donc une "trappe" à cadmium (NOEL-LAMBOT, 1980b). Ces protéïnes sont décelées dans des poissons non intoxiqués. 69,8 % du cuivre et 34,3 % de zinc leur sont associés : ces protéïnes constituent donc un réservoir de métaux. C'est une fonction qui a déjà fait l'objet de nombreux commentaires (ONOSAKA et al., 1982 ; CHERIAN et al., 1977).

La présence de cadmium pour les poissons dits témoins, non contaminés expérimentalement, est décelée essentiellement au niveau des protéïnes de haut poids moléculaire. Mais la quantité de cadmium augmente dans les métallothionéïnes. Elle traduit l'augmentation des teneurs en cadmium du foie total. Ces résultats concordent avec ceux observés par NOEL-LAMBOT en 1980(a) sur l'anguille.

Nous avons également remarqué une augmentation plus forte de la teneur en zinc des métallothionéïnes "like" protéïnes par rapport à celle de la quantité totale de la fraction soluble du foie. WHANCER et al., 1983 et SUGAWARA, 1977 ont observé le même phénomène chez le rat.

Le pourcentage de cuivre reste constant.

Les résultats présentés dans le chapitre III montrent que l'intoxication par le cadmium provoque une baisse de la teneur en zinc du culot. Il pourrait donc exister une redistribution du zinc de la partie insoluble du foie vers les métallothionéïnes.

L'étude particulière de la fraction comportant les protéïnes de petit poids moléculaire montre qu'au 2ème jour d'intoxication, la quantité des trois métaux y est égale. La fixation du cadmium se ferait donc par déplacement du zinc et /ou du cuivre des sites qu'ils occupent sur ces protéïnes.

Comme les variations du cuivre et du zinc sont similaires, il n'apparaît pas qu'un de ces deux métaux soit privilégié par rapport à l'autre. Les données bibliographiques montrent cependant que l'affinité des ions Zn^{2+} pour les métallothionéïnes est plus faible que celle des ions Cu^{2+} (KÄGI et al., 1960 ; PULIDO et al., 1966 ; NORDBERG et al., 1974). Ce fait a été vérifié par une expérience réalisée *in vitro* par NOEL-LAMBOT en 1980. En ajoutant du cadmium à la fraction soluble de foies d'anguilles non intoxiquées, cet auteur a montré que ce métal se fixait sur les métallothionéïnes et entraînait une disparition du zinc. De même, SUZUKI et al., 1983 ont réalisé une injection de cadmium dans le surnageant issu du foie de grenouilles (*Xenopus laevis*) déjà contaminés par le zinc.

La distribution du zinc est altérée mais pas celle du cuivre. Ils ont également injecté du cuivre à la place du cadmium, ce qui a entraîné une baisse de la teneur en zinc. Les protéïnes liant le zinc seraient donc remplacées *in vitro* par le cuivre (SUZUKI et al., 1981).

Le rôle des métallothionéïnes apparaît donc double. Elles constituent un réservoir de zinc et de cuivre pour les organismes non intoxiqués (WHANCER et al., 1981).

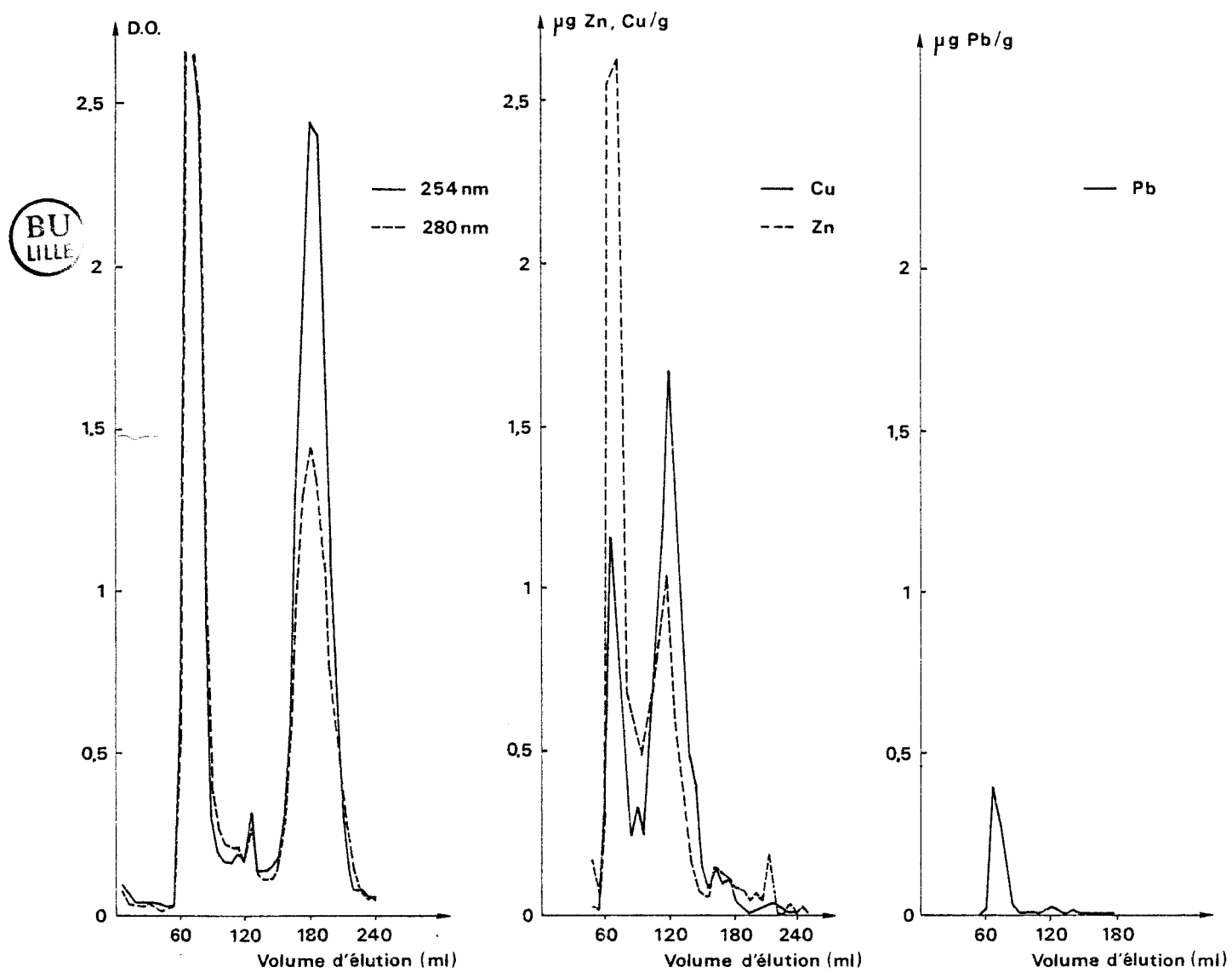
Elles font partie d'un système de détoxification pour les métaux toxiques tels que le cadmium (KITO et al., 1982 ; WOODWORTH et al., 1983) ou le mercure (BOUQUEGNEAU, 1979).

La présence de ces protéïnes peut donc être considérée comme un indicateur biologique de la pollution par les métaux lourds, elles ont été trouvées, en effet chez des animaux naturellement intoxiqués (RAY et al., 1981 ; RIDLINGTON et al., 1981 ; NOEL-LAMBOT, 1980 ; ROCH et al., 1982). C'est pourquoi TOHYAMA a préconisé en 1982 l'utilisation comme test de routine vis à vis de l'intoxication au cadmium, des dosages de métallothionéïnes dans les urines des ouvriers. On sait, en effet (NORDBERG et al., 1982) que ce métal est fortement éliminé par le rein.

Cependant il ne faut pas oublier que certains animaux tels les mollusques sont capables d'accumuler de grandes quantités de polluants même dans un milieu relativement peu pollué. La présence de ces métaux peut provenir d'une intoxication antérieure (nous avons vu que la bio-accumulation du cadmium dans les tissus était importante et stable.)

Il convient donc d'être prudent dans le choix des bio-indicateurs de la qualité du milieu marin.

Fig . 45: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets intoxiqués dans 10 ppm de $PbCl_2$ pendant 43 jours.
Colonne de séphadex G 75 ,(40 x 2,6 cm)
débit : 12,5 ml/h
éluant : Formiate d'Ammonium 0,01 M pH 7,4.



IV - EXPERIENCE DE CONTAMINATION PAR LE PLOMB

4.1. Rappels

Nous avons montré dans le chapitre III que lors de l'intoxication par le plomb, aucun organe particulier ne témoignait d'accumulation privilégiée en plomb. Toutefois les teneurs en ce métal du culot de foie et du sang augmentent avec le temps de contamination.

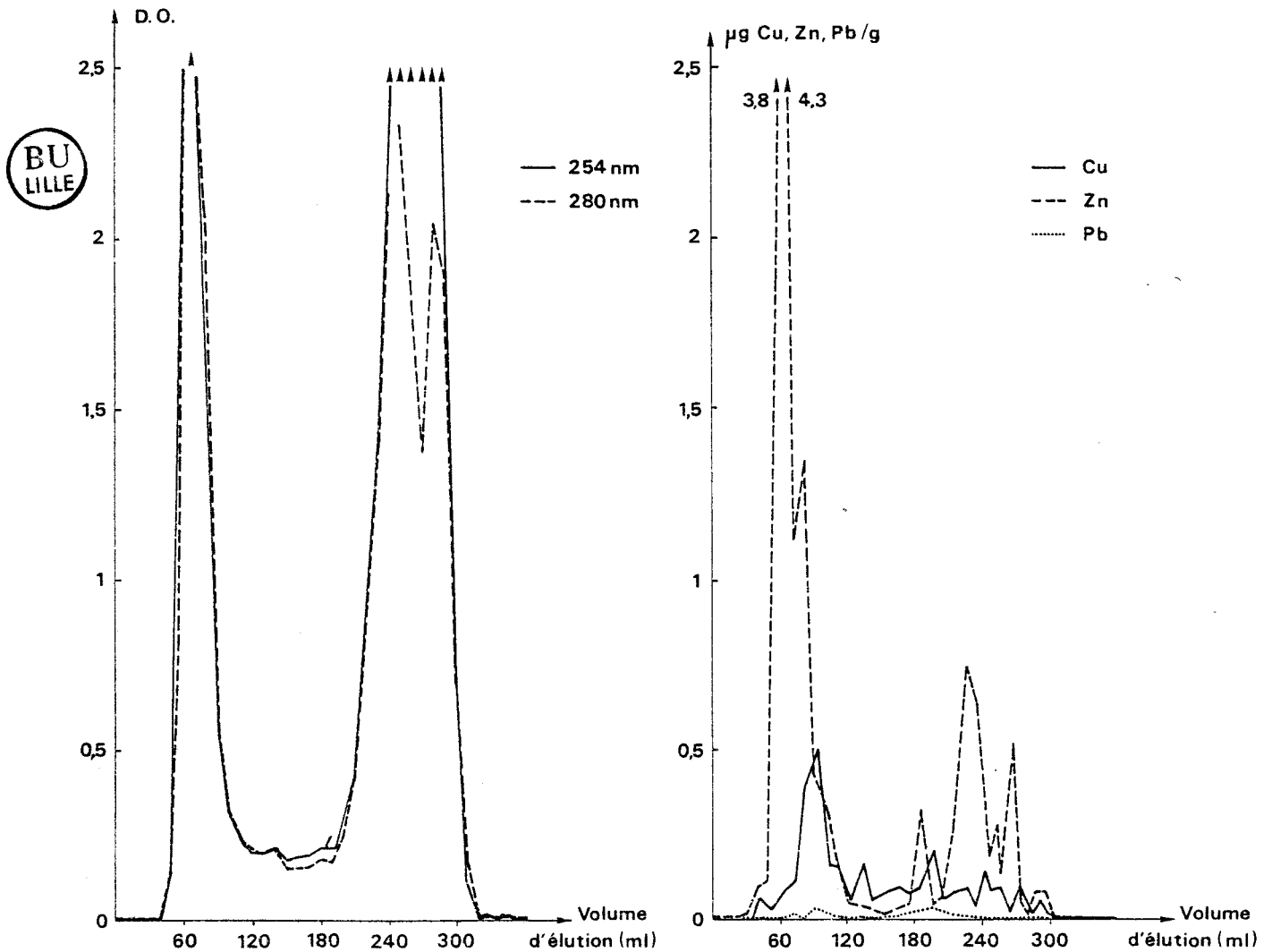
4.2. Etude de la fraction soluble du foie par chromatographie sur gel de Séphadex G 75.

Le profil chromatographique réalisé sur la fraction soluble du foie de flets intoxiqués pendant 43 jours dans 10 ppm $PbCl_2$ montre trois pics présentant une absorption à 254 et 280 nm (Fig. 45). Le deuxième pic de protéine (Pic II) correspond au volume d'élution des protéines de poids moléculaire voisin de 11 000 daltons. Les profils de cuivre et de zinc sont comparables à ceux déjà observés pour les poissons intoxiqués par le cadmium c'est-à-dire deux pics caractéristiques, le premier pour les protéines de haut poids moléculaire, le deuxième pour le pic II. Le plomb est essentiellement situé dans le volume d'élution des protéines de masse moléculaire élevée. Il n'apparaît donc pas de composé de petit poids moléculaire complexant le plomb. Le profil chromatographique d'un poisson témoin, soumis aux mêmes conditions de jeûne et de survie (43 j), prélevé à Dunkerque ne présente pas de plomb (Fig. 46). On peut également remarquer sur ce profil la quasi-absence du pic II concernant la teneur en cuivre et en zinc. Les composés de poids moléculaire $<$ à 5000 comportent également une quantité non négligeable de zinc ainsi qu'un peu de cuivre.

4.3. Discussion

La capacité du plomb d'induire la synthèse des métallothionéïnes est sujet à controverse. Certains auteurs suggèrent l'induction de la protéine après une administration de plomb (YOSHIKAWA et al., 1982). D'autres n'ont pas pu vérifier cette observation (KÄGI et al., 1979 ; ARIZONO et al., 1983) KÄGI considère que le plomb n'est pas un composant naturel des métallothionéïnes *in vivo*, bien qu'il ait une affinité considérable pour l'apométallothionéïne *in vitro* (BERNHARD et al., 1983). Les deux situations d'étude *in vivo* et *in vitro* doivent donc être distinguées (KÄGI, communication personnelle, 1983).

Fig . 46 : Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets non intoxiqués. Colonne de séphadex G 75 , (40 x 2,6 cm). Débit : 12,5 ml/h. Eluant : Formiate d'Ammonium 0,01 M pH 7,4.



Nos résultats confirment ceux de REICHERT et al., 1979 : l'accumulation du plomb se ferait dans les protéines de poids moléculaire élevé. Par contre ARIZONO et al., en 1983 ont montré qu'une intoxication par le plomb provoquait une augmentation de la teneur en zinc-thionéine dans le foie de rat.

Nous ne l'avons pas constaté lors de notre expérience de contamination par le plomb.

V - EXPERIENCE DE CONTAMINATION PAR LE ZINC

5.1. Rappels

Nous avons montré dans le chapitre III que la teneur en zinc des poissons intoxiqués et des poissons témoins ne variaient pas significativement. Nous avons observé cependant une augmentation de la teneur en zinc dans le foie des poissons contaminés, (surnageant et culot). Nous avons également constaté la présence dans ces fractions d'une liaison entre la teneur en zinc et la teneur en cuivre.

5.2. Analyse des chromatogrammes

Les profils chromatographiques obtenus lors de la contamination par le zinc (au nombre de 10) sont similaires à ceux des témoins (5 échantillons). Nous observons 3 pics d'absorbance à 254 et 280 nm. Les deux premiers se caractérisent par une teneur en cuivre et en zinc élevée (Fig. 47 et 48). L'absorption à 254 nm est supérieure à celle de 280 nm pour le pic dont le volume d'élution est de 120 ml. Le profil chromatographique obtenu pour les poissons témoins se caractérise par une faible teneur en cuivre des protéines de haut poids moléculaire (PHPM), teneur qui augmente au niveau des protéines de poids moléculaire inférieur (PPPM). Par contre la teneur en zinc apparaît supérieure dans les PHPM par rapport aux PPPM. Nous remarquons une nette augmentation de ces concentrations en zinc et en cuivre dans le cas de poissons intoxiqués tant pour les PPPM que pour les HPPM.

5.3. Distribution du cuivre et du zinc dans la fraction soluble des foies de flet

5.3.1. Poissons témoins

Nous retrouvons, dans les poissons témoins les mêmes pourcentages de métaux liés aux protéines que lors de l'intoxication par le cadmium

Fig . 47 : Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets intoxiqués dans 10 ppm de $ZnCl_2$, pendant 43 jours.
Colonne de séphadex G 75, (40 x 2,6 cm)
débit : 12,4 ml/h.
Eluant : Formiate d' Ammonium 0,01 M pH 7,4.

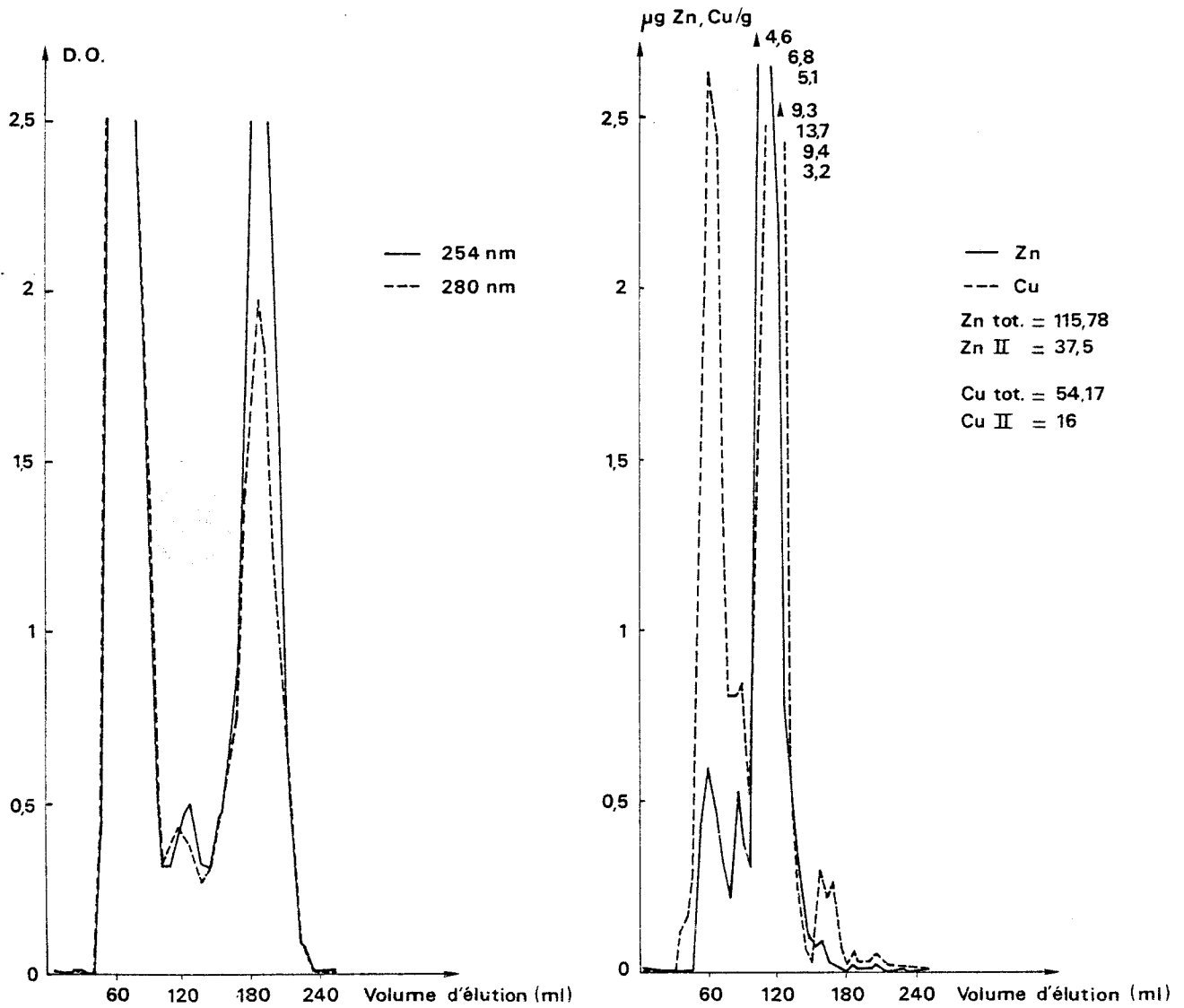


Fig. 48: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets non intoxiqués.
Colonne de séphadex G 75 , (40 x 2,6 cm)
Débit : 12,4 ml/h.
Eluant : Formiate d'Ammonium 0,01 M pH 7,4.

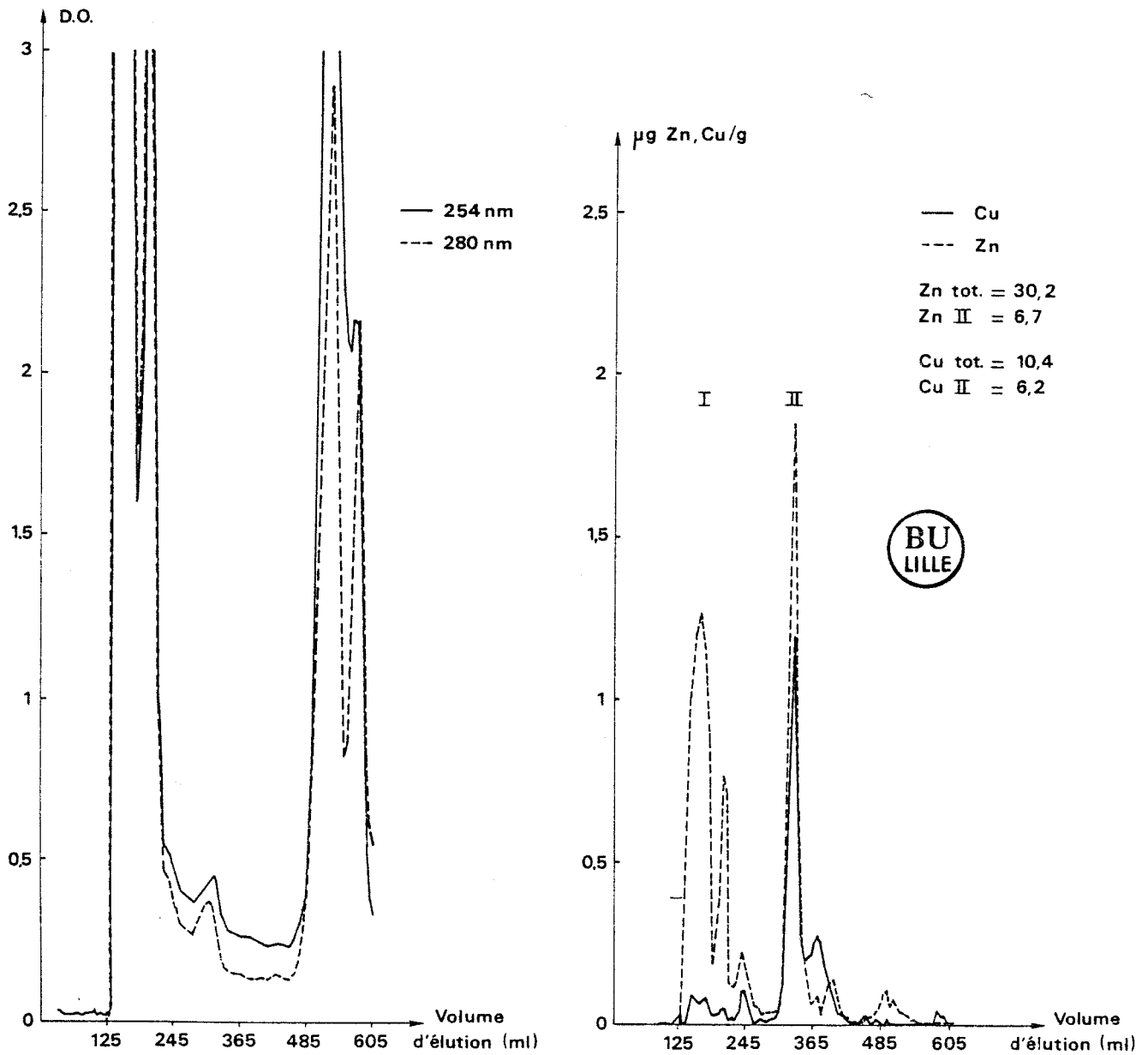


TABLEAU 24 : DISTRIBUTION DU ZINC ET DU CUIVRE DANS LE FOIE DES FLETS TEMOINS ET INTOXIQUES
DANS 10 PPM DE ZnCl₂ EN FONCTION DU TEMPS D'INTOXICATION

Temps d'intoxication	Métal dans le foie entier (µg/g)	Métal dans l'extrait soluble du foie (µg/g)	Métal contenu dans 1 fraction II		
			µg/g Foie	% relatif au contenu en métal de l'extrait soluble	µatg/g
t = 0	Zn 30,78 ± 7,25	19,70 ± 1,45	6,93 ± 0,95	35,1	0,105
	Cu 8,26 ± 2,88	5,53 ± 2,15	4,22 ± 2,0	76,3	0,066
n = 5	Zn + Cu				0,171
t = 1 h	Zn 50,82	44,9	6,16	13,7	0,094
	Cu 24,31	20,1	13,62	67,7	0,214
n = 1	Zn + Cu				0,308
t = 5 h	Zn 26,41	18,32	2,97	16,2	0,045
	Cu 11,32	9,63	3,89	40,3	0,061
n = 1	Zn + Cu				0,106
t = 18 h	Zn 32,65 ± 18,7	16,97 ± 8,9	3,21 ± 1,58	18,8	0,049
	Cu 11,18 ± 1,47	8,91 ± 1,70	4,75 ± 0,77	53,3	0,075
n = 5	Zn + Cu				0,124
t = 2 j	Zn 10,84	10,85	3,31	30,5	0,050
	Cu 2,69	7,34	1,94	26,3	0,030
n = 1	Zn + Cu				0,080
t = 4 j	Zn 33,38	37,98	11,92	31,3	0,182
	Cu 11,272	18,04	9,03	49,2	0,142
n = 1	Zn + Cu				0,324
t = 43 h	Zn 115,78	50,37	37,51	74,4	0,573
	54,18	23,51	15,98	68,0	0,251
n = 1	Zn + Cu				0,824

(Tableau 24). La fraction des protéines de petit poids moléculaire (PPPM) contient 35,1 % de zinc et 76,3 % de cuivre. La concentration en μatg de métal par gramme d'organe est de 0,171 dans une proportion de 105 - 66 respectivement pour le cuivre et le zinc.

5.3.2. Poissons intoxiqués

Lors de l'intoxication par le zinc, nous observons dans les animaux contaminés des pourcentages de zinc de la fraction des PPPM inférieurs à ceux des témoins jusqu'au 2ème jour de contamination. Nous remarquons également que le pourcentage de cuivre décroît. La concentration totale en μatg de métal chez les contaminés est équivalente à celle des poissons témoins. Le 4ème jour, nous observons un pourcentage identique entre les poissons de deux lots, poissons intoxiqués et poissons non contaminés témoins, en cuivre et en zinc dans la fraction des PPPM. Néanmoins, la concentration totale est de 0,324 $\mu\text{atg/g}$. Ceci implique une augmentation de la teneur en cuivre et en zinc équivalente dans les deux fractions. Une différence importante est notée le 43è jour ; en effet, la quantité de zinc présente dans la fraction II du foie de poissons intoxiqués est deux fois supérieure* à celle du foie des poissons témoins. Le cuivre reste stable. La teneur totale est de 0,824 μatg de cuivre et de zinc par gramme de poids frais de foie, soit une valeur 7 fois supérieure à celle des poissons témoins.

5.3.3. Discussion

Nous avons indiqué que les variations des teneurs en zinc et en cuivre entre les poissons intoxiqués et témoins n'étaient pas significatives. Il apparaît donc que la contamination par 10 ppm de ZnCl_2 n'est pas responsable des différences observées. Ces résultats doivent être examinés avec circonspection : il faut tenir compte de la faible quantité d'échantillons dont nous disposions et du manque de résultats entre 4 et 43 jours résultant de problèmes techniques lors de la réalisation des chromatographies.

Nous observons cependant une augmentation de la teneur du zinc et du cuivre. Cette augmentation s'observe également au niveau des protéines de haut poids moléculaire (le pourcentage des métaux entre PPPM et PHPM reste constant jusqu'au 4ème jour).

* Quantité exprimée en pourcentage du contenu en métal de l'extrait soluble.

Par contre, nous observons le 43ème jour, une nette augmentation du zinc de la fraction des petits poids moléculaires. Ceci semble indiquer que l'intoxication par le zinc provoque une augmentation de la synthèse des PPPM entre le 4ème et le 43ème jour. Des résultats semblables ont été obtenus par KOJIMA et al. en 1978 et BREMMER et al., en 1975 : ils ont en effet montré qu'un apport de zinc augmentait la synthèse des métallothionéïnes.

La variation non significative des teneurs entre les poissons témoins et intoxiqués doit provenir essentiellement du faible nombre d'échantillons et de l'absence, correspondant à des prélèvements effectués entre 4 et 43 jours. Il serait donc nécessaire de recommencer l'expérience afin de vérifier l'évolution des concentrations dans les différentes fractions cellulaires chez les poissons contaminés et les témoins.

NOEL-LAMBOT, en 1980 et MJOR-GRIMSRUD et al., 1979 ont également montré que la distribution du cuivre et du zinc dans les fractions solubles est fortement dépendante de la concentration totale de zinc dans le foie. Quand la teneur en ce métal est supérieure à 60 ppm par rapport au poids sec de l'organe, la distribution de ces métaux se retrouve dans les petits poids moléculaires. Nous avons montré que les poissons dits "témoins" prélevés par chalutage possédaient des quantités importantes de zinc et de cuivre dans la fraction de petits poids moléculaires.

Il faudrait mettre en place une expérience de contamination sur des poissons provenant d'élevages dans des milieux dont la teneur en zinc serait contrôlée. Nous pourrions alors déterminer les effets réels de l'intoxication par ce métal.

VI - ETUDE DES CHROMATOGRAMMES OBTENUS A PARTIR D'EXTRAITS DE FOIE DE POISSONS PROVENANT DU MILIEU NATUREL

Nous avons recherché la présence des protéïnes de petit poids moléculaire liant les métaux dans des poissons provenant des zones de Dunkerque, (zone "polluée") et d'Hardelot (zone "saine") et comparé des poissons d'aspect sain à d'autres "nécrosés".

6.1. Poissons provenant d'Hardelot

La zone d'Hardelot étant considérée comme zone témoin (Chapitre II), nous pouvons penser que les poissons ne sont pas soumis à une intoxication par les métaux lourds. Le profil chromatographique obtenu pour des animaux

sains est identique pour les 3 échantillons utilisés et montre la présence de 3 pics essentiels d'absorption à 254 et 280 nm (Fig. 49a). La présence de métaux est décelée essentiellement au niveau des protéines de poids moléculaire élevé. On remarque en effet un pic important de zinc ainsi qu'un pic de cuivre. Il n'apparaît pas de fixation de ces métaux sur les protéines de poids moléculaire inférieur. La recherche de métaux toxiques, tels que le plomb ou le cadmium a été effectuée. Les teneurs de ces métaux sont trop faibles pour pouvoir être décelées dans les diverses fractions chromatographiques. Nous pouvons donc considérer que les poissons d'Hardelot "témoins" ne présentent pas de protéines de poids moléculaire voisin de 12 000 liant les métaux.

Nous avons relaté dans le chapitre I les données concernant les "nécroses" de poissons, nous avons vu également que les métaux lourds étaient incriminés dans leur genèse. Ceci nous a conduit à rechercher la présence de protéines complexant les métaux chez quelques individus malades, récoltés dans la zone témoin. Les profils chromatographiques obtenus pour 2 poissons présentant des "nécroses" cutanées montrent de nombreuses variations de l'absorption à 254 et 280 nm (Fig. 49b).

L'existence de protéines de petit poids moléculaire complexant les métaux est très nette comme l'indique la distribution des métaux sur le chromatogramme d'extrait de foie. Celle-ci fixe du zinc et du cuivre en très grande quantité, respectivement 43,7 % et 74,1 % des métaux présents dans la fraction soluble totale du foie. La présence de cadmium et de plomb n'a pas été décelée pour ces échantillons provenant de la zone témoin d'Hardelot.

6.2. Poissons provenant de Dunkerque

L'existence des protéines de petit poids moléculaire voisin de 11 000, liant les métaux, a été décelée dans les poissons apparemment "sains", ainsi que l'indiquent la distribution des métaux et des tracés d'absorbance à 254 et 280 nm (Fig. 50a). Ces protéines fixent essentiellement le zinc et le cuivre. Nous n'avons pas détecté de cadmium dans les fractions chromatographiques, la teneur étant inférieure à la sensibilité de l'appareil. La recherche du plomb a été également effectuée : les teneurs sont très faibles mais nous avons noté la présence d'une trace de ce métal dans les protéines de haut poids moléculaire.

Fig .49 : Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de filets d'Hardelot.
Obtenue sur gel de Sephadex G 75, (98 x 2,6 cm)
débit : 12 ml/h ; éluant : Formiate d'Ammonium
0,01 M pH 7,4.

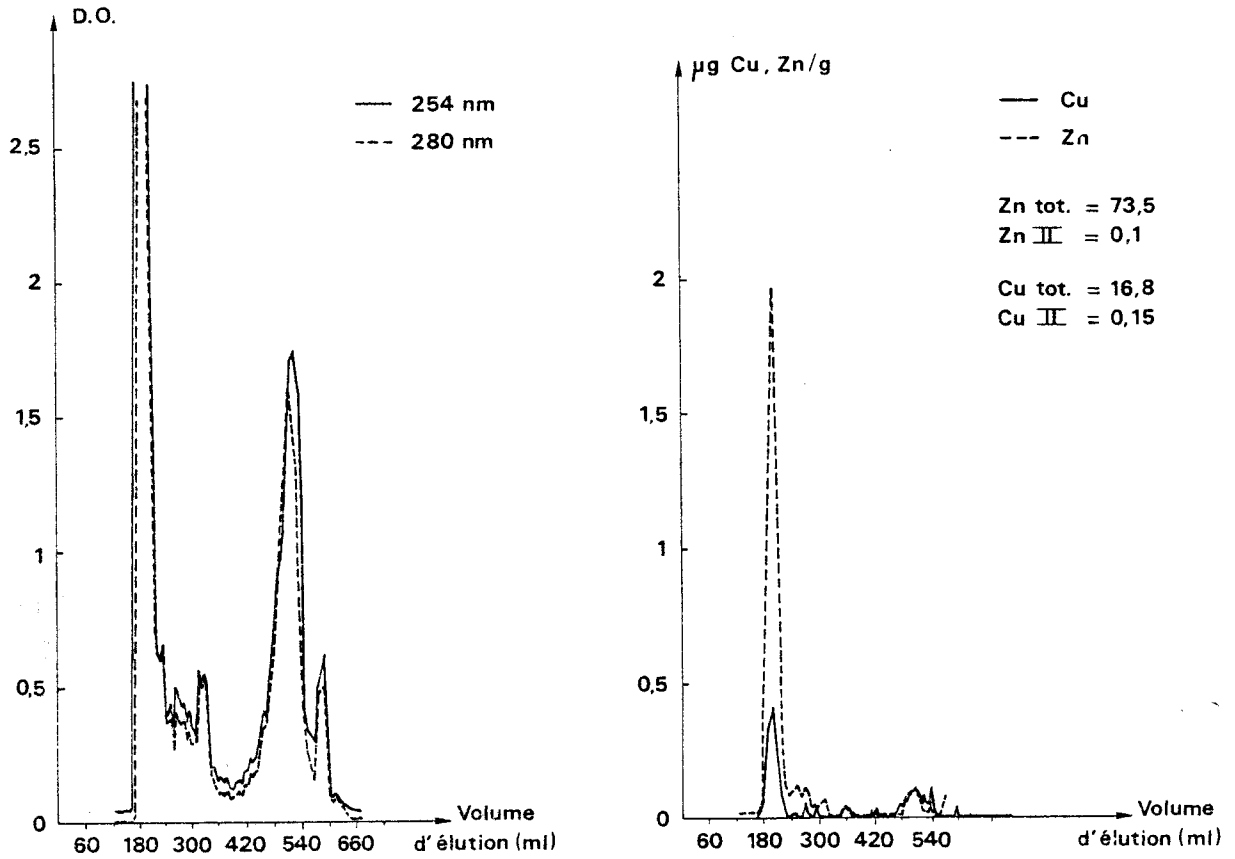


Fig. 49 a : Poissons "Sains"

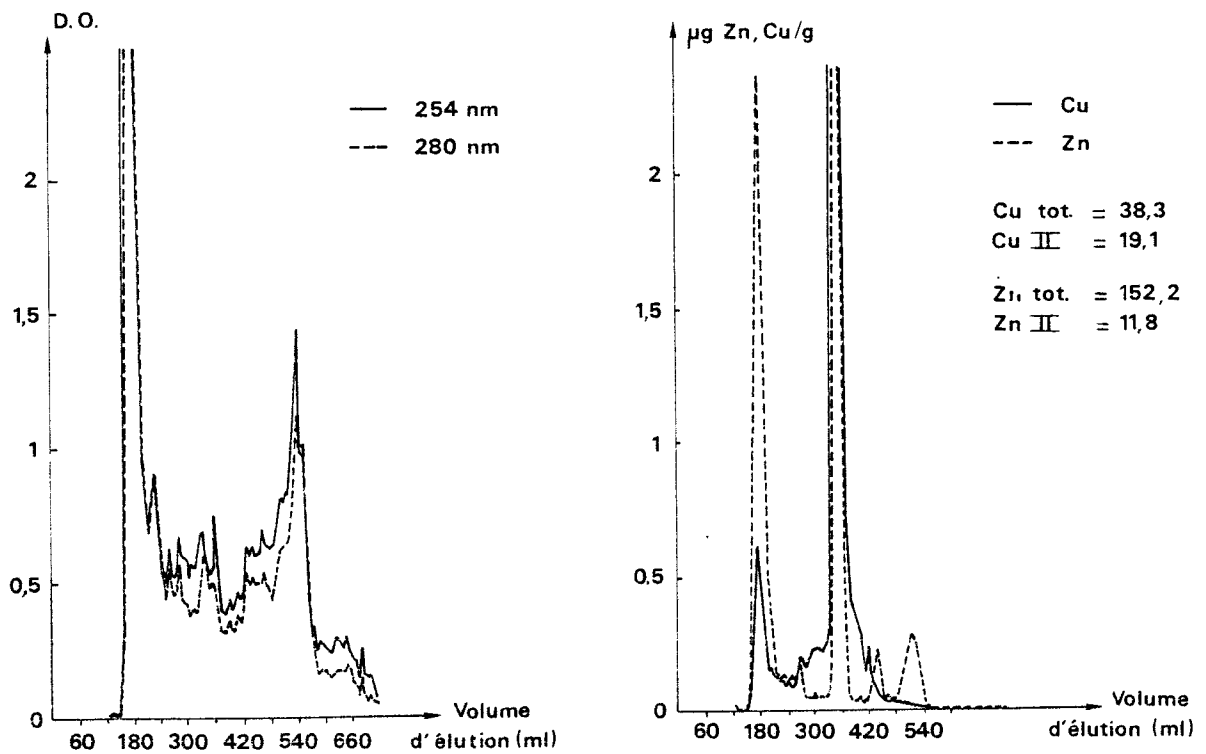


Fig . 49 b : Poissons "malades"

Fig. 50 : Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets de Dunkerque obtenue par gel filtration sur séphadex C 75 (98 x 2,6 cm). Débit: 12ml/h .
éluant : Formiate d'Ammonium 0,01 M pH 7,4.

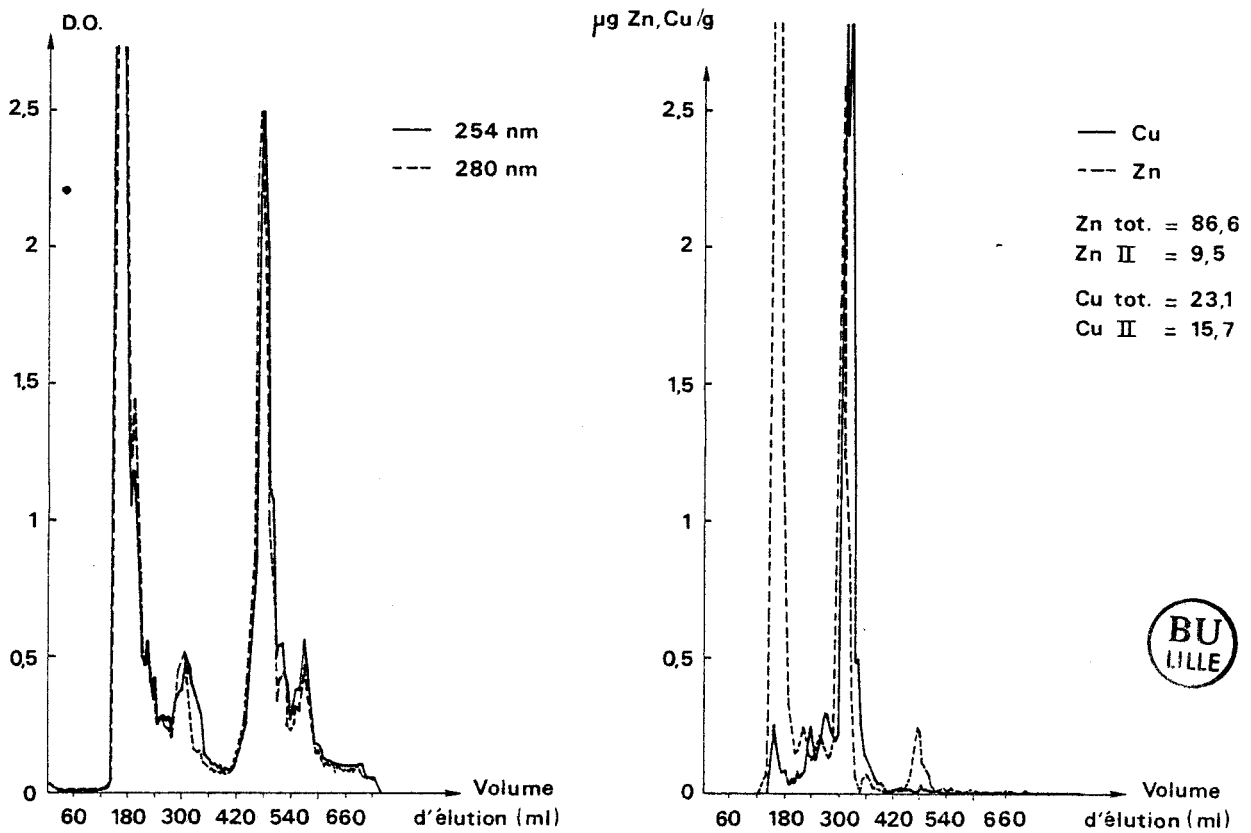


Fig:50 a: Poisson "Sain"

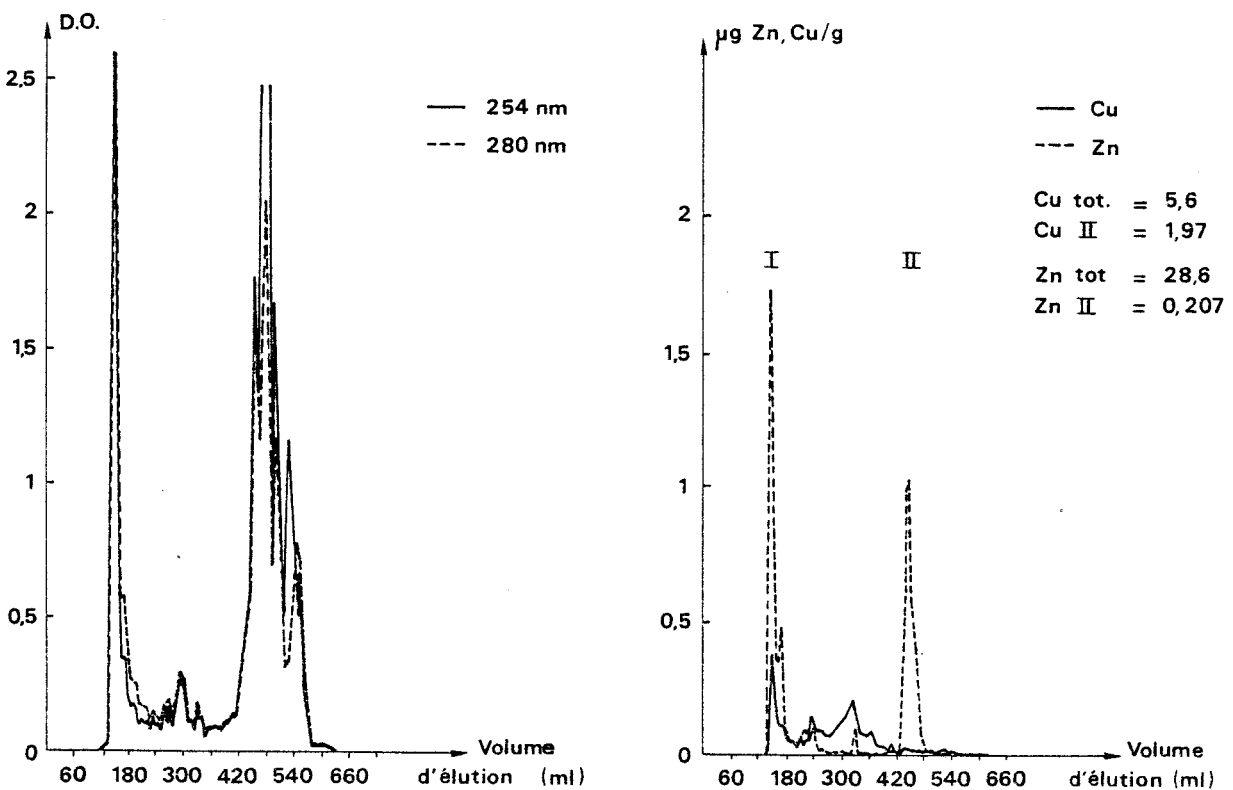


Fig:50 b: Poisson présentant des "Nécroses"

Les chromatogrammes réalisés sur des poissons "Nécrosés" de Dunkerque au nombre de 4, montrent des variations importantes par rapport aux individus "sains" (Fig. 50b). On détecte la présence de trois pics d'absorption à 254 et 280 nm. Le premier pic contient du zinc et du cuivre, comme dans tous les poissons étudiés. Par contre on n'observe pas de concentration importante de ces métaux dans la fraction des protéines de poids moléculaire voisin de 12 000. On remarque un faible pic de cuivre ; 40,9 % de la concentration totale ; et un peu de zinc, 2,1 % de la fraction soluble du foie. On observe également la présence d'un pic très important de zinc au niveau des protéines de poids moléculaire voisin de 6 000.

6.3. Discussion

Nous avons noté l'absence de protéines de petit poids moléculaire complexant le zinc et le cuivre dans le foie des 3 poissons "sains" pêchés sur le littoral d'Hardelot. Ces résultats sont en contradiction avec ceux obtenus par d'autres auteurs qui pensent qu'elles existent naturellement chez les téléostéens et qu'elles constituent ainsi un réservoir de zinc et de cuivre, nécessaires aux fonctions métaboliques (NOEL-LAMBOT, 1980 ; RIDLINGTON et al., 1981).

Par contre, nous avons observé la présence de ces protéines dans les poissons présentant des ulcérations. Il apparaît donc nécessaire de compléter nos observations sur d'autres échantillons afin de déterminer si la présence de ces protéines est due à un manque de données concernant les poissons "sains" ou bien liées à la présence d'ulcérations tégumentaires. Nous avons remarqué que les poissons "sains" de Dunkerque contenaient des protéines de petit poids moléculaire voisin de 12 000 liant le cuivre et le zinc. Cependant cette zone est considérée comme polluée par les métaux ainsi que nous l'avons vu dans le chapitre II.

Les résultats concernant le zinc et le cuivre sont très complexes. La présence de ces métaux peut témoigner de leur rôle biologique ou d'une pollution.

Nous n'avons pas décelé de concentrations importantes en cadmium et en plomb dans les fractions solubles de foies de flets provenant du milieu naturel.

La mesure des teneurs en métaux des protéines de poids moléculaire voisin de 12 000 chez le flet ne constitue donc pas un bon indicateur de la pollution. Il serait intéressant de rechercher la présence de ces protéines dans les moules ou les coques du littoral qui contiennent des quantités importantes de plomb, de cadmium et de mercure.

VII - CONCLUSION

Face à une contamination par les métaux lourds, les organismes vivants utilisent des processus de détoxification variés. Les métallothionéines constituent un de ces mécanismes. Leur présence est donc recherchée dans les milieux naturels considérés comme pollués. De nombreux auteurs ont en effet montré la présence de ces protéines ou de protéines "liant" les métaux après intoxication naturelle ou artificielle. Nous avons observé leur formation* dans le cas d'une intoxication par le cadmium et le zinc, mais non par le plomb. Il existerait donc deux classes de métaux. Les premiers, tels le cuivre, le zinc, le cadmium, le mercure peuvent induire la synthèse et se fixer sur les métallothionéines. La deuxième classe, contiendrait des métaux qui peuvent provoquer la formation de métallothionéines mais qui ne se lient pas à ces protéines tels le plomb, le manganèse et le chrome (YOSHIKAWA et al., 1982).

Les métallothionéines ont donc deux rôles : le premier rôle consiste en un stockage de métaux essentiels (cas du zinc et du cuivre). Le deuxième rôle constitue un système de détoxification face aux métaux toxiques. ROCH et al., 1982, suggèrent que la fixation des métaux dans les protéines de poids moléculaire élevé serait responsable de la toxicité alors que dans les protéines de poids voisin de 12 000 daltons, elle serait un signe de processus de décontamination. Cependant, les métabolismes des métaux sont liés. La contamination par les métaux lourds tels que plomb, mercure et cadmium a une répercussion sur la teneur en zinc des métallothionéines.

La présence de ces protéines complexant le cadmium et le mercure peut constituer un indicateur de la qualité du milieu marin. Ce n'est pas le cas pour le zinc et le cuivre qui sont des constituants naturels des métallothionéines des téléostéens. Nous n'avons pas observé de teneurs

* La purification de ces protéines par chromatographie d'échange d'ions ainsi que les analyses d'acides aminés sont en cours afin de lever l'incertitude concernant leur nature.

importantes en cadmium et en plomb dans les fractions solubles des foies de flets d'Hardelot et de Dunkerque. Il apparaît donc que le niveau de pollution par ces métaux n'induit pas la synthèse de métallothionéïnes chez le flet. Il serait intéressant de rechercher ces protéïnes dans les moules et coques du littoral, puisque nous avons montré dans le chapitre II que leurs teneurs en plomb et cadmium y étaient importantes. Il faudra néanmoins accorder une attention particulière au choix de l'indicateur de qualité et sérier les informations. Les mollusqués, capables d'accumuler des quantités importantes de polluants même dans un milieu relativement peu pollué seraient les premiers indicateurs plus sensibles que ne le sont les poissons.

Il est difficile de définir un organisme type indicateur de la qualité du milieu marin.

L'absence de métallothionéïnes au cadmium dans les flets chalutés ne veut pas dire que littoral n'est pas pollué ! Il ne faut pas oublier en effet que les phénomènes dus à une pollution s'expriment souvent par une perturbation de la croissance ou de la reproduction des organismes et que nous avons observé de nombreux individus porteurs de lésions tégumentaires dont la présence liée aux rejets de polluants n'est plus à démontrer.

La pollution du littoral de Calais à Dunkerque paraît due à une multiplicité d'éléments métalliques plutôt qu'à un contaminant spécifique. Des effets synergiques ainsi que des actions combinées des métaux peuvent exister. Ainsi que nous l'avons vu pour les "Boues rouges" où les rejets d'acide prédisposeraient la peau des cétacés à des attaques nocives par les métaux (Manganèse - Titane - Chrome ...).

CONCLUSION

CONCLUSION

L'étude que nous avons réalisée contribue à la connaissance des processus de détoxification mis en oeuvre par un poisson téléostéen, le flet, face à une contamination par les métaux lourds.

L'état des rejets sur le littoral de Calais à Dunkerque montre que l'essentiel de la pollution provient de Calais, c'est cette zone polluée qui a été comparée à la zone d'Hardelot, dépourvue d'industries et considérée comme témoin "saine".

La pollution du littoral est due à une multiplicité d'éléments, dont le cadmium et le plomb, plutôt qu'à un contaminant spécifique. L'étude de la teneur en métaux des différents organes du flet, provenant du milieu naturel, a montré que le foie était l'organe privilégié de l'accumulation.

Nous avons également indiqué que les poissons apparemment "sains" de Dunkerque présentaient des teneurs en métaux lourds plus élevées que ceux d'Hardelot. Ces résultats confirment les choix de nos zones d'étude "témoin" et "polluée". Le littoral NORD se caractérise par la présence de plomb, zinc et cadmium en quantité importante.

Lors des intoxications expérimentales réalisées à la Station Marine, nous avons montré que les trois métaux, zinc, cadmium et plomb s'accumulaient dans les organes du flet. Le zinc, de façon préférentielle dans le foie et le rein ; le plomb, dans le sang et le culot de foie ; et le cadmium dans tous les organes.

L'accumulation de métaux tels le cadmium et le plomb est néfaste car ces éléments ne possèdent aucune fonction biologique connue.

Le zinc, par contre est un élément essentiel. Il est donc présent naturellement dans les organismes vivants. Nous avons observé que sa teneur dans le foie du flet, était perturbée dans le cas des intoxications expéri-

mentales par le plomb et le cadmium. Il apparaît donc une interaction entre les métabolismes des différents métaux. Le test t de comparaison de moyennes a permis de mettre en évidence une variation non significative de la teneur en zinc des poissons témoins et contaminés par le zinc. Nous pensons qu'il est nécessaire de recommencer cette expérience en utilisant des poissons d'élevage dans un milieu dont la teneur en zinc serait minimale et contrôlée afin de déterminer la part réelle de la contamination et celle de la teneur naturelle en ce métal du poisson.

L'étude particulière de la fraction soluble du foie de flet a montré la présence d'une protéine complexant le cadmium, le zinc et le cuivre. Le plomb, quant à lui, ne semble pas induire la synthèse d'une telle protéine. Il existerait donc deux classes de métaux. Les premiers, tels le cuivre, le zinc, le cadmium et le mercure peuvent induire la synthèse des métalloprotéines et s'y fixer. La deuxième classe contiendrait des métaux pouvant provoquer la formation de métallothionéines mais ne s'y liant pas, tels le plomb, le manganèse et le chrome. Le rôle de ces métalloprotéines est double. Elles constituent un réservoir de cuivre et de zinc pour les poissons non intoxiqués. Elles font également partie d'un système de détoxification pour les métaux toxiques que nous avons mis en évidence dans le cas du cadmium.

D'un point de vue toxicologique, on peut donc considérer que ces protéines ont un rôle bénéfique puisqu'elles agissent comme des agents protecteurs vis à vis de la toxicité du cadmium et d'autres métaux. D'un point de vue écologique, on doit leur attribuer néanmoins un rôle néfaste puisqu'en favorisant la fixation des métaux dans les tissus, elles augmentent le risque de contamination des organismes prédateurs.

La présence de ces protéines peut donc être considérée comme un indicateur biologique de la pollution par les métaux lourds, elles ont été trouvées en effet chez des poissons prélevés dans le milieu pollué.

Nous n'avons pas décelé de concentrations importantes en cadmium et en plomb dans les fractions solubles de foies de filets provenant du milieu naturel.

La mesure des teneurs en métaux de ces protéines ne constitue donc pas un bon indicateur de la pollution pour le flet. Bien que nous n'ayons pas observé la formation de protéines au cadmium dans les flets chalutés, nous pouvons considérer que le littoral est pollué par une multiplicité d'éléments métalliques qui peuvent agir de façon synergique sans provoquer la synthèse de protéines particulières pour un métal.

Nous pensons qu'il serait intéressant de rechercher la présence de protéines complexant les métaux dans les moules et coques du littoral, puisque leurs teneurs en plomb, cadmium et nickel y sont très importantes. De plus, ces animaux étant sédentaires, nous pourrions être certains qu'ils sont des témoins significatifs dans un site, des attaques de polluants.

Néanmoins, il ne faut pas oublier que les mollusques sont capables de biomagnification des polluants. Il est donc difficile de définir un indicateur type de la qualité du milieu marin ainsi que de choisir un test particulier précis pouvant donner des informations sur la qualité du milieu naturel.

Nous avons montré que les teneurs en polluants tels le cuivre, le zinc et le cadmium augmentaient sur le littoral de Calais à Dunkerque. C'est pourquoi nous pensons qu'il est nécessaire de poursuivre les études concernant la concentration en métaux lourds des organismes vivants et de rechercher la présence des métallothionéines, protéines indicatrices d'une contamination par les métaux lourds.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

- Anonyme, 1968 - Courants de marée dans la Manche et sur les côtes françaises de l'Atlantique.
Service d'Hydrographie et d'Océanographie de la marine. S.H.550.
Paris, 287p.
- Anonyme, 1978 - Bilan des apports telluriques sur trois années de mesures sur le littoral du Nord. 1976, 1977, 1978.
C.I.P.L.I.N.O.R., Port Autonome de Dunkerque, 27p.
- Anonyme, 1980 - Microbiologie des eaux. Micropolluants des sédiments.
Campagne Hydrobios, Novembre 1980,
Institut Pasteur de Lille. Monographie. 70p.
- Anonyme, 1981 - Amélioration de la qualité des eaux du littoral Artois-Picardie
Analyse de l'état actuel. Utilité et efficacité des rejets urbains par émissaires en mer.
Agence de l'eau. SOGREA. Ingénieurs conseils.
- ALLEN, S.E., GRIMSHAW, H.M., PARKINSON, J.A., QUARMBY, C., 1974 - Chemical Analysis of Ecological Materials.
Edited by S.E. Allen. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 565p.
- ALPERS, C.E., Mc CAIN, B.B., MYERS, M.S., WELLINGS, S.R., 1977 - Lymphocystis disease in yellowfin sole (*Limanda aspersa*) in the Bering sea.
J. Fish. Res. Board Can. , 34 , 611-616.
- ANDREWS, J., 1964 - Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex Gel-Filtration.
Biochem. J. , 91 , 222-233.
- ARIZONO, K., ITO, T., YAMAGUCHI, M., ARIYOSHI, T., 1983 - Studies on Lead-Induced Zinc-thionein in rat liver.
J. Pharm. Dyn. , 6 , S.19.
- ATTAR, E.N., MALY, E.J., 1982 - Acute toxicity of Cadmium, Zinc and Cadmium-Zinc mixtures to *Daphnia magna*.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. , 11 , 291-296.
- AUBERT, M., BITTEL, R., LAUMOND, F., ROMEO, M., DONNIER, B., BARELLI, M., 1972 -
Utilisation d'une chaîne trophodynamique de type pélagique pour l'étude des transferts des pollutions métalliques.
Rev. Intern. Océanogr. Méd., Tome XXVIII , 27-52.
- AUBERT, M., PETIT, L., DONNIER, B., BARELLI, M., 1973 - Transferts de polluants métalliques au consommateur terrestre à partir du milieu marin.
Rev. Intern. Océanogr. Méd., Tome XXX , 39-59.

- AUBERT, M., BITTEL, R., LAUMOND, F., ROMEO, M., DONNIER, B., BARELLI, M., 1974 - Utilisation d'une chaîne trophodynamique de type néritique à Mollusque pour l'étude des transferts des polluants métalliques. Rev. Intern. Océanogr. Mèd. , Tome XXXIII , 7-29.
- AUBERT, M., BITTEL, R., LAUMOND, F., BARELLI, M., GAUTHIER, M., DONNIER, B., ROMEO, M., 1975 - Utilisation d'une chaîne trophodynamique de type benthique pour l'étude des transferts des polluants métalliques. Rev. Intern. Océanogr. Mèd. , Tomes XXXIX-XXXX , 117-151.
- AUBERT, M., LAUMOND, F., FLATAU, G., BARELLI, M., ROMEO, M., PUEL, D., 1976 - Utilisation d'une chaîne trophodynamique marine de type néritique à Crustacés pour l'étude du transfert et de l'accumulation de divers polluants métalliques. Rev. Intern. Océanogr. Mèd. , Tome XLIII , 47-63.
- AUBERT, M., AUBERT, J., ORCEL, L., 1979 - Etude sur l'extension géographique et l'origine des nécroses des poissons sur le littoral méditerranéen. Rev. Intern. Océanogr. Mèd. , Tomes LII-LIV , 3-21.
- BAKIR, F., DAMLUJI, S.F., AMIN-SAKI, L., MURDAHA, M., KHALIDI, A., AL-RAWI, N.Y., TIKRITI, S., DHAHIR, H.I., CLARDSON, T.W., SMITH, J.C., DOHERTY, R.A., 1973 - Methyl-Mercury poisoning in Iraq. SC. , 181 , 230-240.
- BALKAS, T.I., TUGRUL, S., SALIHOGLU, I., 1982 - Trace metal levels in fish and Crustacea from Northeastern Mediterranean coastal waters. Marine Environ. Res. , 6 , 281-289.
- BETZER, S.B., PILSON, M.E.Q., 1974 - The seasonal cycle of copper concentration in *Busycon canaliculatum*. Biol. Bull. Mar. Lab., Woods Hole , 146 , 165-175.
- BITTEL, R., LACOURLY, G., 1968 - Discussion sur le concept de facteur de concentration entre les organismes marins et l'eau en vue de l'interprétation des mesures. Rev. Intern. Océanogr. Mèd. , Tome XI , 107-128.
- BITTEL, R., 1973 - Etude du comportement des métaux lourds en milieu marin en vue de l'évaluation de la capacité limite d'acceptation des écosystèmes océaniques pour la pollution chimique. Rev. Intern. Océanogr. Mèd. , Tome XXX , 3-37.
- BOLLINGBERG, H.J., JOHANSEN, P., 1979 - Lead in spotted wolffish (*Anarhicas minor*) near a zinc-lead mine in Greenland. J. Fish Res. Board Can. , 36 , 1023-1028.
- BOUDOU, A., RIBEYRE, F., DELARCHE, A., MARTY, R., 1980 - Bioaccumulation et bioamplification des dérivés du mercure par un consommateur de troisième ordre, *Salmo gairdneri*, incidences du facteur température. Wat. Res. , (14) , 1 , 61-65.

- BOUGARD, M., DEWARUMEZ, N., MENU, D., RICHARD, A., SOUPLLET, A., 1978 - Etude hydrobiologique du site de Dunkerque. Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin. U.S.T. Lille , 106 pages.
- BOUQUEGNEAU, J.M., 1975 - Accumulation du mercure et ses effets physiologiques chez *Anguilla anguilla* L. et *Myoxocephalus scorpius* L. Thèse de Doctorat, Liège. 204 pages.
- BOUQUEGNEAU, J.M., 1979 - Evidence for the protective effect of metallothioneins against inorganic mercury injuries to fish. Bull. Environ. Contam. Toxicol. , 23 , 218-219.
- BOUQUEGNEAU, J.M., NOEL-LAMBOT, F., 1980 - Les Metallothionéines. Structure fonctions et incidences dans les milieux marins pollués par les métaux lourds. Actualités de Biochimie marine. Colloque GABIM. La Rochelle , 219-232.
- BOUQUEGNEAU, J.M., MARTOJA, M., 1982 - La teneur en cuivre et son degré de complexation chez quatre Gastéropodes marins. Données sur le cadmium et le zinc. Oceanol. Acta , (5) , 2 , 219-228.
- BEATTIE, J.H., PASCOE, D., 1979 - A cadmium binding protein in Rainbow trout Toxicol. Letters , 4 , 241-246.
- BELTRAMINI, M., LERCH, K., 1983 - Spectroscopic studies on *Neurospora* copper metallothionein. Biochemistry , 22 , 2043-2048.
- BERNHARD, W., GOOD, M., VASAK, M., KÄGI, J.H.R., 1983 - Spectroscopic studies and characterisation of metallothioneins containing mercury, lead, and bismuth. Inorg. Chim. Acta , 79 , 154.
- BOWEN, H.J.M., 1966 - Trace elements in biochemistry. Academic Press , New York , 241 pages.
- BREMNER, I., DAVIES, N., 1975 - The induction of metallothionein in rat liver by zinc injection and restriction of food intake. Biochem. J. , 149 , 733-738.
- BREMNER, I., YOUNG, B.W., 1976(a) - Isolation of (copper-zinc)-thioneins from pig liver. Biochem. J. , 155 , 631-635.
- BREMNER, I., YOUNG, B.W., 1976(b) - Isolation of (copper-zinc)-thioneins from the livers of copper injected rats. Biochem. J. , 157 , 517-520.

- BRIGGS, R.P., 1977 - An ambicolorate flounder *Platichthys flesus* L. from the river Bann, Northern Ireland.
Irish Naturalists J. , (19) , 3 , 70-71.
- BRIGGS, R.W., ARMITAGE, I.M., 1982 - Evidence for site selective metal binding in calf liver metallothionein.
Journ. Biol. Chem. , (257) , 3 , 1259-1262.
- BUCKLEY, J.T., ROCH, M., McCARTER, J.A., RENDELL, C.A., MATHESON, A.T., 1982 - Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper. I : Effect on growth, on accumulation and distribution of copper and on copper tolerance.
Comp. Biochem. Physiol. , 72 C , 15-19.
- BUHLER, R.H.O., KÄGI, J.R., 1974 - Human hepatic metallothioneins.
Febs letter , (39) , 2 , 229-234.
- CABRIDENC, R., CHOUROULINKOV, I., 1977 - Tests biologiques d'évaluation d'effets toxiques de substances chimiques dans l'environnement.
Rech. SC. Tech. sur l'Environ. , 5 .
- CALABRESE, A., THURBERG, F.B., DAWSON, M.A., WENZLOFF, D.R., 1975 - Sublethal physiological stress induced by cadmium and mercury in the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* .
In : Sublethal effects of toxic chemicals on aquatic animals.
Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam. , 15-21.
- CAPLUN, E., PETIT, D., PICCIOTTO, E., 1984 - Le plomb dans l'essence.
La Recherche , (15) , 152 , 270-280.
- CARMICHAEL, N.G., FOWLER, B.A., 1981 - Cadmium Accumulation and toxicity in the Kidney of the Bay Scallop *Argopecten irradians* .
Mar. Biol. , 65 , 35-45.
- CARPÈNE, E., CATTANI, O., HAKIM, G., SERRAZANETTI, G.P., 1983 - Metallothionein from foot and posterior adductor muscle of *Mytilus galloprovincialis*.
Comp. Bioch. Physiol. , 74 C , 2 , 331-337.
- CASTAGNA, A., SINATRA, F., SCALIA, M., CAPODICASA, V., 1981 - Observations of the effect of zinc on the gametes and various development phases of *Arbacia lixula*.
Mar. Biol. , 64 , 285-289.
- CHARCOT., 1876 -
Le Progrès Médical, 10 Juin 1876, p 450. in Littré.
- CHARLOU, J.L., 1983 - in : Manuel des analyses chimiques en milieu marin.
C.N.E.X.O. , Brest , 275-283.
- CHEN, R.W., VASEY, E.J., WHANGER, P.D., 1977 - Accumulation and depletion of zinc in rat liver and kidney metallothioneins.
J. Nutr. , 107 , 805-813.

- CHERIAN, M.G., GOYER, R.A., 1977 - Characteristics of Copper and Zinc Induced Metallothioneins.
in : Trace substances in environmental health-XI Edited by D.D. Hemphill
University of Missouri . 193-200.
- CHERIAN, M.G., GOYER, R.A., 1978 - Metallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals.
Life Sci. , 23 , 1-10.
- CHERIAN, M.G., 1983 - Cellular adaptation in Metal Toxicology and Metallothionein.
Toxicology , (28) , 1-2 , 1-15.
- CLARKSON, T.W., SMITH, J.C., MARSH, D.O., TURNER, M.D., 1975 - A review of Dose-response relationships resulting from human exposure to methylmercury compounds.
in : Heavy Metals in the aquatic environment. Edited by P.A.Krenkel
Pergamon Press. 1-12.
- COLAS, P., 1980 - Analyse des métaux dans le milieu marin. Remarques méthodologiques. Corrélations entre les paramètres physico-chimiques des sédiments Accumulation par les organismes vivants.
Thèse de 3ème Cycle . U.S.T.Lille. 176p.
- COOMBS, T.L., 1977 - Uptake and storage mechanisms of heavy metals in marine organisms.
Proc. Analyt. Div. Chem. Soc. , 14 , 219-222.
- COSSON, R.P., THOMPSON, J.A.J., 1983 - Utilisation de l'électrode PAR 303 pour la détection et le dosage des métallothionéines dans les tissus des invertébrés marins.
Analysis , V II , 1 , 33-35.
- DEAN, P.A.W., LAW, A.Y.C., SZYMANSKA, J.A., STILLMAN, M.J., 1983 - Cadmium binding to metal-free metallothionein : a correlation of U.V, C.D, and ¹¹³Cd N.M.R. data, and ¹¹³Cd N.M.R. characterisation of the binding sites, in the reconstituted protein.
Inorganica Chimica Acta , 78 , 275-279.
- DEKNUDT, G., 1978 - Etude des effets cytogénétiques du zinc, du plomb et du cadmium chez les mammifères.
Thèse 3ème cycle. U.S.T.Lille , 197 pages.
- DELARCHE, A., RIBEYRE, F., 1978 - Chaîne trophique expérimentale en milieu limnique : conception et réalisation du modèle expérimental; étude de la bioaccumulation et de la bioamplification du méthylmercure en fonction de la température; incidences écotoxicologiques de la contamination au niveau du consommateur terminal (*Salmo gairdneri*).
Thèse de 3ème cycle. Université de Bordeaux I, 272 pages.

- DELVAL, C., DESMARCHELIER, M., 1982 - Les maladies des poissons. Le littoral Nord-Pas de Calais pollué?
Publication S.M.Wimereux. Contrat C.N.E.X.O., n° 81/2469 , 75 pages.
- DELVAL, C., DESMARCHELIER, M., 1982 - Biologie du flet (*Platichthys flesus*)
Etude des chalutages effectués sur le littoral Nord-Pas de Calais.
D.E.A , U.S.T.Lille , 120 pages.
- DENNAI, N., 1984 - Effets Histophysio-pathologiques et biochimiques de l'intoxication d'un ver marin (*Nereis diversicolor*) par deux métaux lourds (le cadmium et le mercure).
Thèse de 3ème cycle. U.S.T.Lille , 48 pages.
- DESMARCHELIER, M., 1984 - Les nécroses des poissons du littoral Nord Pas de Calais.
J. Rech. Océanogr. , (9) , 1 , 35-37.
- DEWARUMEZ, J.M., SMIGIELSKI, F., RICHARD, A., 1978 - *Abra alba* (Mollusque Lamelibranche) sa localisation en zone littorale de la Mer du Nord.
Haliotis , 7 , 13-19.
- DONNIER, B., 1972 - Etude de la toxicité d'effluents de papéterie en milieu marin.
Rev. Intern. Oceanogr. Méd. , Tome XXVIII, 53-93.
- DUCHAUSSOY, J., 1971 - Le Zinc.
Que Sais-Je ? , Presses Universitaires de France, n° 1170 , 126 pages.
- FALCK, F.Y., FINE, L.J., SMITH, R.G., GARVEY, J., SCHORK, A., ENGLAND, B., McCLATCHEY, K.D., LINTON, J., 1983 - Metallothionein and occupational exposure to cadmium.
British J. of Industrial Medecine , 40 , 305-313.
- FARMER, G.J., ASHFIELD, D., SAMANT, H.S., 1979 - Effects of zinc on juvenile Atlantic salmon, *Salmo salar* : acute toxicity, food intake, growth and bioaccumulation.
Environ. Pollut. , (19) , 2 , 103-117.
- FELDMAN, S.L., COUSINS, R.J., 1978 - Degradation of cadmium-thionein in rat liver and kidney.
J. Toxicol. and Environ. Health , 4 , 805-813.
- FLANAGAN, P.R., HAIST, J., VALBERG, L.S., 1983 - Zinc absorption, intraluminal zinc and intestinal metallothionein level in zinc-deficient and zinc-replete rodents.
J. Nutr. , (113) , 5 , 962-972.

- FLETCHER, G.L., KING, M.J., 1978a - Seasonal dynamics of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} in gonads and liver of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) evidence for summer storage of Zn^{2+} for winter gonad development in females.
Can. J. Zool. , (56) , 2 , 284-290.
- FLETCHER, G.L., KING, M.J., 1978(b) - Copper, zinc and calcium, magnesium and phosphate in the gonads and livers of Sockeye Salmon (*Oncorhynchus nerka*) during spawning migration.
Comp. Biochem. Physiol. , 60 A , 127-130.
- FLOS, R., CARITAT, A., BALASCH, J., 1979 - Zinc content in organs of dogfish (*Scoleciorhinus canicula*) subject to sublethal experimental aquatic zinc pollution.
Comp. Biochem. Physiol. , 64 C , 77-81.
- FOX, M.R.S., 1974 - Effect of essential minerals on cadmium toxicity. A review.
J. Food. Sc. , 39 , 321-324.
- FRANKENNE, F., NOEL-LAMBOT, F., DISTECHE, A., 1980 - Isolation and characterisation of metallothioneins from cadmium loaded mussel, *Mytilus edulis*.
Comp. Biochem. Physiol. , 66 C , 179-182.
- FRIBERG, L., PISCATOR, M., NORDBERG, G.F., KJELLSTOM, T., 1974 - Cadmium in the environment. 2nd edition.
C.R.C. Press , 248 pages.
- FRIEDEN, E., 1976 - Copper and iron metalloproteins.
TIBS , December 1976 , 273-274.
- GAUTHIER, M., 1976 - Les pollutions marines et l'équilibre biologique océanique.
Travaux Publics Fr. , (1013) , 112 , 19-34.
- GEORGE, S.G., PIRIE, B.J.S., 1979(a) - The occurrence of cadmium in sub cellular particles in the kidney of the marine mussels : *Mytilus edulis* exposed to cadmium.
Biochim. Biophys. Acta , 580 , 234-244.
- GEORGE, S.G., CARPENE, E., COOMBS, T.L., OVERNELL, J., YOUNGSON, A., 1979(b) - Characterisation of cadmium binding proteins from mussels, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium.
Biochim. Biophys. Acta , 580 , 225-233.
- GEORGE, S.G., 1980 - Correlation of metal accumulation in mussels with the mechanisms of uptake, metabolism and detoxification : a review.
Thalassia Jugosl. , 16 , 347-365.

- GEORGE, S.G., 1983 - Heavy Metal Detoxification in the mussel *Mytilus edulis*
Composition of Cd-containing kidney granules, (Tertiary lysosomes).
Comp. Biochem. Physiol. , 76 C , 53-57.
- HAMANAKA, T., MISHIMA, S., 1981 - Cadmium and Zinc Concentrations in marine
Organisms in the northern North Pacific Ocean.
Res. Inst. N. Pac. Fish. , Hokkaido Univ. Spe. Vol. , 191-206.
- HILDEBRAND, H.F., VERON, C., HERLANT-PEERS, M.C., FERNANDEZ, J.P., KERCKAERT, J.P.,
-1984 - Les conséquences biologiques de la présence d'ions métalliques
dans la cavité buccale.
Revue d'Odonto-Stomatologie , Tome XIII , 1 , 41-56.
- HILL, C.H., MATRONE, G., PAYNE, W.L., BARBER, C.W., 1963 - *In vivo* interactions
of cadmium with copper, zinc and iron .
J. Nutr. , 80 , 227-232.
- JACKIM, E., 1973 - Influence of lead and other metals on fish δ -amino
levulinate dehydrase activity.
J. Fish Res. Board Can. , 30 , 560-562.
- JANSSEN, H.H., SCHOLZ, N., 1979 - Uptake and Cellular Distribution of cadmium
in *Mytilus edulis*
Mar. Biol. , 55 , 133-141.
- JENNINGS, J.R., RAINBOW, P.S., SCOTT, A.G., 1979 - Studies on the uptake of
cadmium by the crab *Carcinus maenas* in the laboratory .
II . Preliminary Investigation of cadmium-binding proteins.
Mar. Biol. , 50 , 141-149.
- JERNELOV, A., LANDNER, L., LARSSON, T., 1975 - Swedish perspective on mercury
pollution.
J. Wat. Pollut. Control. Federation. , 47 , (4) , 810-822.
- KÄGI, J.H.R., VALLEE, B.L., 1960 - Metallothionein : A cadmium and Zinc
containing protein from Equine Renal Cortex.
J. Biol. Chem. , 235 , (12), 3460-3465.
- KÄGI, J.H.R., HIMMELHOCH, S.R., WHANGER, P.D., BETHUNE, J.L., VALLEE, B.L., 1974 -
Equine Hepatic and Renal Metallothioneins.
J. Biol. Chem. , 249 , (11) , 3537-3542.
- KÄGI, J.H.R., NORDBERG, M., 1979 - Metallothionein .
Proceedings of the First International Meeting on Metallothionein
and other Low-Molecular Weight Metal Binding Proteins .
Experientia Supplementum 34 , ZÜRICH , July 17-22 1978.
- KATZ, M., 1975 - The effects of heavy metals on fish and aquatic organisms.
in : Heavy Metals in the Aquatic Environment . edited by P.A. Krenkel
Pergamon Press . 25-30.

- KISSLING, M.M., KÄGI, J.H.R., 1977 - Primary structure of human hepatic metallothionein.
 Febs Letter , 82 , 247-250.
- KITO, H., TAZAWA, T., OSE, Y., SATO, T., ISHIKAWA, T., 1982 - Formation of metallothionein in fish.
 Comp. Biochem. Physiol. , 73 C , (1) , 129-134.
- KITO, H., TAZAWA, T., OSE, Y., SATO, T., ISHIKAWA, T., 1982 - Protection by metallothioneins against cadmium toxicity.
 Comp. Biochem. Physiol. , 73 C , (1) , 135-139.
- KLEIN, D.H., GOLDBERG, E.D., 1970 - Mercury in the marine environment.
 Environ. Sc. Technol. , 4 , (9) , 765-768.
- KÖHLER, K., RIISGÅRD, H.U., 1982 - Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel *Mytilus edulis*.
 Mar. Biol. , 66 , (1) , 53-59.
- KOJIMA, Y., BERGER, C., VALLEE, B.L., KÄGI, J.H.R., 1976 - Amino-Acid sequence of equine renal metallothionein-1B .
 Proc. Natl. Acad. Sci. , 73 , (10) , 3413-3417.
- KOJIMA, Y., KÄGI, J.H.R., 1978 - Metallothionein .
 TIBS , Avril 1978 , 90-91.
- KRISHAN, A., FALSHUK, K.H., VALLEE, B.L., 1975 - DNA Distribution in the cell cycle of *Euglena gracilis*. Cytofluorométry of zinc deficient cells.
 Biochemistry , 14 , (15) , 3439-3444.
- KUDO, A., 1976 - Mercury transfert from bed sediments to freshwater fish, (Guppies) .
 J. Environ. Qual. , 5 , (4) , 427-430 .
- KUREISHY, T.W., SANZGIKY, S., BRAGANCA, A., 1981 - Some heavy metals in fishes from the Andaman Sea.
 Indian Journal of Marine Sciences , 10 , 303-307.
- KUSTIN, K., Mc LEOD, G.C., 1983 - Vanadium and other metals ions in the physiological Ecology of marine Organisms.
 Structure and Bonding. Springer-Verlag. 139-160.
- LABAT, R., ROQUEPLO, C., RICARD, J.M., LIM, P., BURGAT, M., 1977 - Actions écotoxicologiques de certains métaux (Cu, Zn, Pb, Cd) chez les poissons dulçaquicoles de la rivière Lot.
 Annls. Limnol. , 13 , (2) , 191-207.
- LABAT, R., LHONORE, D., CHAISEMARTIN, G., 1977 - La contamination des chaines biologiques d'eau douce par bioaccumulation.
 XXII ème Congrès de l'association française de limnologie. Réunion de Metz. 16-19 Mai 1977. 16p.

- LÅRSSON,Å.,BENGTSSON,B.E.,SVANBERG,O., 1976 - Some haematological and biochemical effects of cadmium in fish.
in : Effects of pollutants on aquatic organisms. edited by A.P.M. Lockwood. Cambridge University Press. 35-45.
- LÅRSSON,Å.;LEHTINEN,K.J.,HAUX,C., 1980 - Biochemical and haematological Effects of a titanium dioxide industrial effluent on fish.
Bull. Environm. Contam. Toxicol. , 25 , 427-435.
- LERCH,K., 1980 - Copper metallothionein ,a copper binding protein from *Neurospora crassa*.
Nature , 284 , (5754) , 368-370.
- LERCH,K.,AMMER,D.,OLAFSON,R.W., 1981 - Amino-Acid sequence of crab metallo-
-thionein.
Febs Letter , 126 , (2) , 165-168.
- LERCH,K.,AMMER,D., 1982 - Crab metallothionein.Primary structures of metallo-
-thioneins 1 and 2.
J. Biol. Chem. ,257 , (5) , 2420-2426.
- KEY,H.L.,FAILLA,M.L.,CHERRY,D.S., 1983 - Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*)
Comp. Biochem. Physiol. , 74 B , (3) , 507-513.
- L'HOPITAUULT,J.C., 1982 - Mollusques 82 . Pollution chimique des moules et des coques du littoral nord de la France.
Institut Pasteur de Lille. Monographie. 93p.
- L'HOPITAUULT,J.C.,DELATTRE,J.M., 1983 - Pollution chimique des sédiments du littoral nord de la France.
Insitut Pasteur de Lille. Hydrobios II. 15p.
- LUCKEY,T.D., 1975 - Hormology with inorganic compounds.
in : Heavy Metal Toxicity,Safety and Hormology.edited by F.Coulston Albany/New York .120p. 81-103.
- LYON,R.,TAYLOR,M.,SIMKISS,K., 1983 - Metal binding proteins in the hepato pancreas of the crayfish (*Austropotamobius pallipes*)
Comp. Biochem. Physiol. , 74 C , (1) , 51-54.
- MACARA,I.G., 1980 - Vanadium . An element in search of a role.
TIBS ,Avril 1980 , 92-94.
- Mc COSKER,J.E.,NIGRELLI,R.F., 1971 - New records of lymphocystis diseases in four eastern Pacific fish species.
J. Fish Res. Board Can. , 28 , 1809-1810.
- MAGGI,P.,LE BAUT,C., 1981- Première campagne. Maladies,Anomalies et parasites de poissons d'interêts commerciaux (MAPPIC)du 13/10 au 3/11 1981.
Rapport ISTPM . 30p.

- MARCHAND, M., 1981 - Amoco-Cadiz. Bilan du colloque sur les conséquences d'une pollution accidentelle par hydrocarbures.
Brest. Novembre 1979.
Rapport Scientifique et Technique 44 , 86p. Publication du CNEXO.
- MARGOSHES, M., VALLEE, B.L., 1957 - A cadmium protein from Equine Kidney Cortex.
J. Am. Chem. Soc. , 79 , 4813-4814.
- MARTOJA, R., VIALE, D., 1977 - Accumulation de granules de sélénure mercurique dans le foie d'Odontocètes : un mécanisme possible de détoxification du méthylmercure par le sélénium.
C. R. Acad. Sc. Paris , 285 , 109-112.
- MARTOJA, R., BOUQUEGNEAU, J.M., VERTHE, C., 1983 - Toxicological effects and storage of cadmium and mercury in an insect *Locusta migratoria* (Orthoptera)
Journ. of Invertebrate Pathology , 42 , 17-32.
- MARTOJA, R., TRUCHET, M., LOPEZ, E., LALLIER, F., VIDAL, B., 1984 - Mise en évidence de lithiases rénales chez des poissons littoraux de la Manche et de la Mer du Nord (*Limanda limanda* , *Platichthys flesus*). Relation avec la dégénérescence des corpuscules de Stannius et les ulcérations tégumentaires.
C. R. Acad. Sc. Paris , 298 , (7) , 185-191.
- MARTOJA, M., MARTOJA, R., 1984 - La bioaccumulation des métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution.
Courrier du CNRS , 54 , 32-37.
- MASON, R., BRADY, F.O., WEBB, M., 1981 - Metabolism of zinc and copper in the neonate: Accumulation of Cu in the gastrointestinal tract of the newborn rat.
Br. J. Nutr. , 45 , 391-399.
- MATHIES, J.C., 1958 - Preparation and properties of highly purified alkaline phosphatase from swine kidney.
J. Biol. Chem. , 23 , 1121-1127.
- MAURI, M., ORLANDO, E., 1982 - Experimental study on renal concretions in the wedge shell : *Donax trunculus* L;
J. Exp. Mar. Biol. Ecol. , 63 , 47-57.
- MAURI, M., 1984 - Variability of Zn and Mn Concentrations in relation to sex and season in the bivalve *Donax trunculus*.
Mar. Pollut. Bull. , 14 , (9) , 342-346.
- MEARS, H.C., EISLER, R., 1977 - Trace metals in liver from bluefish, tautog and tilefish in relation to body length.
Cheaseapeake Science. , 18 , (3) , 315-318.
- MEHRA, R.K., 1984 - Metallothionein-I in the plasma and liver of neonatal rats.
Biochem. J. , 217 , (3) , 859-862.

- MELLEGAARD, S., 1984 - Fishery Gear induced ulcerations in Cod.
Discussion paper for the marine Fish disease survey of the R.V.
" Anton Dohrn " , 2-13 Janvier 1984.
- MERTENS, J.L., PRUDHON, F., 1976 - Pollution du littoral Calais-Dunkerque
Gravelines. Estimation des apports telluriques au milieu marin.
Rapport IRCHA SECADU , 51p.
- METAYER, C., AMIARD, J.C., AMIARD-TRIQUET, C., 1982 - Accumulation de quelques
éléments traces métalliques (Cd, Pb, Cu, et Zn) chez la sole (*Solea solea*)
et le flet (*Platichthys flesus*). Variations en fonction de l'âge et
organotropisme.
Rev. Intern. Océanogr. Méd. , Tomes LXVI-LXVII , 33-45.
- MJØR-GRIMSRUD, M., SØLI, N.E., SIVERTSEN, T., 1979 - The distribution of soluble
Copper and Zinc binding proteins in Goat liver.
Acta Pharmacol. et Toxicol. , 44 , 319-323.
- NEWELL, P.F., APPLETON, T.C., BROWN, B.E., CARNWARTH, J.W., 1979 - Elemental
distribution in relation to skin Necroses of Marine Flatfishes
from the English Channel.
Mar. Biol. , 51 , 93-99.
- NOËL, J.C., BOGUSZ, D., BARA, J.C., LAURENT, M., LAVARDE, R., STOCKMAN, G., MATHIAN, R.,
1980 - La pollution industrielle dans le bassin Nord-Artois-Picardie
Bilan de 10 années 69-79.
Cahiers techniques N°1 .Agence de l'eau Artois-Picardie.
- NOËL-LAMBOT, F., 1980 a - La bioaccumulation du cadmium en milieu marin.
Thèse de doctorat. Université de Liège . 258p.
- NOËL-LAMBOT, F., BOUQUEGNEAU, J.M., FRANKENNE, F., DISTECHE, A., 1980b -
Cadmium, Zinc and copper Accumulation in Limpets (*Patella vulgata*) from
the Bristol Channel with special reference to Metallothioneins.
Mar. Ecol. Prog. Ser. , 2 , 81-89.
- NOLAN, C.V., DUKE, E.J., 1983 - Cadmium-Binding proteins in *Mytilus edulis* :
relation to the mode of administration and significance in tissue
retention of cadmium.
Chemosphère , 12 , (1) , 65-74.
- NOMIYAMA, K., 1975 - Toxicity of cadmium. Mechanisms and diagnosis.
in : Heavy Metals in the aquatic environment edited by P.A. Krenkel
Pergamon Press . 15-20.
- NORDBERG, G.F., NORDBERG, M., PISCATOR, M., VESTERBERG, O., 1972 - Separation
of two forms of rabbit Metallothioneins by isoelectric focusing.
Biochem. J. , 126 , 491-498.

- NORDBERG, M., TROJANOWSKA, B., NORDBERG, G.F., 1974 - Studies on metal-binding proteins of low molecular weight from renal tissues of rabbits exposed to Cd or Hg.
Environ. Physiol. Biochem. , 4 , 149-158.
- NORDBERG, M., 1978 - Studies on metallothionein and cadmium.
Environmental Research , 15 , 381-404.
- NOUNOU, P., MARTOJA, R., ORCEL, L., 1980 - Ulcérations des poissons et mammifères marins pêchés dans les eaux côtières françaises.
 Rapport scientifiques et techniques n° 43/1980; C.N.E.X.O.
- O'BRADY, F., PANEMANGALORE, M., DAY, F.A., 1979 - *In vivo* and *ex vivo* induction of rat liver metallothionein.
 In : *Metallothionein*. Edited by Kägi and Nordberg , 34 , 261-271.
- O'BRADY, F., WEBB, M., 1981 - Metabolism of Zinc and Copper in the neonate. (Zinc, Copper)-thionein in the developing rat kidney and testis.
J. Biol. Chem. , (256) , 8 , 3931-3935.
- O'DELL, B.L., 1969 - Effect of dietary components upon zinc availability. A review with original data.
Am. J. Clin. Nutr. , 22 , 1315-1322.
- OLAFSON, R.W., THOMPSON, J.A., 1974 - Isolation of heavy metal binding proteins from Marine vertebrates.
Mar. Biol. , (28) , 2 , 83-87.
- OLAFSON, R.W., SIM, R.G., BOTO, K.G., 1979(a) - Isolation and characterisation of the heavy metal binding protein metallothionein from marine invertebrates.
Comp. Biochem. Physiol. , 623 , 407-416.
- OLAFSON, R.W., SIM, R.G., 1979(b) - An electrochemical approach to quantitation and characterisation of metallothioneins.
Anal. Biochem. , 100 , 343-351.
- ONOSAKA, S., CHERIAN, M.G., 1981 - The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rat in response to metals. I- Effect of repeated injection of cadmium salts.
Toxicology , 22 , 91-101.
- ONASAKA, S., CHERIAN, M.G., 1982 - The induced synthesis of metallothionein in various tissues of rats in response to metals. II- Influence of zinc status and specific effect on pancreatic metallothionein.
Toxicology , 23 , 11-20.
- OVERNELL, J., COOMBS, T.L., 1979 - Purification and properties of plaice metallothioneins, a Cd binding proteins from the liver of the Plaice (*Pleuronectes platessa*).
Biochem. J. , (183) , 2 , 277-283.

- OVERNELL, J., 1982(a) - Copper metabolism in crabs and metallothionein. In vivo effects of copper^{II} on soluble hepatopancreas metal binding components in the crab, *Cancer pagurus*, containing varying amounts of cadmium. Comp. Biochem. Physiol. , 73 B , 3 , 555-565.
- OVERNELL, J., 1982(b) - A method for isolation of metallothionein from the hepatopancreas of the crab, *Cancer pagurus*, that minimized the effect of the tissue proteases. Comp. Biochem. Physiol. , 73 B , 3 , 547-555.
- PAQUET, M., 1983 - Variations saisonnières de la teneur en Cd, Cu et Zn chez une population de *Mytilus edulis* : liaisons avec le métabolisme protéique. Memoire, Université de Québec, Rimouski. 91 pages.
- PENTREATH, R. J., 1976 - Some further studies on the accumulation and retention of ⁶⁵Zn and ⁵⁴Mn by the Plaice, *Pleuronectes platessa* . J. Exp. Mar. Biol. Ecol. , (21) , 2 , 179-189 .
- PEQUIGNOT, J., LABAT, R., CHATELET, A., MOGA, A., 1975 - Action du sulfate de cuivre sur les cellules à mucus de l'alevin de truite (*Salmo irideus*). Journal Européen de Toxicol. , (8) , 1 , 52-56.
- PETERSON, M. G., LAZDINS, I., DANKS, D. M., MERCER, J. F. B., 1984 - Cloning and sequencing of a sheep metallothionein cDNA. Eur. J. Biochem. , 143 , 507-511.
- PINTA, M., 1978 - Modern methods for trace elements analysis. Ann. Arbor. Sc. , 492 pages.
- POIRIER, L., COSSA, D., 1981 - Distribution tissulaire de cadmium chez *Meganyctiphanes norvegica* (Euphausiacée) : état naturel et accumulation expérimentale de formes solubles. Can. J. Fish. Aquat. Sci. , 38 , 1449-1453.
- POLL, M., 1947 - Faune de Belgique et poissons marins. Patrimoine du Musée Royal d'Histoire Naturelle de Belgique. Bruxelles. 452 pages.
- PULIDO, P., KAGI, J. H. R., VALLEE, B. L., 1966 - Isolation and some properties of human metallothionein. Biochemistry , 5 , 1768-1777.
- RADOUX, D., BOUQUEGNEAU, J. M., 1979 - Uptake of mercuric chloride from sea water by *Serranus cabrilla*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. , 22 , 771-778.
- RAY, S., WHITE, M., 1981 - Metallothionein like protein in lobsters (*Homarus americanus*) . Chemosphere. (10) , 11/12 , 1205-1213.

- REICHERT, W.L., FREDERIGHI, A., MALINS, D.C., 1979 - Uptake and metabolism of lead and cadmium in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*).
Comp. Bioch. Physiol. , 63 C , 229-234.
- RESEAU NATIONAL D'OBSERVATION DE LA QUALITE DU MILIEU MARIN, 1976-1977 -
Recueil des observations : Campagnes 1976 , 258 pages.
Campagnes 1977 , 346 pages.
Ministère de l'environnement et du cadre de vie , C.N.E.X.O.
- RESEAU NATIONAL D'OBSERVATION DE LA QUALITE DU MILIEU MARIN, 1981 -
Synthèse des travaux de surveillance 1975-1979.
C.N.E.X.O. , 358 pages.
- RESEAU NATIONAL D'OBSERVATION DE LA QUALITE DU MILIEU MARIN, 1981-1982 -
Bulletins trimestriels , n° 18 et 19 .
Ministère de l'environnement et du cadre de vie , C.N.E.X.O.
- RIBAS, B., 1983 - Isolation of metallothionein isoforms in rat liver.
Trace elements-Analytical chemistry in Medicine and Biology. (2) ,
180-197.
- RICHARDS, M.P., COUSINS, R.J., 1975 - Mammalian zinc homeostasis : requirement
for RNA and metallothionein synthesis.
Biochem. Biophys. Res. Commun. , 64 , 1215-1223.
- RICHARDS, M.P., COUSINS, R.J., 1977 - Isolation of an intestinal metallothionein
induced par parenteral zinc.
Biochem. Biophys. Res. Commun. , 75 , 286.
- RICHARD, A., DURCHON, M., VANDCRPE, B., 1975 - Rapport des experts nommés par
le tribunal de Boulogne sur Mer, suite à la plainte contre X des marins
pecheurs de Grand Fort Philippe et de l'A.D.E.L.F.A.
- RICHARD, A., 1977 - Nécroses de poissons. Littoral Manche-Mer du Nord. (Baie
de Somme à Frontière Belge).
Contrat C.N.E.X.O. n° 77/1739 , 84 pages.
- RICHARD, A., SOUPLET, A., DEWARUMEZ, J.M., 1978 - Le littoral de la Mer du Nord;
les problèmes de l'environnement liés à l'industrialisation et aux
aménagement portuaires.
Colloque International du C.N.R.S. Second colloque Franco Japonais de
Géographie "Villes et ports " . 489-499.
- RICHARD, A., SOUPLET, A., DUHAMEL, F., 1979 - Etude des nécroses de poissons
(Littoral Nord-Pas de Calais) .
Contrat C.N.E.X.O. n° 79/2133 , 14p.
- RIDLINGTON, J.W., CHAPMAN, D.C., GOEGER, D.E., WHANGER, P.D., 1981 - Metallothionein
and Cu chelatin : characterisation of metal-binding proteins from
tissues of four marine animals.
Comp. Biochem. Physiol. , 70 B , 1 , 93-104.

- RIVKIN, R.B., 1979 - Effects of lead on growth of the marine diatom *Skeletonema costatum*.
Mar. Biol. , 50 , 239-247.
- ROBERTS, R.J., SHEARER, W.M., MUNRO, A.L.S., ELSON, K.G.R., 1970 - Studies on ulcerative dermal necrosis of salmonid. II : The sequential pathology of the lesions.
J. Fish. Biol. , 2 , 372-378.
- ROBERTS, R.J., BULLOCK, A.M., 1976 - The dermatology of marine teleost fish : II : Dermato pathology of the integument.
Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev. , 14 , 227-246.
- ROCH, M., McCARTER, J.A., MATHESON, A.T., CLARK, M.J.R., OLAFSON, R.W., 1982 - Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell river system.
Can. J. Fish. Aquat. Sc. , (39) , 12 , 1596-1601.
- ROESI JADI, G., HALL, R.E., 1981 - Characterisation of mercury-binding proteins from the gills of marine mussels exposed to mercury.
Comp. Biochem. Physiol. , 70 C , 59-64.
- ROESI JADI, G., CALABRESE, A., NELSON, D.A., 1982 - Mercury-binding proteins of *Mytilus edulis*.
In : Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity. Academic press , Inc. , 75-87.
- SAMPSON, C.E., CHICHESTER, C.O., HAYES, J.A., 1984 - Alterations in collagen biosynthesis and in metallothionein in lungs of rats acutely or repeatedly exposed to cadmium chloride aerosol.
Ann. Rev. of Resp. Dis. , (129) , 4 , 619-625.
- SCHULZ-BALDES, M., 1974 - Lead uptake from sea water and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis*.
Mar. Biol. , 25 , 177-193.
- SHAIKH, Z.A., LUCIS, O.J., 1971 - Isolation of Cd-binding proteins.
Experimenta , 27 , 1024-1025.
- SIEWICKI, T.C., SYDLOWSKI, J.S., WEBB, E.S., 1983 - The nature of cadmium binding in commercial Eastern Oysters (*Crassostrea virginica*).
Arch. Environ. Contam. Toxicol. , 12 , 299-304.
- SINDERMAN, C.J., 1970 - Principal diseases of marine fish and Shellfish.
Academic Press , 369 pages.
- SIMKISS, K., TAYLOR, M., MASON, A.Z., 1982 - Metal detoxification and bioaccumulation in Molluscs.
Marine Biology Letters , 3 , 187-201.

- SKIDMORE, J.F., 1970 - Respiration and osmoregulation in rainbow trout with gills damaged by zinc sulfate.
J. Exp. Biol. , 52 , 484-494.
- SMIGIELSKI, J.F., 1976 - Etude des peuplements benthiques en relation avec les teneurs en métaux des sédiments au large de Calais.
D.E.A. , U.S.T.Lille , 95 pages.
- SMIGIELSKI, J.F., 1978 - Etude cytologique et ultrastructurale des nécroses et nodules de poissons, en relation avec leurs teneurs en éléments métalliques. (Littoral, Mer du Nord).
Thèse de 3ème cycle , U.S.T.Lille , 55 pages.
- SOKOLOWSKI, G., PILZ, W., WESER, V., 1974 - X-ray photoelectron spectroscopic properties of Hg-thionein.
Febs Letters , (48) , 2 , 222-225.
- SPRAGUE, J.B., 1969 - Measurement of pollutant toxicity to fish. I- Bioassay methods for acute toxicity.
Water Res. , 3 , 793-821.
- STORA, G., 1975 - Contribution à l'étude de la notion de concentration létale limite moyenne appliquée à des invertébrés marins. II- C.L 50 et détermination de la toxicité des produits polluants.
Revue Int. Océanogr. Med. , Tomes XXXVII-XXXVIII , 97-123.
- SUGAWARA, N., 1977 - Influence of cadmium on zinc distribution in the mouse liver and kidney : Role of metallothionein.
Toxicol. Appl. Pharmacol. , 42 , 377-386.
- SUZUKI, T.K., YAMAMURA, M., 1979 - Gel and anion exchange chromatographic properties of copper containing metallothioneins.
Arch. Environ. Contam. Toxicol. , 8 , 471-485.
- SUZUKI, K.T., MAITANI, T., 1981 - Metal dependent properties of metallothionein. Replacement *in vitro* of zinc in zinc-thionein with copper.
Biochem. J. , 199 , 289-295.
- SUZUKI, K.T., TANAKA, Y., 1983 - Induction of metallothionein and effect on essential metals in cadmium loaded from *Xenopus laevis*.
Comp. Biochem. Physiol. , 74 C , 2 , 311-319.
- SUZUKI, K.T., SUNAGA, H., AOKI, Y., YAMAMURA, M., 1983 - Gel permeation, ion exchange and reversed-phase columns for separation of metallothioneins by high performance liquid chromatography-atomic absorption spectrophotometry.
J. of Chromatography , 281 , 159-166.
- TAKEUTCHI, T., D'ITRI, F.M., FISCHER, P.V., ANNETT, C.S., OKABE, M., 1976 - The outbreak of Minamata disease (Methyl mercury poisoning) in cats on Northwestern Ontario Reserves.
Environ. Res. , 13 , 215-228.

- TOHYAMA,C.,SHAIKH,Z.A.,NOGAWA,K.,KOBAYASHI,E.,HONDA,R., 1982 - Urinary metallothionein as a new index of renal dysfunction in "Itai-Itai" disease patients and other Japanese women environmentally exposed to cadmium.
Arch. Toxicol. , 50 , 159-166.
- TOURNAMILLE,J., 1975 - Contribution à l'étude des protéines sériques et cristalliniennes chez le Loup (*D. labrax* et *D. punctatus*).
Thèse de 3ème cycle , Montpellier, 129 pages.
- UI,J.,KITAMURA,S., 1971 - Mercury in the Adriatic:
Mar. Pollut. Bull. , 4 , 56-59.
- VALLEE,B.L.,WACKER,W.E.C., 1956 - Zinc, a component of rabbit muscle lactic-dehydrogenase.
J. Amer. Chem. Soc. , 78 , 1771-1772.
- VALLEE,B.L., 1976 - Zinc biochemistry : a perspective.
T.I.B.S. , Avril 1976 , 88-91.
- VALLEE,B.L., 1979 - Metallothionein : historical. Review and perspectives.
In : Metallothionein. Edited by J.H.R. Kägi et M.Nordberg. 19-40.
- VANDORPE,B.,SMIGIELSKI,F., 1976 - Présence des métaux dans les nodules et nécroses des poissons. (Morue et Pleuronectidés)
Rev. Intern. Océanogr. Méd. , Tome XLIX , 29-35.
- VASAK,M.,GALDES,A.,HILL,H.A.O.,KAGI,J.H.R.,BREMNER,R.I.,YOUNG,B.W., 1980 - Investigation of the structure of metallothioneins by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy.
Biochemistry , 19 , 416-425.
- VENUGOPAL,B.,LUCKEY,T.P., 1975 - Toxicology of non radioactive heavy metals and their salts .
In : Heavy metal toxicity safety and hormology. Vol. I . Edited by F. Coulston Albany /N.Y . Academic Press. 4-74.
- VEATHE,C.,BOUQUEGNEAU,J.M.,NOEL-LAMBOT,F., 1981 - Influence de la matière organique sur l'accumulation du mercure inorganique par un mysidacé : *Leptomysis lingura*.
Bull. Soc. Roy. Sc. Liège , (11-12) , 546-548.
- VIALE,D.,KOECHLIN,N.,MARTOJA,R., 1973 - Etude des lésions tégumentaires d'un cétacé tué près de la zone de déversement des "boues rouges".
Détection à la microsonde d'accumulations métalliques anormales.
C.R. Acad. Sc. Paris , Tome 227 , série D , 1385-1388.
- VIALE,D., 1974 - Recherches effectuées sur le tégument des cétacés échoués en Corse. Relation avec le déversement de déchets de l'usine Montedison de Scarlino. Mémoire pour le Juge d'Instruction. Procès de Livourne. Les arguments scientifiques du procès dit des "Boues Rouges".
Rev. Inf. Reg. Sud Est , n° 14, URVN 83. Le Muy.

- VIALE, D., 1974 - Divers aspects de la pollution par les métaux chez quelques cétagés de Méditerranée Occidentale.
IIèmes journées, Etud. Pollutions, Monaco, CIESM , 183-191.
- VIARENGO, A., PERTICA, M., MANCINELLI, G., ORUNESU, M., 1980 - Rapid induction of copper-binding proteins in the gill of metal exposed mussels.
Comp. Biochem. Physiol. , 67 C , 2 , 215-218.
- VIGHI, M., 1981 - Lead uptake and release in an experimental trophic chain.
Ecotox. Environ. Safety , 5 , 177-193.
- WALSH, A.H., RIBELIN, W.E., 1976 - The pathology of pesticide poisoning.
In : Pathology of fishes. University Wisconsin Press. 515-541.
- WEBB, M., 1972 - Protection by zinc against cadmium toxicity.
Biochem. Pharmacol. , 21 , 2767-2771.
- WELLINGS, S.R., MCCAIN, B.B., MILLER, B.S., 1976 - Epidermal papillomas in pleuronectidae of Puget Sound, Washington.
Progress in Experimental Tumor Res. , (20) , 55-74.
- WHANGER, P.D., RIDLINGTON, J.W., 1981 - Role of metallothionein in zinc metabolism.
In : Biological roles of metallothionein. Elsevier-North Holland .
edited by E.C.Foulkes. 263-278.
- WHANGER, P.D., DEAGEN, J.T., 1983 - Effect of dietary mercury level and cadmium on rat tissue metallothionein : mercury binding and influences on zinc.
Environ. Res. , 30 , 372-380.
- WOOD, J.M., 1975 - Metabolic cycles for toxic elements in the environment.
A study of kinetics and mechanism.
In : Heavy metals in the aquatic environment, P.A.Krenkel, Pergamon Press. 105-115.
- WOODWORTH, J., EVANS, A.S.A., PASCOE, D., 1983 - The production of cadmium binding protein in three species of freshwater fish.
Toxicology Letters , 15 , 289-295.
- WOOLERY, M., LEWIN, R.A., 1976 - The effects of lead on algae. IV : Effects of Pb on respiration and photosynthesis of *Phaeodactylum tricoratum* (Bacillariophyceae).
Water, Air and Soil pollution , 6 , 25-31.
- WONG, P.T.S., SILVERBERG, B.A., CHAU, Y.K., HODSON, P.V., 1978 - Lead and the aquatic biota.
In : Biogeochemistry of lead in the environment. Elsevier-North Holland Biomedical Press . 279-342.

WOSEBER,G., 1975 - Prolonged oral administration of methyl-mercury chloride to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fingerlings.
J. Fish. Res. Board Can. , (32) , 11 , 2015-2023.

YAMAMURA,M.,SUZUKI,K.T., 1983 - Characterisation of metallothionein induced in the fish *Carassius auratus langsdorfi* .
Eisēi Kagaku , (29) , 2 , 100-104.

YOSHIKAWA,H.,OHTA,H., 1982 - Interaction of metals and metallothionein.
In : Biological roles of metallothionein . Elsevier-North Holland, Inc.
edited by E.C.Foulkes. 13-23.

FICHE DE RENSEIGNEMENTS

Date et Heure :

Préleveur :

Embarcation (et port d'attache) :

Laboratoire auquel le spécimen est envoyé :

C A P T U R E

Mode de capture :

Lieu (aussi exact que possible) :

Etat de la mer :

Inventaire des captures saines (espèces, poids total, nombre) :

Inventaire des poissons lésés (espèces, poids total, nombre) :

S P E C I M E N

Genre et espèce (âge, sexe) :



Le spécimen a été pêché : vivant, agonisant, mort.

Biométrie (en centimètre et en grammes)

- . Longueur totale : Longueur à la tête : Hauteur à l'anus :
- . Poids :
- . Orientation (droitier ou gaucher pour les poissons plats) :

Présence de parasites externes :

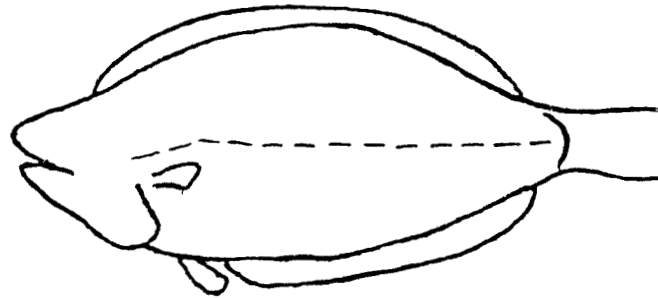
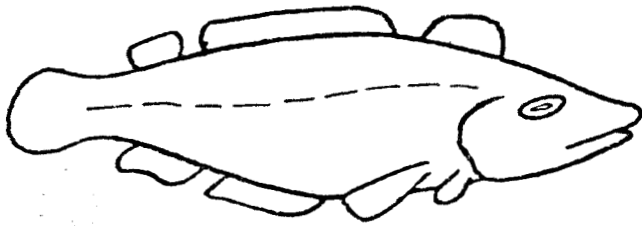
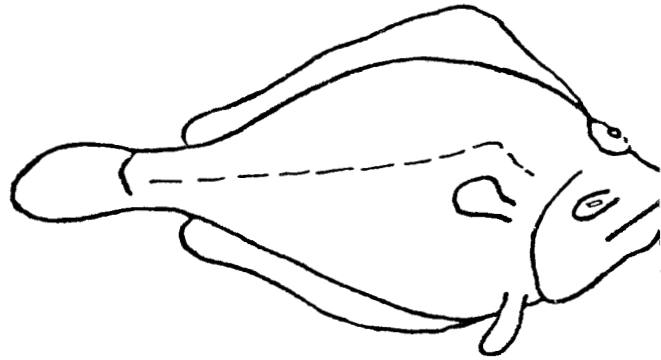
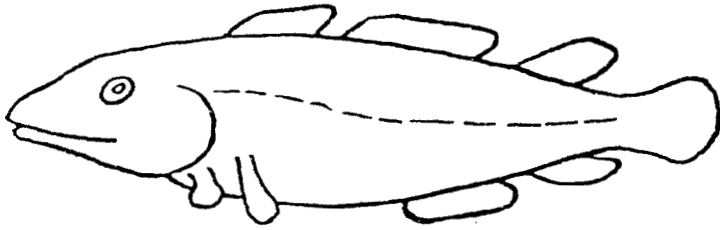
- . Situation sur les téguments :
- . Espèces :

OBSERVATIONS COMPLEMENTAIRES

(du préleveur ou des laboratoires de contrôles)

LESIONS ET PRELEVEMENTS

LESIONS TEGUMENTAIRES (Bien situer les lésions par rapport aux repères anatomiques fondamentaux : ouïes, bouche et barbillons, yeux, implantation des nageoires, ligne latérale, anus et orifices génitaux).



ETAT DES BRANCHIES ET DE LA CAVITE BUCCALE :

ETAT DES VISCERES :

VISCERES	COULEUR	LESIONS	PRELEVEMENTS		
			Histo.	Chimie	Bacterio
Cavité coelomique					
Estomac et contenu					
Intestin et contenu					
Foie					
Rate					
Rein					
Gonades					
Coeur et gros vaisseaux					

Codes à utiliser : (Indiquer entre parenthèses la taille de chaque lésion, en mm)
 N : Nécrose- n: Nodule- I: Infiltrat- T : Tuméfaction- H: Hémorragie- M: Tache hyperpigmentée
 m : Tache dépigmentée- D : Modifications diverses des téguments (à préciser dans les renseignements).

ANNEXE 2 : PRINCIPALES SOURCES DE REJETS DE MATIERES TOXIQUES SUR
LE LITTORAL DE CALAIS A DUNKERQUE

(Extrait de : Publication de l'agence de l'eau - 1981)

	Flux de pollution (NOEL, 1980) (En K eq. tox/jour de matières inhibitrices)*	
	Epuré	Rejeté
<u>DUNKERQUE</u>		
1 : Creusot Loire	100	13
2 : Air liquide	0	0
3 : Canal exutoire	-	-
4-5 : Laboratoire E.D.F.	-	-
6 : USINOR	150	28
7 : B.P.	166	166
8 : C.P.A.	-	-
9 : Usine Lesieur	120	0
10 : USINOR Mardyck	500	0
11 : Canal grand gabarit	-	-
12 : Rejets TOTAL	0	0
13 : Rejets Stoch Nord	-	-
14 : Rejets C.F.P.	-	-
<u>GRAVELINES</u>		
15 : Cartonneries mécaniques du Nord	Pollution organique	
16 : Rivière AA	-	-
<u>CALAIS</u>		
17 : Papeteries Boucher	Pollution organique	
18 : Tioxide	3091	3091
19-20 : Egouts	-	-
21 : Textile Courtauld	438	438



* Test de toxicité basé sur la mobilité de *Daphnia magna* selon la norme AFNOR T 90 301 (Avril 1974)
teneurs normales en Kéquitox/jour = 10 → 300.

ANNEXE 3 : Teneurs en Cuivre , Zinc et Manganèse des branchies, reins et foies des poissons du milieu naturel.

Date	lieu	Sain Nécrosé	Sexe	Taille cm	BRANCHIES			REINS			FOIES		
					Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm	Cu ppm	Zn ppm	Mn ppm
7/11	D	S	F	31	1,618	15,73	3,925	1,378	43,18	1,456	14,98	59,43	4,78
7/11	D	S	F	32	1,144	26,68	5,949	0,492	6,857	0,968	16,05	33,44	1,960
7/11	D	S	M	30,5	0,734	18,93	3,979	1,396	63,20	1,650	15,46	25,13	0,300
7/11	D	S	F	32,5	0,965	26,09	4,549	1,291	31,91	1,924	12,88	52,94	2,170
7/11	D	S	M	24	1,158	10,70	8,567	0,118	58,43	0,989	8,04	31,95	2,11
7/11	D	S	M	28	1,831	27,92	12,56	0,189	28,26	0,392	9,02	39,47	1,46
7/11	D	S	F	36	0,578	13,13	4,142	0,663	26,43	0,884	23,52	95,10	4,48
7/11	D	S	F	31	0,632	17,33	4,357	0,929	27,18	1,165	25,02	65,99	2,31
7/11	D	S	M	26	1,496	20,24	4,886	1,843	25,32	1,565	11;27	29,54	0,699
7/11	D	S	M	26	0,294	18,40	7,078	0,862	45,67	-	39,35	233,1	1,044
7/11	D	S	F	30	1,337	22,88	12,73	2,064	38,51	2,073	39,80	93,01	4,840
7/11	D	S	F	28	1,815	18,15	1,815	1,361	50,46	3,027	23,68	53,34	1,671
7/11	D	S	F	28	1,363	21,74	7,448	1,629	73,94	-	19,30	47,51	1,673
7/11	D	S	F	26	0,845	12,22	3,543	1,822	76,25	-	13,30	74,45	4,620
7/11	D	S	F	34	2,522	17,59	4,605	1,792	53,05	0,948	23,16	86,66	2,324
7/11	D	S	F	26	0,523	29,61	2,403	1,835	45,50	-	20,62	71,88	1,303
7/11	D	S	F	27	0,415	16,38	2,930	2,535	5,096	1,477	14,15	63,83	1,817
7/11	D	S	M	25	0,679	7;93	3,818	1,084	26,42	0,677	8,30	21,75	1,240
7/11	D	S	M	23	4,891	33,89	4,225	1,313	49,75	1,442	9,94	25,35	1,270
7/11	D	S	M	28	0,241	52,27	3,526	1,681	41,73	0,840	14,55	17,03	1,45
7/11	D	S	M	25	0,114	34,49	2,35	11,09	122,6	2,290	9,18	27,41	1,00
11/3	D	S	F	34	1,103	16,34	4,269	1,244	32,49	1,477	19,81	48,32	0,585
11/3	D	S	F	32	1,767	11,55	2,163	1,175	25,22	0,597	24,86	51,32	1,593
11/3	D	S	F	34	0,917	10,53	3,21	1,098	17,81	0,488	13,52	41,27	0,882
11/3	D	S	F	33	2,887	25,50	2,089	0,515	24,01	0,637	13,94	32,02	1,527
11/3	D	S	F	32	0,406	20,14	3,400	1,023	28,10	0,745	32,03	50,34	1,108
11/3	D	S	F	34	0,547	15,07	3,181	0,581	19,71	0,797	16,79	44,96	1,430
11/3	D	S	F	31	0,120	6,239	3,060	1,768	69,00	0,825	20,87	41,77	1,011
11/3	D	S	F	31	0,315	7,395	-	2,717	54,06	1,325	6,28	39,26	0,810
11/3	D	S	F	32	0,671	12,89	-	1,776	50,44	1,120	20,72	43,76	0,692
11/3	D	S	F	32	0,754	15,27	-	1,973	-	0,615	16,68	44,95	0,711
11/3	D	S	F	33	0,336	3,90	-	2,137	32,59	-	32,29	58,02	0,908
12/4	H	N	F	32	0,304	6,649	1,549	0,046	8,100	0,478	8,992	54,57	2,244
12/4	H	N	F	31	0,568	9,669	4,032	2,460	54,62	-	4,62	8,80	1,960
12/4	H	N	F	35	0,215	7,631	-	1,841	42,89	-	38,25	153,45	1,950
12/4	H	N	F	31	0,252	12,93	-	1,508	55,52	0,730	45,05	58,90	-
12/4	H	N	F	30	0,897	17,56	-	2,370	21,03	-	14,71	19,15	-
12/4	H	N	F	31	0,485	25,49	1,610	1,610	59,83	0,620	6,31	24,84	-
17/4	D	N	F	32	0,292	10,24	3,089	1,174	18,00	1,607	6,357	15,22	5,69
17/4	D	N	F	34	1,192	55,13	2,935	4,613	56,08	0,948	3,05	43,47	0,797
17/4	D	N	F	33	1,491	29;67	1,754	2,307	40,23	0,461	19,34	42,36	1,200



ANNEXE 4 : ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES

d'après : S.FRONTIER . Méthode statistique
Masson 1981. 246p.

1 : Comparaison des pourcentages :

Les fréquences calculées, sont comparées deux à deux en fonction de la fréquence moyenne pondérée, calculée comme suit:

$$F = \frac{N_1 F_1 + N_2 F_2}{N_1 + N_2}$$

$$F_1 - F_2$$

Test de comparaison :

$$\sqrt{F(1-F) \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}$$

où F_1 est la fréquence obtenue pour un échantillon N_1
 F_2 est la fréquence obtenue pour un échantillon N_2

2 : Comparaison de moyennes :

Compte tenu des faibles échantillons ($N \leq 11$) Le test de normalité n'a pas été effectué.

Les moyennes calculées sont comparées deux à deux par le test t qui suit une loi de Student.

$$t = \frac{|M_1 - M_2|}{\sqrt{\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2}}}$$

où M_1 = Moyenne calculée sur un effectif N_1 d'écart type S_1
 M_2 = Moyenne calculée sur un effectif N_2 d'écart type S_2

Le nombre de degrés de liberté est estimé par $N = (N_1 + N_2) - 2$, si les variances S_1^2 et S_2^2 sont peu différentes. Dans le cas contraire le nombre de degrés de liberté est défini par la formule de Welsch. (Communication personnelle de S. Frontier)

$$k = \frac{\left(\frac{S_1^2}{N_1} + \frac{S_2^2}{N_2} \right)^2}{\frac{1}{N_1 - 1} \left(\frac{S_1^2}{N_1} \right)^2 + \frac{1}{N_2 - 1} \left(\frac{S_2^2}{N_2} \right)^2}$$

3 : Corrélations :

Le coefficient de corrélation est défini par :

$$r = \frac{\sum_1^N x_i y_i - N \bar{x} \bar{y}}{\sqrt{\left(\sum_1^N x_i^2 - N \bar{x}^2\right) \left(\sum_1^N y_i^2 - N \bar{y}^2\right)}}$$

où x_i et y_i sont les variables aléatoires à corrélérer dont les moyennes sont \bar{x} et \bar{y} , N étant le nombre de couples (x_i, y_i) formé.

L'équation de la droite de régression s'écrit : $y = a_1 x + a_0$

$$\text{La pente est } a_1 = \frac{\sum_1^N x_i y_i - \frac{\sum_1^N x_i \sum_1^N y_i}{N}}{\sum_1^N x_i^2 - \frac{(\sum_1^N x_i)^2}{N}}$$

et l'ordonnée à l'origine $a_0 = \bar{y} - a_1 \bar{x}$

Le coefficient de corrélation est estimé à $(N-2)$ degrés de liberté et comparé au r de la table au seuil de 5% .

ANNEXE 5 : Concentration en métaux (Cu , Zn) des branchies, reins et foies de flets lors de l'intoxication par le zinc.

DUREE D'INTOXICATION		1 h		5 h		18 h		48 h		4 J	
Poissons intoxiqués I		I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
Poissons témoins T											
Nombre de poissons		2	2	2	2	5	0	1	0	1	1
Teneur en métaux des Branchies (µg/g P.F)	Cu	2,744 + 1,492	8,314	2,876 + 2,860	0,545	2,245 + 2,103	-	2,245	-	2,291	-
	Zn	58,12 + 6,427	74,76	43,005 + 0,063	21,02	39,86 + 12,68	-	70,47	-	108,9	-
Teneur en métaux des Reins (µg/g P.F)	Cu	4,07 + 0,007	3,80 + 2,557	1,973 + 2,329	8,581 + 8,01	3,190 + 1,912	-	1,058	-	3,431	2,414
	Zn	26,195 + 1,237	88,63 + 62,27	54,75 + 2,036	146,50 + 103	90,382 + 56,66	-	60,14	-	86,19	108,54
Teneur en métaux des Culots de foie (µg/g P.F)	Cu	2,620 + 1,314	1,278 + 0,608	1,438 + 0,381	1,058 + 0,053	1,170 + 0,419	-	0,738	-	2,010	2,86
	Zn	5,56 + 0,608	6,495 + 1,332	6,991 + 1,518	6,767 + 0,285	5,88 + 1,937	-	7,516	-	4,197	6,03
Teneur en métaux des surnageants de foie (µg/g P.F)	Cu	-	-	-	-	10,58 + 7,49	-	1,947	-	9,262	-
	Zn	-	-	-	-	14,94 + 12,20	-	3,32	-	29,18	-
DUREE D'INTOXICATION		9 J		18 J		27 J		43 J			
Poissons intoxiqués I		I	T	I	T	I	T	I	T		
Poissons témoins T											
Nombre de poissons		1	1	1	1	2	1	1	1		
Teneur en métaux des Branchies (µg/g P.F)	Cu	1,439	1,278	-	-	-	-	-	-		
	Zn	40,59	34,31	-	-	-	-	-	-		
Teneur en métaux des Reins (µg/g P.F)	Cu	4,147	3,915	-	-	-	-	-	-		
	Zn	125,23	50,83	-	-	-	-	-	-		
Teneur en métaux des Culots de foie (µg/g P.F)	Cu	1,179	1,182	2,335	2,829	4,198 + 1,212	2,758	5,880	2,146		
	Zn	5,695	5,062	12,173	4,355	15,273 + 4,779	3,188	13,390	8,365		
Teneur en métaux des surnageants de foie (µg/g P.F)	Cu	10,71	-	9,343	17,557	17,875 + 2,996	9,992	48,297	8,224		
	Zn	34,36	8,200	20,170	17,474	40,461 + 27,16	16,186	102,389	21,856		



ANNEXE 6 : Concentration en métaux (Cu , Zn, Pb) des branchies
Reins et foies de filets lors de l'intoxication
par le plomb.

DUREE D'INTOXICATION	1 h		4 h		24 h		48 h		4 J	
Poissons intoxiqués I Poissons témoins T	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
Nombre de poissons	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
Teneur en Cu métaux des Branchies. (µg/g P.F)	1,278	-	2,705	0,431	2,694	0,921	0,865	0,722	0,475	0,952
Zn	48,10	-	34,77	8,534	30,47	1,719	2,793	0,762	6,530	3,860
Pb	0,949	-	0,521	0,646	0,638	0,443	1,033	0,283	4,930	1,938
Teneur en Cu métaux des Reins. (µg/g P.F)	1,366	-	2,741	-	1,959	0,662	2,851	0,929	1,264	0,760
Zn	149,5	-	46,21	-	46,77	23,06	65,63	34,36	92,60	22,99
Pb	1,426	-	0,592	-	0,469	0,310	1,360	0,260	1,919	0,184
Teneur en Cu métaux des Culots de foie (µg/g P.F)	4,377	-	3,565	1,185	2,089	1,326	5,996	1,537	1,831	3,759
Zn	12,038	-	9,746	5,539	4,205	21,213	58,260	15,667	64,627	23,98
Pb	0,954	-	1,026	0,226	0,759	0,036	0,840	0,048	0,790	0,065
Teneur en Cu métaux des surnageants de de Foie. (µg/g P.F)	21,220	-	32,742	15,56	15,32	5,993	13,31	11,21	22,86	20,12
Zn	33,89	-	37,252	38,54	46,84	25,816	80,556	64,36	11,86	25,14
Pb	1,900	-	1,339	0,109	1,366	0,110	1,437	0,090	1,412	0,101
DUREE D'INTOXICATION	8 J		18 J		20 J		27 J		43 J	
Poissons intoxiqués I Poissons témoins T	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
Nombre de poissons	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
Teneur en Cu métaux des Branchies (µg/g P.F)	0,917	0,029	-	-	0,724	-	-	-	-	-
Zn	-	-	-	-	32,61	-	-	-	-	-
Pb	3,174	0,915	-	-	0,644	-	-	-	-	-
Teneur en Cu métaux des Reins (µg/g P.F)	1,059	0,378	-	-	1,231	-	-	-	-	-
Zn	59,17	42,19	-	-	121,22	-	-	-	-	-
Pb	1,550	0,439	-	-	1,310	-	-	-	-	-
Teneur en Cu métaux des Culots de foie (µg/g P.F)	2,840	4,740	3,405	5,453	2,804	-	2,454	2,758	1,464	2,146
Zn	1,514	63,635	6,120	8,460	9,838	-	7,216	3,188	7,574	3,365
Pb	0,875	0,078	0,881	0,083	0,940	-	1,976	0,208	2,965	0,096
Teneur en Cu métaux des surnageants de Foie (µg/g P.F)	26,25	23,48	8,204	8,945	9,176	-	9,496	9,992	2,716	8,224
Zn	33,43	54,11	13,320	14,474	13,840	-	23,441	16,186	9,429	21,856
Pb	1,528	0,040	0,696	0,057	1,432	-	1,780	0,028	0,471	0,036

ANNEXE 7 : Concentration en métaux (Cu , Zn , Cd) des branchies, reins et foies de filets lors de l'intoxication par le cadmium.



DUREE D'INTOXICATION	1 J		2 J		10 J		20 J		28 J		30 J		40 J	
	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T
Poissons intoxiqués Poissons témoins T	1	1	1	1	3	0	2	2	2	2	2	1	1	0
Nombre de poissons														
Teneur en métaux des Branchies (µg/g P.F)	Cu 0,851	Cu 0,963	Cu 0,954	Cu 0,493	Cu 0,756 + 0,022	Cu -	Cu 0,612 + 0,118	Cu 0,564 + 0,157	Cu 1,347 + 0,270	Cu 0,692	Cu 0,481 + 0,101	Cu 0,581	Cu 0,805	Cu -
	Zn 21,54	Zn 22,50	Zn 35,22	Zn 21,677	Zn 21,996 + 1,583	Zn -	Zn 15,187 + 6,256	Zn 23,826 + 5,77	Zn 20,634 + 0,925	Zn 29,39	Zn 19,055 + 7,247	Zn 24,44	Zn 31,506	Zn -
	Cd 1,470	Cd 0,192	Cd 1,155	Cd 0,164	Cd 4,171 + 0,989	Cd -	Cd 4,701 + 1,209	Cd 0,277 + 0,332	Cd 7,285 + 31788	Cd 0,428	Cd 10,783 + 2,108	Cd 0,085	Cd 11,740	Cd -
Teneur en métaux des Reins (µg/g P.F)	Cu 1,288	Cu 1,388	Cu 1,565	Cu 1,449	Cu 1,433 + 0,346	Cu -	Cu 1,683 + 0,338	Cu 1,013 + 0,685	Cu 1,433 + 0,198	Cu 1,077	Cu 1,848 + 0,615	Cu 1,311	Cu 2,246	Cu -
	Zn 73,62	Zn 59,47	Zn 83,85	Zn 56,18	Zn 21,06 + 9,67	Zn -	Zn 17 + 2,280	Zn 23,06 + 17,98	Zn 29,94 + 1,307	Zn 39,39	Zn 38,6 + 9,984	Zn 14,79	Zn 11,29	Zn -
	Cd 2,711	Cd 0,059	Cd 4,892	Cd 0,250	Cd 3,549 + 2,779	Cd -	Cd 9,353 + 6,542	Cd 0,152 + 0,130	Cd 21,166 + 8,041	Cd 0,082	Cd 10,813 + 7,43	Cd 0,113	Cd 67,564	Cd -
Teneur en métaux des Culots de roie (µg/g P.F)	Cu 3,326	Cu 2,442	Cu 2,736	Cu 13,719	Cu 3,070 + 0,923	Cu -	Cu 4,338 + 2,213	Cu 4,418 + 1,802	Cu 3,028 + 0,156	Cu 1,071	Cu 5,366 + 0,555	Cu 1,058	Cu 3,214	Cu -
	Zn 16,269	Zn 18,812	Zn 13,529	Zn 26,598	Zn 12,021 + 4,334	Zn -	Zn -	Zn 5,835 + 2,163	Zn 8,154 + 1,040	Zn 3,843	Zn 11,641 + 0,578	Zn 4,250	Zn 4,680	Zn -
	Cd 1,085	Cd 0,330	Cd 2,660	Cd 0,186	Cd 3,804 + 0,034	Cd -	Cd 13,892 + 4,854	Cd 0,099 + 0,118	Cd 12,347 + 0,819	Cd 0,024	Cd 10,185 + 1,180	Cd 0,108	Cd 10,332	Cd -
Teneur en métaux des Culots de foie (µg/g P.F)	Cu 5,395	Cu 3,724	Cu 3,760	Cu 3,258	Cu 10,690 + 4,101	Cu -	Cu 9,195 + 5,052	Cu 8,02 + 1,874	Cu 15,983 + 0,758	Cu 1,836	Cu 17,268 + 0,266	Cu 3,438	Cu 10,879	Cu -
	Zn 21,724	Zn 20,58	Zn 30,359	Zn 24,077	Zn 22,694 + 3,590	Zn -	Zn 19,426 + 8,373	Zn 16,55 + 9,49	Zn 22,738 + 11,501	Zn 30,205	Zn 18,985 + 3,029	Zn 9,372	Zn 20,194	Zn -
	Cd 2,626	Cd 0,165	Cd 3,932	Cd 0,256	Cd 18,752 + 6,557	Cd -	Cd 36,746 + 20,415	Cd 0,528 + 0,048	Cd 78,024 + 4,261	Cd 0,155	Cd 47,342 + 11,149	Cd 0,610	Cd 84,132	Cd -

ANNEXE 8 : LISTE DES FIGURES

	pages
Fig 1 : Réseau de collecte du matériel biologique sur le littoral français	4
Fig 2 : Répartition des traits de chalut pour le flet.....	9
Fig 3 : Localisation des chalutages, stations d'hydrologie et de Molysmologie lors de la campagne Cryos	24 à 26
Fig 4 : Sources de rejets de polluants métalliques sur le littoral de Calais à Dunkerque.....	29
Fig 5 : Répartition géographique des pollutions par arrondissement en 1979	33
Fig 6 : Teneurs en métaux lourds dissous en différents points du littoral français en 1979.....	35
Fig 7 : Teneurs en métaux lourds dissous en différents points du littoral français en 1980	36
Fig 8 : Principaux contaminants métalliques des sédiments.....	41
Fig 9 : Contaminants métalliques majeurs des moules et des coques.	
Fig 10: Intensité du courant obtenu pour l'échantillon de plomb et les trois ajouts par polarographie.....	82
Fig 11: Courbe d'étalonnage pour le plomb.....	83
Fig 12: Teneur en zinc des organes de flets intoxiqués dans 10ppm de $ZnCl_2$	86
Fig 13: Cinétique du Zinc lors de l'intoxication par le zinc.....	87
Fig 14: Cinétique du cuivre lors de l'intoxication par le zinc.....	88
Fig 15: Relation entre la teneur en zinc et la teneur en cuivre du surnageant de foie.....	90
Fig 16: Relation entre la teneur en zinc et la teneur en cuivre du culot de foie.....	90
Fig 17: Relation entre la teneur en cuivre du surnageant de foie et du rein.....	90
Fig 18: Teneur en plomb des organes de flets intoxiqués dans 10 ppm de $PbCl_2$	92
Fig 19: Cinétique du plomb lors de l'intoxication par le plomb dans le culot de foie	94
Fig 20: Cinétique du plomb lors de l'intoxication par le plomb dans le sang total.....	94
Fig 21: Relation entre la teneur en zinc des branchies et du culot de foie lors de l'intoxication par le plomb.....	96
Fig 22: Teneur en cadmium des organes de flets intoxiqués dans 10 ppm de $CdCl_2$	98
Fig 23: Cinétique du cadmium lors de l'intoxication par le cadmium...	100
Fig 24: Cinétique du zinc dans le culot lors de l'intoxication par le cadmium.....	101
Fig 25: Relation entre la teneur en cadmium et la teneur en cuivre dans les reins.....	102
Fig 26: Relation entre la teneur en cadmium et la teneur en zinc du culot de foie.....	102
Fig 27: Relation entre la teneur en cadmium des branchies et du surnageant de foie	104

Fig 28: Relation entre la teneur en cadmium du surnageant de foie et du culot.....	104
Fig 29: Relation entre la teneur en cadmium du surnageant de foie et du rein.....	104
Fig 30: Calibration des colonnes suivant la relation : Log du poids moléculaire - constante d'élution.....	121
Fig 31: Profils d'élution sur séphadex G 75 (40 x 2,6 cm) de la fraction soluble de foie de flets intoxiqués pendant 1 Jour dans 10 ppm de CdCl ₂	123
Fig 32: Spectre ultra-violet de la fraction A du pic II obtenu par chromatographie.....	125
Fig 33: Profils chromatographiques des différentes fractions obtenues par fractionnement acétonique.....	127
Fig 34: Chromatographie d'un extrait de foie de flets non intoxiqué traité par chauffage à 80°C pendant 10 minutes.....	129
Fig 35: Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de la fraction II de foies de flets séparée par filtration sur séphadex G 75.....	133
Fig 36: Chromatographie sur DEAE Cellulose (colonne de 1,5x20 cm) de la fraction II obtenue par gel filtration sur séphadex G 75 d'un foie de flet non intoxiqué	135
Fig 37: Test de précipitation des protéines.....	137
Fig 38: Profil de la teneur en cuivre et zinc des fractions obtenues par chromatographie sur DEAE Cellulose.....	137
Fig 39: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets intoxiqués dans 10 ppm de CdCl ₂	142-143
Fig 40: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets non intoxiqués.....	144
Fig 41: Relation entre la proportion de cadmium associé au pic II (en % du cadmium de l'extrait soluble de foie) et la teneur en cadmium de cet organe.....	145
Fig 42: Proportion de métaux associés au pic II (en % de métaux de l'extrait soluble de foie) en fonction du temps d'intoxication	
Fig 43: Teneur en cuivre, zinc et cadmium du pic II obtenu par chromatographie sur gel de séphadex G 75, de la fraction soluble de foies de flets intoxiqués dans 10 ppm de CdCl ₂	150
Fig 44: Evolution de la teneur en cadmium (en µg/g de poids frais) des différentes fractions cellulaires du foie de flet au cours de l'intoxication par 10 ppm de CdCl ₂	151
Fig 45: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets intoxiqués dans 10 ppm de PbCl ₂ pendant 43 jours.....	155
Fig 46: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets non intoxiqués.....	157
Fig 47: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets intoxiqués dans 10 ppm de ZnCl ₂ pendant 43 jours.....	159
Fig 48: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets non intoxiqués.....	160
Fig 49: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets d'Hardelot.....	165
Fig 50: Profils chromatographiques de la fraction soluble de foies de flets de Dunkerque obtenus par gel filtration sur séphadex G75...	166

ANNEXE 9 : LISTE DES TABLEAUX

	pages
1 : Evaluation du tonnage et du pourcentage des principales espèces pêchées en 1979/1980 et 1981/1982	8
2 : Repartition par espèce des poissons nécrosés récoltés de 1979 à 1982	11
3 : Repartition par espèce et par zone des poissons récoltés lors de la campagne océanographique "Cryos"	23
4 : Estimation des rejets polluants sur le littoral français de la mer du Nord en 1976.....	31
5 : Teneur en métaux de l'eau de mer de Dunkerque comparée aux valeurs trouvées pour l'Europe.....	37
6 : Teneur en polluants métalliques à Dunkerque	38
7 : Teneur en polluants métalliques en divers points du littoral de la mer du Nord ;.....	39
8 : Comparaison de la teneur en métaux lourds de l'Aa et de la station 1 de Dunkerque en 1978	40
9 : Teneur en métaux des sédiments de Dunkerque	40
10 : Concentration en métaux lourds des moules et coques sur le littoral de Ault à Dunkerque.....	44
11 : Classification des éléments selon leur toxicité.....	46
12 : Traitement des échantillons : Etapes de préparation et Analyses.....	62
13 : Conditions d'utilisation du spectrophotomètre d'absorption atomique	64
14 : Résumé des différences significatives obtenues.....	72
15 : Teneurs moyennes en cuivre et zinc des organes de flets témoins et intoxiqués par 10 ppm de $ZnCl_2$	85
16 : Teneurs moyennes des organes de flets témoins et intoxiqués par 10 ppm de $PbCl_2$	93
17 : Teneur en plomb du sang total des flets intoxiqués dans 10 ppm de $PbCl_2$	95
18 : Teneurs moyennes des organes de flets témoins et intoxiqués par 10 ppm de $CdCl_2$ (Cu,Zn,Cd)	99
19 : Propriétés des métallothionéines.....	111
20 : Protocole expérimental utilisé pour la caractérisation des métallothionéines	119
21 : Composition en acides aminés de la protéine du foie de flet liant le cadmium (obtenue par gel filtration sur séphadex G 75) comparée à la composition en acides aminés de quelques métallothionéines connues	139
22 : Distribution du cadmium, du zinc et du cuivre dans le foie de flets non intoxiqués.....	146
23 : Distribution du cadmium, du zinc et du cuivre dans le foie de flets intoxiqués dans 10 ppm de $CdCl_2$ en fonction du temps d'intoxication.....	149
24 : Distribution du zinc et du cuivre dans le foie des flets témoins et intoxiqués dans 10 ppm de $ZnCl_2$ en fonction du temps d'intoxication.....	161

