

50376
1992
151

61228

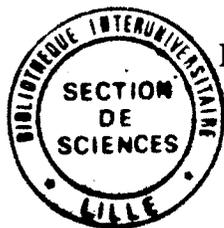
50376
1992
151

N° d'ordre : 959

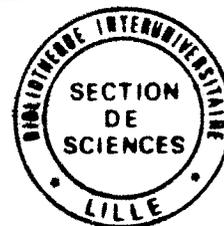
STATION MARINE DE WIMEREUX

THESE PRESENTEE POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE
EN
BIOLOGIE ET SANTE

BIOACCUMULATION METALLIQUE ET
METALLOTHIONEINES CHEZ TROIS ESPECES
DE POISSONS DU LITTORAL NORD-PAS DE CALAIS



Sabine DUQUESNE



Thèse soutenue le 7 juillet 1992 devant le jury composé de :

Président	S. FRONTIER
Rapporteurs	S. PUISEUX-DAO
	P. SAUTIERE
Examineurs	R. COSSON
	F. GALGANI
	A. RICHARD, Directeur de Thèse
	M. WARTEL

AVANT PROPOS

Avant de présenter ce travail, je tiens à remercier, en premier lieu, les personnes qui ont accepté de le juger :

- Monsieur le Professeur S. FRONTIER, de l'Université de Lille I, Directeur de la Station Marine de Wimereux, qui a accepté de présider ce jury. Je tiens à le remercier également pour ses conseils en matière d'Analyses de Données ;

- Madame le Professeur PUISEUX-DAO, de l'Université de Paris VII, qui me fait l'honneur de participer à ce jury. Je la remercie vivement d'avoir accepté d'être rapporteur malgré ses nombreuses responsabilités ;

- Monsieur le Professeur SAUTIERE, de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, que je tiens à remercier pour ses conseils concernant les analyses biochimiques, les analyses d'acides aminés et l'intérêt porté à mon travail qu'il illustre aujourd'hui encore en acceptant d'être rapporteur ;

- Monsieur le Professeur A. RICHARD, de l'Université de Lille I, qui est à l'origine de ces recherches qu'il a mises en place à la Station Marine. Je le remercie pour m'avoir confié ce sujet de thèse et dirigée ;

- Monsieur le Docteur F. GALGANI, du centre IFREMER de Nantes, qui a suivi avec intérêt l'avancement de mon travail. Je le remercie également pour sa disponibilité et ses suggestions ainsi que pour m'avoir accueillie dans son laboratoire ;

- Monsieur le Docteur R. COSSON, de la Faculté de Pharmacie de Nantes, avec qui j'ai pu avoir des discussions et des échanges d'idées fructueux sur les métallothionéines. Je le remercie vivement et amicalement pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail ;

- Monsieur le Professeur WARTEL, de l'Université de Lille I, que je remercie également pour ses conseils concernant les techniques d'analyses de chimie et pour m'avoir permis de réaliser des dosages dans son laboratoire.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance et ma gratitude à tous ceux qui ont aidé, à divers titres, à la réalisation de ce travail.

- Mes remerciements vont tout d'abord aux Docteurs C. HOGSTRAND et C. HAUX de l'Université de Göteborg chez qui j'ai pu réaliser les dosages radioimmunologiques. Je leur suis très reconnaissante pour les compétences, le temps et le matériel qu'ils ont mis à ma disposition ainsi que pour l'accueil chaleureux et la gentillesse qu'ils ont témoigné à mon égard.

- Je remercie le Dr A. SOUPLET et son équipe du centre IFREMER de

Boulogne-sur-Mer, qui ont effectués les lectures d'otolithes ainsi que le Dr D. WOUTERS de l'Institut de Recherche sur le Cancer de Lille pour sa disponibilité et ses conseils concernant la biochimie des protéines et les analyses d'acides aminés.

- J'adresse un grand remerciement à tout le personnel technique de la Station Marine qui a collaboré à ce travail :

Madame N. DEGROS pour la mise en place des techniques chromatographiques en HPLC et sa collaboration lors des analyses ;

Madame M.A. JANQUIN pour son travail en immunologie, ses conseils techniques, son aide et soutien moral ; qu'elle trouve ici le témoignage d'une réelle amitié ;

Monsieur D.MENU qui a réalisé l'iconographie de cet ouvrage avec talent, dévouement... sans oublier son humour! je tiens à lui exprimer mes remerciements et ma sympathie.

Je les remercie également ainsi que Monsieur D. HILDE pour leur contribution lors des analyses chimiques. Je tiens aussi à les remercier ainsi que le Pr. A. RICHARD, le Dr J. LEMAIRE et l'équipage du NO SEPIA II pour l'aide apportée lors des sorties en mer.

J'aurais aimé pouvoir remercier Madame M. PANNIER (†) au même titre que ses collègues et amis; elle avait commencé à dactylographier cette thèse avec la patience et la gentillesse dont elle a toujours fait preuve. Merci à Emmanuelle GOSSET qui, dès son arrivée à la Station Marine, a été très compréhensive et dévouée pour m'aider à achever la frappe de ce manuscrit.

- Je tiens à remercier chaleureusement mes collègues et amis, chercheurs ou étudiants pour leur aide, leur soutien et la sympathie qu'ils m'ont témoignée : Jacques, Dominique, Jean-Marie, Jean-Michel, Françoise, Anne, Christophe et Christophe, Aline.

Que tous ceux que je n'ai pas cités veuillent bien me pardonner ces oublis.

Pendant ces trois années d'études, j'ai bénéficié d'une allocation de recherche accordée par la Région Nord-Pas-de-Calais et IFREMER. Mon déplacement en Suède a également été financé par IFREMER. Je tiens donc à remercier IFREMER et le Conseil Régional.

Enfin, je dédie ce travail à mes parents, à Yannick, à mes amis.

Ce travail n'aurait pû être réalisé sans l'aide financière:

- de la Région Nord-Pas de Calais (Contrat Région Nord-Pas de Calais, Université de Lille I, 999/38 R0 1857, Convention 88.26.67 du 08/07/88);

- d'IFREMER et la Région Nord-Pas de Calais qui m'ont fait bénéficier d'une allocation de recherche du 1/10/88 au 30/09/90 (IFREMER AF/PP n°88-4267; Région: délibération n°88.0997 du 07/10/88) et prolongée jusqu'au 31/09/91 par décision du 17/07/90 (IFREMER, 90/128; Région Nord-Pas de Calais, 91 120017).

- d'IFREMER (centre de Nantes) qui a financé les frais du stage en Suède effectué du 08/02/91 au 08/03/91 (contrat n°91 5 440 026)

SOMMAIRE

Sommaire.....	2
Résumé-Abstract.....	6
Liste des figures.....	7
Liste des tableaux.....	12
CHAPITRE I : INTRODUCTION GENERALE.....	15
1. <u>Introduction</u>	15
2. <u>Les métaux lourds dans l'écosystème aquatique</u>	18
3. <u>Les métaux lourds dans les organismes</u>	19
3.1. Métaux essentiels et non-essentiels.....	19
3.2. Métaux chez les poissons.....	20
4. <u>Les indicateurs biochimiques de la pollution par les métaux lourds</u>	25
4.1. Intérêt des indicateurs biochimiques.....	25
4.2. Indicateurs potentiels de la pollution par les métaux lourds ..	25
5. <u>Les métallothionéines</u>	27
5.1. Caractéristiques des métallothionéines.....	27
5.2. Présence et polymorphisme.....	27
5.3. Structure, immunoréactivité et liaison des métaux lourds	28
5.4. Synthèse et dégradation.....	31
5.5. Fonctions.....	33
5.6. Autres métalloprotéines.....	36
5.7. Quantification des métallothionéines.....	37
6. <u>Présentation des sites d'étude</u>	43
6.1. Cadre de l'étude : pollution métallique du littoral Nord de la France	43
6.2. Présentation des sites de prélèvements et des espèces étudiées.	49
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....	53
1. <u>Description des méthodes d'échantillonnage</u>	53
1.1. Prélèvements du matériel biologique.....	53
1.2. Prélèvements de sédiments.....	53
1.3. Prélèvements des otolithes.....	53

2. <u>Séparation et caractérisation des métalloprotéines hépatiques</u>	55
2.1. Intoxication des poissons par du Cd.....	55
2.2. Extraction tissulaire.....	55
2.3. Chromatographie de filtration sur gel.....	56
2.4. Dosages des métaux par spectrophotométrie d'absorption atomique.	57
2.5. Mesure de l'absorption dans l'Ultra-Violet.....	57
2.6. Chromatographies par HPLC.....	58
2.7. Analyses d'acides aminés.....	59
3. <u>Quantification des métallothionéines</u>	59
3.1. Essai de mise au point d'un dosage des métallothionéines par colorimétrie.....	59
3.2. Préparation des échantillons pour les dosages des MT et pour le dosage des métaux dans les fractions solubles des foies.....	61
3.3. Dosage des MT par polarographie à impulsions différentielles...	61
3.4. Dosage des MT par radiommunologie (RIA).....	65
3.5. Dosage des MT par ELISA.....	69
4. <u>Analyse des teneurs métalliques des sédiments et des échantillons biologiques</u>	71
4.1. Sédiments.....	71
4.2. Echantillons biologiques.....	75
4.3. Dosage des métaux.....	76
5. <u>Analyse statistique des données</u>	76
5.1. Régressions linéaires et tests de comparaison de moyennes.....	76
5.2. Analyse en composantes principales.....	77
CHAPITRE III : TENEURS METALLIQUES DES SEDIMENTS ET POISSONS DU LITTORAL NORD-PAS DE CALAIS.....	79
1. <u>Teneurs métalliques des sédiments</u>	79
1.1. Teneurs métalliques du sédiment total.....	81
1.2. Teneurs métalliques de la fraction fine des sédiments....	83
1.3. Extraction des métaux par l'acide acétique.....	84
2. <u>Teneurs métalliques des organes de poissons</u>	85
2.1. Résultats	85
2.1.1. Comparaison par organe des teneurs métalliques des trois espèces de poissons.....	89

2.1.2. Comparaison des teneurs métalliques des différents organes.....	95
2.1.3. Influence du sexe sur les teneurs métalliques des organes	99
2.1.4. Influence de l'âge sur les teneurs métalliques des organes.....	99
2.1.5. Comparaison des teneurs métalliques des organes de poissons prélevés sur différents sites.....	109
2.1.6. Comparaison des teneurs métalliques des organes de poissons prélevés à différentes saisons.....	117
2.1.7. Bilan concernant les teneurs métalliques des branchies.	131
2.1.8. Bilan concernant les teneurs métalliques hépatiques....	132
2.1.9. Bilan concernant les teneurs métalliques des muscles...	133
2.2. <u>Discussion</u>	134

CHAPITRE IV : CARACTERISATION DES METALLOPROTEINES

HEPATIQUES DE POISSONS.....	147
1. <u>Résultats</u>	147
1.1. Caractéristiques des protéines isolées par chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75.....	147
1.1.1. Echantillons provenant de poissons prélevés en milieu naturel.....	149
1.1.2. Echantillons provenant de poissons contaminés en laboratoire.....	151
2.1. Caractéristiques des protéines isolées par chromatographies HPLC.....	155
2.1.1. Echantillons analysés sur colonne DEAE.....	155
2.1.2. Echantillons analysés sur colonne en phase inverse....	167
2. <u>Discussion</u>	172

CHAPITRE V : TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DES

METALLOTHIONEINES	181
1. <u>Résultats</u>	181
1.1. Dosage des MT par mesure colorimétrique des SH.....	181

1.2. Dosage des MT en immunologie.....	183
1.2.1. Dosage en RIA.....	183
1.2.2. Dosage en ELISA.....	187
1.3. Dosage des MT par DPP.....	191
1.4. Comparaison des différentes techniques.....	191
2. <u>Discussion</u>	195

**CHAPITRE VI : TENEURS HEPATIQUES EN METAL ET METALLOTHIONEINES
DES DIFFERENTES ESPECES DE POISSONS..... 201**

1. <u>Résultats</u>	201
1.1. Comparaison des teneurs en métal et métallothionéines des trois espèces.....	201
1.2. Influence du sexe sur les teneurs en métal et MT.....	207
1.3. Influence de l'âge sur les teneurs en métal et MT.....	207
1.4. Comparaison des teneurs en métal et MT de poissons prélevés sur différents sites.....	207
1.5. Variations des teneurs en métal et MT en fonction de l'époque de prélèvements.....	215
1.6. Comparaison des résultats concernant les prélèvements de l'année 1989 et 1991.....	219
1.7. Répartition des métaux dans les différentes gammes de poids moléculaire.....	222
2. <u>Discussion</u>	224

CHAPITRE VII : BILAN ET CONCLUSIONS..... 235

Liste des abréviations.....	244
Références bibliographiques.....	245
Annexes.....	259

BIOACCUMULATION METALLIQUE ET METALLOTHIONEINES CHEZ TROIS ESPECES
DE POISSONS DU LITTORAL NORD-PAS DE CALAIS.

Ce travail concerne l'impact de la contamination par les métaux lourds du littoral Nord-Pas de Calais sur les niveaux de concentrations métalliques de différents organes et les teneurs en métallothionéines hépatiques des limandes, limande-soles et morues prélevées dans cette zone.

Ces poissons se distinguent par des teneurs élevées en Pb au niveau du muscle. Les teneurs en métal du foie et des branchies varient selon la contamination du milieu environnant. Le mode de vie du poisson influence également les concentrations hépatiques. Des métalloprotéines hépatiques, définies sous le nom de métallothionéines (MT), intervenant dans la détoxification des métaux lourds, ont été détectées chez les trois espèces étudiées. Chez les pleuronectidés (limandes et limande-soles), deux isoformes de ces protéines existent. Différentes techniques de dosages des MT ont été testées (DPP, colorimétrie des SH, immunologie). Après détermination du contenu en MT par immunologie (RIA et ELISA), on a montré qu'au niveau du foie, les rapports (teneurs en métal/teneurs en MT) diffèrent selon les espèces. D'autre part, les teneurs hépatiques en MT, Cu et Zn des limandes et morues capturées sur les sites les plus contaminés sont supérieures à celles des individus provenant des sites "témoins". Si l'on exclut le facteur "reproduction", c'est-à-dire si les poissons sont prélevés en dehors de la période de maturation des gonades, les MT peuvent être utilisées en tant que bioindicateur de pollution par le Cu et le Zn chez ces deux espèces.

Mots-clés: métaux lourds, contamination, milieu naturel, poisson, métallothionéine, détoxification, bioindicateur.

METALLIC BIOACCUMULATION AND METALLOTHIONEINS IN THREE FISH
SPECIES FROM COASTS OF NORD-PAS DE CALAIS COUNTY

The aim of this work was to study the impact of the contamination by heavy metals from the coasts of Nord-Pas de Calais County on the levels of metal concentrations in different tissues and on the amounts of hepatic metallothionein of dab, lemon-dab and cod.

The fish are characterized by high levels of Pb in muscle. Variations in liver and gill metal concentrations can be related with environmental contamination. Behaviour of fish is also significant in influencing hepatic concentrations. Hepatic metalloproteins, defined as metallothionein, involved in detoxification of heavy metals were detected in three fish species studied. We show the existence of two isoforms of those proteins in flatfish (dab and lemon-dab). Several techniques to quantify metallothioneins have been tested (DPP, colorimetric method of thiols, immunological methods). After measurements of MT by immunoassays (RIA, ELISA), we have shown that the ratios (levels of metal/levels of MT) are different in the liver of each species.

The hepatic levels of MT, Cu and Zn are higher in dab and cod caught at the most contaminated sites than at the reference sites. If sampling is avoided during the period of sexual maturation, i.e. excluding the parameter "reproduction", MT can be used as a bioindicator of Cu and Zn pollution for those two species.

Key-words: heavy metal, contamination, environmental condition, fish, metallothionein, detoxification, bioindicator.

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Séquences de MT provenant de différentes espèces d'oiseaux, de mammifères et de poissons. Les acides aminés non précisés sont les mêmes que ceux du poulet. Les délétions sont indiquées par un tiret (d'après COSSON 1987 ; KAY et al., 1991)
- Figure 2 : Principaux contaminants métalliques des sédiments (d'après L'HOPITAULT et al., 1983)
- Figure 3 : Contaminants métalliques majeurs des moules et des coques (d'après L'HOPITAULT, 1982)
- Figure 4 : Localisation des sites de prélèvements
- Figure 5 : Courbe de calibration de la glutathion
- Figure 6 : Réponse électrochimique de l'analyse des MT contenues dans différents volumes d'un surnageant hépatique de limande contaminée en laboratoire, dosées par DPP (électrode utilisée en mode "DME")
- Figure 7 : Courbe de calibration de la MT de foie de lapin
- Figure 8 : Principe du dosage radioimmunologique
- Figure 9 : Courbe de titration du sérum anti-MT de perche produit par le lapin
- Figure 10 : Séparation de ^{125}I -MT des autres produits iodés sur Sephadex G25 après conjugaison des MT avec le réactif de Bolton-Hunter (d'après HOGSTRAND et al., 1987)
- Figure 11 : Etapes du dosage en RIA
- Figure 12a : Principe du dosage en ELISA
- Figure 12b : Schéma simplifié de la procédure du dosage en ELISA
- Figure 13 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de l'ensemble des individus des trois espèces, prélevées en 1989
- Figure 14 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de l'ensemble des individus des trois espèces, prélevées en 1989
- Figure 15 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de l'ensemble des individus des trois espèces prélevées en 1989
- Figure 16 : Teneurs métalliques moyennes des organes de limandes, limande-soles et morues prélevées en 1989
- Figure 17 : Teneurs métalliques moyennes des branchies, foies et muscles des différentes espèces prélevées au printemps 1989
- Figure 18 : Influence du sexe sur les teneurs métalliques des branchies de limandes, limande-soles et morues

- Figure 19 : Influence du sexe sur les teneurs métalliques des muscles de limandes, limande-soles et morues
- Figure 20 : Influence du sexe sur les teneurs métalliques des foies de limandes, limande-soles et morues
- Figure 21 : Influence de l'âge sur les teneurs métalliques des branchies de femelles de limandes, limande-soles et morues
- Figure 22 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de morues âgées de 1 et 3 ans
- Figure 23 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limandes femelles âgées de 2 ans et 4-5 ans
- Figure 24 : Influence de l'âge sur les teneurs métalliques des foies de femelles de limandes, de limande-soles et de morues
- Figure 25 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limande femelles âgées de 2 ans et 4-5 ans
- Figure 26 : Influence de l'âge sur les teneurs métalliques des muscles de femelles de limandes, limande-soles et morues
- Figure 27 : Teneurs métalliques des organes de morues prélevées en automne 1989 à la côte et au large de Calais
- Figure 28 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de limandes prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991
- Figure 29 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limandes prélevées au printemps 1991 à Calais et Boulogne
- Figure 30 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limandes prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991
- Figure 31 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de limande-soles prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991
- Figure 32 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limande-soles prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991
- Figure 33 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limande-soles prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991
- Figure 34 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de limandes prélevées à différentes saisons
- Figure 35 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de limande-soles prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 36 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 37 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limandes prélevées à différentes saisons
- Figure 38 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limande-soles prélevées à différentes saisons de l'année 1989

- Figure 39 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 40 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limandes prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 41 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limande-soles prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 42 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 43 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 de surnageants hépatiques de morue et limande prélevées en milieu naturel
- Figure 44 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 d'un surnageant hépatique de limande-sole prélevée en milieu naturel "témoin" et saturé par du Cd
- Figure 45 : Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre de 200 à 300 nm d'une fraction contenant des protéines de PM moyen, d'un surnageant hépatique de poisson prélevé en milieu naturel
- Figure 46 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 de surnageants hépatiques de limandes et de limande-sole contaminées en laboratoire
- Figure 47 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne DEAE de MT commerciale de foie de lapin composée de 2 isoformes
- Figure 48 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen de surnageants hépatiques de limande contaminée en laboratoire et prélevée en milieu naturel
- Figure 49 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen d'un surnageant hépatique saturé par du Cd provenant d'une limande prélevée en milieu naturel
- Figure 50 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen de surnageants hépatiques de limande-soles contaminée en laboratoire et prélevée en milieu naturel
- Figure 51 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen d'un surnageant hépatique de limande-sole (prélevée en milieu naturel) ayant été saturé par du Cd
- Figure 52 : Profils d'élution obtenus par chromatographies HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen de surnageants hépatiques de limande-sole
- Figure 53 : Profils d'élution de chromatographies HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen de surnageants hépatiques de limandes et de limande-sole contaminées en laboratoire

- Figure 54 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne DEAE de fractions éluées, par filtration sur gel, au début du pic contenant les protéines de PM moyen
- Figure 55 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen d'un surnageant hépatique de morue prélevée en milieu naturel
- Figure 56 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne de phase inverse de MT commerciale de foie de lapin
- Figure 57 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne de phase inverse des métalloprotéines de limande contaminée en laboratoire et séparée sur colonne DEAE en position A, B et C et en position C
- Figure 58 : Profils d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne de phase inverse des métalloprotéines de limande prélevée en milieu naturel, séparées sur colonne DEAE en position A et C
- Figure 59 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne de phase inverse de métalloprotéines de limande-sole contaminée en laboratoire, séparées sur colonne DEAE en position D
- Figure 60 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 de surnageants hépatiques de poissons prélevés en milieu naturel
- Figure 61 : Teneurs en groupements SH, déterminés par colorimétrie, de surnageants hépatiques "témoins" et chauffés provenant de poissons prélevés en milieu naturel
- Figure 62 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 d'un surnageant hépatique de limande
- Figure 63 : Courbe de dilution de surnageant hépatique de perche en RIA et inter-réactivité de l'Ac anti-MT de perche avec les MT hépatiques de limande, limande-sole et morue
- Figure 64 : Courbes de dilutions de surnageants hépatiques de perche et limande provenant du milieu naturel et de limande contaminée en laboratoire
- Figure 65a : Optimisation de la dilution de l'Anticorps 2
- Figure 65b : Optimisation de la dilution de l'Anticorps 2
- Figure 66 : Optimisation de la dilution de l'Anticorps 1
- Figure 67 : Courbes de dilutions en ELISA de surnageants hépatiques de poissons prélevés en milieu naturel et contaminés en laboratoire
- Figure 68 : Droites de régression des courbes standards obtenues en ELISA (présentées sur la figure 67) et inter-réactivité du sérum avec la MT commerciale de foie de lapin
- Figure 69 : Relation entre les teneurs en MT hépatiques de poissons contaminés en laboratoire déterminées en RIA et en DPP
- Figure 70 : ACP réalisée sur les teneurs en métal et MT de l'ensemble des individus des trois espèces prélevées en 1989

- Figure 71 : Teneurs hépatiques moyennes en MT, métal total et métal soluble de limandes, limande-soles et morues prélevées en 1989
- Figure 72 : Influence du sexe sur les teneurs en MT et métal soluble de limandes, de limande-soles et de morues
- Figure 73 : Influence de l'âge sur les teneurs hépatiques en MT et métal soluble de femelles, de limandes, limande-soles et morues
- Figure 74 : Teneurs hépatiques en MT, métal total et métal soluble des morues prélevées en automne 1989 à la côte et au large de Calais
- Figure 75 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en MT et métal (total et soluble) des limandes prélevées au printemps 1991 sur les sites de Calais et Boulogne
- Figure 76 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en métal (total et soluble) et MT des limande-soles prélevées au printemps 1991 sur les sites de Calais et Boulogne
- Figure 77 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en MT et métal (total et soluble) des limandes prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 78 : Teneurs hépatiques moyennes en MT et métal soluble des limandes femelles prélevées en 1991 au printemps et en automne, à Calais et Boulogne
- Figure 79 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en MT et métal (total et soluble) des limande-soles prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 80 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en MT, métal (total et soluble) des morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 81 : Teneurs hépatiques moyennes en MT et métal (total et soluble) des limandes, limande-soles et morues prélevées au printemps, en automne et en hiver de l'année 1989
- Figure 1 : Teneurs métalliques des organes de limandes prélevées
annexe au printemps 1991 à Calais et Boulogne
- Figure 2 : Teneurs métalliques des organes de limande-soles prélevées
annexe au printemps 1991 à Calais et Boulogne
- Figure 3 : Teneurs métalliques moyennes des branchies de poissons
annexe prélevés à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 4 : Teneurs métalliques moyennes des foies de poissons
annexe prélevés à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 5 : Teneurs métalliques moyennes des muscles de poissons
annexe prélevés à différentes saisons de l'année 1989
- Figure 6 : Teneurs hépatiques moyennes en MT, métal total et métal
annexe soluble des limandes et limande-soles prélevées au printemps 1991 sur les sites de Calais et Boulogne

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1 : Eléments métalliques ayant une importance biologique
- Tableau 2 : Contribution relative de l'eau et de la nourriture, estimée ou quantifiée, dans l'accumulation des métaux lourds chez différentes espèces de poissons de mer
- Tableau 3 : Estimation des rejets polluants sur le littoral français de la Mer du Nord en 1976
- Tableau 4 : Récapitulatif des estimations des flux contaminants des principaux cours d'eau débouchant en mer
- Tableau 5 : Flux estimés des principaux rejets industriels directs
- Tableau 6 : Teneurs métalliques moyennes de l'eau de mer dans différentes zones de la Mer du Nord, Manche et Atlantiques
- Tableau 7 : Teneur en métaux de l'eau de mer de Dunkerque comparée aux valeurs de l'Europe
- Tableau 8 : Protocole expérimental utilisé pour la purification et la caractérisation des métalloprotéines
- Tableau 9 : Protocole expérimental utilisé pour l'extraction des métaux biodisponibles liés aux sédiments
- Tableau 10 : Protocoles expérimentaux utilisés pour la minéralisation des sédiments et des tissus biologiques
- Tableau 11 : Estimation des rapports poids frais/poids sec des différents organes de poissons
- Tableau 12 : Limites de détection (en ppm) des différents métaux dosés au spectrophotomètre d'absorption atomique en flamme
- Tableau 13 : Conditions d'analyse du Cd au spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un four graphite
- Tableau 14a : Teneurs métalliques du sédiment total prélevé sur une même station de la zone "côte de Calais", analysé à 2 reprises
- Tableau 14b : Teneurs métalliques du sédiment total prélevé sur les 4 zones de chalutage
- Tableau 14c : Teneurs métalliques de la fraction fine du sédiment (< 80 μ m) prélevé sur les 4 zones de chalutage
- Tableau 15 : Teneurs en métaux des sédiments de Dunkerque
- Tableau 16a : Teneurs métalliques (extraites et résiduelles) de la fraction fine des sédiments et pourcentages des métaux extraits par l'acide acétique
- Tableau 16b : Teneurs métalliques (extraites et résiduelles) du sédiment total et pourcentages des métaux extraits par l'acide acétique

- Tableau 17 : Plan d'échantillonnage des trois espèces de poisson
- Tableau 18 : Teneurs métalliques moyennes des différentes fractions d'un foie de morue
- Tableau 19 : Valeurs moyennes des coefficients de variations (exprimés en %) obtenus lors du dosage des éléments métalliques d'un même organe analysé à diverses reprises (n = 3) chez plusieurs morues (N = 6)
- Tableau 20 : Nombre d'échantillons n'atteignant pas le seuil de détection au SAA en flamme
- Tableau 21 : Teneurs métalliques moyennes des muscles de morues
- Tableau 22 : Teneurs métalliques minimales et maximales du muscle de différentes espèces de poissons prélevées en Atlantique Nord, Manche et Mer du Nord
- Tableau 23 : Teneurs métalliques des organes de poissons plats capturés en Mer du Nord (zone de Calais-Dunkerque)
- Tableau 24 : Composition en acides aminés de fraction constituant les pics 2 des profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 de surnageants de foies
- Tableau 25 : Rapports d'absorbance (abs.254 nm/abs. 280 nm) des fractions éluées au niveau du pic2 par filtration sur gel Sephadex G75 des surnageant hépatiques de limandes (a et b) et limande-sole (c) contaminées en laboratoire (profils d'élutions présentés sur la figure 46)
- Tableau 26 : Teneurs en MT hépatiques de surnageants de limande contaminées en laboratoire, estimées par les teneurs en métal et en SH des fractions éluées au niveau des pics 2 par filtration sur gel Sephadex G75 (échantillons correspondant aux profils a et b de la figure 46)
- Tableau 27 : Récapitulatif de la position des métalloprotéines éluées en DEAE après filtration sur gel Sephadex G75 pour différents types d'échantillons hépatiques de poissons
- Tableau 28 : Composition en acides aminés des fractions éluées sur colonne de phase inverse provenant des isoformes 1 et 2 de métalloprotéines hépatiques séparées sur colonne DEAE
- Tableau 29 : Composition en acides aminés des MT de différents organismes et de la chélatine de rat
- Tableau 30 : Caractéristiques des courbes de dilutions de surnageants hépatiques de perche, limande, limande-sole et morue, obtenues en RIA
- Tableau 31 : Caractéristiques des courbes standards des surnageants hépatiques de limandes et limande-soles, obtenues en ELISA
- Tableau 32 : Comparaison des teneurs en MT hépatiques déterminées par DPP chez des limandes contaminées en laboratoire et prélevées en milieu naturel

- Tableau 33 : Rapports des teneurs en MT déterminées par DPP dans des surnageants contenant des proportions différentes de foie
- Tableau 34 : Teneurs moyennes en MT hépatiques déterminées en DPP et en RIA d'échantillons de poissons contaminés en laboratoire et prélevés en milieu naturel
- Tableau 35 : Comparaison de la moyenne des teneurs en MT hépatiques déterminées en DPP et en ELISA, de poissons prélevés en milieu naturel et corrélation entre les teneurs déterminées par les 2 techniques.
Chaque échantillon a été tripliqué. L'écart type des 3 mesures est représenté par le coefficient de déviation standard intragroupe exprimé en %
- Tableau 36 : Comparaison des moyennes des teneurs en MT hépatiques de limandes prélevées en milieu naturel déterminés en DPP, RIA et ELISA (n = 8 ; MT exprimés en $\mu\text{g/g PF}$)
- Tableau 37 : Proportions de métal soluble par rapport au métal total dans les foies des poissons plats prélevés à Calais et Boulogne au printemps 1991
- Tableau 38 : Rapports poids frais/poids sec des foies de limandes, limande-soles et morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989
- Tableau 39 : Quantité minimales et maximales de Cu et de Zn liées aux pics 1 et 2 isolés par chromatographie de filtration sur gel Sephadex G75
- Tableau 40 : Corrélations entre les teneurs hépatiques en MT et métal de différents compartiments cellulaires, de limandes prélevées en milieu naturel

CHAPITRE I

INTRODUCTION GENERALE

1. Introduction

Lors de ces dernières décennies, les problèmes posés par la pollution marine et notamment au niveau du littoral sont devenus des préoccupations majeures à l'échelle internationale.

Le Nord de la France est une région soumise à une densité de population et à une industrialisation particulièrement importantes. Il en résulte une augmentation des rejets de polluants dans le milieu marin dont la qualité peut être modifiée voire dégradée, d'où des perturbations au niveau du biotope (modifications de métabolisme, physiologiques, nécroses de poissons...). L'étude de l'impact de la pollution sur les organismes vivants se doit d'être considérée.

Les métaux lourds sont des polluants dont la nocivité est essentiellement liée à leur rémanence et à leur spéciation. Ces substances peuvent être toxiques même à l'état de traces. En effet, à l'inverse des polluants organiques, les métaux lourds sont peu métabolisés. Ils peuvent donc être transférés dans le réseau trophique et s'accumuler dans la matière vivante.

Les organismes vivants, confrontés à des contaminations métalliques, peuvent se détoxifier en séquestrant les métaux par élaboration de protéines ayant la capacité de complexer les éléments métalliques. Ces métalloprotéines ont fait l'objet de diverses études en laboratoire et ont été définies comme étant, dans la majorité des cas, des métallothionéines (MT). Il faut noter, cependant, que certaines espèces synthétisent des protéines qui ne possèdent pas les caractéristiques des MT (STONE et OVERNELL, 1985).

Lors d'études concernant les poissons, des MT ont été induites par des intoxications métalliques en laboratoire, par voies naturelles (eau, nourriture) (KITO et al., 1982 ; OLSSON et al., 1987 ; OVERNELL et al., 1988), ou par injection (OVERNELL et COOMBS, 1979 ; SHEARS et FLETCHER, 1984). Une relation de cause à effet entre l'intoxication métallique et la synthèse de MT est démontrée. La mise en évidence d'un tel phénomène a amené l'hypothèse que les MT pourraient être utilisées en tant que bioindicateur de la pollution du milieu naturel par les métaux lourds.

Etant donné la complexité des situations en milieu naturel, les conditions environnementales (facteurs exogènes) et biologiques (facteurs

endogènes) constituent un ensemble de paramètres qui rendent délicates l'extrapolation d'observations du milieu artificiel au milieu naturel.

Jusqu'à présent, les études menées en milieu naturel sont relativement peu nombreuses. Elles ont concerné des poissons d'eau douce (perche, truite) provenant de rivières ou de lacs présentant un net gradient de pollution ; les individus ont été prélevés ponctuellement en amont ou en aval de sites de pollution (ROCH et al., 1982 ; OLSSON et HAUX, 1986 ; HOGSTRAND et al., 1991) ou ont été maintenus artificiellement dans des sites différemment contaminés (ROCH et MC CARTER, 1984b).

Dans ces milieux naturels plus ou moins confinés, le paramètre "degré de contamination du site" est donc relativement bien défini. D'autre part, l'influence du facteur "saison" ou des facteurs biologiques ont été peu approfondis lors de ces études alors que ces derniers ont fait l'objet de multiples études en laboratoire.

Compte tenu de ces éléments, le but de notre travail est donc de définir si les niveaux de contamination en polluants métalliques du littoral Nord-Pas-de-Calais sont reflétés dans les tissus des poissons marins d'intérêt commercial. Il consiste également à démontrer si un processus de détoxification par synthèse de MT est mis en place chez ces organismes et d'évaluer finalement dans quelle mesure ces protéines pourraient être utilisées en tant que bioindicateur de pollution métallique.

La démarche suivie lors de ce travail se résume en quatre points essentiels qui seront traités successivement.

- Nous avons établi un suivi des niveaux de concentrations en éléments métalliques (Pb, Cu, Zn, Cd, Mn et Fe) dans les sédiments et les tissus de trois espèces de poissons (limande, limande-sole et morue). Les paramètres : espèce, organe, site de prélèvement, nature du métal, âge, sexe et époque de prélèvements ont été pris en compte lors de cette analyse.

- Nous avons ensuite isolé, identifié et caractérisé les protéines hépatiques complexant les métaux, en particulier chez les deux espèces de poissons plats. Cette recherche a eu pour but de déterminer, si chez ces espèces, la détoxification est assurée par des métallothionéines ou par un autre type de métalloprotéine.

- Puis, la mise en évidence de l'existence des MT a permis leur quantification et a nécessité le choix de méthodes de dosages ; plusieurs techniques ont donc été mises en oeuvre.

- Enfin, nous discuterons des relations entre les teneurs hépatiques en métal et en MT et des variations de ces teneurs en fonction des différents facteurs considérés lors de l'étude des teneurs métalliques des poissons.

Cette analyse réalisée chez les trois espèces, en relation avec leur milieu extérieur, permettra de préciser si ces protéines sont susceptibles d'être utilisées en tant que bioindicateur de pollution.

2. Les métaux lourds dans l'écosystème aquatique

En milieu aquatique, les métaux sont répartis dans cinq compartiments différents : l'eau de mer, les sédiments, l'eau interstitielle, la matière en suspension et le biotope.

L'accumulation des métaux dans le biotope va dépendre de facteurs physico-chimiques ainsi que de facteurs biologiques.

La disponibilité des métaux vis-à-vis des organismes est influencée par leur distribution entre forme soluble et forme particulaire, par la spéciation du métal et par la chimie de l'eau. Les corrélations entre le métal total et le métal dans les organismes vivants sont très faibles lorsque l'environnement géochimique diffère car il induit des modifications dans la répartition et la spéciation des métaux (LUOMA, 1989). Par exemple, les organismes dulçaquicoles sont plus sensibles au Cd que les organismes marins, à cause de la formation de complexes avec les ions chlorures dans l'eau de mer. Il existerait même une relation inverse entre la salinité et la toxicité du métal (SUNDA et al., 1978 cités par COSSON, 1987).

Les organismes vivants sont plus ou moins vulnérables, selon les conditions environnementales. Il a été montré que l'accumulation aussi bien que la toxicité des métaux lourds peut dépendre des espèces chimiques mises en jeu (PISCATOR, 1986 cité par DALLINGER et al., 1987). Le mercure est l'exemple le plus frappant. Son affinité pour les groupements méthyles lui confère un pouvoir hautement toxique car, sous cette forme, il est facilement assimilable par les organismes.

Les forces de liaison des métaux aux particules et par conséquent leur capacité à être dissociés des sédiments peut aussi affecter la disponibilité des métaux vis-à-vis des organismes (TESSIER et al., 1979).

En ce qui concerne les facteurs biologiques, l'appartenance à une espèce et à un groupe zoologique donné et par conséquent, le mode de vie, joue un rôle dominant dans l'accumulation métallique. Ces caractéristiques initiales peuvent être modifiées par l'influence de facteurs physiologiques telle que l'activité métabolique aussi bien que par l'influence de paramètres écologiques tels que la température ou le type de nourriture disponible.

La toxicité d'un métal s'exerce selon diverses modalités. En effet, pour une même substance la toxicité peut différer selon les quantités absorbées et la durée de l'exposition :

- la toxicité aiguë se traduit par la mort immédiate ou à court terme des individus ;
- lorsque la toxicité est subaiguë, une partie des individus peut survivre ;
- la toxicité à long terme est due à une exposition à des doses faibles de contaminants mais sur de longues périodes de temps.

Les deux premiers types de toxicité sont souvent le cas d'expositions artificielles en laboratoire tandis que la toxicité à long terme reflète davantage le processus pouvant intervenir en milieu naturel.

3. Les métaux lourds dans les organismes

3.1. Métaux essentiels et non-essentiels (tableau 1)

Les organismes vivants exercent une sélectivité à l'égard de la charge métallique de leur organisme.

Tableau 1 : Eléments ayant une importance biologique

Eléments majeurs indispensables	Ca Mg K Na
Oligo-éléments essentiels	Co Cu Fe Mn Zn Al Mo Si V
Oligo-éléments secondaires	Cs Cr Ni Rb Sr
Oligo-éléments toxiques	Sb As Ba Be Bi Cd Pb Hg Se Ag

(D'après WOLFE et RICE, 1972 cité par DESSAINT, 1987)

Les éléments Na, K, Mg et Ca sont présents en grande quantité car ils ont un rôle essentiel dans les fonctions métaboliques (éléments majeurs) alors que d'autres métaux sont présents en beaucoup plus faibles concentrations (oligo-éléments). Pour ces métaux, une distinction doit être faite entre ceux qui sont essentiels à la vie et ceux qui ne le sont pas.

Parmi les métaux essentiels, on peut citer le cuivre, le zinc et le fer. Ces éléments sont des composants d'enzymes et de pigments respiratoires. Par exemple, le transport d'oxygène est assuré par l'hémoglobine ou l'hémocyanine contenant respectivement du fer ou du cuivre. Lorsque ces composés sont déficients, le métabolisme des organismes vivants est perturbé. Par opposition, au-delà d'un certain seuil, la concentration confère à ces éléments un pouvoir inhibiteur voire toxique.

D'autres métaux traces, tels que le mercure ou le cadmium n'ont aucun rôle biologique connu. Ils exercent une forte toxicité sur le biotope et sont considérés avec l'arsenic et l'étain comme présentant les plus grands risques pour l'environnement (CEE, 1982 cité par AMIARD-TRIQUET, 1989).

3.2. Métaux chez les poissons

Les espèces situées au sommet du réseau trophique sont soumises à une contamination par la nourriture transférée le long de la chaîne alimentaire par des processus de bioaccumulation ou de biomagnification. Le premier processus est défini comme étant l'accumulation d'un polluant dans un organisme, résultant d'une contamination soit directe par l'eau soit indirecte par voie alimentaire. La biomagnification est une forme particulière de bioaccumulation, caractérisée par une augmentation de la concentration dans les prédateurs par rapport à leurs proies (AMIARD-TRIQUET, 1989). D'après les données de la littérature reprises par cet auteur, chez les organismes aquatiques, la bioaccumulation du Cu et du Cd est plus vraisemblable que la biomagnification, alors que pour le Zn les données sont davantage controversées. Le Hg est le seul métal pour lequel le processus de biomagnification soit évident.

L'incorporation des métaux lourds dans les organismes va dépendre du mode d'assimilation, soit par la nourriture, soit par l'eau, mais l'importance relative de ces deux vecteurs demeure incertaine.

Dans le tableau 2 sont résumés les résultats de quelques études mises en oeuvre pour tenter d'estimer les contributions relatives de l'eau et de la nourriture dans l'assimilation des métaux par les poissons marins. La plupart de ces données sont dérivées d'expériences en laboratoire. Il

semblerait que l'assimilation des métaux par la nourriture constitue le mode de contamination le plus important.

Tableau 2 : Contribution relative de l'eau et de la nourriture, estimée ou quantifiée, dans l'accumulation des métaux lourds chez différentes espèces de poissons de mer.

Métal	Espèce	Contribution dans l'assimilation des métaux par	
		la nourriture	l'eau
Cd-115	Pleuronectes platessa	++	+
	Raja clavata	++	+
Mn-54	Pleuronectes platessa	++	+
Zn-65	Pleuronectes platessa	++	+
	Paralichthys sp.	++ (65 %)	+
Zn	Pleuronectes platessa	++	+ (10 %)
	Gambusia affinis	++ (78 %)	+
	Leiostomus xanthurus	++ (82 %)	+
	Gobius sp.	++ (60 %)	+

++ : Dominance d'un mode d'assimilation sur l'autre

+ : Une contribution dans l'assimilation des métaux a été observée

() : Contribution quantifiée

(D'après les données de DALLINGER et al., 1987)

En milieu naturel, les métaux présents sous forme particulière, assimilés par le poisson, proviennent de la matière en suspension, des sédiments et des organismes constituant la nourriture. La voie de contamination la plus vraisemblable est donc le tractus alimentaire.

Les métaux contenus dans la nourriture ou les sédiments constituent une source de contamination beaucoup plus importante que l'eau qui, même dans des sites fortement pollués, présente des concentrations métalliques beaucoup plus faibles. En effet, l'inertie relative des sédiments et leur capacité de rétention (en particulier dans les particules fines) font que leurs concentrations métalliques sont 1 000 à 10 000 fois plus élevées que celles de la colonne d'eau (WITTMAN et FORSTNER, 1975 cité par DESSAINT, 1987). Les concentrations métalliques des organismes benthiques constituant la nourriture des poissons, notamment des poissons de fond, sont de ce fait également importantes. En effet, les peuplements benthiques, du fait de leur faible mobilité ne peuvent échapper à la pollution du milieu environnant. Ces espèces, se nourrissant directement à partir de l'eau

ou des particules en suspension, concentrent les éléments métalliques dans leurs tissus. On peut citer l'exemple du mollusque *Murex trunculus* qui, capturé dans la baie de Calvi, présente une teneur en Cd jusqu'à un million de fois plus élevée que celle de l'eau de mer (BOUQUEGNEAU et al., 1983).

Lorsque les poissons sont exposés à du métal soluble, ces métaux sont détectés dans les branchies (WESTERNHAGEN et al., 1980 ; LAUREN et MC DONALD, 1985). Le passage à travers les branchies est une voie de contamination importante pour les métaux lourds en solution.

La peau peut être considérée comme une voie mineure pour l'assimilation des métaux. La sécrétion de mucus pourrait prévenir l'entrée des métaux dans les organismes (PÄRT et LOCK, 1983 cité par DALLINGER et al., 1987).

Les branchies et les intestins représentent donc les deux organes les plus impliqués dans l'assimilation des éléments métalliques (LUOMA, 1983 ; DALLINGER et al., 1987, SPRY et al., 1988). A partir de ces organes, les métaux absorbés sont transférés par le sang et distribués vers les organes cibles et les autres parties de l'organisme.

Une question importante se pose : l'assimilation des métaux à partir de l'eau ou de la nourriture est-elle reflétée par des concentrations élevées dans les différents organes de poissons ?

3.2.1. Distribution des métaux dans les organes

Après contamination par du cuivre ou du cadmium, ces métaux sont détectés en quantités importantes dans le foie et les reins. Ces organes sont les sites d'accumulation ultimes de nombreux métaux lourds.

- En effet, chez la truite soumise à une intoxication à court terme (9 µg Cd/l ; 2 semaines), c'est dans les branchies que le Cd est accumulé. Après de plus longues périodes d'exposition, la majorité du Cd est localisée dans les reins (environ 65%) ; les branchies, le foie et les reins contiennent 99% du métal incorporé (THOMAS et al., 1983 ; THOMAS et al., 1985). Lorsqu'il s'agit d'intoxication totalement artificielle (injections intrapéritonéales de sels métalliques), la répartition des métaux dans les organes est modifiée puisque le Cd est alors localisé dans le foie essentiellement (THOMAS et al., 1983).

- Le foie est le site d'accumulation le plus important pour le cuivre (TAKEDA et SHIMIZU, 1982 ; LAUREN et MC DONALD, 1987).

L'augmentation des concentrations en Cu dans la nourriture entraîne une augmentation des teneurs de ce métal dans le poisson entier mais avec un facteur de concentration plus faible que dans le foie (JULSHAMM et al., 1988). L'exposition du saumon (*Coho salmon*) à des concentrations sublétales de Cu entraîne d'abord une augmentation

du Cu au niveau des branchies puis dans le foie (BUCKLEY et al., 1982). On constate donc qu'une contamination par l'eau se reflète tout d'abord au niveau branchial avant d'affecter les organes internes.

- Le Zn est présent dans de multiples tissus. Au niveau des organes internes, il est accumulé dans le foie, les reins et les gonades (PENTREATH, 1973).

3.2.2. Régulation des concentrations métalliques

Les études concernant les cinétiques d'accumulation et d'élimination des métaux chez les poissons ont montré que les métaux essentiels tels que le Cu et le Zn sont plus rapidement éliminés des organismes que le Cd et le Hg d'où leur toxicité élevée (LAUREN et MC DONALD, 1987). En effet, le Hg n'étant pas régulé, le flux d'entrée n'est pas compensé par le flux de sortie. Ceci entraîne une augmentation de la concentration de ce métal dans les organismes avec l'âge et pour des concentrations externes ainsi que des niveaux trophiques croissants (AMIARD-TRIQUET, 1989).

3.2.3. Distribution intracellulaire

- Cytoplasme

Lorsque les métaux lourds traversent la membrane cellulaire, ils sont distribués dans la cellule et le cytoplasme apparaît être le compartiment le plus important pour le stockage des métaux lourds (COUSINS, 1985). Les métaux lourds vont réagir et se complexer aux composants du cytoplasme pour lesquels ils ont une forte affinité, tels que les groupements sulfhydryles. De nombreuses altérations métaboliques dues à la toxicité des métaux lourds sont dérivées d'interactions avec ces groupements sulfhydryles (GOERING et al., 1987).

Cependant, il a été montré que la plupart du Cd présent dans le cytoplasme est lié à une protéine de PM égal à 10 kDa environ, riche en groupements sulfhydryles et connue sous le nom de métallothionéine (MT). Les proportions relatives de Cu et de Zn liées aux MT sont moins bien définies car ces éléments interviennent, en tant que métaux essentiels, dans de nombreux processus métaboliques (NOEL-LAMBOT et al., 1978 ; LEY et al., 1983 ; OLSSON et HOGSTRAND, 1987b). La complexation des métaux aux MT inhibe leur potentiel toxique. Les MT interviendraient donc dans les processus de détoxification métallique et seraient également impliquées dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

- Lysosomes

Les lysosomes constituent un autre site important pour l'accumulation des métaux. Les lysosomes jouent un rôle important dans l'élimination des MT. En effet, les MT présentes dans le cytoplasme des cellules des glandes digestives de moules intoxiquées par le Cu, sont accumulées sous forme de polymères insolubles dans les lysosomes puis éliminés par exocytose (VIARENGO et al., 1983b). Les métaux associés aux autres composés du cytoplasme sont également incorporés dans ces organites par endocytose.

L'assimilation des métaux par les lysosomes peut provoquer une diminution de la stabilité de leur membrane. Dans l'organite, les métaux se dissocient de leur "transporteur", étant donné l'acidité du milieu interne de ces organites. Les métaux libres sont alors capables d'initier le processus de peroxydation lipidique, processus qui induit la formation de granules de lipofuscine. Ces composés sont capables, en retour, de séquestrer les produits de la peroxydation et les métaux sous forme de polymères insolubles, devenant alors non disponibles pour la cellule (VIARENGO, 1985).

- Noyau et mitochondries

Du Cu et du Zn sont présents dans le noyau des cellules hépatiques de truite (respectivement 13% et 9% du métal total contenu dans la cellule) (JULSHAMM et al., 1988). Après intoxication des carpes par le Cd, des MT sont également détectées dans le noyau des hépatocytes (KITO et al., 1986). Les MT complexant la plupart du Cd présent dans la cellule, on peut en déduire que du Cd est localisé dans le noyau.

Les métaux tels que Fe, Mn, Cd, Hg et Zn sont accumulés activement par les mitochondries (GEORGE, 1982) tandis que le Cu est assimilé de façon passive. Des études ont montré que de faibles concentrations métalliques peuvent inhiber la phosphorylation oxydative.

4. Les indicateurs biochimiques de la pollution par les métaux lourds

4.1. Intérêt des indicateurs biochimiques

Dans l'environnement aquatique, une fraction seulement des métaux sera disponible pour le biotope (LUOMA, 1983). Il est donc nécessaire de relier les concentrations de métaux lourds dans l'environnement à leur impact sur les organismes. L'évaluation de la disponibilité des métaux est donc obtenue en mesurant leur accumulation dans le biotope. Cependant, les niveaux de contamination des organes ne fournissent que peu d'information concernant leurs effets sur les organismes. Aussi, il est intéressant de développer des méthodes permettant de détecter l'impact des polluants sur les organismes.

L'avantage d'une approche biochimique réside en sa capacité de prévention. En effet, si une pollution chimique provoque l'altération de mécanismes biochimiques au niveau de l'individu, des mesures de protection peuvent être entreprises avant que les effets n'apparaissent dans l'ensemble de la chaîne biologique.

4.2. Indicateurs potentiels de la pollution par les métaux lourds

Un indicateur biochimique idéal doit présenter diverses caractéristiques. Ces critères ont été définis pour évaluer l'état de santé d'une population de poissons par HAUX et FORLIN (1988):

- ce bioindicateur a un but de prévention. Sa réponse doit donc être détectable avant que l'ensemble de la population ne soit affectée par une contamination excessive ;

- sa réponse doit être aussi spécifique que possible afin d'identifier un composé ou un groupe de composés chimiques ;

- sa réponse doit permettre d'établir une relation "dose-réponse" liée au degré de la pollution en prenant en compte les facteurs endogènes et exogènes qui affectent la réponse.

Différents "marqueurs" sont susceptibles d'être utilisés en tant que bioindicateur.

Les effets toxiques des métaux lourds sont liés à leur capacité d'altérer l'activité des enzymes. L'inhibition des enzymes pourrait être considérée comme indicateur potentiel de la toxicité sublétales des métaux, toutefois la complexité des phénomènes rendent difficiles l'interprétation des résultats (VIARENGO, 1985). On peut, toutefois, citer le système transporteur d'ions au niveau branchial (ATPases) qui est perturbé par la présence des métaux lourds. Il en résulte un dysfonctionnement de la balance ionique et une altération de la composition ionique du milieu intérieur (PATEL et CHANDY, 1987 ; SAYER, 1991 ; REID et MC DONALD, 1991). Les Ca^{2+} -ATPases sont extrêmement sensibles au Cd ; de ce fait, l'activité spécifique de cette enzyme pourrait être indicatrice de la pollution par le Cd (VERBOST et al., 1988).

Le glutathion est un peptide contenant un groupement thiol. Ce tripeptide a une importance biologique car il constitue, avec NADH et NADPH, le système impliqué dans le maintien des conditions oxydo-réductrices de la cellule (REED et BEATTY, 1980 d'après WOFFORD et THOMAS, 1984). Les métaux pourraient former des conjugués avec le glutathion. Cependant, étant donné les résultats contradictoires obtenus lors de diverses intoxications de poissons par le Cd (THOMAS et al., 1982 ; WOFFORD et THOMAS, 1984), des études complémentaires sont nécessaires afin de déterminer l'importance de la liaison du Cd à la glutathion et les mécanismes impliqués dans la régulation des teneurs de ce peptide.

D'après des études récentes, il est apparu que les organismes peuvent développer un système régulateur au niveau cellulaire qui augmente leur tolérance face aux conditions suboptimales de l'environnement. Il s'agit des protéines de stress également définies sous le terme de protéines de choc thermique qui sont inductibles par une variété de paramètres tels que les métaux lourds, l'élévation de la température du milieu (SANDERS, 1988 ; SANDERS et al., 1991). L'induction de la synthèse de ces protéines de 60 kDa et 70 kDa est peu spécifique et les informations concernant la présence de ces protéines chez les poissons sont trop limitées actuellement pour envisager leur utilisation en tant que bioindicateur de la pollution par les métaux lourds.

Parmi les bioindicateurs potentiels, les métallothionéines (MT) apparaissent être les plus adaptées pour détecter la pollution par les métaux lourds dans l'environnement. L'induction des MT chez les poissons a été démontrée en laboratoire par injections intrapéritonéales de Zn, Cu et Cd et par exposition dans l'eau (HAMILTON et MEHRLE, 1987). Il a donc été proposé par différents auteurs que les teneurs en MT des tissus servent d'indicateur de l'exposition métallique des espèces aquatiques. Quelques études réalisées en milieu naturel ont montré que les MT peuvent être induites par les métaux lourds présents dans l'environnement (ROCH et al., 1982 ; ROCH et MC CARTER, 1984b ; OLSSON et HAUX, 1986 ; HOGSTRAND et HAUX, 1990 ; HOGSTRAND et al., 1991).

5. Les métallothionéines

5.1. Caractéristiques des métallothionéines

Les métalloprotéines ont été découvertes dans le rein de cheval en 1957 (MARGOSHES et VALLEE, 1957). Le nom de métallothionéines (MT) leur a été donné du fait de leur teneur élevée en cystéine et de leur capacité à lier les métaux (KÄGI et VALLEE, 1960).

Les MT sont des protéines qui se distinguent par un ensemble de caractéristiques qui ont été récapitulées par KÄGI et NORDBERG en 1979 :

- leur contenu métallique (Cu-Zn-Cd) est élevé ;
- elles contiennent environ 30% de cystéine mais pas d'acide aminé aromatique, d'histidine ni de ponts disulfures ;
- la quantité d'ions métalliques liée aux groupements SH est de 1 ion métallique pour 3 SH ; il existe donc, généralement, 7 atomes de métal divalent liés aux 20 à 21 cystéines ;
- elles sont constituées par un enchaînement de 61 acides aminés ;
- l'absorbance optique de la Cd-thionéine est importante à 254 nm (à cause de la liaison métal-mercaptan) et faible à 280 nm (due à l'absence d'acides aminés aromatiques) ;
- les MT sont résistantes à la chaleur ;
- d'après la composition en acides aminés, les MT ont un poids moléculaire (PM) compris entre 6 et 7 kDa mais leur PM déterminé par chromatographie de filtration sur gel est d'environ 10 kDa.

5.2. Présence et polymorphisme

Les MT sont localisées dans le cytoplasme et ont été trouvées dans la

plupart des tissus examinés chez les vertébrés (HAMER, 1986). La majorité des études ont été axées sur le foie et les reins car ce sont les organes cibles de l'accumulation métallique mais les MT existent dans d'autres organes (rate, intestin...) et dans différents types de cultures cellulaires (fibroblastes, hépatocytes) (ZAFARULLAH et al., 1990).

Elles ont également été détectées chez un grand nombre d'eucaryotes incluant, non seulement des vertébrés mais également des invertébrés, des plantes et des microorganismes (KÄGI et NORDBERG, 1979 ; HAMER, 1986 ; COSSON, 1987 ; KÄGI et KOGIMA, 1987). Beaucoup de ces protéines ne sont pas strictement analogues à celles caractérisées à l'origine dans le rein de cheval mais les polypeptides riches en cystéine et en métal sont définis sous le terme général de métallothionéine (MT), de "metallothionein-like protein" ou de "metal-binding protein" (FOWLER et al., 1987). Le nom de "metallothionein-like protein" ou "metal-binding protein" (métalloprotéine) est donné lorsque la composition en acides aminés n'est pas déterminée ou quand, les protéines considérées présentent certaines caractéristiques qui diffèrent de celles définies précédemment.

Chez la plupart des vertébrés étudiés, les MT sont présentes sous deux formes distinctes ou parfois davantage, qui sont regroupées en deux classes désignées par MT-1 et MT-2. Cette classification est basée d'après leur position sur le profil d'élution quand elles sont chromatographiées sur résine échangeuse d'anions. Les différents isoformes de MT d'une même espèce peuvent différer dans leur composition ou leur séquence d'acides aminés. Lorsqu'ils sont isolés à partir de diverses espèces, les isoformes MT1 (ou MT2) ne présentent pas nécessairement une totale homologie structurale ou fonctionnelle.

5.3. Structure, immunoréactivité et liaison des métaux lourds

La MT de mammifère est une protéine composée de 61 acides aminés comportant 20 à 21 cystéines. Pour de nombreuses espèces, la séquence d'acides aminés a été déterminée et les résultats révèlent que la structure primaire est très bien conservée ; l'homologie structurale entre les MT de diverses espèces est donc importante (HAMER, 1986). Cette séquence présente une conservation remarquable de la position des cystéines dans la molécule (présente sous forme Cys-X-X-Cys, Cys-X-Cys ou Cys-Cys). Les différences dans la composition en acides aminés des MT issues de différents organismes, sont généralement localisées en dehors de ces séquences (DUNN et al., 1987).

Bien que les MT d'organismes variés aient conservé leurs propriétés fonctionnelles (forme et taille de la molécule, affinité pour les métaux etc), des changements survenus au cours de l'évolution ont provoqué une hétérogénéité au niveau de l'enchaînement de certains acides aminés, autres que la cystéine, qui va conditionner l'immunoréactivité de la molécule.

Le contenu métallique des MT purifiées est dépendant de l'organisme et du tissu, considérés ainsi que de l'exposition métallique antérieure. Les MT hépatiques ont tendance à lier essentiellement du Zn et également du Cu alors que dans le rein, les MT vont lier du Cu et du Cd.

Les métaux associés aux MT sont liés exclusivement aux groupements sulfhydryles. Les liaisons SH-MT sont réversibles et en milieu acide les métaux peuvent être dissociés des MT. L'apo-thionéine (MT dépourvue de métal) résultante sera reconstituée par complexation avec 7 atomes de métal bivalent (Cd, Zn) ou 12 atomes de Cu au niveau des 20 groupements thiols (WINGE et MIKLOSSY, 1982 ; NIELSON et WINGE, 1984).

Tous les métaux ne possèdent pas la même capacité à induire la synthèse des MT, ni la même affinité pour se lier aux MT.

Les métaux qui peuvent induire la synthèse des MT appartiennent aux groupes IB et IIB de la classification périodique (NORDBERG et KOGIMA, 1979). Leur capacité d'induction est liée à leur configuration électronique (JONES et al., 1988 cité par BREMNER et BEATTIE, 1990).

L'affinité des ions métalliques pour les MT diffère selon les éléments. Il faut noter qu'une forte affinité des métaux pour les MT "in vitro" n'est pas forcément liée à une forte capacité d'induction de la synthèse des MT "in vivo". Le Pb, en particulier, possède une grande capacité pour déplacer le Zn "in vitro" mais induit très peu la synthèse des MT (EATON et TOAL, 1980 cité par WAALKES et al., 1984). Les constantes d'affinité n'ont pas été calculées pour la liaison du Cu, Cd, Zn et Hg aux MT chez les poissons. Toutefois, la position des cystéines étant conservée, il est probable que les constantes d'affinités soient proches de celles déterminées pour les mammifères (ces constantes étant de 10^{11} à $10^{14}/M$ pour le Zn, 10^{15} à $10^{17}/M$ pour le Cd et 10^{17} à $10^{19}/M$ pour le Cu) (WEBB, 1979 ; HAMER, 1986 ; KÄGI et KOGIMA, 1987). Les constantes d'affinité déterminent la hiérarchie qui existe pour déplacer les métaux en cas d'intoxication ou "in vitro".

L'arrangement des métaux dans les MT a été étudié par la technique de Cd^{113} - RMN (OTVOS et ARMITAGE, 1980 ; BOULANGER et ARMITAGE, 1982 ;

BOULANGER et al., 1983). La conformation des MT est telle que dans sa structure apparaissent deux domaines impliqués dans la liaison des métaux : le premier possède 4 ions métalliques (Cd ou Zn) liés aux 11 cystéines réparties dans la partie carboxy-terminale qui s'étend entre les résidus 31 à 61 (domaine α) ; le second contient trois métaux et 9 cystéines appartenant au domaine amino-terminal (domaine β - résidus 1 à 30) (WINGE et MIKLOSSY, 1982).

5.4. Synthèse et dégradation

Les organismes injectés par des sels métalliques (Cu, Zn, Cd) biosynthétisent des MT. Cette capacité d'induction des MT a été démontrée chez le rat (BREMNER et DAVIES, 1975 ; BREMNER et YOUNG, 1976) et chez les poissons (BOUQUEGNEAU et al., 1975 ; NOËL-LAMBOT et al., 1978). Les métaux ne sont pas les seuls inducteurs des MT ; leur synthèse peut être induite également par des hormones (glucocorticoïdes, glucagon, noradrénaline) ou par des agents inflammatoires (CCl₄, endotoxine) (BRADY, 1982 ; WEBB et CAIN, 1982 ; DURNAM et al., 1984 ; KARIN, 1985 ; KLASSEN et LEHMAN-MC KEENAM, 1989). Le stress physiologique provoqué par la température environnante ou le manque de nourriture induisent également la synthèse des MT (BREMNER et DAVIES, 1975 ; OH et al., 1978) ; en effet, ces conditions provoquent l'augmentation des niveaux d'hormones glucocorticoïdes circulantes (WEBB et CAIN, 1982). Les métaux lourds sont, cependant, les inducteurs les plus puissants des MT (KLASSEN et LEHMAN-MC KEEMAN, 1989).

Chez les poissons, la connaissance des mécanismes d'induction des MT est plus limitée que chez les mammifères, mais les métaux lourds, les glucocorticoïdes (cortisol) et la noradrénaline provoquent la synthèse des MT (CHAN et al., 1987 ; CHAN et al., 1989 ; OLSSON et al., 1990b).

Au niveau des gènes, l'induction se fait essentiellement au niveau transcriptionnel bien que le contrôle posttranscriptionnel puisse influencer, en partie, la synthèse des MT (MC CORMICK et al., 1991).

La liaison métal-thionéine est le résultat de l'activation de la transcription des gènes MT par les métaux lourds (DURNAM et PALMITER, 1981). Les ions métalliques stimulent la liaison d'un ou plusieurs facteurs de la transcription, spécifiques aux métaux et responsables de la séquence des gènes MT (ZAFARULLAH et al., 1988). La liaison du facteur de transcription augmente la transcription du gène MT. Les nouvelles apo-MT traduites, appelées également thionéines, vont se lier rapidement aux métaux et devenir des MT. Les apo-thionéines ne sont jamais détectées dans

la cellule, probablement parce que les MT qui ne sont pas complètement saturées en métal sont rapidement dégradées (BREMNER et BEATTIE, 1990). COUSINS (1979) a montré que chez le mammifère, l'administration de Cd provoque l'augmentation des polysomes MT mRNA après afflux du métal dans les hépatocytes. Lorsque les quantités de polyA-RNA synthétisées sont suffisantes, il y a une augmentation concomitante de la synthèse des MT et de la liaison métallique.

Contrairement aux processus de synthèse, les mécanismes de dégradation des MT sont relativement mal connus.

Après fractionnement de la cellule, on a constaté que les MT sont localisées essentiellement dans la fraction cytosolique. Les MT pouvant être détectées dans le plasma et l'urine, il est probable qu'une partie des MT est sécrétée hors de la cellule.

Cependant, la présence de Cd puis de MT dans les urines sont le signe d'une néphropathie. Des lésions rénales peuvent apparaître si le taux de synthèse de thionéines est insuffisant par rapport à la libération du Cd suite à une dégradation des Cd-MT par les protéases. La détection de Cd-MT dans l'urine est d'ailleurs utilisée comme dépistage des lésions rénales suite à une intoxication chronique chez les ouvriers travaillant dans un environnement riche en Cd (FALCK et al., 1983).

Théoriquement, les MT peuvent être incorporées dans les lysosomes et former des polymères insolubles excrétés de la cellule par exocytose. La majorité d'entre elles est dégradée ; dans ce cas, les métaux libérés vont provoquer la synthèse de nouvelles MT.

Les temps de 1/2 vie des MT hépatiques chez le rat ont été déterminés expérimentalement par mesure de l'incorporation de S^{35} -Cystéine. Le temps de 1/2 vie de la Cd-thionéine est supérieur à celui de la Zn-thionéine (3,7 jours pour la Cd-thionéine contre 18 à 20 heures pour la Zn-thionéine) (FELDMAN et COUSINS, 1976).

Les apo-thionéines ou les MT incomplètement saturées sont, quant à elles, plus sujettes à la dégradation par les enzymes protéolytiques (FELDMAN et al., 1978 ; BREMNER et BEATTIE, 1990). Quand la chaîne polypeptidique des MT est dégradée, les ions Cd libérés sont rapidement incorporés dans les chaînes nouvellement synthétisées ; il y a donc un maintien de la quantité de Cd avec une dégradation continuelle concomitante des MT (COUSINS, 1979). Ceci explique que l'élimination du Cd suite à une contamination est beaucoup plus lente que celle des autres métaux.

A l'inverse de la synthèse, la dégradation des MT est donc très influencée par la nature des espèces métalliques liées.

5.5. Fonctions

Le rôle des MT est débattu depuis leur découverte.

Les MT sont induites par les métaux lourds et les complexent dans des conditions normales ou après intoxication. Elles ont donc une fonction importante dans la régulation des teneurs métalliques.

5.5.1. Rôle des MT dans le métabolisme cellulaire

Le rôle des MT dans le métabolisme du Cu et du Zn en dehors de toute intoxication est reconnu. En effet, les MT ont été détectées dans de nombreux tissus. L'hypothèse que les MT jouent un rôle important dans le métabolisme normal des métaux traces essentiels est avancée du fait de la présence des MT chez des poissons non exposés à une contamination (NOËL-LAMBOT et al., 1978). Des protéines associées au Cu et au Zn possédant des propriétés similaires à celles des MT ont été mises en évidence chez une dizaine d'espèces de poissons, prélevés dans un environnement sain (KRESOSKI et al., 1988). De plus, selon SHEARS et FLETCHER (1984), les MT jouent probablement un rôle dans l'absorption du Zn au niveau intestinal.

La fonction première des MT serait donc d'être impliquées dans la régulation des métaux traces essentiels tels que le Cu et le Zn (WEBB et CAIN, 1982).

D'après KARIN (1985), des protéines dont la synthèse est soumise à une régulation aussi complexe que celle des MT doivent occuper un rôle central dans le métabolisme cellulaire. Comme la majorité des protéines liant le Zn dans la cellule, les MT peuvent moduler d'importants processus biologiques qui nécessitent des enzymes liant le Zn. Leur implication peut être directe par interaction avec des apoenzymes inactives ou indirecte par régulation du Cu et du Zn disponible dans la cellule. Il a été montré que quelques apoenzymes nécessitant du Zn peuvent être réactivées par transfert du Zn des MT vers les apoenzymes (LI et al., 1980 ; WINGE et MIKLOSSY, 1982 cités par BRADY, 1982).

La présence de MT durant les stades de la vie embryonnaire et différentes étapes du développement a été montrée chez quelques espèces.

Chez le rat nouveau-né et lors des stades suivants de croissance et de développement, des teneurs élevées de Zn-thionéines ou de Zn-Cu-thionéines sont présentes dans des tissus à croissance rapide tels que le

foie, le tractus gastrointestinal et les testicules. Ces quantités importantes de MT doivent servir de "réservoir" de Cu et de Zn pour le métabolisme des acides nucléiques, la synthèse des protéines et d'autres processus métaboliques (BRADY et WEBB, 1981).

Chez les poissons, les MT sont impliquées dans la régulation du Cu et du Zn pendant la période de reproduction. Les MT hépatiques augmentent pendant la phase de maturation sexuelle de la truite (*Salmo gairdneri*) mâle et femelle avec simultanément une redistribution du Cu et du Zn vers les MT (OLSSON et al., 1987). Au niveau des gonades le même phénomène est observé mais uniquement chez les femelles (OLSSON, et al., 1990b). L'augmentation des quantités de MT hépatiques durant la maturation sexuelle peut être simulée par injection d'œstradiol 17 β chez la truite femelle juvénile (OLSSON et al., 1989b). Des teneurs élevées en MT et Zn hépatiques ont également été observées chez le carrelet pendant la période de reproduction (OVERNELL et al., 1987b). Lors du développement embryonnaire, une augmentation des teneurs en Cu lié aux MT, accompagnée d'une augmentation du MTm-RNA, survient au stade gastrulation (OLSSON et al., 1990b). Les variations des quantités de MT durant le développement sont donc étroitement associées avec la régulation des teneurs métalliques mais leur fonction exacte n'a pas été établie.

5.5.2. Détoxification des métaux lourds

Chez les poissons, les études concernant le rôle des MT ont été centrées sur leur faculté à détoxifier les métaux lourds (KLAVERKAMP et al., 1984 ; HAMILTON et MEHRLE, 1986 ; HOGSTRAND et HAUX, 1991).

L'administration de métaux tels que le Zn, le Cu, le Cd ou le Hg par injections intrapéritonéales induit la synthèse des thionéines et la liaison de métaux pour former les MT. L'une des premières études démontrant ce phénomène concerne le poisson *Sebastes caurinus* (OLAFSON et THOMPSON, 1974). Quand il est contaminé par injection de Cd, ce métal est accumulé au niveau des protéines ayant un PM apparent de 10 kDa environ, de façon dépendant de la dose.

Diverses expériences ont montré que les MT sont induites chez les poissons suite à des expositions à des teneurs en Cd élevées dans l'eau (MC CARTER et al., 1982 ; MC CARTER et ROCH, 1983 ; DUNCAN et KLAVERKAMP, 1983 ; WOFFORD et THOMAS, 1984 ; MC CARTER et ROCH, 1984). La protection contre la toxicité des métaux lourds résulterait d'une augmentation du taux de synthèse des MT car le résultat de l'induction des MT est une augmentation

de la liaison des éléments métalliques à la protéine, la plupart du Cd intracellulaire se lie aux MT lors d'expositions chroniques du poisson (OLSSON et HOGSTRAND, 1987b ; HOGSTRAND et HAUX, 1991). Il a été suggéré que les effets toxiques du Cd et du Hg surviennent quand la capacité de liaison des MT est dépassée. Les métaux en excès se lieraient alors au niveau des protéines de poids moléculaire élevé et seraient responsables de problèmes pathologiques apparaissant dans l'organisme ; il s'agit de l'hypothèse du "spillover" (WINGE et al., 1974 ; BROWN et PARSONS, 1978). Cette hypothèse est critiquée par d'autres auteurs qui ont démontré que la présence des métaux au niveau des protéines de PM élevé n'était pas synonyme de toxicité (ROCH et MC CARTER, 1984) ou n'était pas liée aux symptômes pathologiques résultant de l'intoxication (DIN et FRAZIER, 1986).

La synthèse des MT peut aussi être induite par la présence de teneurs importantes de Zn dans l'eau chez la carpe (*Cyprinus carpus*) (KITO et al., 1982b). De cette contamination, il résulte une augmentation des teneurs en Cu liées aux protéines de PM égal à 10 kDa environ. L'exposition au Zn stimulerait donc le métabolisme du Cu suite à une augmentation des concentrations en MT combinée à la forte affinité du Cu pour les MT.

Le rôle de détoxification des MT a pu être démontré par des travaux réalisés sur des lignées cellulaires modifiées pour que leur capacité à produire des MT soit stimulée ou inhibée. Des lignées cellulaires incapables de produire des MT par hyperméthylation des gènes vont devenir particulièrement sensibles aux métaux lourds (HAMER et al., 1985). A l'opposé, des lignées cellulaires surproduisant des MT, par amplification du gène, sont moins sensibles aux métaux lourds (BEACH et PALMITER, 1981).

5.5.3. Tolérance aux métaux lourds

La tolérance est généralement évaluée par la capacité de survie des organismes.

La pré-exposition des animaux à des doses sublétales de métaux lourds peut augmenter leur résistance lors d'expositions ultérieures à des concentrations métalliques plus élevées (CHERIAN et NORDBERG, 1983 ; KLAVERKAMP et al., 1984 ; KITO et al., 1986). Cette résistance accrue est accompagnée d'une augmentation des MT ou "MT-like protein". Cette induction des MT lors du prétraitement va probablement protéger l'individu contre la toxicité des métaux lourds. Lors d'intoxications ultérieures, le Cd sera incorporé dans les MT pré-synthétisées ce qui va réduire la quantité de métal potentiellement toxique (GOERING et KLAASSEN, 1984). D'après KITO et

al. (1982), l'induction de la synthèse de MT par pré-exposition dans l'environnement à du Cd ou Zn peut conduire à une augmentation du temps de survie des carpes exposées dans ce milieu.

Une forte corrélation entre la concentration létale 50% (CL50) et les teneurs en MT hépatiques a été mise en évidence chez des poissons ayant été pré-exposés à du Cu ou à un mélange de Cu, Zn et Cd (MC CARTER et ROCH, 1983 ; ROCH et MC CARTER, 1984a). Or, ces auteurs démontrent que l'acclimatation du saumon coho au Cu intervient avant que l'augmentation des teneurs en MT hépatiques ne soit détectable ce qui amène à la conclusion que cette relation ne doit être qu'une coïncidence.

En fait, les branchies, plutôt que les organes internes représentent le site le plus touché lors d'exposition aiguë à court-terme (LAUREN et MC DONALD, 1985).

Si les MT sont liées au développement de la tolérance, il est probable que les MT contenues dans les branchies soient responsables de cet effet, mais peu de données supportent cette hypothèse.

L'effet de la pré-exposition sur l'acquisition de la tolérance peut être lié à une diminution de l'accumulation métallique. En effet, l'accumulation des métaux lourds au niveau des branchies est réduite chez les poissons ayant été acclimatés (BRADLEY et al., 1985 ; WICKLUND-GLYNN et OLSSON, 1991).

Chez les poissons, le fait que les MT hépatiques soient impliquées dans le développement de la tolérance n'a été montré que de façon indirecte. Le mécanisme d'acclimatation est présumé se dérouler au niveau des branchies.

5.6. Autres métalloprotéines

Bien que les MT aient été localisées dans divers tissus d'organismes contaminés par les métaux lourds, cette protéine n'est toutefois pas considérée comme l'unique métalloprotéine capable de complexer les métaux (STONE et OVERNELL, 1985). En effet, la présence d'autres métalloprotéines cytosoliques de faible PM ont été détectées chez les mammifères. Le rat, après intoxication par le Zn, produit, au niveau des testicules, deux métalloprotéines ayant une composition en acides aminés différente de celle des MT (WAALKES et PERANTONI, 1986). Dans le foie de rat, une protéine isolée et caractérisée a été définie sous le nom de Cu-chélatine (WINGE et al., 1975; IRONS et SMITH, 1977). Cette protéine a été détectée ultérieurement chez des organismes marins. Elle peut être combinée ou non

avec des MT et d'autres métalloprotéines (RIDLINGTON et al., 1981).

Selon la voie de contamination, la nature et la concentration de l'élément métallique dans l'eau, différentes métalloprotéines peuvent être synthétisées chez la truite (*Salmo gairdneri*) (THOMAS et al., 1983; THOMAS et al., 1985; KAY et al., 1986). En effet, chez la truite prétraitée puis intoxiquée par du Cd, ce métal se trouve lié dans le cytosol hépatique à deux métalloprotéines autres que les MT ; le Cu et le Zn sont, quant à eux, associés aux deux isoformes de MT. Si les truites sont pré-exposées par du Zn, puis intoxiquées par du Cd, le Cd se répartit entre les deux isoformes de MT et les deux autres métalloprotéines. Par opposition, lorsque les truites sont contaminées par injections intrapéritonéales de Cd, la plupart du métal accumulé dans le foie est séquestré par les MT. Chez la même espèce exposée à des teneurs élevées en Cu, le métal complexé est présent au niveau de trois pics différents dont deux sont constitués par des isoformes de MT, la composition de la troisième protéine n'a pas été précisée (MC CARTER et al., 1982).

5.7. Quantification des métallothionéines

Les MT possèdent diverses caractéristiques dont certaines ont été exploitées pour la mise au point de techniques de quantification de ces protéines. Parmi ces propriétés, citons l'absorbance de la Cd-thionéine à 254 nm, la liaison de 7 atomes de métal divalent par mole de MT, la richesse en cystéine, la réversibilité de la liaison métal-thionéine ainsi que les forces de liaison métal-thionéine qui sont différentes selon les métaux considérés.

5.7.1. Contenu métallique et propriétés optiques

OLAFSON et THOMPSON en 1974 et BOUQUEGNEAU en 1975 ont recherché les teneurs en MT des fractions isolées par filtration sur gel et contenant des protéines dont les poids moléculaires sont de l'ordre de 10 000 Da environ. Ces teneurs étaient estimées en analysant les concentrations métalliques et/ou en mesurant l'absorbance à 254 nm. Ces méthodes sont toujours utilisées mais doivent être considérées comme des techniques semi-quantitatives voire qualitatives.

5.7.2. Saturation des MT par le métal

Cette technique a souvent été employée (PIOTROWSKI et SZYMANSKA, 1976 ; ONOSAKA et CHERIAN, 1982). Elle consiste à saturer "in vitro" les MT

par un métal unique, de préférence un radioisotope du Cd ou du Hg. Les MT sont ensuite séparées des autres ligands du métal et du métal libre, soit par chromatographie (LEHMAN et KLAASSEN, 1986), soit par dénaturation à la chaleur. Dans le second cas, le métal libre est éliminé par complexation avec de l'hémoglobine (EATON et TOAL, 1982). La concentration du métal de substitution est déterminée et les teneurs en MT sont déduites d'après le rapport qui existe entre ce métal et la MT (exemple 7 atomes de Cd/mole MT). Cependant, la présence éventuelle de Hg ou de Cu au niveau de la protéine native peut entraîner une saturation incomplète des MT par le métal de substitution car ces métaux (Hg et Cu) sont fortement liés aux MT. Le dosage des différents métaux dans les fractions contenant les MT après chromatographie peut résoudre ce problème de sous-estimation des teneurs en MT.

5.7.3. Dosage des groupements thiols

La richesse des MT en cystéine a été mise à profit en dosant les groupements thiols par colorimétrie. En effet, le réactif de ELLMAN ou acide dithionitrobenzoïque (DTNB) permet de quantifier les groupements thiols présents dans une solution. Cette technique a été utilisée pour déterminer la quantité de MT dans des fractions isolées par chromatographie (TUKENDORF et BASZYNSKI, 1985; BERTHET, 1989). Elle a également été appliquée au dosage des SH, directement dans des surnageants qui ont été purifiés au préalable par précipitation à l'acide. Dans ce cas, la mesure des thiols prend en compte, non seulement les MT, mais également le glutathion et la cystéine (WOFFORD et THOMAS, 1984 ; SPRY et WOOD, 1989).

Ces techniques permettent donc de quantifier les MT mais présentent l'inconvénient de nécessiter des étapes de chromatographies afin de quantifier les MT, soit dans leur totalité (la technique de saturation par le Cd ne prend pas en compte les MT complexant le Cu), soit exclusivement (le dosage des thiols prend en compte des résidus SH autres que ceux des MT).

D'autres techniques permettent de doser les MT dans des échantillons biologiques nécessitant peu de préparation. Il s'agit des techniques immunologiques et la technique de polarographie à impulsions différentielles (DPP).

5.7.4. Techniques immunologiques

La production d'Anticorps (Ac) polyclonaux anti-MT a permis d'utiliser les techniques immunologiques pour l'étude des MT. Ces anticorps vont permettre de réaliser des dosages quantitatifs en RIA (TOHYAMA et SHAIKH, 1981 ; VANDER MALLIE et GARGEY, 1979 ; GARVEY et al. 1982) ou en ELISA (ROESIJADI et al., 1988 ; THOMAS et al., 1986). La mise au point de ces techniques a permis d'améliorer le dosage de MT car elles sont plus sensibles et plus spécifiques que les autres techniques (DPP, saturation par le Cd). Toutefois, elles demeurent relativement peu répandues car la production d'Ac anti-MT est délicate et ce, pour plusieurs raisons :

- la protéine est faiblement immunogène même lorsqu'elle est couplée à un transporteur (par exemple, le glutaraldéhyde ou l'immunoglobuline) (GARVEY et al., 1982 ; MEHRA et BREMNER, 1983)
- l'absence de groupements aromatiques exclut la possibilité d'incorporer directement l'iode radioactif dans la molécule traçeuse (BRADY et KAFKA, 1979).

Seuls quelques laboratoires ont obtenu des Ac anti-MT ayant un titre, une avidité et une spécificité suffisantes pour permettre de réaliser des dosages corrects en routine.

D'autre part, les Ac produits contre les MT de mammifères peuvent présenter une bonne réactivité vis-à-vis des MT d'autres espèces de mammifères (TOHYAMA et SHAIKH, 1978 ; GARVEY et al., 1982 ; VANDER MALLIE et GARVEY, 1979) mais réagissent peu par rapport aux MT existant chez des espèces autres que les mammifères (TOHYAMA et SHAIKH, 1981 ; KAY et al., 1986).

Plus récemment, des Ac anti-MT de moule (*Mytilus edulis*) (ROESIJADI et al., 1988), de truite (*Salmo gairdneri*) (NOREY et al., 1990), de carpe (*Cyprinus carpio*) (KITO et al., 1986), de poisson-chat (*Heteropneustes fossilis*) (CHATTERJEE et MAITI, 1987) et de perche (*Perca fluviatilis*) (HOGSTRAND et HAUX, 1990) ont été produits et utilisés en RIA chez la perche ou en ELISA chez la moule et la truite. Certains de ces auteurs ont montré que les Ac de poissons réagissaient peu vis-à-vis des MT de mammifères.

L'utilisation de ces Ac est donc limitée du fait des problèmes de spécificité et d'immunoréactivité qui existent entre différentes classes de vertébrés. Ces limitations sont liées aux variations de la structure primaire au niveau de la partie N-terminale de la séquence d'acides aminés (voir 5-3-2).

5.7.5. Polarographie à impulsions différentielles (DPP)

La DPP a été utilisée par différents auteurs pour quantifier les teneurs en MT, ou pour détecter la présence de "MT-like proteins", dans des échantillons biologiques (ROCH et al., 1982 ; THOMPSON et COSSON, 1984 ; OLSSON et HAUX, 1986 ; COSSON, 1987 ; RASPOR et al., 1989)

La méthode est basée sur la détection d'une variation d'intensité de courant électrique qui survient dans un électrolyte quand un composé est réduit ou oxydé. Lors du dosage des MT par DPP, c'est le signal correspondant à la réduction de l'hydrogène des groupements sulfhydryles qui sera mesuré. Cette détection électrochimique se fait dans un tampon ammoniacal contenant du cobalt dont la composition a été mise au point par BRIDCKÅ en 1933. L'utilisation de cet électrolyte permet de quantifier la cystéine sans interférence majeure avec d'autres molécules électrochimiquement actives.

Puisque les molécules contenant des groupements sulfhydryles déterminent le signal, la spécificité de la méthode va dépendre de la composition de l'échantillon. L'échantillon biologique devra donc être purifié afin de débarrasser les MT de la majorité des autres molécules contenant des résidus SH. Comme les MT sont des composés de poids moléculaire moyen (8 à 12 KDa environ) résistant à la chaleur, la dénaturation par la chaleur est la méthode utilisée pour éliminer les molécules de poids moléculaire élevé, tout en préservant les MT. Les composés de faibles PM contenant des groupements SH tels que le glutathion, la cystéine libre ou les produits de dégradation des protéines de haut PM n'interviennent pas dans le dosage (THOMPSON et COSSON, 1984 ; OLSSON et HOGSTRAND, 1987).

La quantité de MT est déduite aisément grâce à l'utilisation directe de standards, non pas de cystéine, mais de MT commercialisée de foie de lapin.

Le dosage des MT par DPP a été comparé avec d'autres techniques telles que la méthode de saturation par le Cd (ONOSAKA et CHERIAN, 1982) et la méthode radioimmunologique (HOGSTRAND et HAUX, 1992). Ces comparaisons mettent en évidence certains avantages de la technique DPP :

- il s'agit d'une technique relativement rapide puisque le dosage est réalisé directement dans des surnageants préalablement chauffés ; en dehors des étapes de préparation de l'échantillon, la durée du dosage est de 5 minutes environ par échantillon.

- la composition métallique de l'échantillon n'intervient pas dans le dosage à l'inverse des techniques de saturation par le cadmium (radioactif ou froid). Les dosages peuvent donc être réalisés sur des échantillons provenant aussi bien du milieu naturel que contaminés en laboratoire ; de plus, on évite la manipulation d'isotopes radioactifs.

- les problèmes de spécificité qui se posent lors du dosage en immunologie de MT provenant d'espèces différentes, sont également évités ; en effet, les différences interspécifiques de structure des MT n'interviennent, ni au niveau du nombre, ni au niveau de la position des cystéines dans l'enchaînement des acides aminés et donc n'influencent pas le résultat du dosage en DPP.

Par contre, cette technique est moins sensible que les techniques immunologiques ; la DPP permet de détecter des quantités de MT qui sont de l'ordre de quelques $\mu\text{g/g}$ de tissu biologique, alors qu'en immunologie le seuil de détection est de l'ordre de quelques ng/g de tissu.

Alors que les méthodes immunologiques permettent de quantifier les MT dans plusieurs dizaines d'échantillons simultanément, la DPP nécessite un temps de préparation et un dosage pour chaque échantillon, d'où d'éventuels problèmes de reproductibilité des mesures et un temps de présence nécessaire plus important de la part du chercheur.

DIETER et ses collaborateurs ont publié, en 1985, une étude dans laquelle cinq méthodes de quantification des MT ont été comparées ; il s'agit des techniques de saturation des MT par le Hg, de saturation des MT par le Cd avec précipitation par l'hémoglobine, de la RIA, du dosage par colorimétrie des SH et de la méthode "G75" qui consiste à doser les métaux dans les fractions éluées après chromatographie de filtration sur gel. D'après les critères considérés pour le dosage d'un point de vue quantitatif (précision et linéarité de la méthode, sur ou sous-estimation des résultats et quantité de matériel biologique disponible), les meilleures performances sont attribuées à la RIA. Par contre, d'un point de vue qualitatif (considérant la technicité du matériel et du "savoir-faire"), la RIA est moins intéressante que les techniques de saturation par les métaux ou que le dosage colorimétrique des SH. Le temps nécessaire au dosage des MT est, toutefois, moins important en RIA. La technique "G75" représente selon ces différents critères, la technique globalement la moins intéressante.

Tableau 3 : Estimation des rejets polluants sur le littoral français de la Mer du Nord en 1976

Zones de rejets	Estimation des débits moyens (m3/jour) Octobre 76	Charges journalières (Estimations 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	27024	396	71	1765	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	+ 1765	+ 1539	427

+ : ces valeurs ne tiennent compte que des rejets industriels de la zone de Calais (d'après MERTENS J.L. et F. FRUDHON - Rapport SECADU, 1976 cité par RICHARD et al., 1978)

Tableau 4 : Récapitulatif des estimations des flux contaminants des principaux cours d'eau débouchant en mer (kg/an)

COURS D'EAU	Pb	Zn	Cu	Cd
Canal exutoire (Dunkerque)	700	2 500	1 850	-
Aa	700	2 400	450	50
3 canaux de Calais	1 500	149 000	1 700	80
Liane	400	5 300	450	30
Canche	2 850	8 100	6 100	110
Authie	1 850	5 000	3 450	170
TOTAL arrondi	8 000	172 300	14 000	440

(d'après Chaussepied et al., 1989)

Les techniques de quantification des MT sont donc relativement diversifiées, chacune présentant ses avantages et inconvénients. La nature et les objectifs de l'étude sont déterminants pour le choix d'une technique.

6. Présentation des sites d'étude

6.1. Cadre de l'étude : pollution métallique du littoral Nord de la France

6.1.1. Etats des rejets sur le littoral du Nord-Pas-de-Calais

La presque totalité des activités industrielles situées sur les bassins versants et sur la côte intéressant le littoral Nord-Pas-de-Calais sont rassemblées essentiellement autour des agglomérations de Dunkerque, de Calais et également de Boulogne-sur-mer.

Une estimation des rejets polluants a été entreprise sur le littoral français de la Mer du Nord en 1976 par le SECADU (Syndicat mixte d'Etudes pour l'Aménagement du littoral Calais-Dunkerque) (tableau 3).

Une étude plus récente (CHAUSSEPIED et al., 1989) a concerné les flux des contaminants chimiques issus des rejets industriels directs à la mer. Ces rejets constituent le deuxième ensemble d'apports à la mer par l'importance des tonnages, après les apports par les cours d'eau car les flux des contaminants déversés par les cours d'eau de la région de Calais sont également très importants (tableau 4).

Tableau 5 : Flux estimés des principaux rejets industriels directs (kg/an)

ZONES	Pb	Hg	Zn	Cu	Cd	Autres Contaminants	MI équitox/j
Dunkerque (Sollac)	610	6	33900	810	52	Cr = 2 000 Mn = 7 120 Fe = 33 820 Ni = 220 CN = 5 0250	21 700
Calais (Tioxide)	730	2	22000	730	22	Cr = 146 000 Mn = 168 000 Mg = 3 070 Fe = 9.10 ⁶ SO ₄ = 136.10 ⁶	3.935 000
Boulogne (SFPO)	3 181 400*	5	14000	660	106 60*	Mn = 36 600 18 600* Fe = 9 340 4 600* CN = 75 000 96 500*	218 200
TOTAL arrondi	4 520 1740*	13	69900	2 200	180 134*		4 175 000

() : apport majeur du secteur
MI : Matières inhibitrices (test daphnies)
* : données récentes (DRIR 1987)

(d'après Chaussepied et al., 1989)

Tableau 6 : Teneurs métalliques moyennes de l'eau de mer dans différentes zones de la Mer du Nord, Manche et Atlantiques

ZONES	Hg		Cd		Cu		Pb	
	n	m (ng/l)	n	m (µg/l)	n	m (µg/l)	n	m (µg/l)
Côte Belge	10	160,4	10	1,42	10	10,74	10	14,66
Côte Française de la baie de Seine à Dunkerque	23	83,2	24	1,16	24	10,39	24	11,98
Manche centrale du Pas-de-Calais au Cotentin	8	120,3	11	1,72	11	11,71	11	9,84
De la pointe de la Hague à Guernesey ----- De Guernesey à Ouessant	Pas de mesures		3 { 2,14 12 { 0,84 9 { 0,40	12	8,00	12	6,29	
Atlantique du Cap Ortegal à Ouessant	17	35,9	23	0,24	23	21,93	23	15,11
Atlantique au large de l'Espagne et du Portugal	16	31,6	20	0,36	20	18,67	20	10,56
Des Bouches de l'Escault à l'Estuaire du Tage	74	75,6	100	0,84	100	14,59	100	11,77
MEDITERRANEE	1318	152,5	1136	0,4	1298	5,1	1251	4,9

n : nombre de mesures ; m : moyenne correspondante (d'après Aubert et al., 1987)

Tableau 7 : Teneur en métaux de l'eau de mer de Dunkerque comparée aux valeurs de l'Europe

	EAUX COTIERES "littoral"		EAUX COTIERES "large"	
	Europe (1)	Dunkerque (2)	Europe (1)	Dunkerque (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

(d'après DELVAL, 1984)

(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).

Les flux majeurs des contaminants métalliques provenant des rejets industriels se situent géographiquement de la façon suivante (tableau 5) : Zn et Hg à Dunkerque, Pb et Cd à Boulogne et Cu sur l'ensemble des trois zones portuaires.

Des mesures de toxicité globale des effluents industriels, par tests biologiques (test daphnie), ont montré l'importance prépondérante des apports du secteur de Calais. Tioxide représente à lui seul près de 80% des apports toxiques de toute la région.

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

Le littoral de Hardelot à Boulogne est pratiquement dépourvu d'industries. Seule la zone portuaire de Boulogne est soumise aux rejets industriels de la SFPO (Société des Ferro-Manganèses de Paris- Outreau).

6.1.2. Teneurs en métaux lourds de l'eau de mer

Une étude comparant la Mer du Nord, la Manche et l'Atlantique a montré que les teneurs en Hg, Cd, Cu et Pb de la zone située entre la Baie de Seine et Dunkerque sont moins élevées que celles de la côte Belge et de la Manche centrale (excepté pour le Cu) (tableau 6). Cependant, les concentrations en Hg et Cd dans cette même zone sont supérieures à celles de la façade Atlantique (AUBERT et al., 1987).

Comparées aux concentrations métalliques moyennes des eaux côtières d'Europe, les teneurs relevées dans les eaux côtières de Dunkerque sont peu élevées (tableau 7). Par contre, les concentrations estimées pour la zone du large se situent ou dépassent nettement (pour Cu et Zn), les valeurs maximales des plages de variations concernant l'Europe.

6.1.3. Teneurs en métaux des sédiments

Deux campagnes Hydrobios (Hydrobios I et Hydrobios II) ont été réalisées en 1980 et 1983 et ont permis de décrire l'état de contamination métallique des sédiments superficiels d'une zone littorale, large d'une dizaine de km environ, située entre la frontière belge et Ault.

Sur la carte synthétique résumant les résultats obtenus (figure 2), on distingue deux zones :

Le Sud de Boulogne est une zone où la diversité des contaminants est moindre que celle située entre Calais et Dunkerque.

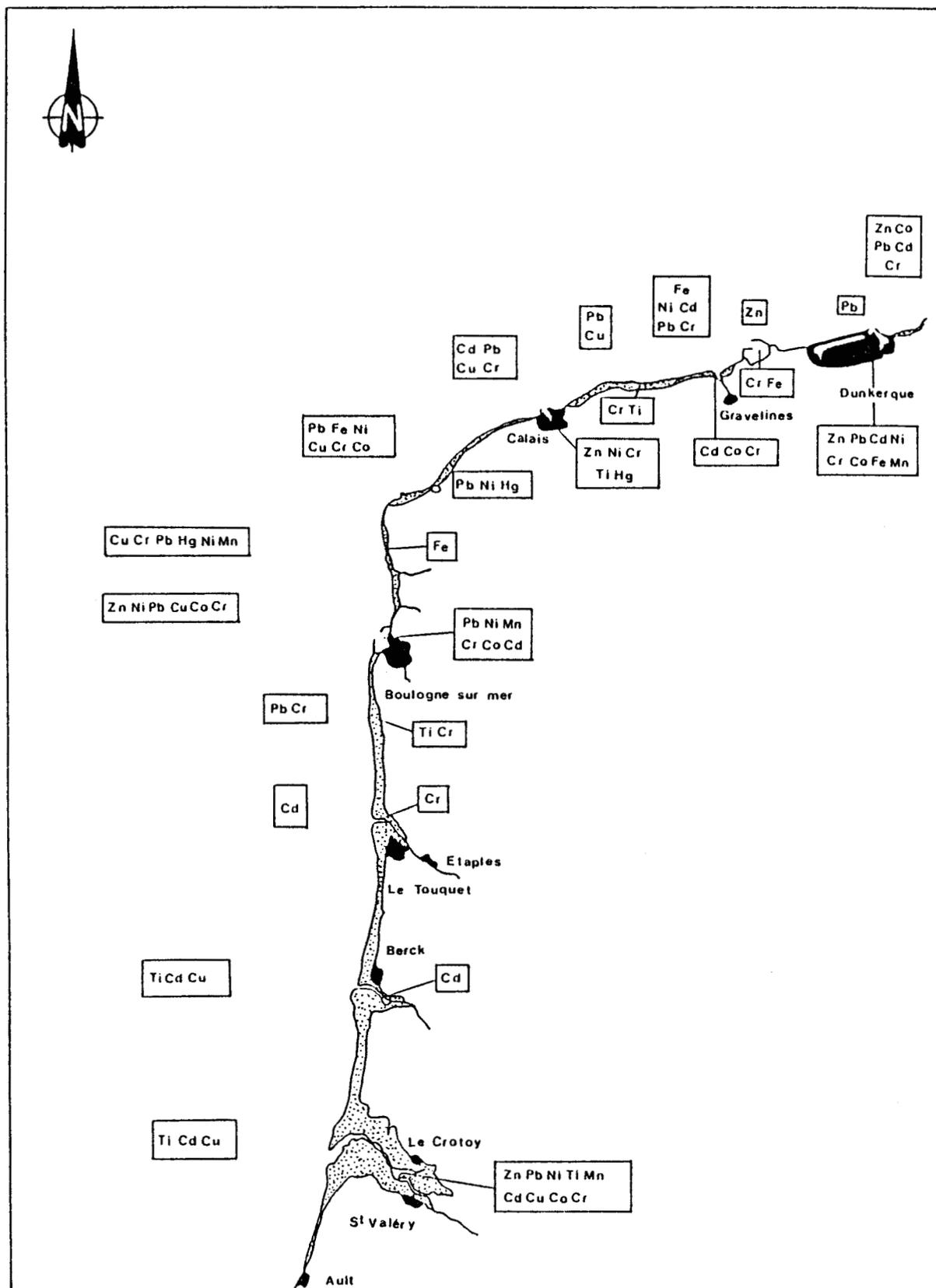


Figure 2 : Principaux contaminants métalliques des sédiments
(d'après L'HOPITAUULT et al., 1983)

De Boulogne à la frontière Belge, deux types de contamination peuvent être distingués :

- une pollution côtière, très diversifiée selon les activités industrielles locales et le degré d'urbanisation,
- une pollution généralisée (essentiellement par Fe, Zn, Pb et Cu) observée au large entre Boulogne et le Cap Gris-Nez, entre Calais et Gravelines et au nord de Dunkerque.

D'après les travaux de DELABRE (1985), s'intégrant dans la campagne Hydrobios II (estran et zone subtidale proche), le secteur de Calais à Gravelines est caractérisé par une pollution métallique particulièrement importante de la zone subtidale éloignée notamment par le Cu, puis le Zn, le Pb et enfin le Cd. A l'opposé, la frange côtière apparaît, dans l'ensemble, moins polluée.

En face de Boulogne, les sites présentent une contamination générale au Cd et également en Zn, Pb et Hg. La zone située au Sud de Boulogne apparaît être la moins polluée de toutes celles étudiées.

La localisation des points contaminés dans les zones subtidales correspond aux dépôts de dragages qui sont considérés comme source de pollution. En effet, comparés aux apports de métaux sur le littoral Nord, le flux de métaux lourds liés aux dragages portuaires est considérable : 5 fois plus grand pour le Cu ; 3,4 fois pour le Zn et 5,6 fois pour le Pb.

L'étude de DESSAINT (1987) a eu pour but de déterminer les teneurs en Cd, Co, Cu, Fe, Ni et Pb des fractions fines des sédiments (<63µm) provenant de quatre sites différents. Les trois premiers sont situés en Manche, entre Berck et Etaples et répartis de la côte vers le large (bancs du "littoral", de la Bassure de Baas et du Vergoyer). Le dernier site est localisé en Mer du Nord sur le banc du Dyck au large de Calais.

Les résultats obtenus montrent que les métaux Cd, Co et Fe ne dépassent pas le "seuil de surcharge", défini comme étant égal à 5 fois celui des teneurs naturelles des sédiments en métaux.

Le Ni et le Pb révèlent une pollution du milieu, principalement pour le "littoral" et le Dyck, deux zones à sédiments plus ou moins envasés.

Le Cu n'aurait pas une origine anthropique ou serait à intégrer dans le cadre d'une pollution généralisée extrarégionale.

6.1.4. Teneurs en métaux de la matière vivante

Durant les campagnes Hydrobios, les mollusques *Mytilus edulis* et *Cardium edule* ont été utilisés pour évaluer les teneurs en métaux de la

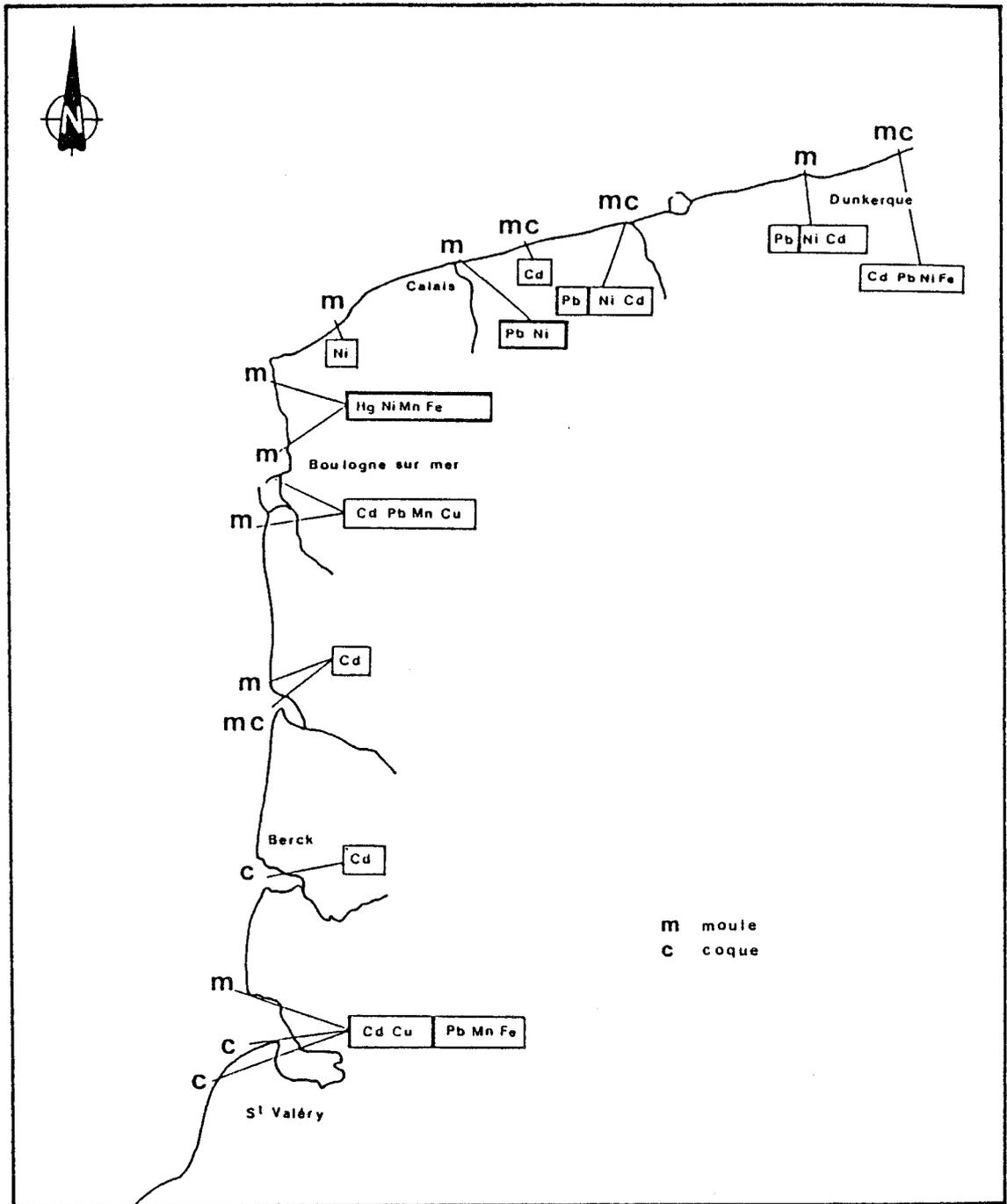


Figure 3 : Contaminants métalliques majeurs des moules et des coques (d'après L'HOPITAULT, 1982)

matière vivante sur le littoral de Ault à la frontière belge. La figure 3 présente les sites où les concentrations métalliques sont anormales avec dépassement de la capacité d'autoépuration des mollusques (L'HOPITAUULT, 1982).

Comme pour les sédiments, on ne constate pas de contamination dominante par un seul métal mais plutôt une multiplicité de contaminations. On remarque que dans la zone Calais-Dunkerque, les éléments Pb et Ni sont abondants dans les mollusques. Au sud de Boulogne, les organismes présentent une contamination moins variée et plutôt caractérisée par le Cd.

Des données concernant ces mêmes espèces sont exposées dans un rapport de BARBIER et al. (1986). Les résultats obtenus dans les mollusques et les sédiments sont cohérents entre eux. Ils permettent de caractériser l'état de la contamination métallique du littoral régional.

La majorité des concentrations mesurées sur le littoral Nord-Pas-de-Calais sont faibles et correspondent à des valeurs habituellement rencontrées dans le milieu naturel.

Cependant divers sites présentent des concentrations en métaux élevées. Ils sont situés dans les secteurs Calais-Dunkerque et Boulogne-Gris-Nez. Les zones de contamination identifiées correspondent aux sites de rejets de boues de dragages portuaires pour le large et aux abords des grands ensembles urbains et portuaires, à la côte.

Sur le littoral sud, le secteur de Berck et Etaples présente les concentrations les plus faibles. De ce fait, il peut être considéré comme le secteur de référence au plan régional.

D'ailleurs, les teneurs métalliques observées chez des flets (*Platichthys flesus*) prélevés sur ce site de référence et au niveau de Dunkerque confirment l'hypothèse d'une zone témoin "saine" dont la contamination est moindre que celle de la zone de Dunkerque (DELVAL, 1984).

6.2. Présentation des sites de prélèvements et des espèces étudiées

La région de Calais à Dunkerque constitue la zone la plus contaminée du littoral.

Comme l'essentiel des métaux lourds provient de Calais ; ceux-ci sont entraînés vers le Nord-Est en raison du pas de marée ce qui amène à ce que la zone contaminée par les rejets se situe entre Calais et Gravelines.

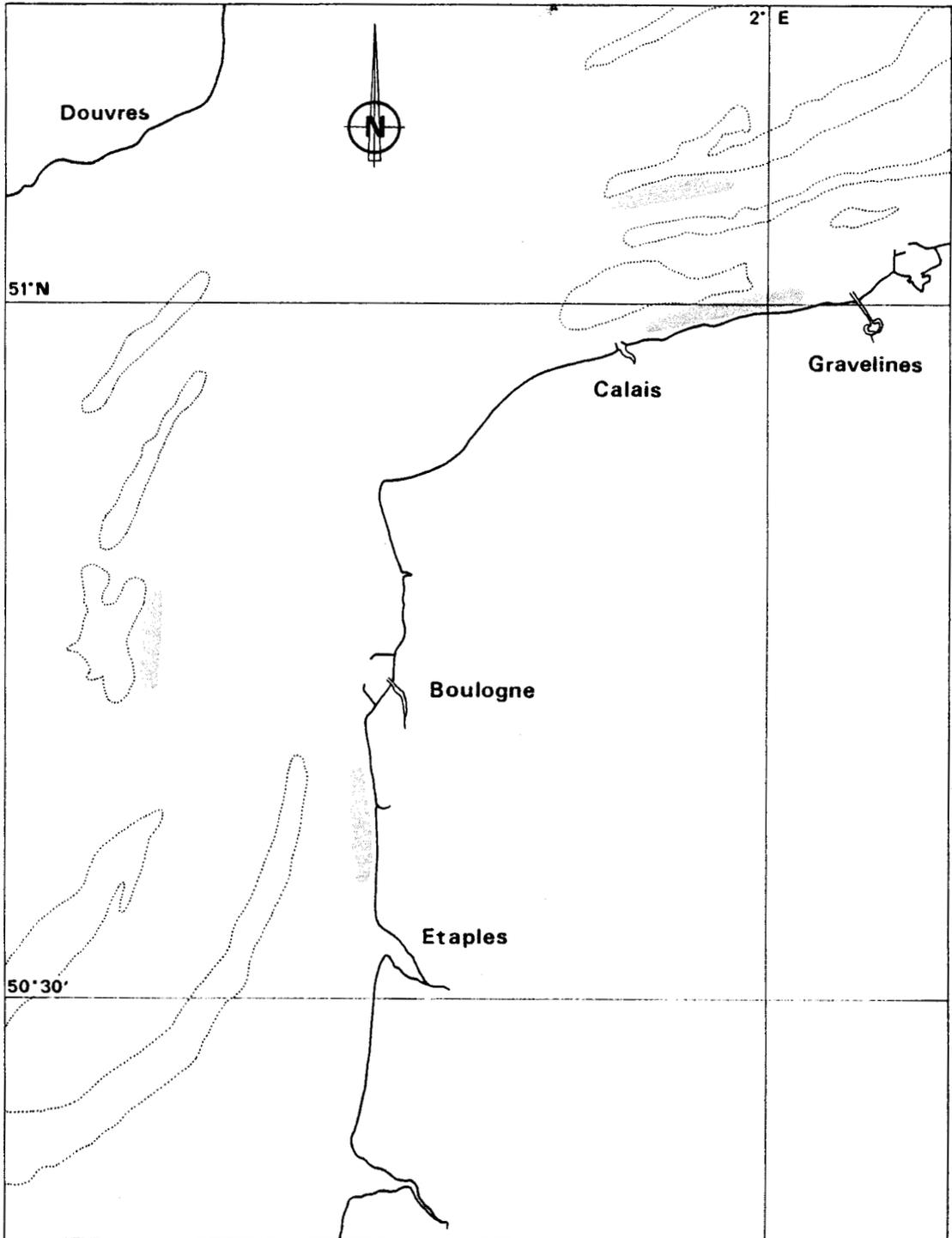


Figure 4 : Localisation des sites de prélèvements

C'est donc dans cette zone que nous effectuerons les chalutages, à la côte et au large.

Ces chalutages visaient à capturer trois espèces de poissons : la morue (*Gadus morhua*) ainsi que deux espèces de pleuronectidés, la limande (*Limanda limanda*) et la limande-sole (*Microstomus kitt*).

La limande est un poisson plat benthique, carnivore. En Mer du Nord, la période de maturation des gonades débute en Octobre-Novembre et la ponte a lieu en avril-mai (TASSEL, 1985). Pendant toute la période de reproduction, cette espèce vit à la côte puis repart vers le large. Nos prélèvements ayant eu lieu en automne (octobre-novembre) jusqu'au printemps (avril-mai), nous avons toujours pêché les limandes sur les sites "côte". Le sédiment meuble sablo-vaseux constitue le biotope de la limande.

La limande-sole, pleuronectidé comme la limande, ne vient pas à la côte. Cette espèce recherche les fonds durs et les sédiments caillouteux. On la trouve de la Norvège à la Manche où elle devient rare.

La morue, appartenant à la familles des Gadidés, est un poisson nectobenthique carnivore dont le régime alimentaire est contitué principalement de vers, de crabes et de crevettes. A l'âge adulte, les morues se nourrissent de poissons plus petits, et à ce titre, peuvent être qualifiées de consommateurs tertiaires.

La morue et la limande-sole ont donc été prélevées au large dans une zone située à l'extrémité sud du banc "Out Ruytinghem" ; les fonds atteignent environ 40 mètres et le sédiment y est grossier (sables coquilliers). Les prélèvements de limandes ont été effectués à la côte dans la zone du phare de Walde, sur des fonds de 10 à 15 mètres (figure 4).

Afin de disposer de poissons de "référence" prélevés dans une zone dite "saine", en fait moins contaminée (voir 6.1), nous avons effectué en parallèle, des chalutages dans la région de Boulogne. Deux zones ont été sélectionnées : à la côte, au niveau d'Hardelot et au large, au niveau des ridens de Boulogne. Les natures des sédiments de ces deux sites sont comparables à celles des sites contaminés.

Les prélèvements du large devaient, à l'origine, être effectués au niveau du Vergoyer (secteur sud de Boulogne), zone peu contaminée mais nos pêches peu fructueuses nous ont contraint à un "repli" sur le site des "ridens", localisé en face de Boulogne.

CHAPITRE II

MATERIEL ET METHODES

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

1. Description des méthodes d'échantillonnage

1.1. Prélèvements du matériel biologique.

Les poissons ont été prélevés à bord du SEPIA II, navire océanographique du C.N.R.S., rattaché à la Station Marine de Wimereux.

Les spécimens destinés aux analyses ont été mesurés puis disséqués. Les poissons ont été tués par section de la tête en arrière des ouies. Les organes prélevés (muscle, foie, branchies) ont été placés immédiatement à - 20°C dans des sachets en polyéthylène ainsi que la tête afin de prélever les otolithes ultérieurement. Le sexe et la taille de chaque poisson ont été notés.

Les spécimens destinés aux intoxications expérimentales ont été placés dans les viviers, à bord du SEPIA II, puis transférés rapidement dans les aquariums de la Station Marine de Wimereux.

1.2. Prélèvements de sédiments

Des sédiments ont été prélevés en différentes stations, situées au niveau de chacun des traits de chalut, ceci afin de vérifier l'homogénéité de chaque zone de travail. Pour chaque point d'échantillonnage, les prélèvements ont été tripliqués.

A la côte, la nature du sédiment a permis de réaliser des prélèvements au carottier Reineck modifié. Les échantillons prélevés dans les trois carottes obtenues sont limités à la fraction superficielle du sédiment (5 à 6 cm).

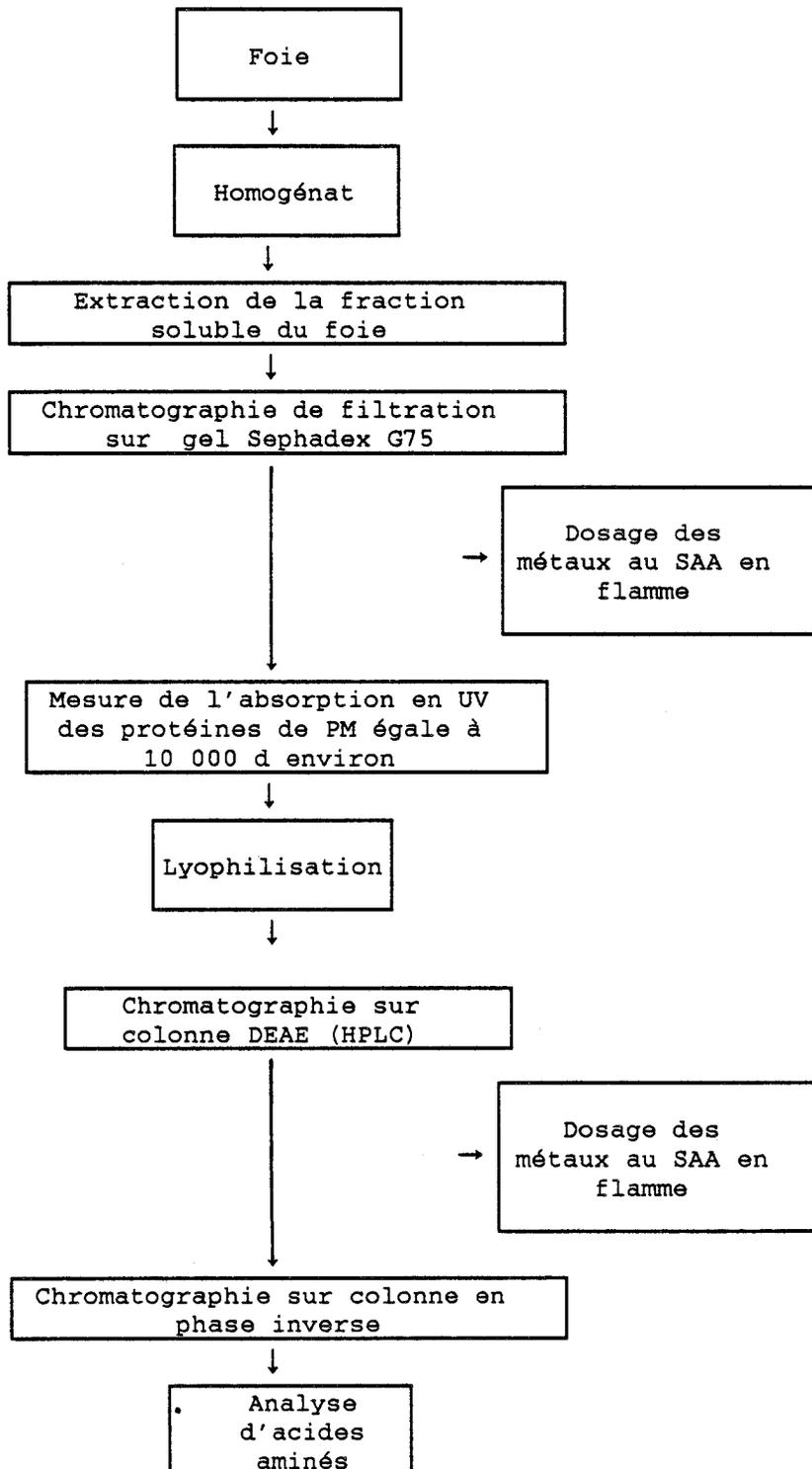
Au large, le sédiment beaucoup plus grossier n'a pu être prélevé qu'à la benne Shipeck car les autres moyens de prélèvement posaient divers problèmes techniques. A chaque station, plusieurs prélèvements ont été réalisés afin d'obtenir trois échantillons de taille correcte.

Les échantillons ont été stockés au congélateur dans des sacs de polyéthylène.

1.3. Prélèvements des otolithes

Les otolithes sont contenues dans l'oreille interne et présentes au nombre de trois paires. Chez de nombreuses espèces de poissons, la Sagitta est la plus grande et permet de déterminer l'âge grâce à l'alternance de zones opaques et hyalines liée au métabolisme du calcium en fonction des saisons estivales et hivernales.

Tableau 8 : Protocole expérimental utilisé pour la purification et la caractérisation des metalloprotéines



Les otolithes ont été analysées par les soins du personnel de l'équipe Dr. A. SOUPLLET (IFREMER Boulogne-sur-mer). Les otolithes de limandes et limande-soles sont observées "in toto" à la loupe binoculaire ; celles de morues sont coupées transversalement après inclusion dans la résine, montées sur lames et l'observation à la loupe binoculaire permet de compter le nombre d'anneaux translucides et opaques.

2. Séparation et caractérisation des métalloprotéines hépatiques

La plupart des méthodes utilisées pour la purification et la caractérisation des métalloprotéines (MP) sont récapitulées dans le tableau 8. Les techniques d'analyses que nous avons utilisées ont été mises au point lors d'études menées au laboratoire concernant la caractérisation des métalloprotéines de flet (*Platichthys flesus*) (DELVAL, 1984 ; RICHARD et al., à paraître).

2.1. Intoxication des poissons par du Cd

Des MP ont été induites artificiellement chez les poissons pour servir de protéines de référence lors de l'étude des protéines complexant les métaux dans des échantillons provenant du milieu naturel.

Des poissons ont été intoxiqués par injections intrapéritonéales de Cd à raison de 1 mg/kg (sous forme de CdCl₂). Ils ont reçu sept à huit injections de cette dose de contaminant, réparties sur une durée de 36 heures environ puis ont été disséqués de la même façon qu'en mer.

2.2. Extraction tissulaire

Un échantillon de foie d'environ 1,5 g est broyé et homogénéisé pendant deux minutes, à 0°C, au moyen d'un homogénéiseur Ultra-turrax, dans deux volumes de sucrose 0,5 M. Les homogénats sont alors centrifugés à 37 000 g, à 4°C, pendant trois heures. Les surnageants sont ensuite prélevés. Un volume de 2,5 à 3 ml de surnageant est nécessaire pour une chromatographie de filtration sur gel. Lorsque la taille du foie le permet, davantage de foie est broyé et homogénéisé et des fractions de surnageants de 2,5 à 3 ml sont aliquotées et congelées à - 20°C pour être utilisées dans le mois suivant tandis que les autres sont lyophilisées.

2.3. Chromatographie de filtration sur gel

La filtration sur gel permet de séparer les constituants d'un mélange selon leur taille moléculaire. Cette filtration s'effectue pour des protéines complexant les métaux, selon les conditions définies par SUZUKI en 1983, cité par DELVAL en 1984 :

- on considère que l'absorbance des métaux sur la colonne est négligeable,
- il n'y a pas de ligands, pour les différents métaux étudiés, au niveau des tampons,
- le pH est neutre ou légèrement basique, pour éviter la dissociation des métaux,
- la composition de l'éluant doit être constante lors de l'élution et de la détection.

Nous avons utilisé du gel Sephadex G75 (Superfine, Pharmacia). Ce type de gel exclut les macromolécules de poids moléculaire (PM) supérieur à 70 kDa et permet une séparation maximale des protéines de PM compris entre 60 et 3 kDa.

Les colonnes utilisées ont une hauteur de 95 cm et un diamètre de 2,6 cm. Avec ce type de colonne, on peut chromatographier jusqu'à 3 ml de surnageant tout en s'assurant d'une bonne séparation des molécules des différentes gammes de PM.

Le tampon utilisé est du formiate d'ammonium 0,01 M ; pH = 7,4 (pH proche du milieu intérieur). Son débit est réglé par une pompe péristaltique (Micro Perpex Pump LKB 2132) à 12 ml/heure.

La sortie de la colonne est reliée à un détecteur d'absorption UV (Uvicord S, LKB 2138) réglé à 254 nm (absorption spécifique des Cd-thionéines) sur une échelle d'absorbance qui s'étend de 0 à 0,2. Il est lui-même relié, d'une part à un collecteur de fractions (LKB 2212 Helirac) (réglé à 30 minutes par fraction), d'autre part à un enregistreur (LKB 2210 Recorder). Cet ensemble (excepté l'enregistreur) est placé dans une armoire réfrigérée à 4°C.

Les volumes d'élution des molécules de différents PM sont déterminés suite à une chromatographie réalisée avec des standards (γ -globuline 158 kDa ; Ovalbumine 44 kDa ; Myoglobine 17 kDa ; Vitamine B12, 1 350 Da). L'homogénéité de la colonne est vérifiée par un échantillon de 2 ml de Bleu Dextran enrichi par du sucrose.

Les protéines qui nous intéressent ont un PM compris entre 8 et 12 kDa environ et elles sont éluées au niveau du pic défini sous le vocable "pic2". Les fractions éluées au niveau de ce pic sont retenues et lyophilisées, hormis les volumes destinés au dosage des métaux qui sont conservés à 4°C ou à - 20°C. Les fractions contenant les molécules de haut et faible PM sont également conservées pour le dosage des métaux afin d'établir les profils de répartition des métaux dans les différentes gammes de PM.

2.4. Dosages des métaux par spectrophotométrie d'absorption atomique (SAA)

- Principe du SAA en flamme

Une solution contenant l'élément métallique à doser est injectée dans une flamme dans laquelle les éléments tendent à rester à l'état fondamental. Une radiation de longueur d'onde caractéristique de l'élément à doser provenant d'une lampe à cathode creuse est émise à travers la flamme. En absorbant cette énergie, les atomes passent à l'état excité. La baisse de l'intensité de la radiation due à l'absorption d'énergie est mesurée par un spectrophotomètre et elle est fonction du nombre d'atomes présents sur le chemin de la radiation à tout moment (ALLEN, 1974 cité par DELVAL, 1984).

- Dosages

Les concentrations de Cu, Zn et Cd des fractions obtenues après chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 ou sur colonne DEAE en HPLC sont mesurées au SAA en flamme (Perkin-Elmer 100) équipé d'une flamme air-acétylène. Le nombre de réplicats et le temps d'analyse sont fonction du volume de solution disponible. Les résultats obtenus sont des moyennes exprimées en ppm. L'écart-type est également indiqué. Ces résultats sont ensuite convertis en µg/g de poids frais. Les seuils de détection des différents éléments métalliques sont regroupés dans le tableau 4.

2.5. Mesure de l'absorption dans l'Ultra-Violet

Les fractions qui ont été retenues après chromatographie de filtration sur gel G75 ont été analysées au spectrophotomètre UV (Beckman modèle 24 ou Kontron Uvicon 940). Les densités optiques ont été mesurées de 200 à 300 nm pour plusieurs raisons :

- On a utilisé le rapport d'absorbance (abs.) : $\text{abs.220 nm} \times 0.13$ pour évaluer approximativement la quantité de protéines en mg/ml d'une solution, ceci afin de déterminer la quantité de protéines à injecter en HPLC (communication du Dr. SAUTIERE, Institut de Recherche sur le Cancer - Lille).

- Les MT absorbent peu à 280 nm du fait de l'absence d'acides aminés aromatiques et l'absorbance à 254 nm est caractéristique de la liaison Cd-thionéine (KAGI et NORDBERG, 1979). Des rapports $\text{abs.254 nm}/\text{abs.280 nm}$ élevés sont donc caractéristiques de la présence de métallothionéines (MT) ayant complexé du Cd.

2.6. Chromatographies par HPLC

L'équipement HPLC est un système Gold Beckman équipé d'un module binaire de sélection automatique des solvants (modèle 126) et d'un détecteur spectral (modèle 167), associé à un microordinateur Victor (modèle V 286C).

Deux types de chromatographies ont été réalisées en HPLC. Pour chacune, le débit du tampon est de 1 ml/minute et les absorbances à 220 nm et à 254 nm sont enregistrées en continu. Les tampons sont préparés dans de l'eau bidistillée et sont filtrés sous vide sur membrane 0,45 μm (Millipore) avant utilisation.

- Chromatographie sur colonne échangeuse d'anions (DEAE) par HPLC

On a utilisé cette technique pour séparer des protéines de PM voisin, en fonction de leur charge ionique.

Les lyophilisats obtenus après chromatographie de filtration sur gel sont dissous dans 300 μl de Tris-HCl 10 mM et filtrés sur des unités de filtration par centrifugation (Millipore, Ultrafree Mc ; 0,22 μm). 250 μl de cette solution sont ensuite chromatographiés sur DEAE (TSK - 5 PW - 7,5 x 75 mm ID Beckman) munie d'une précolonne (TSK - DEAE - 5 PW - Beckman). L'élution s'effectue avec un tampon Tris-HCl (Sigma) à pH égal à 7,4 dont le gradient est linéaire (de 10 à 120 mM, en 18 minutes) ; la durée totale de la chromatographie est de 45 minutes. Le tampon A est une solution Tris-HCl 10 mM et le tampon B est du Tris-HCl 200 mM. Les conditions du gradient sont les suivantes : temps (minutes) / %B = 0/0, 1/0, 19/60, 20/100, 23/0 et 45/0.

Certaines chromatographies (filtration sur gel G75 et DEAE) ont été réalisées après ajout de β -mercaptoéthanol 5 mM (BDH) dans les

tampons, afin de vérifier si des problèmes d'oxydation des protéines interviennent durant ces analyses.

- Chromatographie sur colonne en phase inverse par HPLC.

La chromatographie en phase inverse était, à l'origine utilisée pour dessaler les fractions obtenues en DEAE et destinées aux analyses d'acides aminés ; nous l'avons utilisée également afin de séparer différents constituants, ayant un PM et une charge ionique voisins, selon leur propriétés d'hydrophobicité.

Un volume de 1 ml maximum des fractions à chromatographier est appliqué à la colonne (Beckman - C8 - Ultrapore - RPMC 5 μ m - 4,6 mmx 25 cm) et élué avec un gradient linéaire d'acétonitrile (ACN) (Baker-qualité "pour HPLC") (0 à 50%) contenant 0,05% d'acide trifluoroacétique (TFA) (Merck, pour spectroscopie) à pH égal à 2, d'une durée de 30 minutes. La durée totale de la chromatographie est de 60 minutes. Le gradient est un mélange du tampon A (eau contenant 0,05% de TFA) et du tampon B (ACN contenant 0,05% de TFA). Les conditions du gradient sont les suivantes : temps (minutes) / %B = 0/0, 5/0, 35/50, 40/70, 45/0 et 60/0.

2.7. Analyses d'acides aminés

Les analyses d'acides aminés ont été réalisées au laboratoire du Dr. SAUTIERE. Les échantillons sont hydrolysés par de l'acide chlorhydrique 6N (1 ml/mg de protéine) à 110°C pendant 24 heures, dans des tubes qui sont scellés sous vide. Les hydrolysats sont ensuite repris dans un tampon citrate de sodium à pH : 2,2 et placés dans un autoanalyseur (Beckman 6300).

3. Quantification des métallothionéines

3.1. Essai de mise au point d'un dosage des métallothionéines (MT) par colorimétrie

Les premiers essais ont été réalisés à IFREMER Nantes dans le laboratoire du Dr. F. GALGANI.

3.1.1. Principe du dosage des MT par quantification des thiols.

Il s'agit d'un dosage colorimétrique réalisé à l'aide du DTNB (acide dithionitrobenzoïque) (Sigma) mis au point par ELLMAN (1959). Ce produit est un indicateur coloré de la quantité de groupements

sulfhydryles présents dans la solution à analyser. Il peut donc être utilisé comme indicateur de la quantité de cystéine et donc de MT.

Le but de l'essai est de doser les résidus SH, correspondant à la cystéine des MT exclusivement, dans des surnageants. Ces surnageants doivent être purifiés afin d'éviter les interférences avec les thiols provenant de molécules de haut ou faible PM.

3.1.2. Réalisation du test

Les surnageants sont préparés selon la méthode décrite en 2.2, mais le foie est homogénéisé dans deux volumes de tampon formiate d'ammonium 0,01 M contenant du β -mercaptoéthanol à 0,01 M.

- Élimination des molécules de PM élevé

Les molécules de PM élevé sont éliminées par chauffage des surnageants à 80°C pendant 3 minutes ; cette méthode préserve les MT puisque celles-ci résistent à la chaleur (CHERIAN et al., 1978).

- Élimination des molécules de faible PM

La présence de glutathion, de cystéine libre ou de résidus provenant de la dénaturation des grosses protéines risque d'interférer dans le dosage des thiols. Un système de filtration par centrifugation (Système Centrisart, seuil de coupure égal à 5 kDa - Sartorius) est utilisé afin de les éliminer.

- Dosage des thiols

50 μ l de la solution de DTNB (40 mg de DTNB dans 10 ml de tampon phosphate 0,1 M ; pH = 7,8) sont ajoutés aux 300 μ l d'échantillon (surnageant chauffé et filtré) déposés dans des puits de microplaques (destinées aux dosages immunologiques en ELISA). Le temps d'action du réactif est de 30 minutes et la lecture de l'absorbance à 405 nm est réalisée directement sur lecteur de plaques. Cette absorbance est reportée sur la courbe standard préparée avec du glutathion (Prolabo) dilué dans du tampon formiate d'ammonium 0,01 M (1 mole SH/mole glutathion) (Figure 5). La quantité de MT est estimée grâce au rapport 20 moles SH/mole MT. La gamme utilisée permet de détecter jusqu'à 25 nmoles de SH et elle est caractérisée par l'équation : $y = 0,413 x - 0,023$. Les quantités de MT dosées varient entre 88 pmoles et 1,23 nmoles/puits. Cette technique permet donc de détecter une quantité minimale de MT d'environ 1,77 μ g/ml (0,62 μ g/puits).

3.2. Préparation des échantillons pour les dosages des MT et pour le dosage des métaux dans les fractions solubles des foies.

100 mg de chacun des foies de poissons sont prélevés puis homogénéisés à l'Ultra-turrax dans 2 ml de tampon Tris-HCl 50 mM, à pH 8, à 0°C. Pour certains échantillons (échantillons standards de poissons contaminés en laboratoire), des homogénats contenant 200 mg ou 1 g de foie dans le même volume de tampon sont également préparés.

Les homogénats sont ensuite centrifugés à 10 000 x g, pendant 20 minutes, à 4°C. Pour chaque surnageant, plusieurs fractions de 200 µl sont aliquotées et congelées jusqu'à leur utilisation en RIA, en polarographie à impulsions différentielles et/ou en ELISA. Le reste (0,5 à 1 ml selon les surnageants) est destiné à être minéralisé pour doser les métaux contenus dans la fraction soluble des foies.

3.3. Dosage des MT par polarographie à impulsions différentielles.

Les analyses par polarographie à impulsions différentielles ou "differential pulse polarography" (DPP) ont été réalisées à l'Université des Sciences et Technologies de Lille dans le laboratoire de Chimie Marine du Pr. WARTEL, ainsi qu'à l'Université de Göteborg (Suède) dans le laboratoire du Dr. HAUX.

3.3.1. Principe

La méthode est basée sur la détection d'une variation d'intensité électrique qui survient quand un composé est réduit ou oxydé.

Le dosage de la cystéine est réalisé sous les conditions suivantes :

- la différence de potentiel entre l'électrode de mesure et l'électrode de référence (Ag - AgCl saturée au KCl) varie de - 1,38 V à - 1,62 V à une cadence de 5 mV/s.

- le renouvellement de la goutte de Hg au niveau de l'électrode de mesure a lieu toutes les 0,5 secondes. La réponse électrochimique des protéines contenant de la cystéine apparaît théoriquement à - 1,48 V. Selon les conditions d'analyse (appareillage : étalonnage de l'électrode de référence, nature de l'échantillon analysé), la réponse électrochimique peut être décalée. Effectivement, lors de nos analyses, la réponse électrochimique apparaissait à un potentiel plus bas (-1,53 V). Cette réponse est matérialisée par l'augmentation du courant électrique (visualisée sur l'enregistreur) causée par la réduction de l'hydrogène du groupement sulfhydryle de la cystéine des MT (catalysée

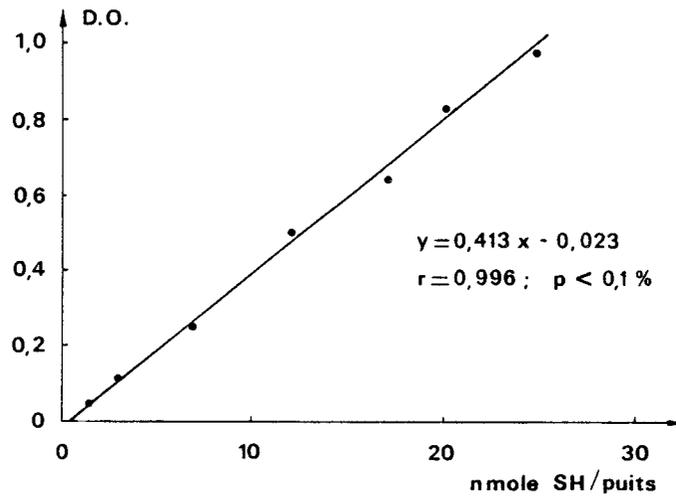


Figure 5 : Courbe de calibration de la glutathion.

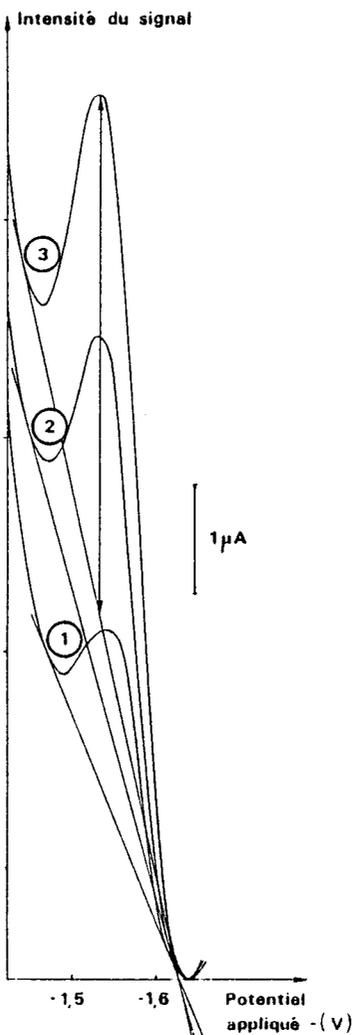


Figure 6 : Réponse électrochimique de l'analyse des MT contenues dans différents volumes d'un surnageant hépatique de limande contaminée en laboratoire, dosées par DPP (électrode utilisée en mode "DME").

① 200 µl, ② 400 µl, ③ 600 µl de surnageant dilué au 1/10ème dans du NaCl.

par le cobalt). La hauteur de cette vague est mesurée par rapport à la tangente aux deux minima (Figure 6), et elle est directement proportionnelle à la concentration de SH.

3.3.2. Réalisation du dosage

- Matériel biologique

Les échantillons biologiques ont été préparés selon la technique décrite en 3.2. Les fractions de 200 µl de surnageants sont décongelées, recentrifugées pour séparer les lipides encore présents après la première centrifugation et ayant précipité durant la congélation. 100 µl sont alors dilués 10 fois dans du NaCl 0,9% (poids/volume). Ils sont chauffés à 95°C, pendant 5 minutes, puis centrifugés à 10 000 g, pendant 5 minutes, à 4°C pour éliminer les molécules de PM élevé. Ils sont alors dosés immédiatement.

- Appareillage et réactif

L'analyse est réalisée avec le Modèle 303 SMDE utilisé en mode DME (c'est-à-dire en mode "goutte tombante") ; il est couplé à l'analyseur PARC EG&G Model 384.

Selon le système d'électrode utilisée, différentes compositions de tampon (électrolyte) ont été testées. Avec le PARC EG&G 303 SMDE, on utilise l'électrolyte de Bridcka modifié qui est composé de 1,2 mM d'Hexaminecobalt chloride (Co (NH₃)₆ Cl₃- Sigma), 1 M de NH₄Cl (Merck-qualité pour analyses), 1 M de NH₄OH (Merck-qualité pour analyses). Cet électrolyte est préparé chaque semaine et stocké à 4°C à l'obscurité.

- Protocole

Un volume connu de surnageant (variant entre 50 et 300 µl) est mélangé à 10 ml de tampon, déposé dans une cellule, auquel sont ajoutés 100 µl de Triton-X100 (12,5 µl/ml) utilisé comme surfactant. L'ensemble est dégazé par passage d'azote pendant 2 minutes. Le dosage est réalisé pour la quantité initiale de surnageant et également après deux ajouts supplémentaires du même échantillon (les durées des purges après les deux ajouts sont limitées à 30 secondes). Le résultat exprimé est calculé à partir des trois valeurs obtenues.

L'appareil est calibré avec de la MT commerciale de foie de lapin (Sigma).

Selon THOMPSON et COSSON, la gamme de linéarité s'étend entre 75 ng et 2,1 µg de MT/10 ml d'électrolyte et la sensibilité de l'appareil est de 4,33 µA/nmole de MT à 17°C (1984). D'autres auteurs ont évalué que la

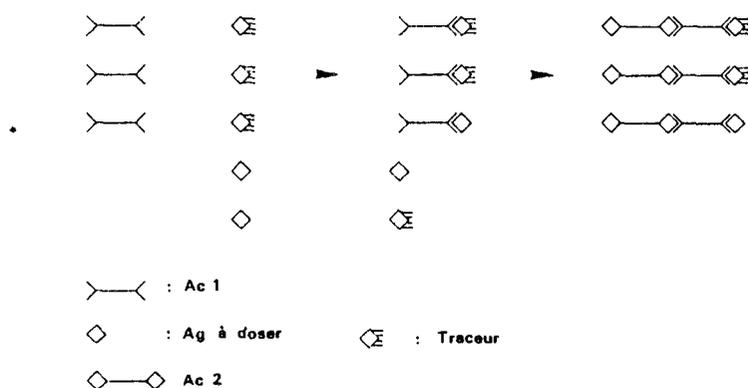


Figure 8 : Principe du dosage radioimmunologique.

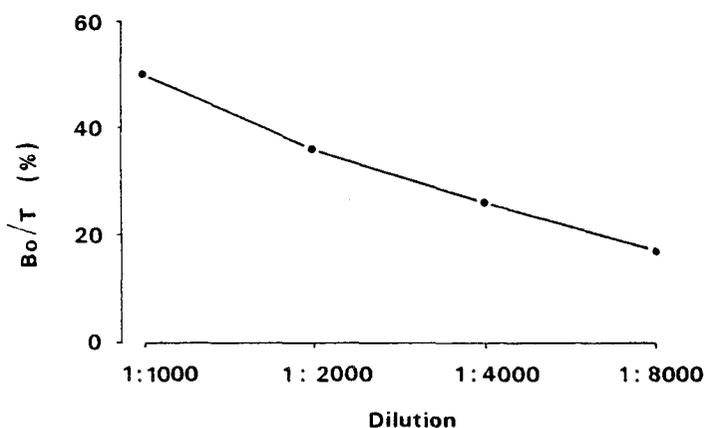


Figure 9 : Courbe de titration du sérum anti-MT de perche produit par le lapin.

Les points illustrent la proportion de ^{125}I -MT précipitée (B0) par rapport à la quantité totale de traceur (T) dans des tubes contenant différentes dilutions du sérum et pas d'antigène "froid".
(d'après HOGSTRAND et HAUX, 1990).

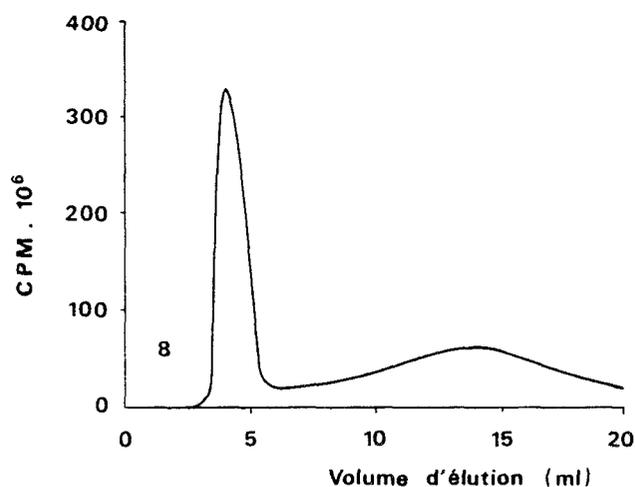


Figure 10 : Séparation de ^{125}I -MT des autres produits iodés sur Sephadex G25 après conjugaison des MT avec le réactif de Bolton-Hunter.
(d'après HOGSTRAND et al., 1987).

gamme étalon est linéaire entre 0,24 et 117 mg MT/10 ml d'électrolyte, que la sensibilité de l'appareil est de 6,42 mA/nmole de MT à 20°C et que la quantité minimale de MT détectée est de 7,2 mg/g foie. (HOGSTRAND et HAUX, 1992).

Nous avons généralement utilisé des gammes étalons variant de 0,37 ou de 0,75 à 6 mg MT/10 ml d'électrolyte (adaptées aux teneurs de nos échantillons) dont la linéarité était bien vérifiée (Figure 7). La sensibilité de l'appareil est de 5,08 μ A/nmole de MT et les quantités minimales détectées d'environ 11 μ g/g de poids frais.

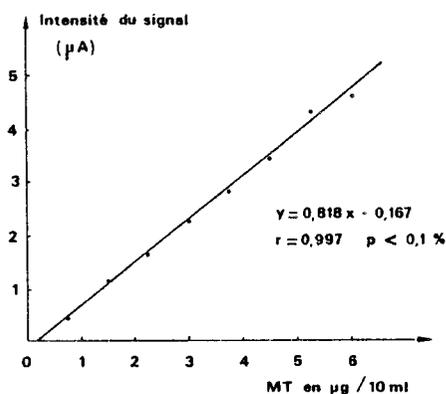


Figure 7 : Courbe de calibration de la MT de foie de lapin.

3.4. Dosage des MT par radioimmunologie (RIA)

3.4.1. Principe

L'idée fondamentale du dosage radioimmunologique réside dans la combinaison d'un marqueur radioactif et d'une immunoréaction. La technique de RIA utilisée est basée sur la méthode du double anticorps (figure 8).

Le dosage RIA revient à titrer un Antigène (Ag) (échantillon à doser) à l'aide d'un Anticorps (Ac) dont la quantité est limitée. L'Ag à quantifier entre en compétition avec une quantité définie d'Ag radiomarqué (traceur) pour se lier aux sites antigéniques des Ac, les Ac étant présents en quantité insuffisante par rapport au nombre total d'Ag.

Avec une quantité accrue d'Ag à déterminer, les chances de liaison des molécules traceuses vont donc diminuer. Une fois la réaction Ag-Ac terminée, la quantité de traceur liée (inversement proportionnelle à la teneur en Ag de l'échantillon) va être séparée du traceur libre par précipitation du complexe Ag-Ac. Cette précipitation aura lieu après ajout d'un deuxième Ac Anti-1er Ac.

3.4.2. Réalisation du dosage

- Réactifs

Le tampon GTB ("Gelatine-Tris Buffer") est composé de Tris-HCl (Merck) 50 mM à pH 8 contenant 0,1% (m/vol) de gélatine (Biorad) et 0,1% (m/vol) d'azide de sodium (NaN₃).

Le réactif de Bolton-Hunter contenant l'Iode radioactive a une activité spécifique d'environ 2000 Ci/mmmole soit 74 TBq/mmmole (Amersham).

Le premier anticorps (Ac1) est un anticorps anti-MT de perche.

Le second anticorps (Ac2) est de l' anti-Immunoglobuline G de lapin produit par la chèvre fourni sous forme lyophilisée et qui contient 125 unités/fiole (Calbiochem).

- Description de la technique utilisée

La technique de RIA utilisée a été mise au point par le Dr. C. HOGSTRAND (Equipe du Dr C. HAUX au laboratoire de zoophysologie de Göteborg, Suède). Les dosages par RIA de MT hépatiques de limandes, limande-soles et morues ont été réalisées dans ce laboratoire lors d'un stage effectué en février /mars 91.

Les Ac dirigés contre la MT de perche sont polyclonaux et ont été produits par le lapin. L'Ac est utilisé à une dilution de 1/2 000. La proportion maximale de MT de perche, marquée à l'Iode radioactive, qui se lie à l'Ac utilisé à cette dilution est de 36% (Figure 9). Des quantités de MT de perche comprises entre 0,15 et 250 ng peuvent être dosées ; la limite de détection est de 15 pg ; la valeur de DE50 est de 10 ng de protéine et la liaison non spécifique atteint 5% de la radioactivité totale présente dans le tube. Le second Ac (Anti-Immunoglobuline G de lapin) va induire la précipitation du complexe Ag-Ac.

- Iodination

10 µg de MT de perche contenus dans 20 µl de tampon borate 0,1 M à pH 9 sont ajoutés à une quantité d'iode radioactive, dont l'activité est de 18,5 MBq. Le solvant benzène diméthylformamide, dans lequel l'I125 est fournie, est évaporée sous azote. La réaction de marquage des MT, avec l'ester iodé séché, se fait pendant 1 heure à 0°C. L'ester n'ayant pas réagi est conjugué avec 500 µl de glycine 200 mM pendant 5 minutes auxquels on ajoute ensuite 500 µl de tampon GTB. La MT marquée est séparée des autres produits radioactifs sur une colonne Sephadex G-25 de 10 ml, équilibrée avec du tampon GTB (Figure 10).

Elle est ensuite stockée à - 20°C par fraction de 1 ml et peut être utilisée pendant 5 semaines sans perte détectable de sensibilité pour l'utilisation en RIA.

Le rendement de la iodination est normalement de 50% et l'activité spécifique de la protéine marquée est de 2,2 MBq/ μ g MT.

- Protocole (Figure 11)

Les dilutions des échantillons, de l'Ac1, de l'Ac2, du sérum non-immun et du traceur sont effectuées dans le tampon GTB. La teneur en MT des standards est préalablement déterminée par DPP (3.3.).

a - 50 μ l de chaque standard ou échantillon à doser (inconnus) sont déposés dans les tubes (Nunc Intermed 3-40339).

b - 50 μ l de traceur dont la dilution représente une radioactivité de 30 000 cpm/tube sont ajoutés puis 400 μ l de l'Ac1 dilué à 1/1600. Le volume total dans chaque tube est donc de 500 μ l et la dilution finale du sérum est de 1/2000. Le contenu des tubes est mélangé puis incubé 48 h à 4°C.

c - 100 μ l de l'Ac2 (Serum de chèvre anti-IgG de lapin) sont alors ajoutés à raison de 0,25 unité/tube. Après mélange, le contenu des tubes est incubé toute la nuit à 4°C.

d - Les tubes sont ensuite centrifugés à 2000 g, à 4°C pendant 60 minutes puis les surnageants sont éliminés. L'I¹²⁵ contenue dans les culots et les tubes "T" est quantifiée avec un compteur Gamma (LKB Wallac 1282 Compugamma).

A chaque expérience RIA, on intègre trois séries de tubes :

- les tubes notés "T" indiquent le nombre total de coups de l'Ag marqué ; ils ne contiennent que les 50 μ l de traceur ;

- les tubes "BO" ou "maximum binding" indiquent la liaison de l'Ag marqué par l' Ac1 en l'absence d'Ag non marqué et remplacé par du GTB ;

- les tubes "NSB" ou "Non Specific Buffer" indiquent la liaison de l'Ag marqué en l'absence d'Ac1 et d'Ag non marqué, c'est donc une mesure de la liaison par les composants autres que l'Ac1. L'Ac1 et l'échantillon sont remplacés par du GTB.

Toutes les analyses (inconnus, standards, NSB, BO, T) sont tripliquées et les résultats exprimés sont les moyennes des 3 valeurs obtenues.

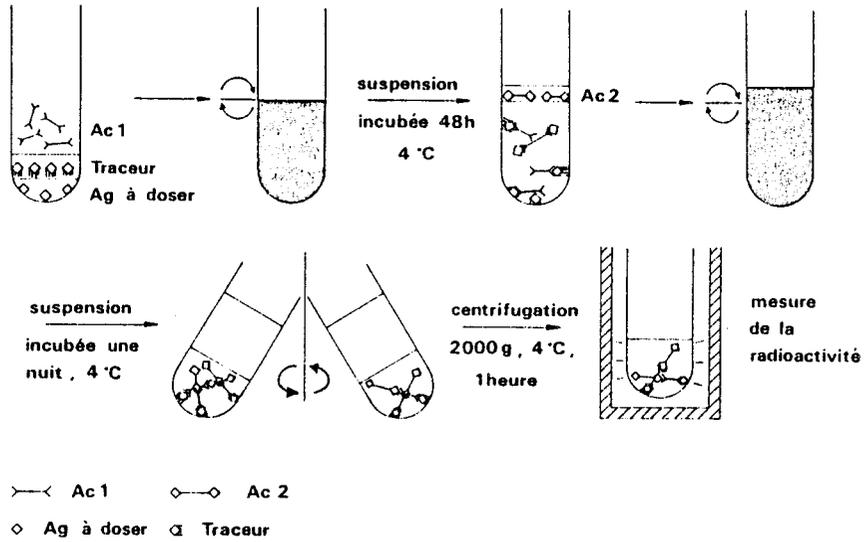


Figure 11 : Etapes du dosage en RIA.

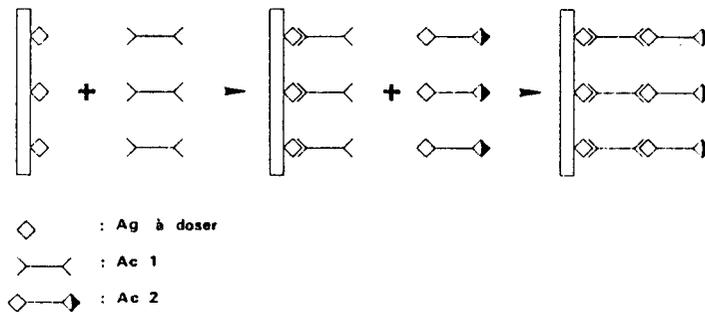


Figure 12a : Principe du dosage en ELISA.

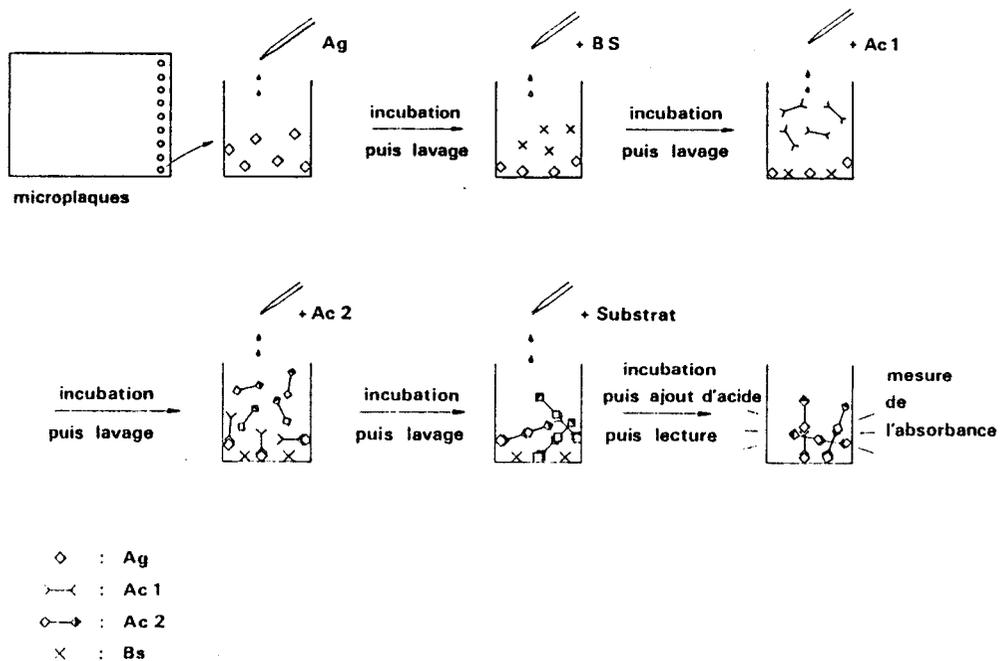


Figure 12b : Schéma simplifié de la procédure du dosage en ELISA.

- Expression des résultats

Les résultats sont exprimés en pourcentages de B/BO en fonction du logarithme de la concentration en MT des échantillons standards. B est égal au nombre de coups détectés dans les tubes contenant les échantillons moins le nombre de coups des tubes NSB. BO est égal au nombre de coups détectés dans les tubes ne contenant pas d'échantillon ("BO") - nombre de coups des tubes NSB.

En fait, $B/BO = (X - NSB)/(BO - NSB)$.

Les courbes standards sont caractérisées par la "dose effective 50%" (DE 50) et la gamme d'utilisation :

La DE 50 correspond à la quantité de MT déterminée par 50% du rapport B/BO c'est à dire la dose pour laquelle 50% de la liaison du traceur est inhibée.

La gamme d'utilisation de la courbe standard est cadrée entre 20% et 80% des limites inférieures et supérieures de la partie linéaire de la courbe.

3.5. Dosage des MT par ELISA

3.5.1. Principe

Les dosages enzymatiques en ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) en phase hétérogène ont été mis au point pour le dosage d'Antigènes (Ag) et très vite appliqués au dosage d'Anticorps (Ac). Les procédés sont comparables à ceux des méthodes radioimmunologiques.

La méthode utilisée ici est la méthode directe qui consiste à doser les Ac (Figure 12a). Selon ce procédé, les Ac à doser réagissent dans un premier temps avec les Ag contenus dans les échantillons qui ont été immobilisés ; dans un deuxième temps, la quantité d'Ac fixée sur l'Ag est mesurée à l'aide d'un second Ac (Anti - IgG) marqué par une enzyme. L'activité enzymatique qui est mesurée, est donc proportionnelle à la quantité d'Ac à doser, elle-même fonction de la quantité d'Ag immobilisée.

3.5.2. Réalisation du dosage

- Réactifs

Le tampon carbonate-bicarbonate (capsules pour ELISA-Sigma) est utilisé à 0,1 M et pH = 7,4.

Le tampon Phosphate ou PBS est un mélange de phosphate monosodique 50 mM et de phosphate disodique 50 mM (Sigma) en proportions telles que

le pH soit de 7,4 ; on ajoute ensuite 150 mM de NaCl (pour analyses - Merck).

La "Blocking Solution" ou BS est une solution de PBS contenant de l'albumine du sérum de bovin (BSA) (pour ELISA-Sigma) à 3%.

Le substrat est composé de tampon citrate (mélange d'acide citrique (pour analyses - Prolabo) 0,1 M et de phosphate disodique 0,2 M pour obtenir un pH d'environ 5) contenant 0,125% d'H₂O₂ (30% - Prolabo) et 0,5 mg d'OPD/ml utilisé comme chromophore (O-Phénylenediamine dihydrochloride - tablettes de 2 mg - Sigma).

Du conjugué de chèvre anti - IgG de lapin marqué à la peroxidase est utilisé comme Ac₂ (Sigma) ; l'Ac anti-MT de perche produit par le lapin utilisé en RIA sert ici aussi de Ac₁. Les 2 Ac sont dilués dans le PBS.

- Protocole (Figure 12b)

Le test est réalisé dans des plaques de microtitration (Nunc-Polylabo) dont les puits sont "coatés" par les échantillons à doser (inconnus) ou des standards.

a - Pour "coater" ces plaques, 100 µl d'échantillon, dilués dans du tampon carbonate-bicarbonate, sont déposés dans chaque puits et incubés environ 18 heures à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées une première fois en distribuant 200 µl/puits d'une solution de tampon phosphate (PBS) contenant 0,05% de Tween 20 (Sigma) puis 4 fois avec du PBS. Elles sont mises à sécher 30 minutes à 37°C.

b - 200 µl de "Blocking Solution" (BS) sont déposés dans les puits et laissés 1 heure à 37°C ; la BS sature les sites restés libres et empêche ainsi la liaison non spécifique des Ac lors des étapes ultérieures. Les plaques sont ensuite lavées selon la procédure décrite en a.

c - 100 µl d'Ac₁ dilué au 1/1000 dans le PBS sont distribués. L'incubation dure 2 h 30 à 37°C, ensuite les plaques sont lavées selon la procédure en a.

d - On ajoute ensuite dans chaque puits, 100 µl d'Ac₂ dilué au 1/1000 dans le PBS ; l'incubation dure 2 h à 37°C puis les plaques sont lavées selon la procédure en a.

e - 100 µl de substrat vont agir 20 minutes et permettre de révéler la réaction.

f - Après ajout de 50 µl d'H₂SO₄ 4N (Merck) pour stopper la réaction, l'absorbance est mesurée à 492 nm au lecteur de "plaques"

(Stripreader - Organon Teknika). Le zéro d'absorbance est obtenu après lecture des puits dans lesquels aucun Ag n'a été "coaté" ("blancs").

On teste 2 à 3 dilutions selon la nature de l'échantillon (surnageants, fractions provenant de chromatographies en Sephadex G75, en HPLC sur colonnes DEAE ou C8).

Tous les échantillons (standards, inconnus) sont testés en tripliquats.

- Expression des résultats

Les résultats (moyenne des trois valeurs du tripliquat) sont exprimés en unités d'absorbance et convertis en quantité de protéines par la relation linéaire logarithmique établie pour les standards.

Les courbes de dilution sont représentées en fonction du log des MT.

La gamme d'utilisation est cadrée entre 20 et 80% des limites inférieure et supérieure de la partie linéaire de la courbe. Les quantités minimales de MT détectables sont déterminées par la valeur correspondant à ces 20% d'absorbance.

4. Analyse des teneurs métalliques des sédiments et des échantillons biologiques

4.1. Sédiments

4.1.1. Préparation des échantillons pour l'analyse du métal total

a - Sédiment total

Les échantillons de sédiments total destinés à l'analyse des métaux sont mis à sécher à l'étuve à 40°C, puis ils sont broyés dans un mortier.

b - Isolement de la fraction fine

L'échantillon de sédiment va subir un tamisage par voie humide afin de recueillir la fraction fine. La séparation est réalisée sur un tamis dépourvu de toute partie métallique dont le maillage était de 80 µm ; nous avons donc dû considérer la fraction fine comme celle ayant une granulométrie inférieure à 80 µm. Cette fraction fine isolée par tamisage est ensuite mise à sécher à l'étuve à 40°C.

c - Analyse granulométrique

Afin de définir la proportion de fraction fine par rapport au sédiment total, une méthode classique d'analyse granulométrique a été utilisée : les échantillons dessalés sont mis à l'étuve à 110°C, jusqu'au séchage ; ils sont ensuite tamisés sur colonne vibrante munie de tamis de

normes AFNOR. Les résultats obtenus pour chaque refus de tamis, sont exprimés en pourcentages du poids total de l'échantillon.

4.1.2. Méthode d'analyse des métaux biodisponibles

L'extraction séquentielle de métaux dans les sédiments permet d'évaluer leur biodisponibilité puisque la fraction liée aux carbonates puis à la matière organique sont successivement extraites. La technique la plus fréquemment utilisée nécessite 5 étapes d'extraction ainsi que des mises au point techniques pour le dosage des métaux en SAA à cause des matrices employées (Chlorure de Magnesium ; Acétate de sodium ...) (TESSIER *et al.*, 1979).

Nous avons opté pour le protocole recommandé dans une publication récente de l'ICES (LORING & RANTALA, 1990) qui a été adapté selon les modifications apportées par STATHAM *et al.* (communication personnelle) (tableau 9), et que nous a conseillé le Pr. WARTEL (Laboratoire de Chimie marine - U.S.T.L.).

Tableau 9 : Protocole expérimental utilisé pour l'extraction des métaux biodisponibles liés aux sédiments

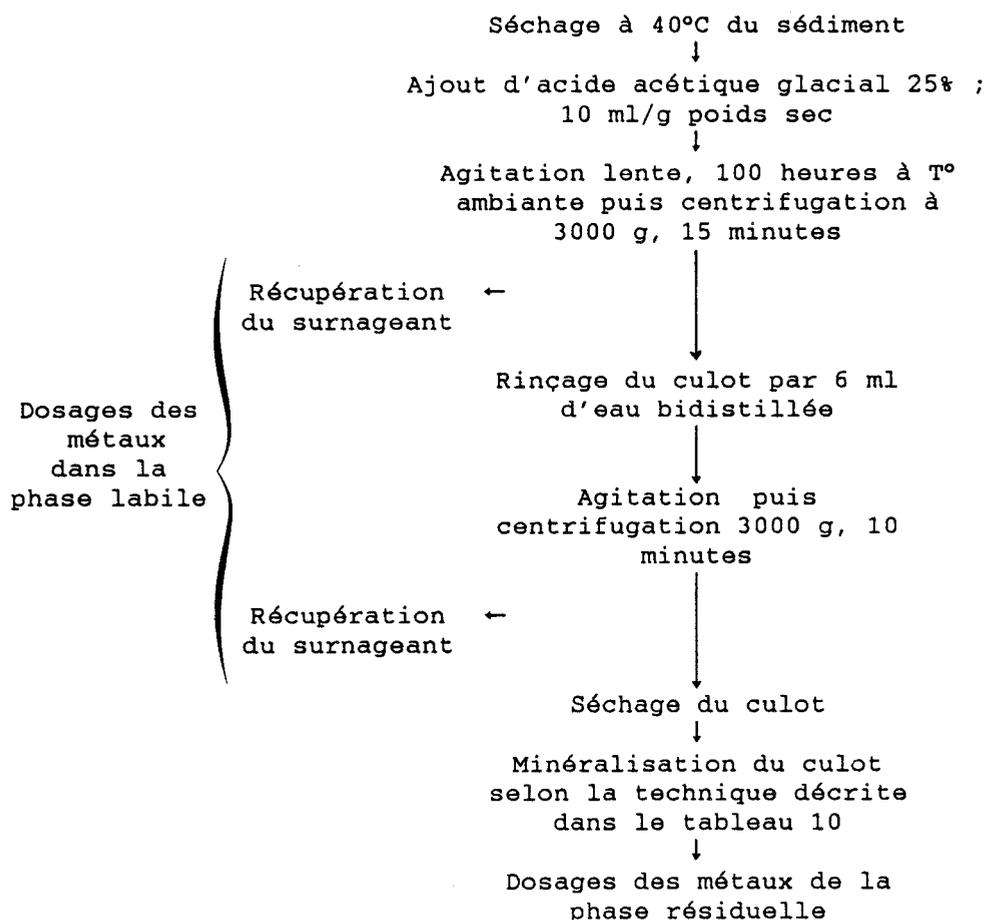


Tableau 10 : Protocoles expérimentaux utilisés pour la minéralisation des sédiments et des tissus biologiques

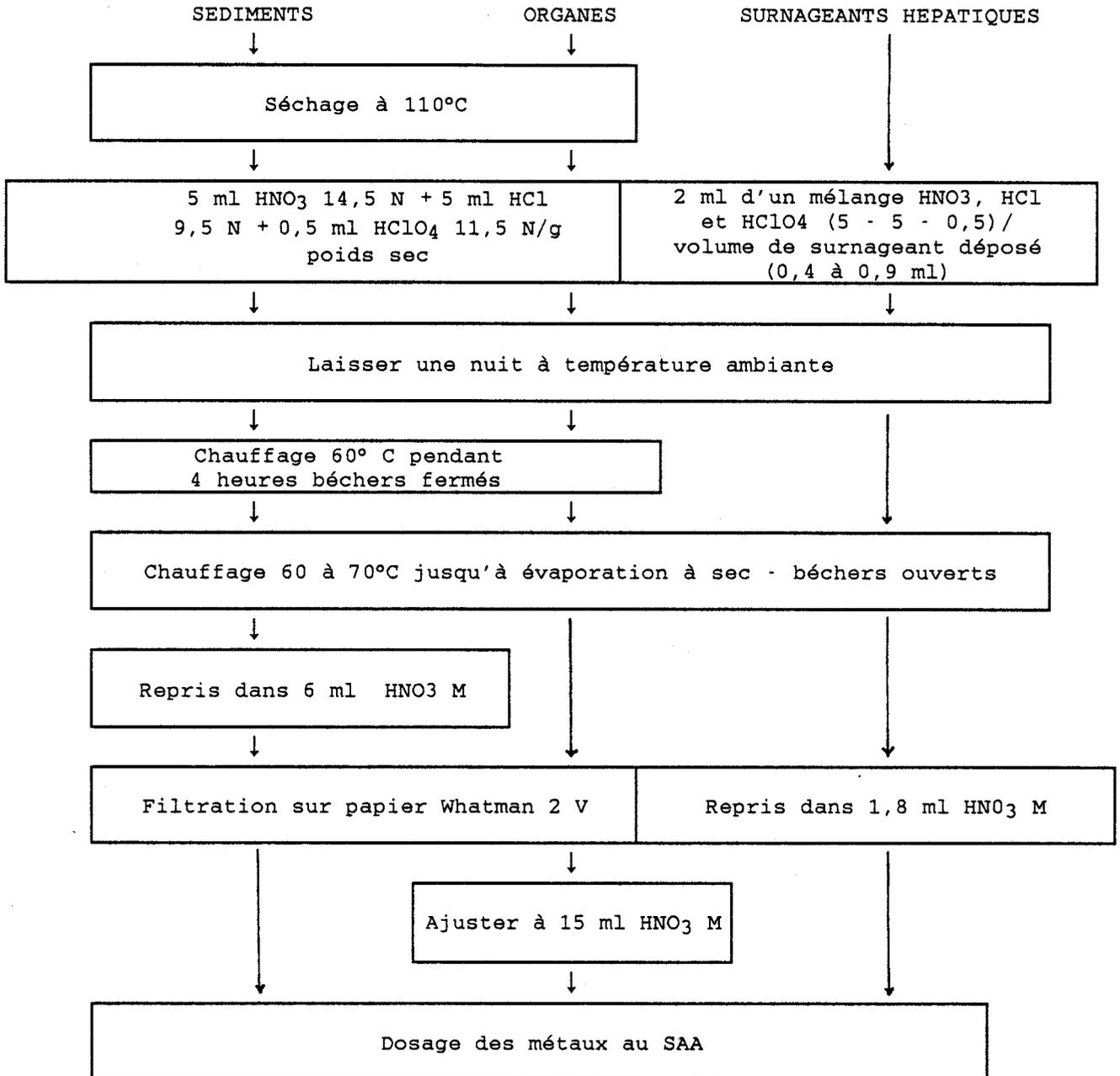


Tableau 11 : Estimation des rapports poids frais/poids sec des différents organes de poissons.

	Foie	Muscle	Branchie
limande	2,1		
limande-sole	2,6	5	5
morue	1,6		

Tableau 12 : Limites de détection (en ppm) des différents métaux dosés au spectrophotomètre d'absorption atomique en flamme.

Cd	Pb	Cu	Fe	Zn	Mn
0,03	0,10	0,05	0,20	0,05	0,10

Tableau 13 : Conditions d'analyse du Cd au spectrophotomètre d'absorption atomique équipé d'un four graphite.

	séchage	calcination	atomisation	nettoyage
T°C	120	400	2000	2650
temps de montée en T°C	20	40	0	1
temps de maintien de la T°C	30	20	6	3

Ce protocole consiste à extraire, par de l'acide acétique glacial (BDH), dilué à 25% dans de l'eau bidistillée, la fraction des métaux adsorbés et formant des complexes de faible résistance avec les particules. La fraction métallique qui n'est pas remise en solution constitue la fraction résiduelle. Elle est quantifiée après minéralisation du sédiment.

4.1.3. Minéralisation des sédiments

Les sédiments (fraction totale, fraction fine et fraction résiduelle après extraction) sont minéralisés selon la technique décrite dans le tableau 10.

Les récipients utilisés sont en téflon et les acides employés (HCl, HNO₃, HClO₄) de qualité Suprapur (Merck). La technique utilisée est comparable à celle qui a été sélectionnée pour la minéralisation des organes (4.2.1.).

4.2. Echantillons biologiques

Les teneurs métalliques des branchies, foies et muscles, des différentes espèces de poissons, ont été déterminées.

Les teneurs des métaux contenus dans les surnageants hépatiques ont également été analysées afin d'étudier les corrélations entre les teneurs en MT et les teneurs en métal total ou en métal soluble.

4.2.1. Minéralisation des organes de poissons

Les organes frais de poissons, dont la quantité est équivalente à 1 g de poids sec environ (Tableau 11), sont déposés dans des béchers en téflon.

La minéralisation se fait selon le protocole décrit dans le tableau 10 qui a été utilisé par divers auteurs (RICHARD et al., 1988 ; DIAZ, 1989).

Les acides utilisés lors de cette minéralisation (HCl, HNO₃, HClO₄) sont de qualité Normapur (Merck).

3 béchers servant de témoins sont intégrés aux séries de minéralisations de 50 béchers maximum.

La reproductibilité des résultats obtenus lors de ces expériences a été vérifiée à partir d'échantillons de morue dont les minéralisations ont été tripliquées.

4.2.2. Minéralisation des surnageants hépatiques

Les surnageants sont déposés dans des béchers en téflon. Le volume destiné à être minéralisé est fonction du volume disponible et varie entre 0,4 et 0,9 ml environ. La minéralisation est faite selon la technique décrite dans le tableau 9. Les acides utilisés sont de qualité Suprapur (Merck).

3 béchers servant de témoins sont intégrés aux séries de minéralisations de 50 béchers maximum ainsi que des témoins contenant des quantités connues de Cu, Zn ou Cd.

4.3. Dosage des métaux

- Les concentrations métalliques ont été dosées par SAA équipé soit d'une flamme air-acétylène (voir 2.2.4.), soit d'un four graphite (Perkin-Elmer, HGA 500) muni d'un échantillonneur automatique (AS 40).

- Les teneurs métalliques des organes de poissons (Fe, Cu, Zn, Cd, Pb, Mn) ont été déterminées par dosage au SAA en flamme. Les seuils de détection sont signalés dans le tableau 12.

- Dans les surnageants, les concentrations en Cu et Zn ont été dosées par SAA en flamme et le Cd a été dosé par SAA équipé d'un four graphite. Les conditions d'analyse sont résumées dans le tableau 13. Les concentrations de Cd dans les échantillons ont été déterminées par la technique des ajouts dosés.

- Les métaux contenus dans les sédiments (Fe, Cu, Zn, Mn, Cd, Pb), ont été dosés par SAA en flamme. Les concentrations obtenues ont été le résultat de 3 lectures de 3 secondes lors du dosage des métaux en SAA flamme quand le volume d'échantillon le permettait. Les matrices n'ont posé aucun problème lors des dosages puisqu'ils s'agissait d'acide nitrique molaire (minéralisation).

5. Analyse statistique des données

5.1. Régressions linéaires et tests de comparaison de moyennes

Les relations entre différentes variables ont été analysées par des régressions linéaires. Les valeurs des coefficients de corrélation obtenus permettent d'estimer si les groupes d'observations présentent ou non une corrélation significative (aux seuils de 5, 1 ou 0,1%). Les valeurs moyennes obtenues pour différents échantillonnages ont été comparées 2 à 2 par des tests de comparaison de moyennes (test t de Student).

5.2. Analyse en composantes principales

Des analyses en composantes principales (ACP) ont permis de traiter de façon plus synthétique des fichiers comprenant différents échantillons (individus) affectés de plusieurs paramètres (variables quantitatives).

Un ensemble de n individus, associé à un ensemble p variables peut être représenté sous la forme d'un nuage de points dans un espace de dimension p . Le nuage de points représentant les individus est "centré-réduit" ce qui permet de donner la même "importance" à chaque variable dans le calcul des distances entre individus (d'après VOLLE, 1985).

Le but de l'ACP est de représenter ce nuage dans un espace de dimension réduite.

Les axes et les plans issus d'une ACP sont réalisés avec des "indices synthétiques" obtenus par des "combinaisons linéaires" des variables initiales ; l'ACP recherche d'abord l'indice qui permet de voir au mieux les individus c'est-à-dire celui pour lequel la variance des individus est maximale : c'est le premier axe principal. La deuxième composante recherchée doit avoir une corrélation linéaire nulle avec la première et avoir à son tour la plus grande variance. Le processus est le même jusqu'à l'obtention de la $p^{\text{ième}}$ et dernière composante principale (pour un tableau à p variables). La phase essentielle de l'ACP consiste donc à transformer les p variables quantitatives initiales (plus ou moins corrélées entre elles) en p nouvelles variables non corrélées appelées composantes principales. On définit ensuite la contribution à l'inertie du nuage pour chaque composante principale comme le pourcentage d'information que donne celle-ci sur la forme initiale du nuage de points. L'espace de dimension réduite obtenu sera ensuite examiné en projetant les individus sur un plan, en général engendré par les deux composantes principales ayant les plus fortes contributions à l'inertie du nuage. Les variables sont des vecteurs et non des points. Les directions des variables, devenues des combinaisons linéaires des composantes principales, peuvent également être projetées dans le plan choisi, on obtient ainsi un plan regroupant les individus et les directions des variables. Si l'individu appartient au plan considéré, la somme des cosinus carrés est égale à 1. La valeur de cette somme est un bon critère pour mesurer la proximité dans l'espace d'un individu et du plan de projection. Le nuage des individus et le nuage des variables sont deux représentations du même tableau, l'une à travers ses lignes et l'autre à travers ses colonnes. Ces deux nuages sont liés par des

relations très fortes, dites de dualité. Le graphique des individus est une représentation approchée des distances inter-individuelles. Celui des variables peut être considéré en tant qu'élément explicatif de cette représentation (et vice versa). Ce n'est donc pas la proximité entre un individu et un ensemble de points représentant des variables qui est importante, mais l'éloignement de l'individu dans la direction de cet ensemble de variables.

Ces études statistiques simples et multidimensionnelles ont été effectuées à l'aide de logiciels STAT-ITCF sur microordinateur.

CHAPITRE III

**TENEURS METALLIQUES DES SEDIMENTS
ET POISSONS
DU LITTORAL NORD-PAS-DE-CALAIS**

CHAPITRE III : TENEURS METALLIQUES DES SEDIMENTS ET POISSONS DU LITTORAL NORD-PAS-DE CALAIS

Le but de cette étude est d'établir les niveaux de concentrations en éléments métalliques (Pb, Cu, Zn, Mn, Fe et Cd) des espèces : limande, limande-soles et morues prélevées sur le littoral de Calais et de Boulogne. Les teneurs métalliques du sédiment ont également été déterminées afin d'évaluer les niveaux de contamination des sites de chalutage des poissons.

1. Teneurs métalliques des sédiments

Lorsque différents sites présentent un environnement géochimique similaire, ce qui est le cas dans notre étude, la disponibilité du métal peut être liée au métal total présent dans le milieu (LUOMA, 1989). Les teneurs métalliques du sédiment total ont donc été définies dans un premier temps.

Parallèlement à ces analyses, les teneurs métalliques de la fraction fine (<80µm) ont été déterminées. Cette pratique se justifie par le fait que ces teneurs sont plus représentatives du pool de métal potentiellement toxique pour la matière vivante que la charge métallique du sédiment total car les particules fines sont plus facilement assimilables par les organismes, notamment par les filtreurs. D'autre part, les métaux se fixent préférentiellement sur les particules les plus fines du sédiment qui présentent une grande surface de contact par unité de masse (MILNER, 1979; DESSAINT, 1987).

Les échantillons de sédiment total et de fraction fine ont également été soumis à des extractions par de l'acide acétique 25% afin d'estimer la biodisponibilité des métaux.

En effet, les métaux extraits par les acides faibles reflètent le métal potentiellement disponible en excluant les formes non biodisponibles pour l'accumulation dans les organismes (LUOMA, 1989 ; LORING et RANTALA, 1990 ; STATHAM et al., sous presse). Cependant, ces extractions présentent l'inconvénient de ne pas être limitées aux formes métalliques qui affectent la bioaccumulation.

Tableau 14a : Teneurs métalliques du sédiment total prélevé sur une même station de la zone "côte de Calais", analysé à 2 reprises.
(exprimées en $\mu\text{g/g}$ poids sec ; chaque échantillon a été analysé au triplicat)

	Cu	Zn	Pb	Cd	Mn	Fe
Echantillon 1	1,36 \pm 0,04	15,06 \pm 0,68	8,13 \pm 0,68	0,60 \pm 0,04	51,77 \pm 2,30	2838 \pm 170
Echantillon 2	1,32 \pm 0,09	16,43 \pm 0,98	7,79 \pm 0,83	0,52 \pm 0,02	49,55 \pm 3,83	2744 \pm 108

Tableau 14b : Teneurs métalliques du sédiment total prélevé sur les 4 zones de chalutage.
(exprimées en $\mu\text{g/g}$ poids sec ; n = 3)

	Cu	Zn	Pb	Cd	Mn	Fe
Calais "côte" 1	1,32 \pm 0,09	16,43 \pm 0,98	7,79 \pm 0,83	0,52 \pm 0,02	49,55 \pm 3,89	2744 \pm 108
Calais "côte" 2	1,61 \pm 0,14	17,80 \pm 1,78	9,29 \pm 0,93	0,70 \pm 0,04	54,37 \pm 6,02	2851 \pm 387
Calais "large"	2,37 \pm 0,13	15,06 \pm 2,58	25,15 \pm 2,81	1,90 \pm 0,04	95,84 \pm 11,40	3566 \pm 853
Boulogne "côte"	1,19 \pm 0,03	14,00 \pm 0,48	7,06 \pm 0,11	0,56 \pm 0,02	43,23 \pm 2,06	2391 \pm 98
Boulogne "large" 1	1,66 \pm 0,07	12,14 \pm 1,12	12,40 \pm 0,78	0,74 \pm 0,02	91,94 \pm 4,91	6616 \pm 595
Boulogne "large" 2	1,63 \pm 0,05	12,58 \pm 1,59	12,58 \pm 1,59	0,90 \pm 0,11	97,37 \pm 20,07	4901 \pm 1088

Tableau 14c : Teneurs métalliques de la fraction fine du sédiment ($< 80 \mu\text{m}$) prélevé sur les 4 zones de chalutage.
(exprimées en $\mu\text{g/g}$ poids sec ; n = 3)

	Cu	Zn	Pb	Cd	Mn	Fe
Calais "côte"	22,4 \pm 1,8	172,8 \pm 12,0	79,1 \pm 4,7	2,5 \pm 0,2	223 \pm 3	19991 \pm 769
Calais "large"	16,8 \pm 2,4	90,5 \pm 8,9	66,3 \pm 7	1,9 \pm 0,1	402 \pm 37	21402 \pm 2670
Boulogne "côte"	25,3 \pm 0,1	122,6 \pm 4,0	66,5 \pm 1,0	2,4 \pm 0,1	242 \pm 6	15957 \pm 344
Boulogne "large"	16,9 \pm 1,6	84,8 \pm 1,7	61,8 \pm 5,0	1,5 \pm 0,2	326 \pm 14	17331 \pm 651

1.1. Teneurs métalliques du sédiment total

Les teneurs métalliques du sédiment total prélevé sur un même site ont été analysés à deux reprises (tableau 14a) ; les résultats obtenus sont comparables, ce qui démontre la reproductibilité de la méthode.

Les teneurs métalliques des sédiments prélevés sur différentes stations de chacun des traits de chalut (Calais "côte" et Boulogne "large") ont été déterminées afin de vérifier l'homogénéité des degrés de contamination des sites étudiés.

On constate que les teneurs des échantillons prélevés en différentes stations d'une même zone sont peu différentes ce qui prouve que la charge en métal varie peu sur une même zone de chalutage.

- Comparaison des teneurs métalliques des sédiments prélevés à Calais et à Boulogne

Les sédiments prélevés au large de Boulogne sont moins chargés en Cu, Pb, Cd et Zn mais autant en Mn et davantage en Fe que les sédiments provenant du large de Calais (tableau 15). La contamination en Mn et Fe est probablement liée au fait que le site de Boulogne, situé au Nord de la zone de rejet de l'entreprise SFPO (Société de Ferromanganèses de Paris-Outreau), doit être soumise à une pollution marquée par le Fe et le Mn.

Les sédiments prélevés à la côte à Boulogne présentent des teneurs métalliques qui dans l'ensemble sont plus faibles que celles des sédiments prélevés à Calais mais les degrés de contamination de ces deux zones sont moins distincts que ceux des sites du large.

Nos résultats sont en accord avec les données concernant cette région précisant que le secteur de Boulogne est moins pollué que le secteur de Calais-Gravelines (DELABRE, 1985 ; BARBIER et al., 1986).

- Comparaison des teneurs métalliques des sédiments prélevés à la côte et au large sur les sites de Calais et de Boulogne

Excepté pour le Zn, on remarque qu'à Calais, la charge métallique est plus importante au large qu'à la côte (tableau 14b). On peut émettre une réserve quant à la précision des concentrations en Fe et Mn, celles-ci ayant pu être légèrement surestimées du fait de la technique de prélèvement (benne Shipeck). Cependant, les teneurs importantes observées dans les sédiments du large sont corroborées par les résultats de DELABRE (1985) qui constate que le secteur Calais-Gravelines est caractérisé par

Tableau 15 : Teneurs 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 réduites de la bibliographie (sédiments marins analysés dans la fraction fine < 65 µm) R.N.O. 75/79.

(d'après DELVAL, 1984).

Tableau 16a : Teneurs métalliques (extraites et résiduelles) de la fraction fine des sédiments et pourcentages des métaux extraits par l'acide acétique (teneurs exprimées en µg/g poids sec)

Site	n	Fraction	Cu	Zn	Pb	Cd	Mn	Fe
Calais côte	3	Extrait	8,57 ± 0,31 23 %	102 ± 3,7 43 %	30,5 ± 1,2 28 %	2,87 ± 0,09 80 %	173 ± 3,4 57 %	6157 ± 237 20 %
		Résidu.	28,57 ± 0,56	136 ± 0,5	79,6 ± 2,4	0,73 ±	129 ± 5	24570 ± 1028
Calais large	3	Extrait	10,94 ± 0,41 23 %	37,73 ± 1,61 32 %	44,51 ± 0,97 55 %	1,83 ± 0,04 74 %	195,5 ± 5,99 59 %	1125 ± 57,7 6 %
		Résidu.	37,21 ± 1,09	79,5 ± 3,15	36,13 ± 0,72	0,63 ± 0,03	134,15 ± 4	17482 ± 1660
Boulogne large	3	Extrait	4,95 ± 0,89 21 %	32,66 ± 1,04 33 %	39,47 ± 2,12 57,4 %	1,53 ± 0,05 73 %	220,7 ± 27,2 61,5 %	2016 ± 412 9,5 %
		Résidu.	19,12 ± 0,93	66,1 ± 9,4	29,29 ± 5,11	0,57 ± 0,04	137,9 ± 32,9	13200 ± 3467
Boulogne côte	1	Extrait	9,48 38 %	48,1 39 %	38 54 %	2,89 82 %	177 68 %	2534 12,3 %
		Résidu.	19,47	76,05	31,94	0,65	82	18038

Tableau 16b : Teneurs métalliques (extraites et résiduelles) du sédiment total et pourcentages des métaux extraits par l'acide acétique (teneurs exprimées en µg/g poids sec)

Site	n	Fraction	Cu	Zn	Pb	Cd	Mn	Fe
Calais large	3	Extrait	2,92 ± 0,45 67 %	0,43 ± 1,11 38 %	27,68 ± 3,11 83 %	2,35 ± 0,26 - 100 %	117,1 ± 25,8 73 %	630 ± 90 8 %
		Résidu.	1,42 ± 0,60	15,64 ± 1,66	5,98 ± 0,97	< seuil	43,32 ± 15,5	7555 ± 1115
Boulogne large	3	Extrait	1,23 ± 0,42 64 %	4,62 ± 0,40 30 %	11,92 ± 3,01 81 %	1,24 ± 0,2 - 100 %	63,04 ± 2,91 68 %	441 7 %
		Résidu.	0,69 ± 0,07	10,8 ± 1,55	2,86 ± 0,24	< seuil	30,06 ± 0,77	5668 ± 461

une pollution métallique particulièrement importante de la zone subtidale éloignée. Il attribue cette pollution, sans rapport direct avec un rejet côtier, aux dépôts de dragages qui constituent une source importante de pollution.

A Boulogne, les sédiments prélevés au large (face à Boulogne) possèdent une charge métallique globalement plus importante que ceux provenant de la station "côte" (sud de Boulogne). Ce phénomène est explicité par le fait que le site du large ne fait pas partie intégrante de la zone considérée comme "saine" (située au sud de Boulogne) et que le déversement des déblais de dragage cause une pollution du large entre Audresselles au nord et Equihen au sud (L'HOPITAULT, 1985).

1.2. Teneurs métalliques de la fraction fine des sédiments

Bien que la plupart des auteurs considèrent 63 μm comme limite arbitraire de la fraction fine, nous avons dû fixer cette limite à 80 μm pour des raisons techniques.

Les quantités de métaux liées à la fraction fine sont nettement plus élevées que celles du sédiment total ; les fractions dont la granulométrie est supérieure à 80 μm joueraient donc le rôle de "diluant".

Les résultats des analyses effectuées ne traduisent pas un état de pollution excessive puisqu'aucune des valeurs n'atteint les seuils considérés comme teneurs anormales (tableau 15), il faut noter que le Pb dans la zone de Calais "côte" est présent en concentration importante (79 ppm).

Ces données sont en accord avec celles de BARBIER et al. (1986) qui constate que la région Nord-Pas-de-Calais n'est pas soumise à une contamination "hors normes". Les teneurs les plus importantes en Pb, Cd et Zn sont localisées au niveau des sites de rejets des boues de dragages, sites sur lesquels elles peuvent dépasser les seuils cités dans le tableau 15. Les teneurs en Cd sont également élevées au large de Calais et les teneurs en Cu ne traduisent pas une situation de contamination bien qu'elles soient généralement élevées (30 à 60 ppm).

Par rapport aux teneurs des sédiments du littoral de Dunkerque déterminées en 1975-1979 (tableau 15), les teneurs en Cu, Pb et Cd détectées dans les sédiments de Calais et de Boulogne sont supérieures. Le Zn est également abondant dans les sédiments du large. Ces différences doivent être liées en grande partie au fait que nos valeurs sont

surestimées puisqu'il s'agit des teneurs métalliques de la fraction inférieure à 80 μm (contre 65 μm dans le tableau 15) ; ces différences peuvent refléter également une augmentation des polluants métalliques des sédiments.

Les fractions fines des sédiments prélevés à la côte (Boulogne et Calais) sont plus riches en Cu-Zn-Cd que les sédiments prélevés au large ; ceux-ci se caractérisant par des teneurs légèrement supérieures en Fe et nettement plus élevées en Mn. Pourtant, le sédiment total prélevé au large sur les deux sites est plus riche en Cu, Pb, Cd, Mn et Fe que les sédiments prélevés à la côte. Les proportions de Cu, Pb et Cd liées aux fractions dont la granulométrie est supérieure à 80 μm , sont donc plus importantes dans les sédiments prélevés au large qu'à la côte.

Des teneurs supérieures dans le sédiment du large n'impliquent donc pas une disponibilité plus importante de ces métaux vis-à-vis des organismes, la biodisponibilité étant davantage liée aux concentrations métalliques de la fraction fine. Il est donc intéressant de déterminer non seulement les teneurs métalliques mais également la nature du sédiment afin d'évaluer le potentiel toxique d'une charge métallique élevée.

1.3. Extraction des métaux par l'acide acétique

Les résultats obtenus lors de ces expériences apparaissent dans le tableau 16 (a et b).

On constate que les quantités de métaux contenus dans la fraction extraite cumulées à celles de la fraction résiduelle sont généralement supérieures aux teneurs métalliques totales, déterminées précédemment (tableau 14). Il aurait été intéressant de renouveler et affiner ces analyses afin d'obtenir des résultats plus précis, mais le but de ces expériences était uniquement d'estimer la disponibilité relative des différents métaux.

Les extractions à l'acide ont permis de montrer que l'intensité des liaisons du Cd, du Mn et du Pb aux sédiments (que ce soit vis-à-vis de la fraction fine ou du sédiment total) sont plus faibles que celles du Cu, Zn et Fe. Ces métaux présentent donc à priori, une capacité à s'accumuler dans les organismes plus importants. Le Fe est dans tous les cas, le métal le plus fortement lié aux particules. Les données concernant les extractions des métaux liés aux sédiments sont généralement réalisées à partir d'échantillons de sédiment total.

Compte tenu des résultats obtenus, on peut donc définir que la biodisponibilité des différents métaux décroît de la façon suivante : Cd>Pb>Mn>Cu>Zn>Fe. Les métaux les plus toxiques pour les organismes (Cd et Pb) sont également les métaux pour lesquels la biodisponibilité est la plus importante puisque ce sont les éléments les plus facilement échangeables.

Cependant, étant donné leurs concentrations respectives dans l'environnement, le Pb est plus susceptible de présenter un risque pour l'écosystème.

2. Teneurs métalliques des organes de poissons

Les niveaux de concentrations en éléments métalliques des trois espèces de poissons ont été déterminées dans les branchies, foies et muscles pour les raisons suivantes :

- les branchies sont en contact direct avec le milieu extérieur; leurs teneurs métalliques doivent être représentatives du degré de contamination du milieu environnant ;

- le foie est l'un des organes accumulateurs, détoxifiant des métaux lourds ;

- le muscle est un vecteur de substances potentiellement toxiques pour le consommateur.

2.1. Résultats

Les sites et époques de prélèvements des trois espèces sont récapitulées dans le tableau 17. Chaque échantillonnage est constitué de 10 à 12 individus environ. La localisation des sites de chalutages apparaît sur la figure 3 (voir I.6).

Les teneurs métalliques des branchies, foies et muscles des trois espèces de poissons ont été déterminées par dosage au spectrophotomètre d'absorption atomique (SAA) en flamme. Tous les échantillons n'ont pas atteint les seuils de détection lors du dosage du Pb et du Cd mais l'intérêt de cette étude était d'établir un suivi global des niveaux de contamination des poissons.

Avant de minéraliser l'ensemble des échantillons, nous avons contrôlé si la répartition des teneurs métalliques varie à l'intérieur d'un même organe. Cette vérification a été réalisée sur un foie de morue qui, du fait de sa vascularisation, est susceptible d'être un organe assez hétérogène.

Tableau 17 : Plan d'échantillonnage des trois espèces de poisson (groupe de 12 individus environ)

Année et zone de prélèvements	Saison	Limande	Limande-sole	Morue
1989 Calais	Printemps (mai)	côte	large	large
	Automne (oct.-nov.)	côte	large	côte et large
	Hiver (février)	côte	large	large
1990 Calais	printemps (mai)	côte	-	-
1991 Calais et Boulogne	printemps (mai-juin)	côte	large	-
	automne (octobre)	côte	-	-

Tableau 18 : Teneurs métalliques moyennes des différentes fractions d'un foie de morue (exprimées en µg/g poids sec)

	n	Cu	Zn
face supérieure	5	3,2 ± 0,4	6,0 ± 1,4
intérieur du foie	6	2,9 ± 0,2	6,4 ± 1,2
face inférieure	5	3,0 ± 0,5	6,3 ± 1,1

Tableau 19 : Valeurs moyennes des coefficients de variations (exprimés en %) obtenus lors du dosage des éléments métalliques d'un même organe analysé à diverses reprises (n = 3) chez plusieurs morues (N = 6).

	Fe	Zn	Mn	Pb	Cu	Cd
Branchie	9,1 ± 5,3	8,6 ± 3,8	7,1 ± 6,16	5,7 ± 4,8	6,3 ± 3,3	7,4 ± 4,5
Foie	11,8 ± 9,6	8,3 ± 6,1	8,05 ± 2,7	-----	10,8 ± 5,2	9,4 ± 1,2
Muscle	10,9 ± 4,9	9,2 ± 2,1	14,3 ± 6,6	10,8 ± 5,8	8,3 ± 4,2	8,6 ± 8,1

Tableau 20 : Nombre d'échantillons n'atteignant pas le seuil de détection au SAA en flamme *.

	n total	Cd			Pb
		Branchie	Foie	Muscle	Foie
Limande	38	19	25	21	35
Limande-sole	36	23	24	24	33
Morue	36	0	33	20	31

* : Pour les organes et les métaux non cités, les teneurs sont supérieures à la limite de détection pour tous les échantillons

Un foie a donc été débité en plusieurs fractions. Les teneurs métalliques moyennes des fractions situées sur la face supérieure, inférieure et à l'intérieur même du foie ne sont pas significativement différentes (tableau 18).

Bien que ces teneurs ne diffèrent pas significativement, les analyses étant destinées à être comparées, la méthode la plus fiable consiste à prélever l'échantillon d'organe toujours au même endroit.

La reproductibilité des résultats obtenus lors des analyses a été testée à partir d'un échantillonnage de six morues dont les organes ont été minéralisés séparément en triplicats. La variabilité des résultats, exprimée en %, apparaît dans le tableau 19.

Globalement, la variabilité la moins importante correspond aux résultats obtenus avec les branchies qui est l'organe présentant les teneurs métalliques les plus élevées. Il est donc difficile d'estimer si les variations observées sont liées à l'organe lui-même ou à l'erreur analytique. Dans l'ensemble, la variabilité est de l'ordre de 10% ce qui représente une valeur tout à fait acceptable, comparée aux variations qui seront observées lors de l'analyse de l'influence des différents paramètres : organes, espèces, nature du métal, époque et site de prélèvements, âge et sexe.

Etant donné le nombre de paramètres pouvant interférer, les résultats des études réalisées en milieu naturel présentent généralement une variabilité assez importante. Nos résultats ont souvent été traités dans un premier temps sous forme d'analyses en composantes principales (ACP), afin de mettre en évidence les variations de teneurs métalliques qui existent selon les différents paramètres cités ci-dessus (organe, espèce...). Ces tendances ont ensuite été précisées par des tests de comparaison de moyennes (test t de Student).

Concernant les ACP effectuées, nous avons présenté le cercle de corrélation des descripteurs (variables correspondant aux teneurs métalliques) et la projection des individus (poissons) dans l'espace réduit déterminé par les axes 1 et 2 et parfois complété par le plan 1-3. Dans la majorité des cas, seuls les deux premiers axes sont retenus car ils représentent toujours au minimum 60% de la variance totale. Les coefficients de corrélation les plus intéressants qui relient les variables seront cités ; ils apparaissent dans la matrice des corrélations obtenue lors de l'analyse. Ces matrices de corrélations ne sont pas exposées dans les chapitres résultats, ceci par souci de clarté.

Axe II 24,8 %

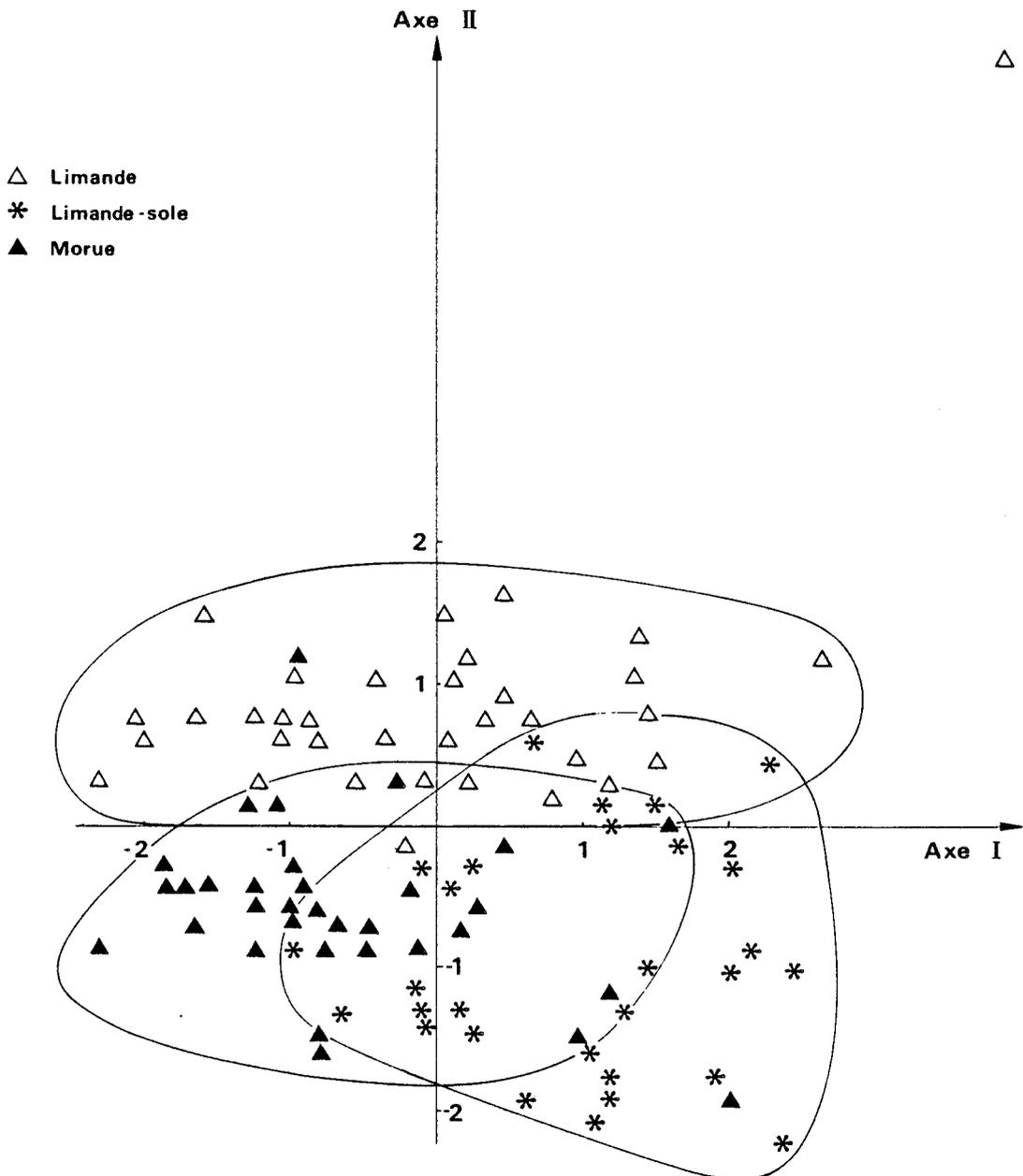
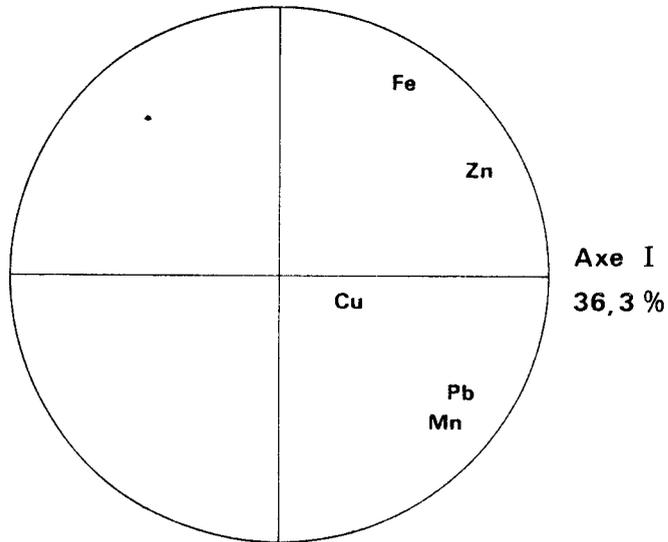


Figure 13 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de l'ensemble des individus des trois espèces, prélevées en 1989.

(morues et limande-soles provenant du large et limandes provenant de la côte, sites de Calais).

Les métaux Cu, Zn, Pb, Mn, Fe et Cd ont été dosés dans tous les organes. Les teneurs en Cd et Pb des organes n'ont pas été systématiquement reportées car les échantillons n'atteignaient pas toujours le seuil de détection au SAA en flamme. En effet, soit les teneurs étaient réellement trop faibles, soit l'échantillon n'équivalait pas à 1 gramme de poids sec, minimum pondéral requis pour ce type d'analyses (branchies de limandes et limande-soles) (tableau 20).

2.1.1. Comparaison par organe des teneurs métalliques des trois espèces de poissons

Les ACP (figures 13, 14 et 15) ont été réalisées en prenant en compte l'ensemble des individus de chaque espèce, prélevés en 1989, caractérisés par leurs teneurs en métal au niveau de chaque organe.

Sur l'ACP concernant les teneurs métalliques des branchies (figure 13), les variables Mn, Pb et Zn évoluent globalement dans le même sens puisqu'elles déterminent l'axe 1 (le Mn détermine également l'axe 2). Les teneurs en Mn, Pb et Zn sont donc les teneurs pour lesquelles la variance des individus est maximale. L'axe 1 contribue pour 36% à la forme initiale du nuage des individus. Le Fe évolue indépendamment des premières variables (il détermine l'axe 2 qui représente 25% de la contribution (Ctb) totale) ainsi que le Cu (déterminant l'axe 3, Ctb = 19%) (projection dans le plan 1-3 non présentée).

Les variables les mieux corrélées deux à deux sont Zn et Fe ($r = 0.478$), Mn et Pb ($r = 0.463$). Les corrélations entre les métaux qui peuvent être caractéristiques d'une espèce précise ne peuvent être mises en évidence ici car il s'agit d'une analyse globale sur les teneurs métalliques des trois espèces.

Le nuage de points représentant les limandes est étalé le long de l'axe 1 et situé du côté positif de l'axe 2. Les limandes ont donc tendance à être caractérisées par des teneurs variées en Zn-Pb et Cu, élevées en Fe et plutôt faibles en Mn.

Les limande-soles semblent posséder des teneurs importantes en (Zn-Pb-Mn) et des teneurs faibles en Fe et Cu.

En ce qui concerne les morues, le nuage d'individus a tendance à être attiré par les variables Mn et Cu mais à être opposé aux variables (Fe-Zn-Pb).

Sur l'ACP concernant les teneurs métalliques hépatiques (figure 14), les variables représentant les teneurs en Cu, Zn, Fe et Mn

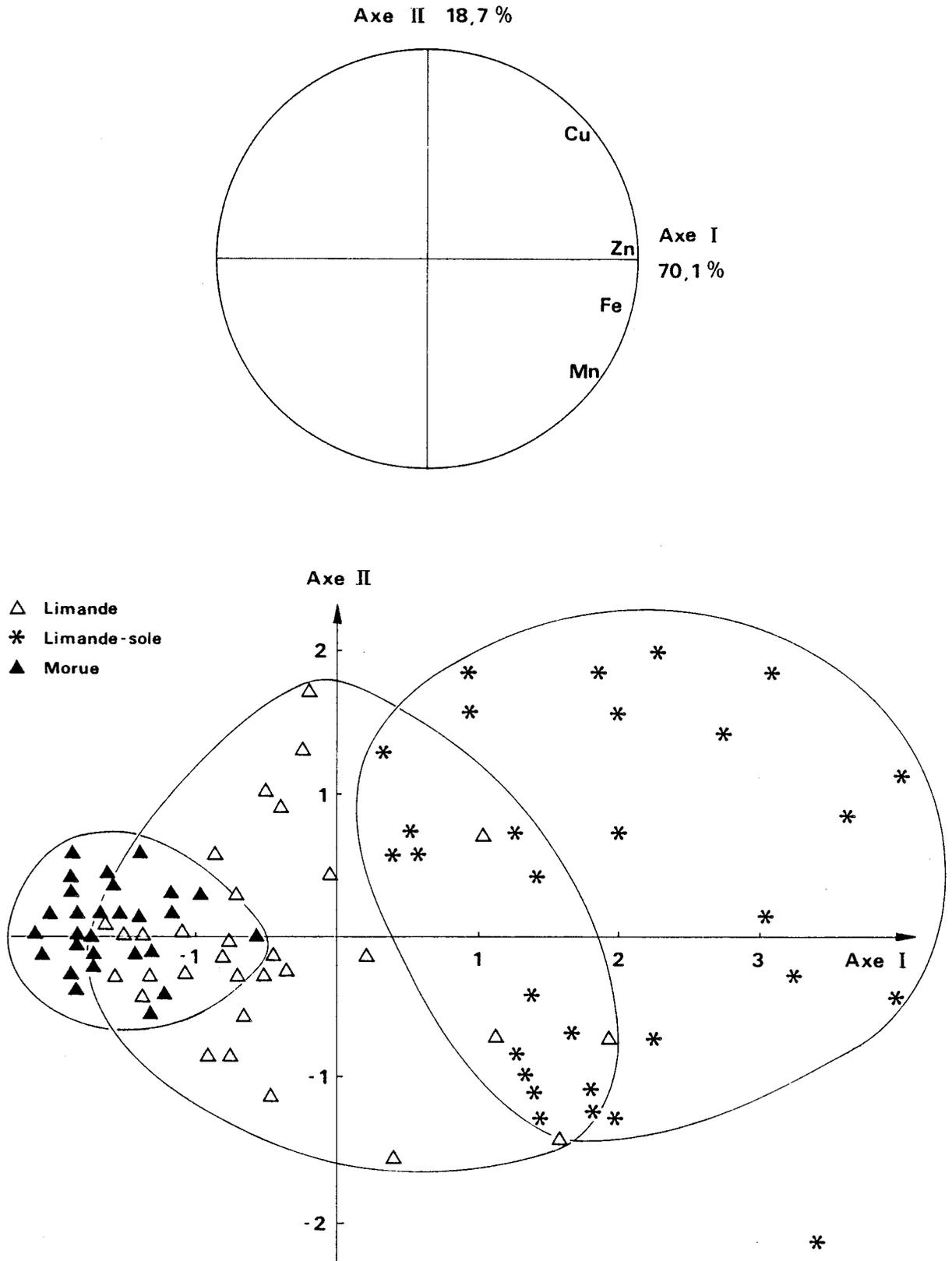


Figure 14 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de l'ensemble des individus des trois espèces, prélevées en 1989.

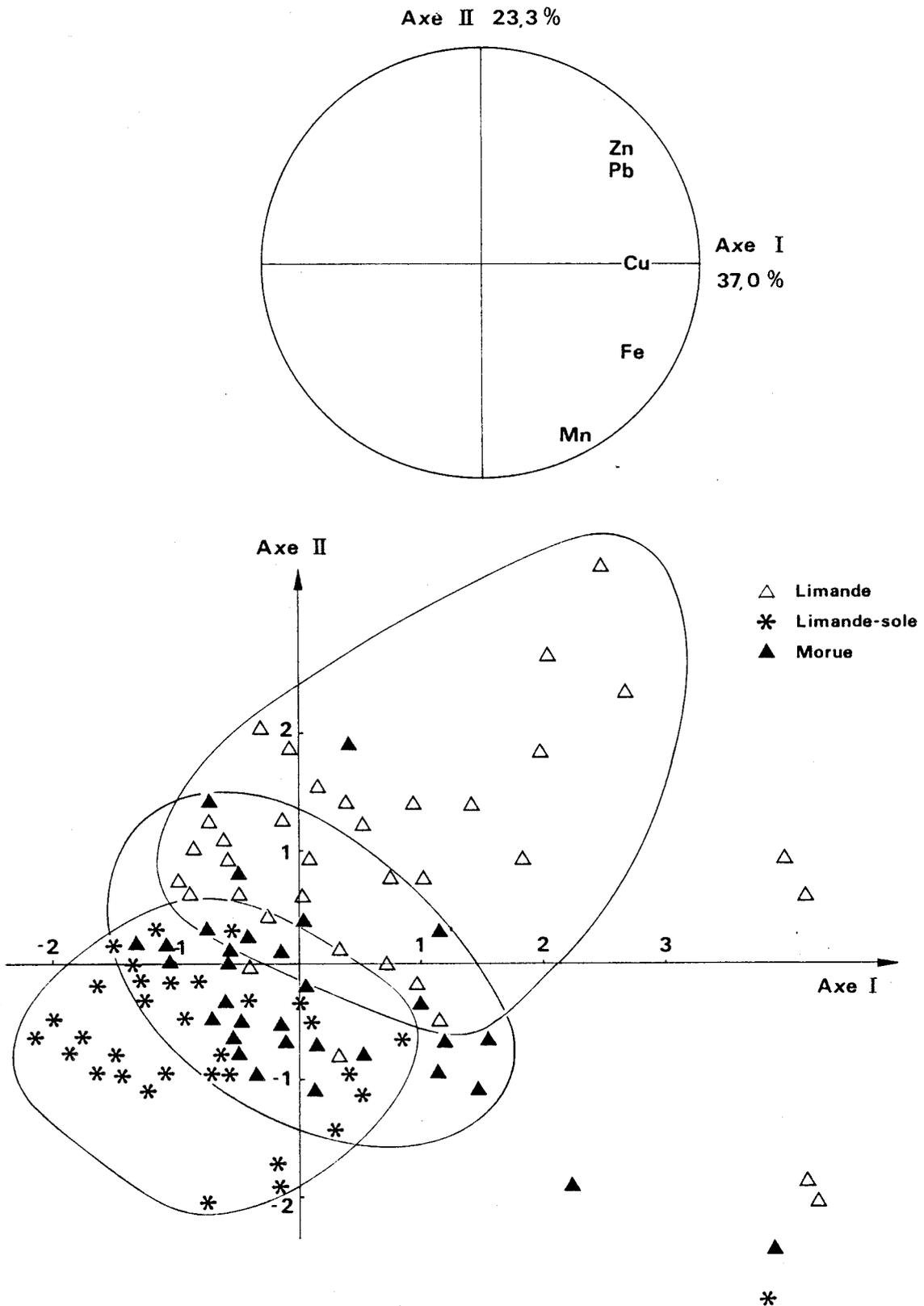


Figure 15 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de l'ensemble des individus des trois espèces prélevées en 1989.

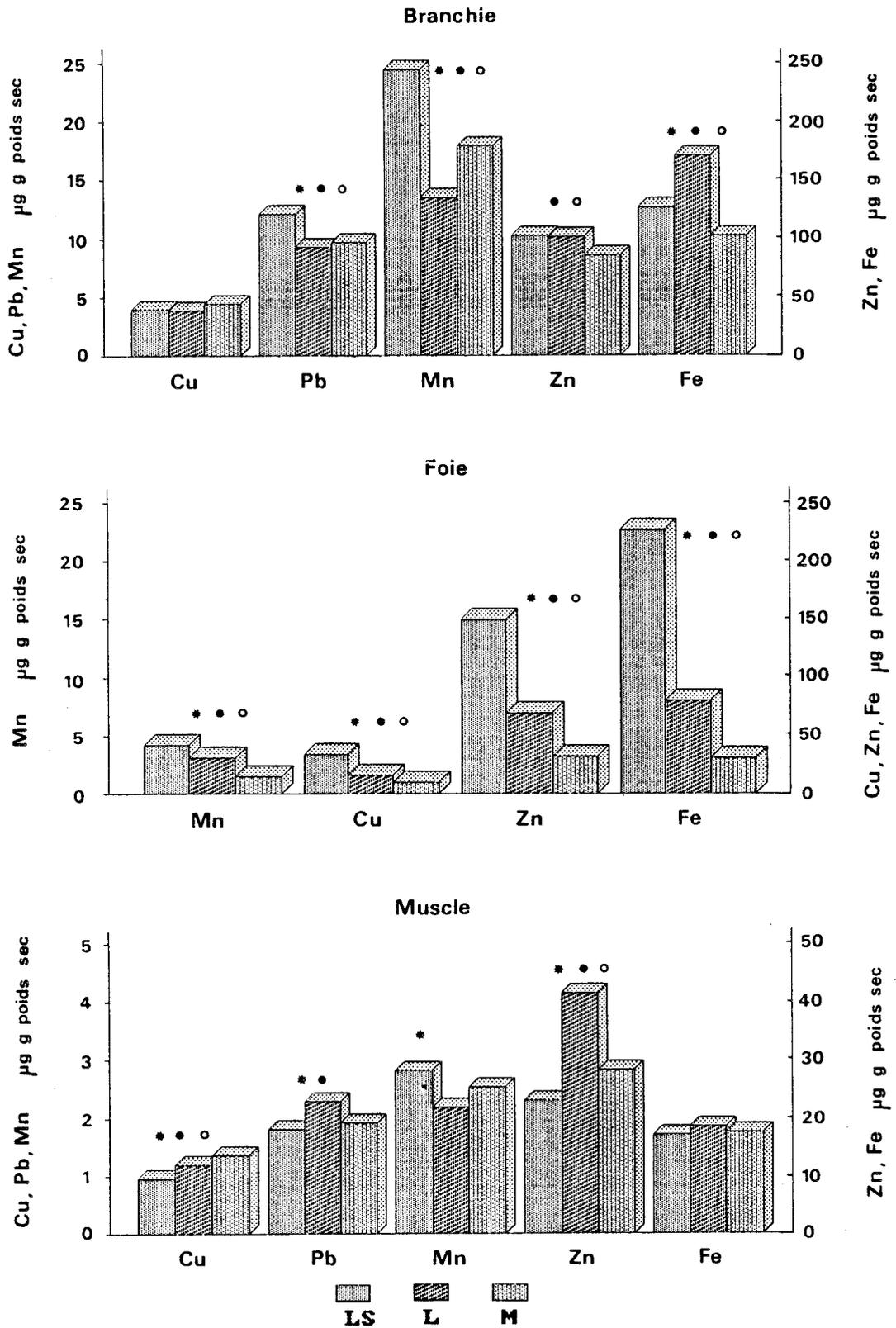


Figure 16 : Teneurs métalliques moyennes des organes de limandes (L), limande-soles (LS) et morues (M) prélevées en 1989. (n = 36 individus environ par espèce) (t significatif au seuil de 5% entre limandes et limande-soles *, limandes et morues •, limande-soles et morues °).

définissent l'axe 1 qui rend compte de 70% de l'inertie du nuage (Ctb = 70%). Les variables (Zn-Fe) et (Zn-Cu) sont bien corrélées ($r = 0,78$ et $0,72$ respectivement).

Les points représentant les morues constituent un nuage compact localisé vers les valeurs négatives de l'axe 1 qui s'oppose au nuage des limande-soles. Les teneurs métalliques des foies de morues sont donc faibles contrairement à celles des limande-soles ; les limandes présentent des teneurs métalliques intermédiaires. Etant donné la dispersion des nuages de points, on constate que les teneurs métalliques des limandes et limande-soles présentent une variabilité plus importante que celles des morues.

Sur l'ACP concernant les teneurs métalliques des muscles (figure 15), les variables (Zn-Pb-Cu-Fe) déterminent l'axe 1 (Ctb = 37%) et le Mn définit l'axe 2 (Ctb = 23,3%). Les variables sont peu corrélées entre elles ($r_{\max} = 0.32$; Mn-Fe), probablement parce que les trois espèces sont intégrées dans l'analyse. Les différentes espèces doivent se distinguer des tendances marquées vis-à-vis des teneurs en Mn.

Les nuages représentant les morues et les limande-soles sont assez homogènes tandis que celui des limandes est plus dispersé.

Les points représentant les limande-soles constituent un nuage dense, positionné vers les valeurs négatives des axes 1 et 2 ; les individus de cette espèce se caractérisent par les teneurs les plus faibles en (Cu-Fe), surtout en (Zn-Pb), et par des teneurs élevées en Mn.

A l'inverse, le nuage représentant les limandes est éclaté. Les teneurs métalliques des muscles de limandes sont donc variées mais ont tendance à être élevées en (Cu-Fe), surtout en Zn-Pb et faibles en Mn.

Les muscles de morues présentent des teneurs en (Cu-Zn-Pb-Fe) intermédiaires à celles des deux espèces de poissons plats et des teneurs en Mn marquées.

L'observation de la figure 16 confirme les tendances mises en évidence à partir des ACP :

· au niveau des branchies, les limandes présentent les teneurs moyennes les plus faibles en Pb et Mn et les teneurs les plus élevées en Fe ; les différences avec les teneurs des autres espèces sont significatives. Les branchies de limande-soles sont significativement plus riches en Mn et Pb que celles des autres espèces ; les teneurs en Cu et Zn sont du même ordre de grandeur que celles des limandes. Les morues possèdent les teneurs les plus élevées en Cu (t non significatif) et les

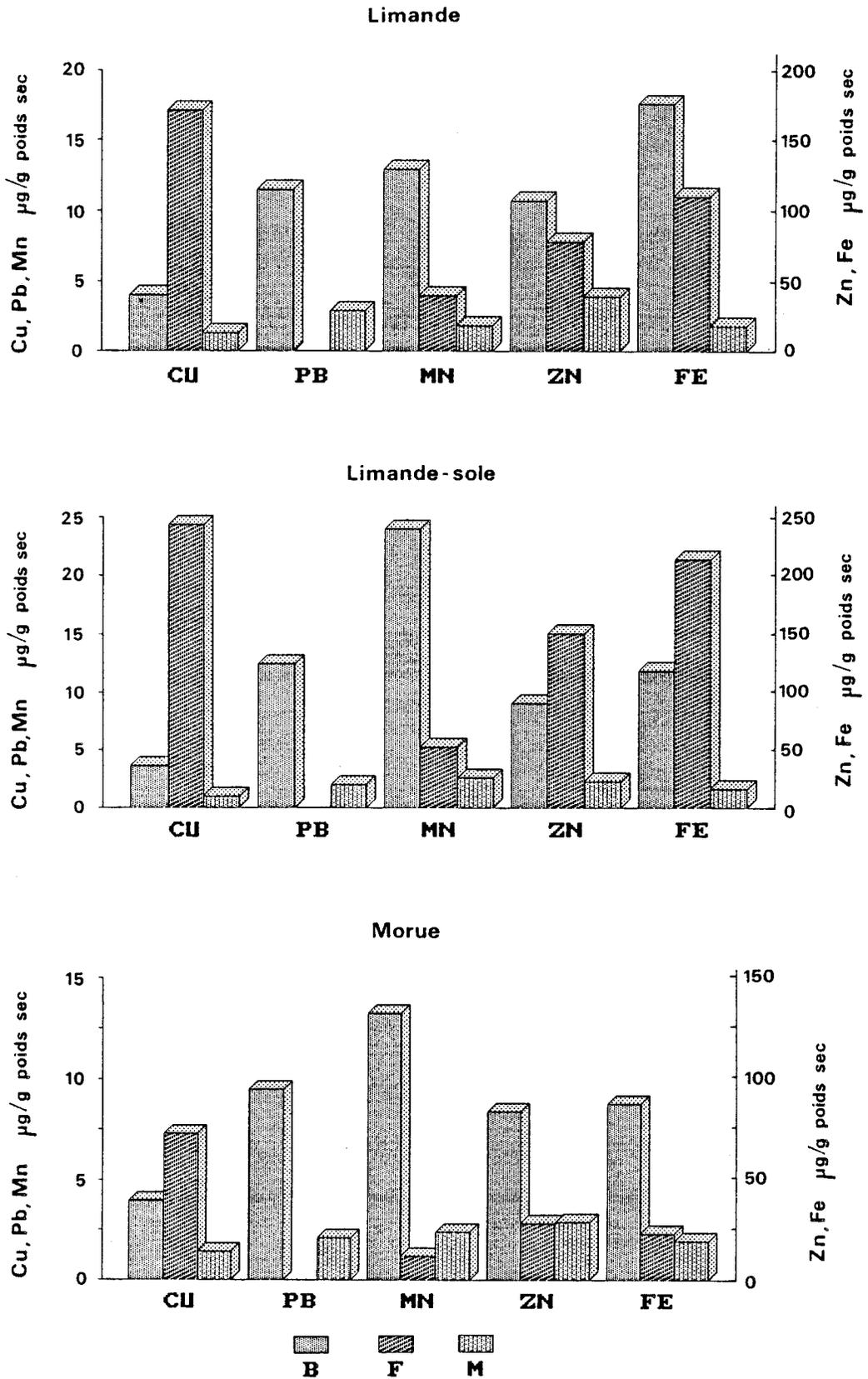


Figure 17 : Teneurs métalliques moyennes des branchies (B), foies (F) et muscles (M) des différentes espèces prélevées au printemps 1989. (n = 12 individus environ par échantillonnage).

plus faibles en Zn et Fe (t significatif). D'autre part, on note que, quelle que soit l'espèce, les teneurs métalliques des branchies décroissent de la façon suivante : Fe>Zn>Mn>Pb>Cu>Cd (non détecté).

- les teneurs métalliques des foies de limande-soles sont supérieures à celles des limandes, elles-mêmes supérieures à celles des morues. D'autre part, on note que les métaux les plus abondants dans les foies des poissons sont le Fe puis le Zn, le Cu et enfin le Mn. Toutefois, il faut préciser que chez la morue ainsi que chez la limande, les teneurs moyennes en Fe et Zn sont du même ordre de grandeur.

- pour le muscle, les limandes présentent les teneurs moyennes les plus élevées en Zn et Pb et les teneurs les plus faibles en Mn. Les espèces limande-sole et morue, caractérisées par des teneurs élevées en Mn, se différencient surtout par rapport aux teneurs en Cu et Zn qui sont plus importantes chez la morue.

Par ailleurs, on note que pour les trois espèces, les teneurs métalliques des muscles décroissent de la façon suivante : Zn>Fe>Mn>Pb>Cu. Toutefois, chez la limande, les teneurs moyennes en Pb et Mn sont du même ordre de grandeur.

Lorsque les poissons sont prélevés à une époque précise, les teneurs métalliques des trois espèces présentent généralement les caractéristiques citées ci-dessus. Chaque espèce possède donc au niveau des teneurs métalliques des organes, des caractéristiques qui lui sont propres et qui sont assez marquées puisqu'elles sont observées pour différents échantillonnages.

2.1.2. Comparaison des teneurs métalliques des différents organes

La figure 17 représente les teneurs métalliques moyennes des organes des individus d'une même espèce, prélevés à la même époque (printemps 1989).

Globalement, les teneurs métalliques des branchies et des foies sont supérieures à celles des muscles. On note, cependant, que la charge en Pb des foies est plus faible que celle des muscles chez les trois espèces ainsi que le contenu en Mn chez la morue. Les branchies présentent dans l'ensemble davantage de métal que les foies. On note, cependant, que les teneurs en Cu sont plus élevées dans le foie que dans les branchies chez les trois espèces ainsi que celles de Zn et Fe chez la limande-sole.

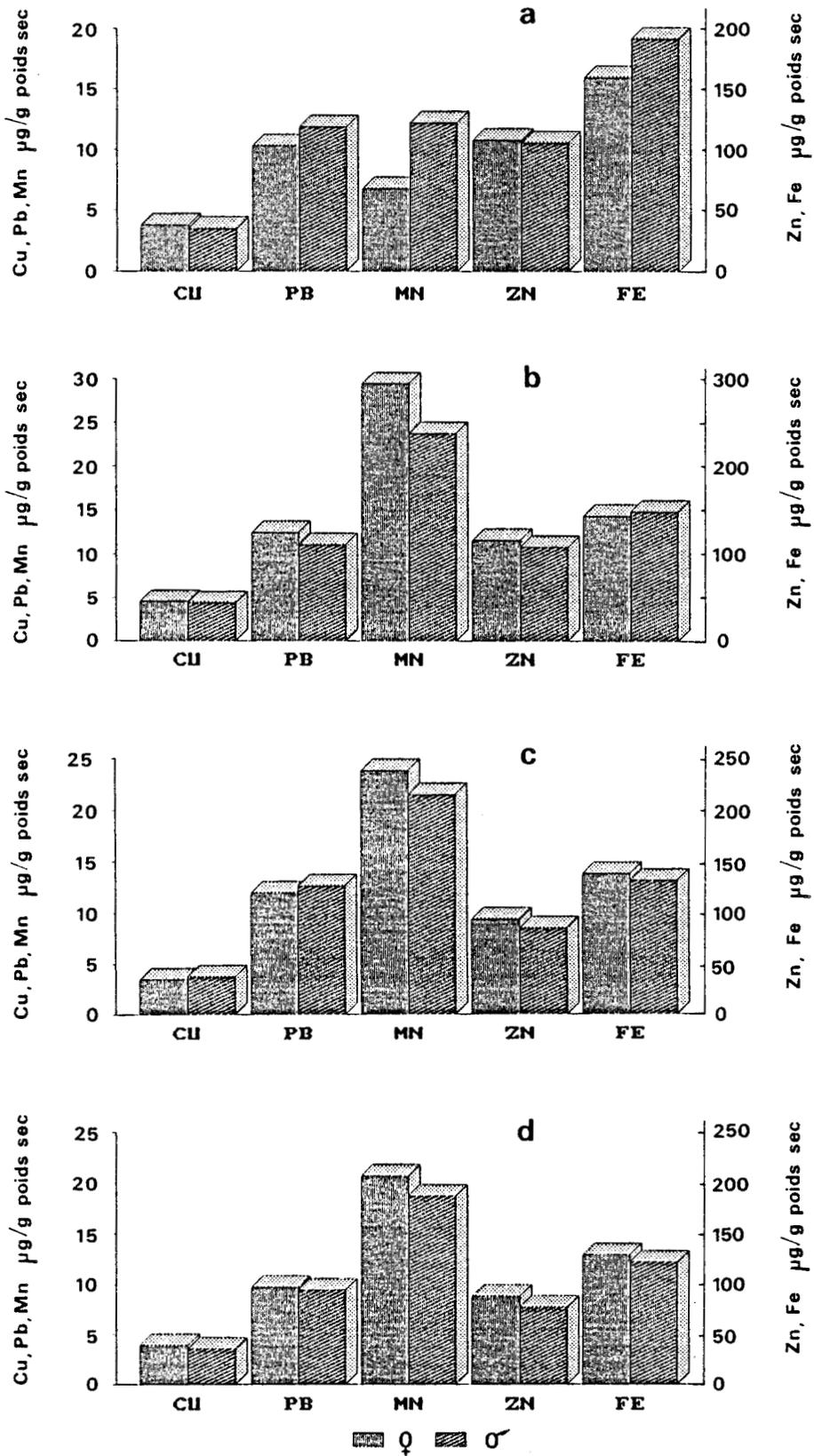


Figure 18 : Influence du sexe sur les teneurs métalliques des branchies de limandes (a), limande-soles (b,c) et morues (d).

a : printemps 1989, 3 ans

b : automne 1989, 2 ans

c : hiver 1989, 3 ans

d : hiver 1989, 2 ans

(* : t significatif au seuil de 5%)

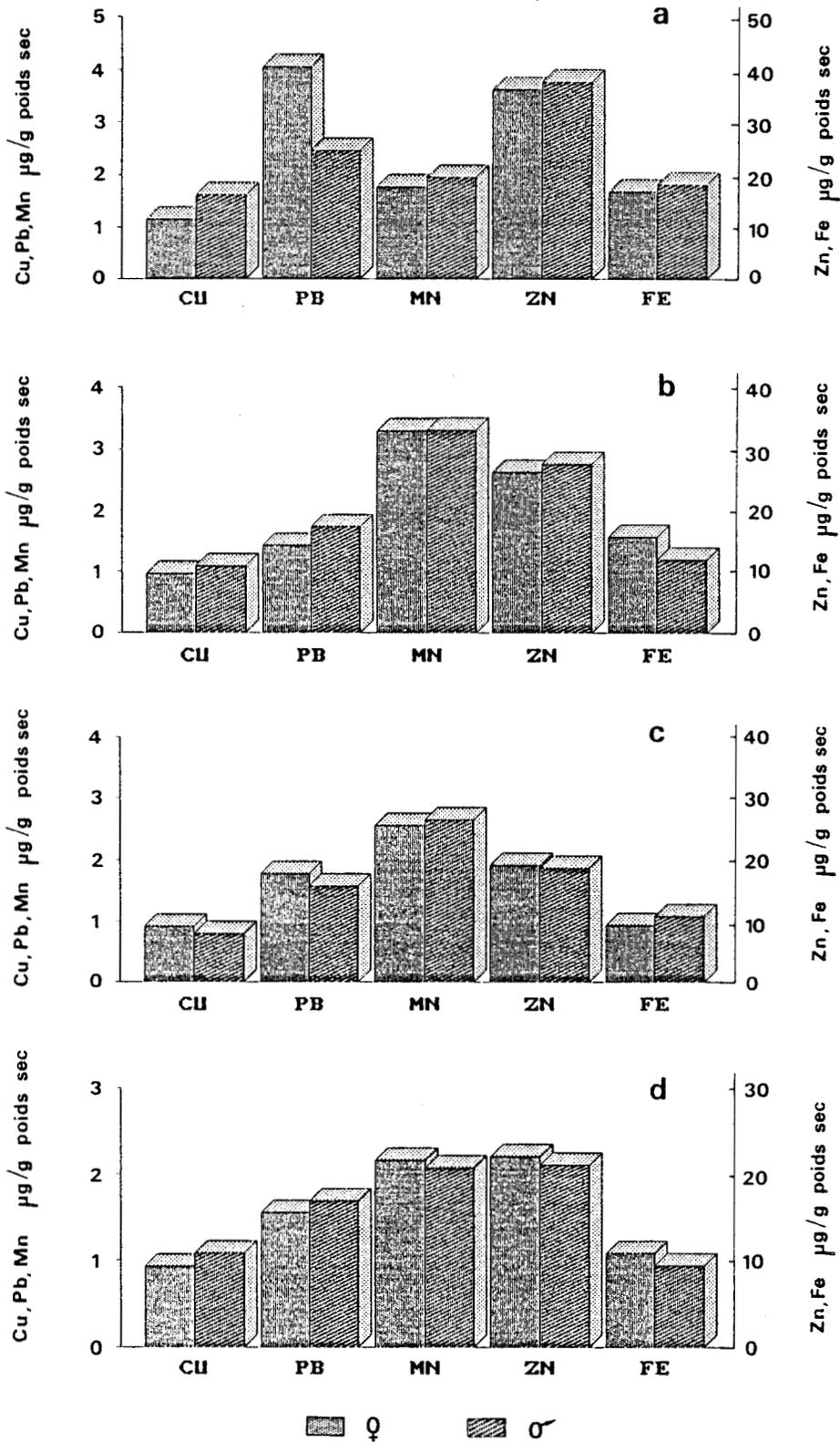
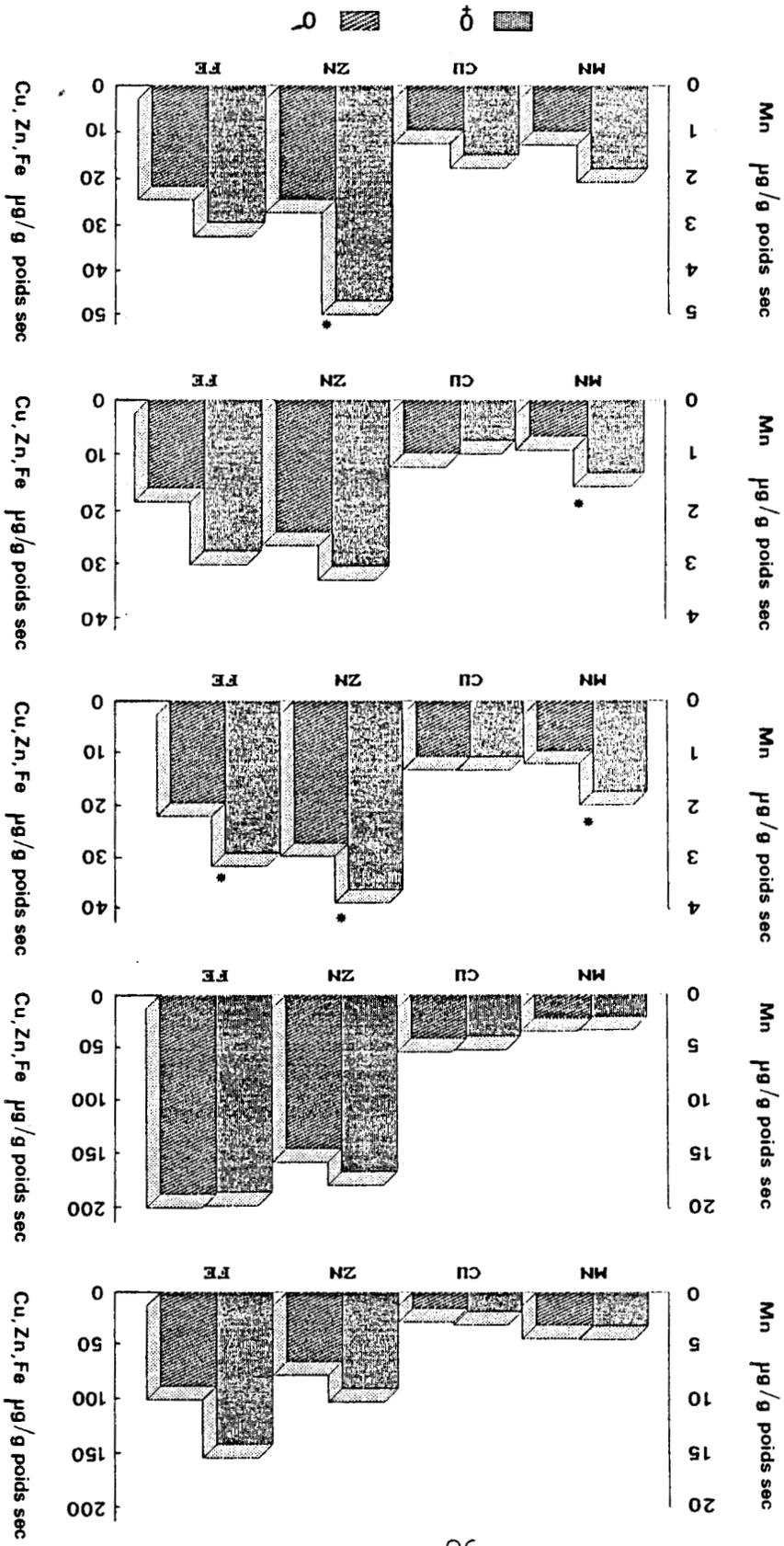


Figure 19 : Influence du sexe sur les teneurs métalliques des muscles de limandes (a), limande-soles (b,c) et morues (d).
 a : printemps 1989 ; 3 ans
 b : automne 1989 ; 2 ans
 c : hiver 1989 ; 3 ans
 d : hiver 1989 ; 2 ans
 (* : t significatif au seuil de 5%)

Figure 20 : Influence du sexe sur les teneurs métalliques des foies de

limandes (a), limande-solles (b) et morues (c,d,e).

a : printemps 1989 ; 3 ans
 b : hiver 1989 ; 3 ans
 c : aléatoire dans le temps
 d : printemps 1989
 e : hiver 1989
 (* : t significatif au seuil de 5%)



Lorsque les poissons ont été prélevés en automne et en hiver 1989, la répartition des métaux dans les différents organes de chaque espèce est identique à celle décrite pour le printemps 1989.

2.1.3. Influence du sexe sur les teneurs métalliques des organes

Les groupes d'individus comparés ont été prélevés sur un même site. Lorsque les échantillonnages le permettaient, les comparaisons ont été effectuées à partir d'individus présentant des caractéristiques identiques (âge et époque de prélèvements).

Les teneurs métalliques des branchies et des muscles de limandes, de limande-soles et de morues ne diffèrent pas de façon significative en fonction du sexe des poissons (figures 18 et 19).

En ce qui concerne le foie (figure 20), les teneurs métalliques moyennes des limandes et limande-soles femelles ne diffèrent pas de façon significative de celles des mâles.

Chez la morue prélevée de façon aléatoire dans le temps, les teneurs en Mn, Zn et Fe sont significativement plus élevées chez les femelles (figure 20c). Lorsqu'elles ont été prélevées au printemps (figure 20d), les teneurs en Mn varient alors qu'en automne (figure 20e), ce sont les teneurs en Zn.

2.1.4. Influence de l'âge sur les teneurs métalliques des organes

- Branchies

On note sur la figure 21b que les teneurs en Fe, Zn et Cu des branchies de limandes femelles prélevées en automne sont plus élevées chez les individus les plus jeunes mais ces tendances sont moins marquées, n'apparaissent pas ou s'inversent lorsque les échantillons ont été prélevés au printemps et en hiver (figures 21a et 21c). Chez la limande-sole, les teneurs métalliques des branchies ne sont pas significativement influencées par l'âge du poisson (figure 21d).

Pour la morue, on note sur l'ACP (figure 22) que les deux nuages d'individus se distinguent par rapport aux axes 1 et 2 et également par rapport aux axes 1 et 3 (projection dans le plan 1-3 non présentée). Les morues de 3 ans se caractérisent par des teneurs plus élevées en (Pb-Cd) (axe 2) et en Mn (axe 3) que celles de 1 an qui semblent présenter des teneurs un peu plus importantes en (Zn-Fe-Cu) (axe 1).

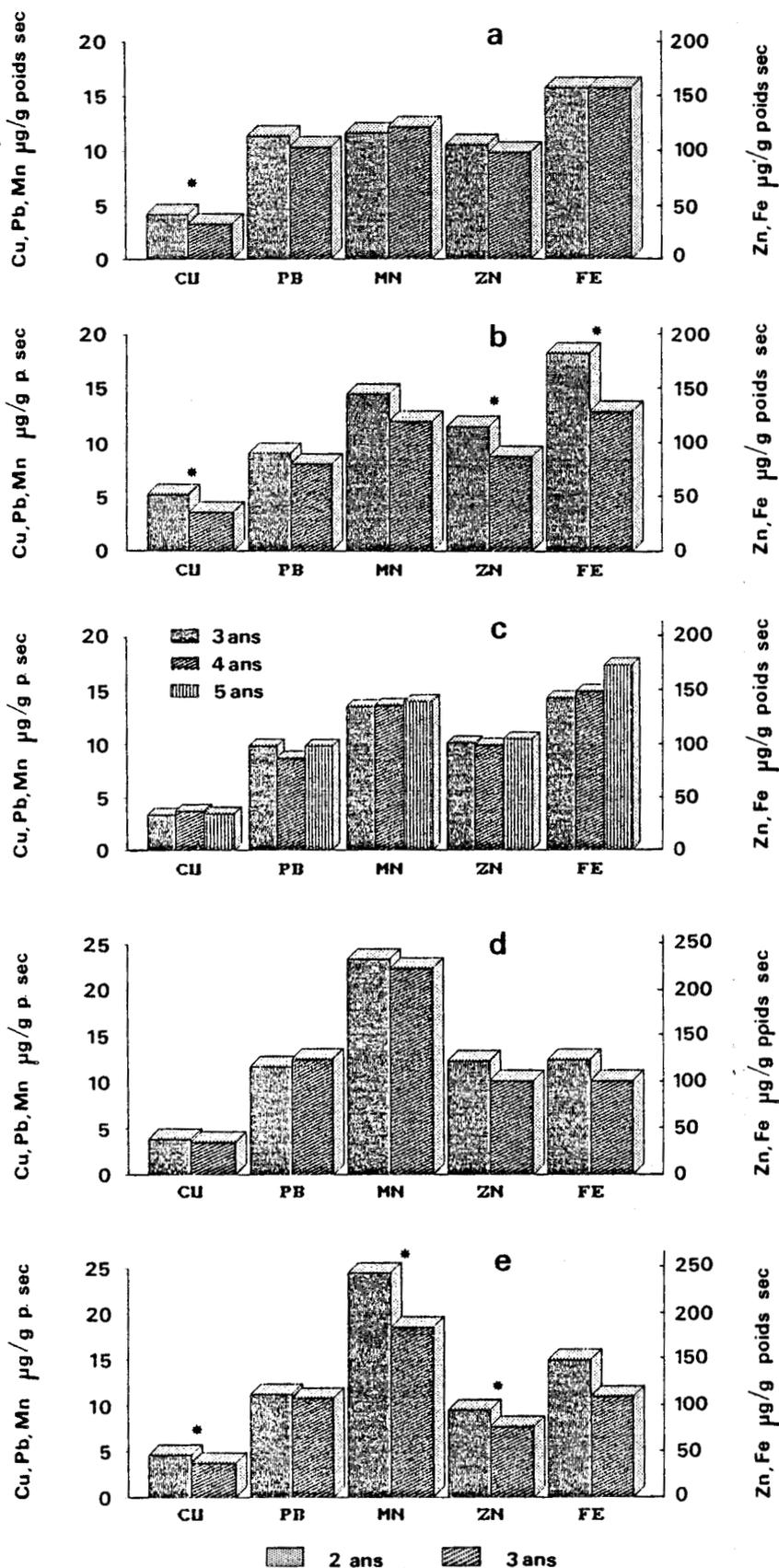


Figure 21 : Influence de l'âge sur les teneurs métalliques des branchies de femelles de limandes (a.b.c), limande-soles (d) et morues (e).
 (a et d : printemps 1989, b : automne 1989, c et e : hiver 1989)
 (*: t significatif au seuil de 5%)

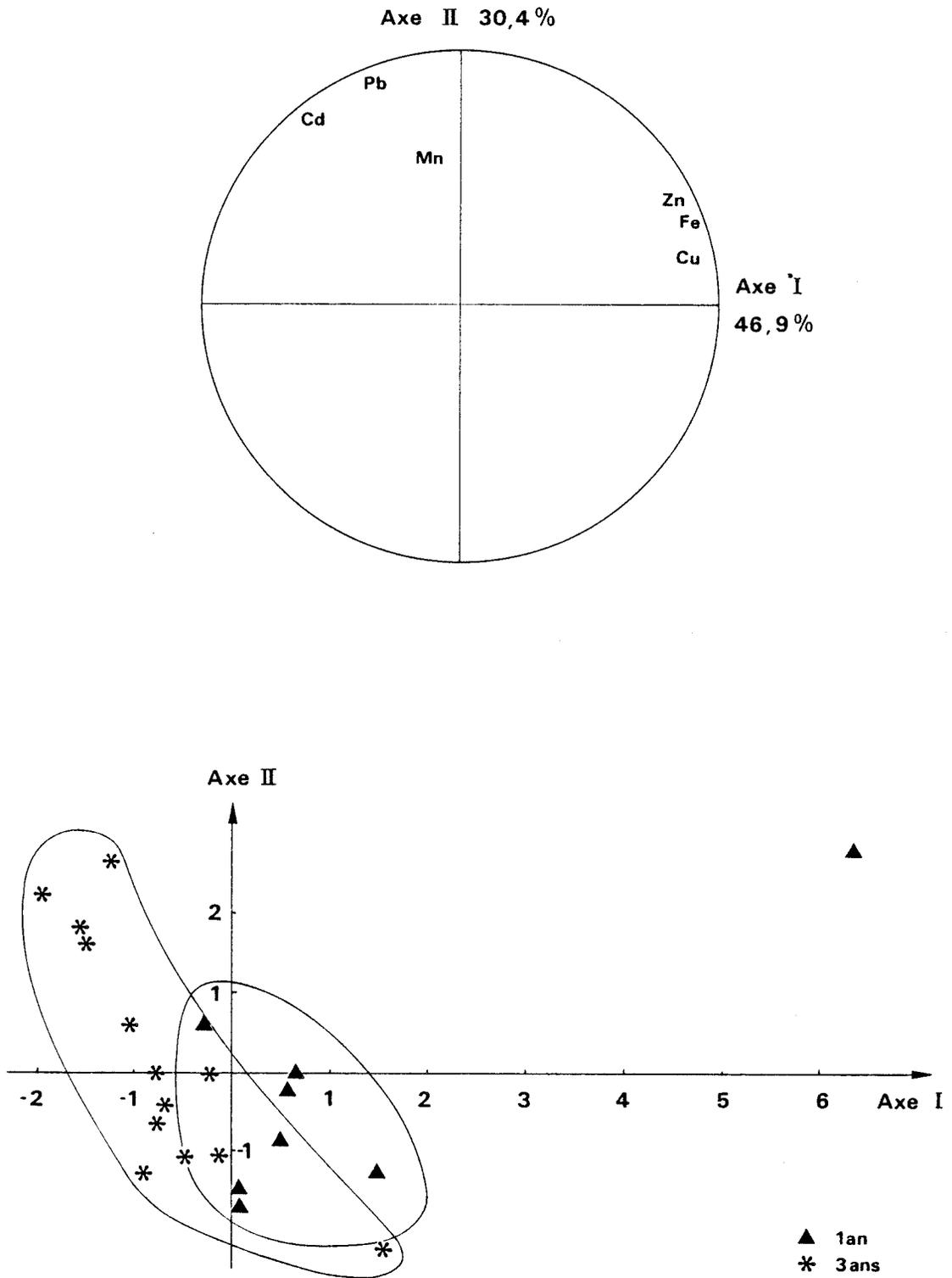


Figure 22 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de morues âgées de 1 et 3 ans. (facteurs "sexe" et "époque de prélèvements" non fixés).

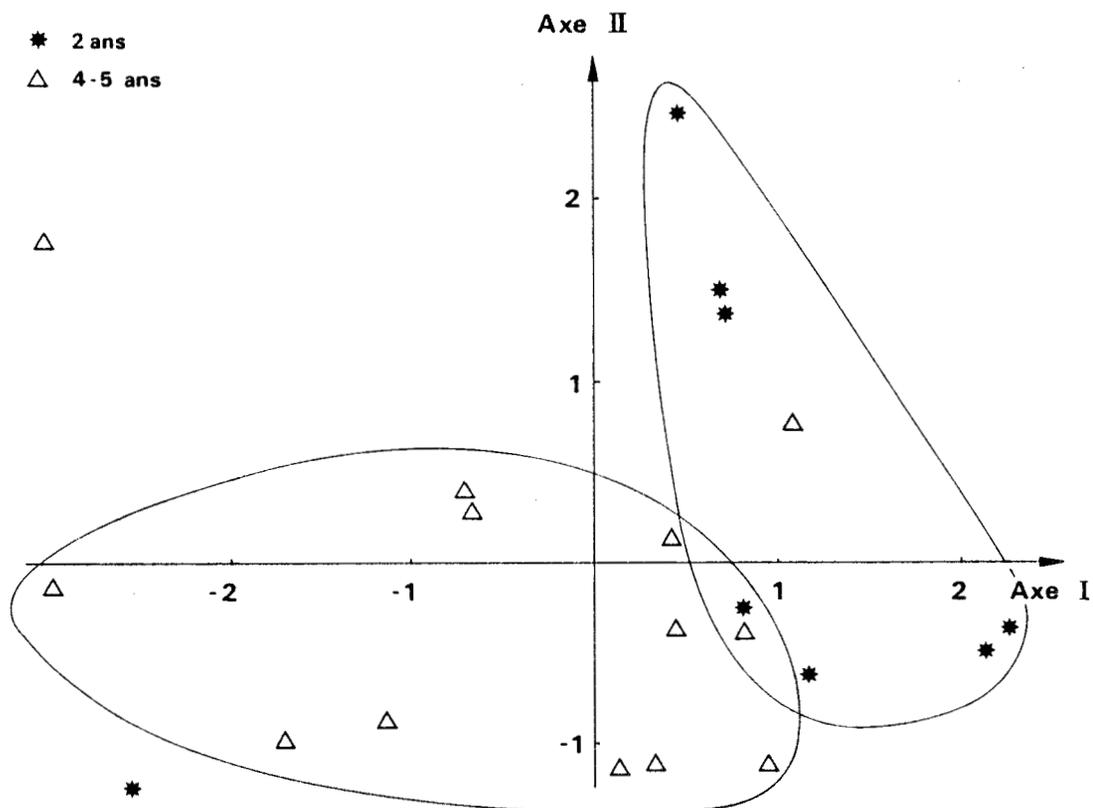
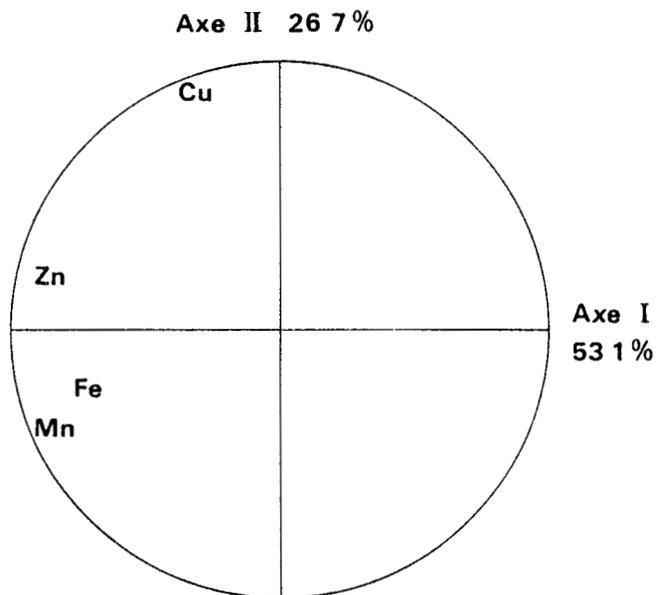


Figure 23 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limandes femelles âgées de 2 ans et 4-5 ans. (époque de prélèvement non fixée).

Effectivement, lorsque les morues sont prélevées à une époque précise (hiver) et que l'échantillonnage est constitué exclusivement de femelles (figure 21e), les individus les plus jeunes (2 ans) possèdent davantage de Zn, de Cu et de Fe ; ils présentent également des teneurs significativement plus élevées en Mn que les individus plus âgés (3 ans) ce qui contredit les observations précédentes.

Les teneurs en Fe, Zn et Cu tendent donc vers des valeurs plus élevées chez les individus les plus jeunes mais aucune conclusion ne peut être tirée quant à l'influence de l'âge sur les teneurs en Mn.

- Foie

Sur l'ACP (figure 23), les variables (Zn-Mn-Fe) déterminent l'axe 1 (Ctb = 53,1%) et le Cu détermine l'axe 2 (Ctb = 26,7%).

Les limandes de 4 et 5 ans ont tendance à être plus chargées en (Zn-Mn-Fe) que les individus de 2 ans. Aucune différence significative entre les teneurs moyennes des deux groupes d'âge n'a été mise en évidence probablement à cause de l'existence d'un individu de 2 ans, visualisé sur l'ACP et qui comporte des teneurs importantes en Zn, Mn et Fe.

Prélevées à la même époque (automne), les limandes femelles de 3 ans possèdent des teneurs en Fe significativement plus élevées que celles de 2 ans (figure 24a) ; par contre, les échantillonnages du printemps ne présentent pas de teneurs significativement différentes (figure 24b).

Chez la limande-sole, les femelles de 2 ans possèdent davantage de Fe que celles de 3 ans (t significatif) (figure 24c).

Chez la morue, le facteur "âge" n'intervient pas de façon significative sur les teneurs hépatiques en métal (figure 24d).

- muscles

Sur l'ACP (figure 25), les limandes de 2 ans possèdent plus de Zn (axe 2) et de Fe (axe 3) (projection dans le plan 1-3 non présentée) que les individus de 4 et 5 ans.

A partir de trois échantillonnages prélevés à des saisons différentes, on remarque (figure 26a, b, c) que les teneurs en Zn sont effectivement plus importantes chez les individus les plus jeunes, parfois de façon significative. Le Fe peut également être plus abondant chez les individus les plus jeunes mais cette tendance n'est pas observée dans tous les cas (figure 26c).

Chez la limande-sole, les teneurs en Zn sont plus élevées chez les individus les plus jeunes (figure 26d). Les autres métaux ont également tendance à être plus abondants chez les individus les plus jeunes mais

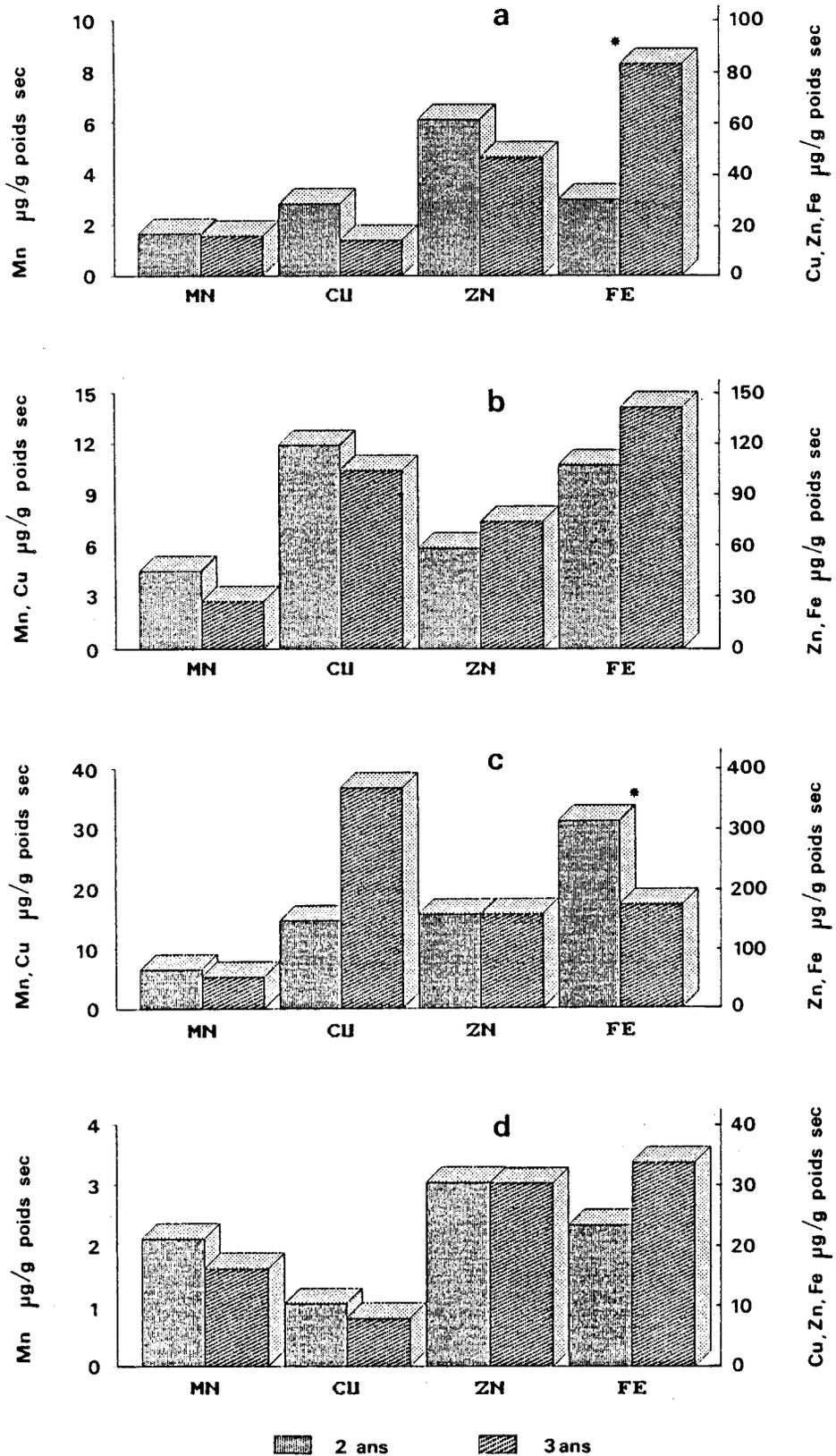


Figure 24 : Influence de l'âge sur les teneurs métalliques des foies de femelles de limandes (a et b), de limande-soles (c) et de morues (d).

a : automne 1989

b et c : printemps 1989

d : hiver 1989

(* : t significatif au seuil de 5%)

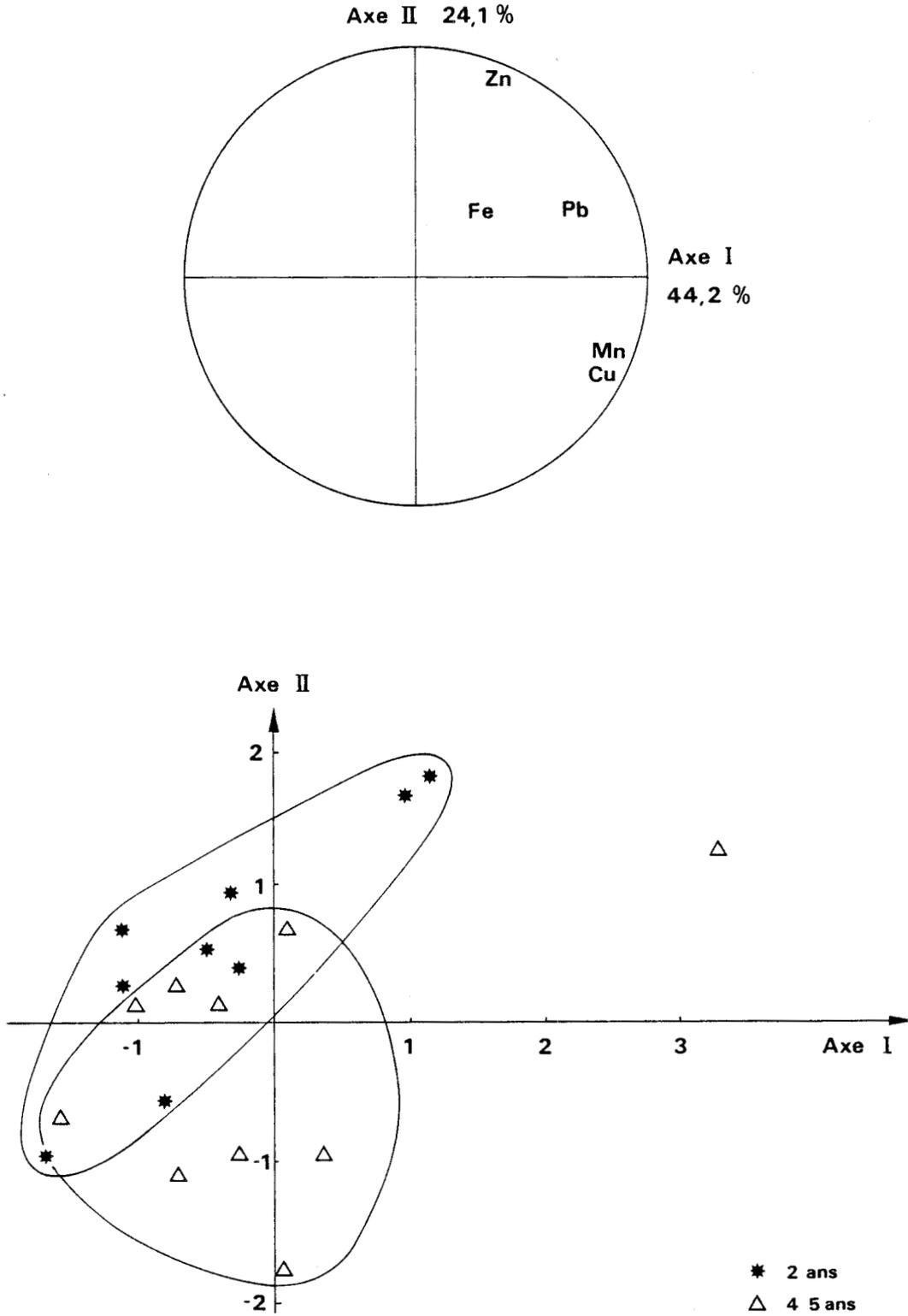
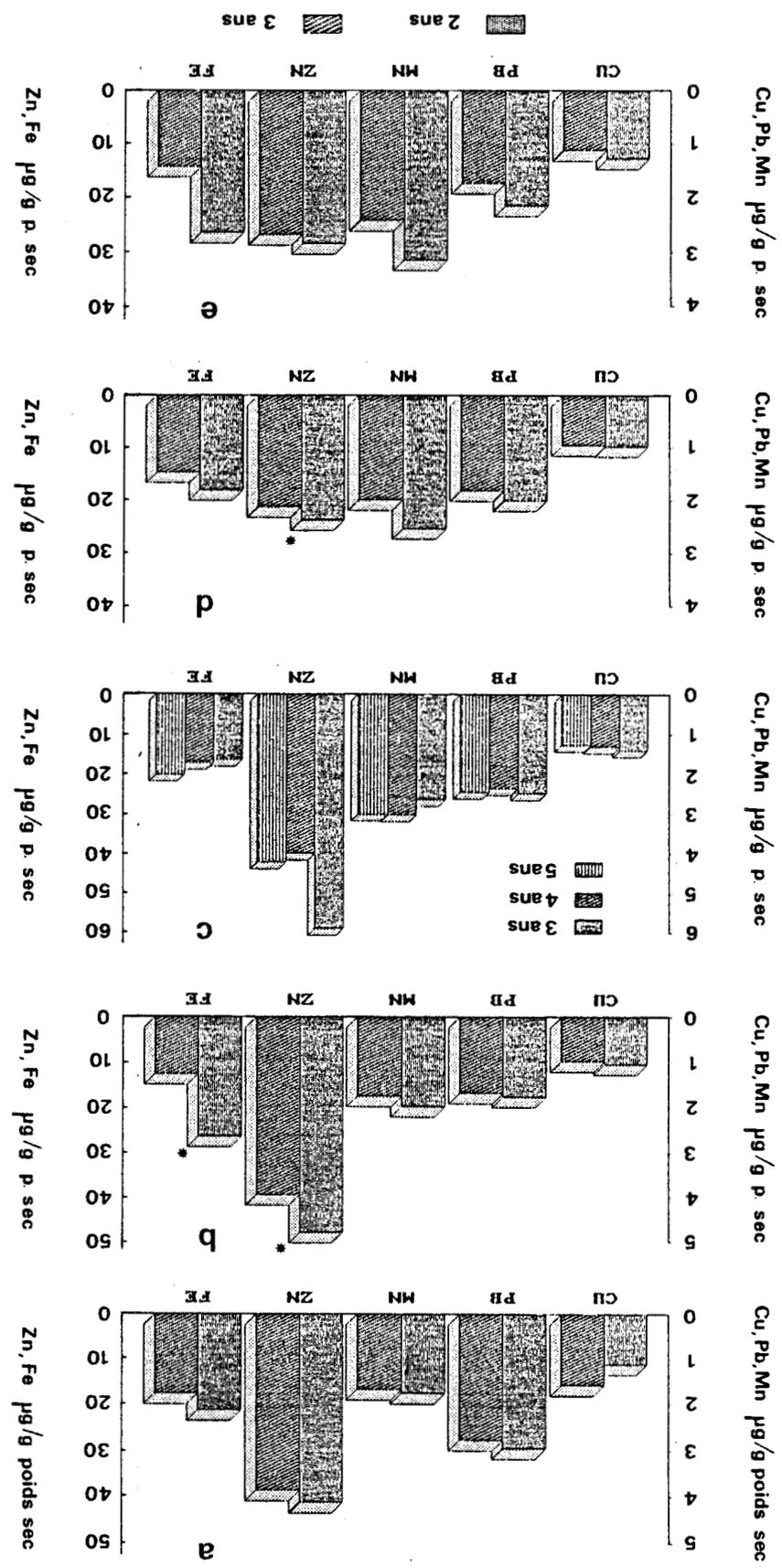


Figure 25 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limande femelles âgées de 2 ans et 4-5 ans. (époque de prélèvement non fixée).

Figure 26 : Influence de l'âge sur les teneurs métalliques des muscles de femelles de limandes (a, b, c, limande-solles (d) et morues (e)).
 a et d : printemps 1989
 b : automne 1989
 c et e : hiver 1989
 (* : t significatif au seuil de 5%)



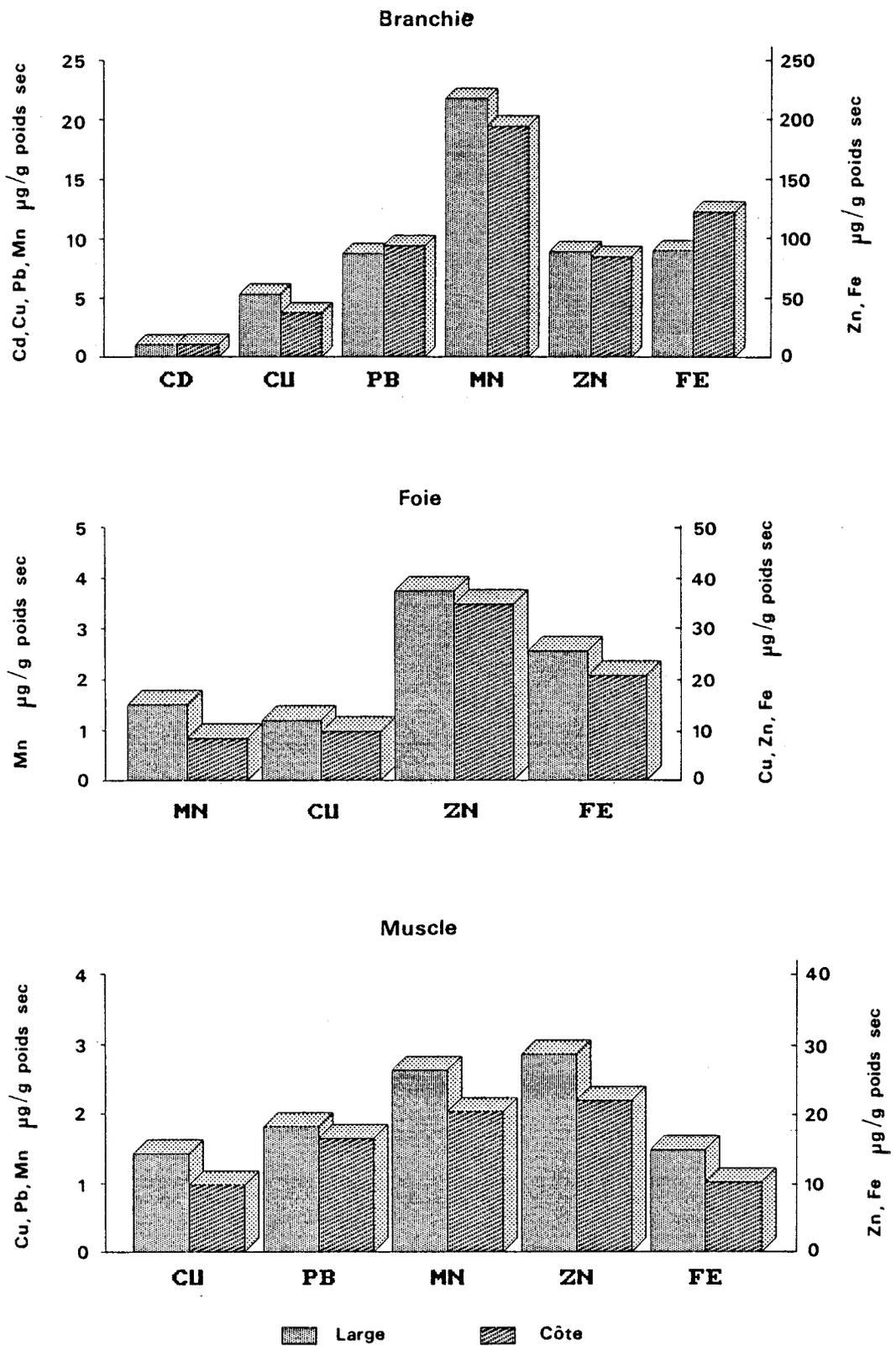


Figure 27 : Teneurs métalliques des organes de morues prélevées en automne 1989 à la côte et au large de Calais.
 (* : t significatif au seuil de 5%)

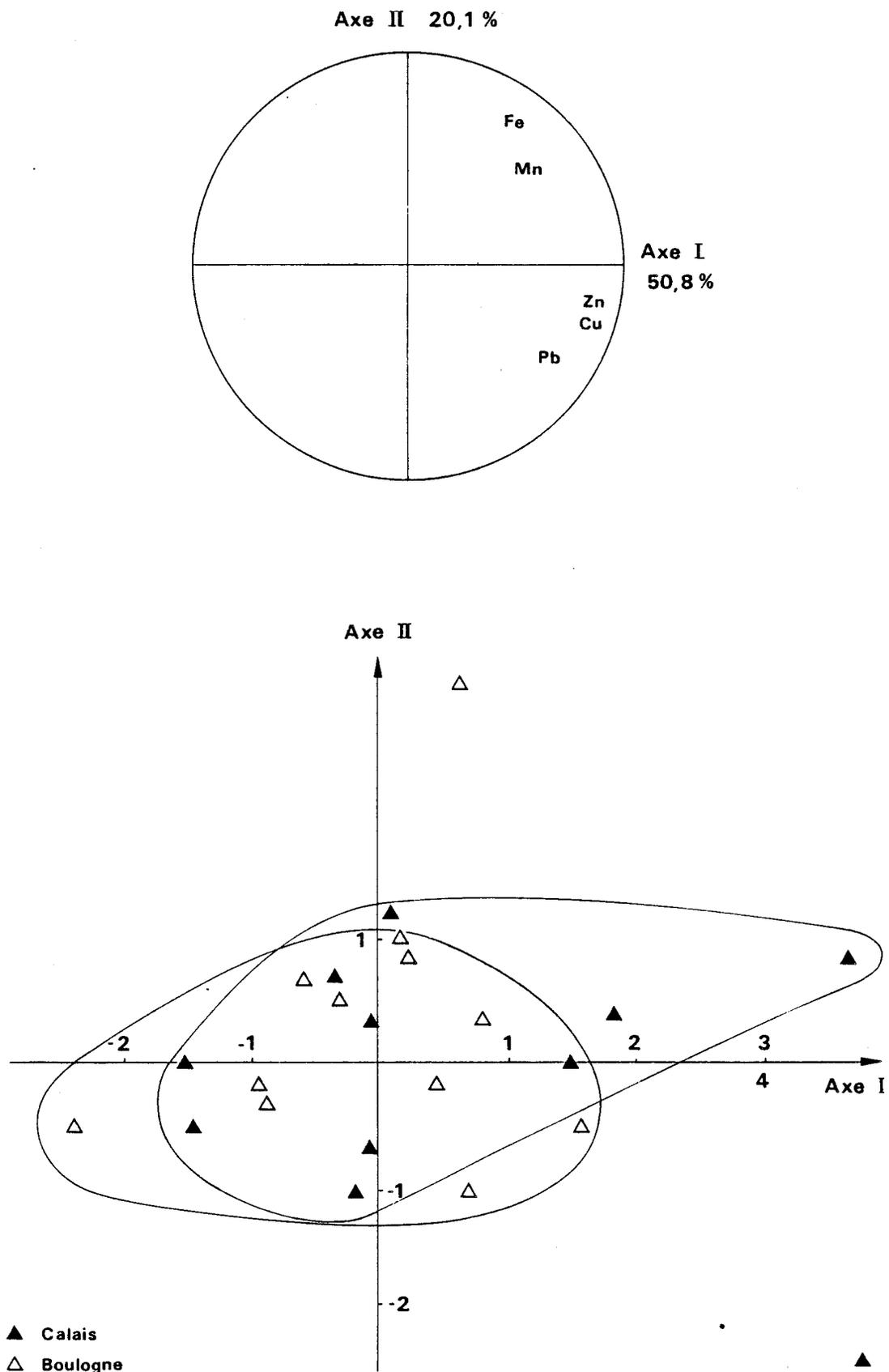


Figure 28 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de limandes prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991. (femelles de 2 ans).

étant donnée la variabilité des résultats, ces différences ne sont pas significatives.

Les teneurs en métal des morues de 2 et 3 ans ne diffèrent pas de façon significative (figure 26e). Cependant, on observe une tendance vers des teneurs métalliques plus importantes chez les individus les plus jeunes.

2.1.5. Comparaison des teneurs métalliques des organes de poissons prélevés sur différents sites

- En automne 1989, des morues ont été prélevées simultanément sur les sites côte et large de Calais. Les deux groupes d'individus (côte et large) sont respectivement âgés de 2,08 ans et 2,54 ans et comportent 8 et 6 femelles sur 12 individus.

Au niveau des branchies, les individus du large présentent davantage de Cu et de Mn et les individus de la côte se distinguent par des teneurs élevées en Fe (figure 27a).

Les teneurs métalliques des foies et des muscles ont tendance à être plus élevées chez les morues provenant du large (figures 27b et 27c). D'après les résultats obtenus lors de l'analyse de l'influence des facteurs "âge" et "sexe" sur les teneurs métalliques des différents organes, les différences observées entre les échantillons du large et de la côte ne sont pas le résultat de l'influence de ces paramètres.

- Les limandes prélevées au printemps 1991 à Calais et à Boulogne sont toutes des femelles âgées de 2 ans. Les facteurs "âge" et "sexe" ne peuvent donc influencer les teneurs métalliques.

Au niveau des branchies, on note sur l'ACP (figure 28), que les deux groupes d'individus se répartissent le long de l'axe 1 déterminé par les variables (Cu-Zn-Pb-Mn) (Ctb = 51%). Il est difficile de faire une distinction entre les deux nuages d'individus mais certains poissons prélevés à Calais tendent à posséder davantage de ces métaux que ceux provenant de Boulogne. Ces observations ne sont pas corroborées par des différences significatives entre les teneurs métalliques des deux groupes d'individus (figure 1 annexe).

Au niveau du foie (ACP figure 29), on remarque que les limandes prélevées à Boulogne sont beaucoup moins chargées en Mn-Zn-Fe (axe 1) et en Cu (axe 2) que celles prélevées à Calais. Leurs teneurs métalliques sont également plus homogènes car le nuage de points est plus dense.

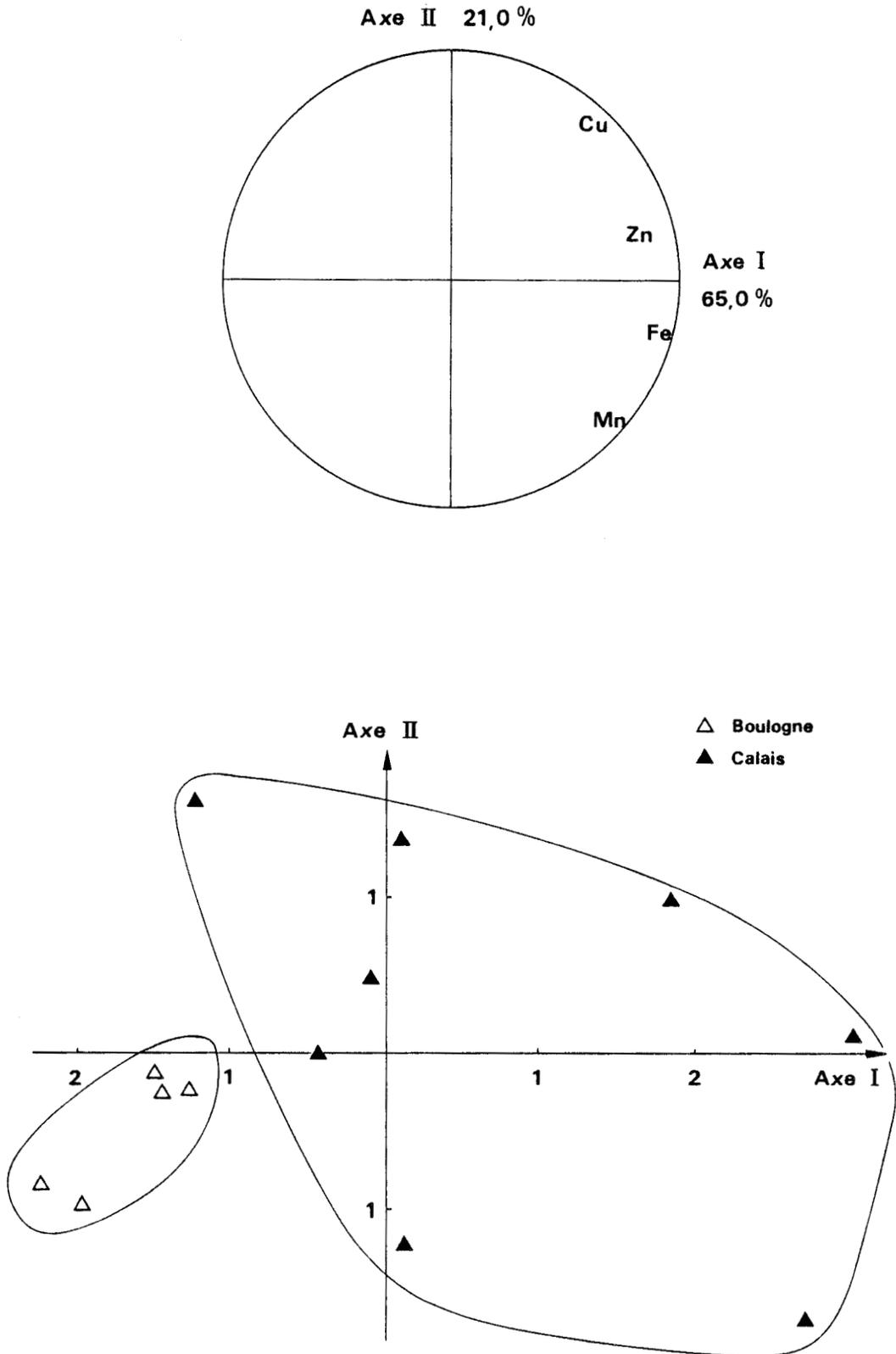


Figure 29 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limandes prélevées au printemps 1991 à Calais et Boulogne. (femelles de 2 ans).

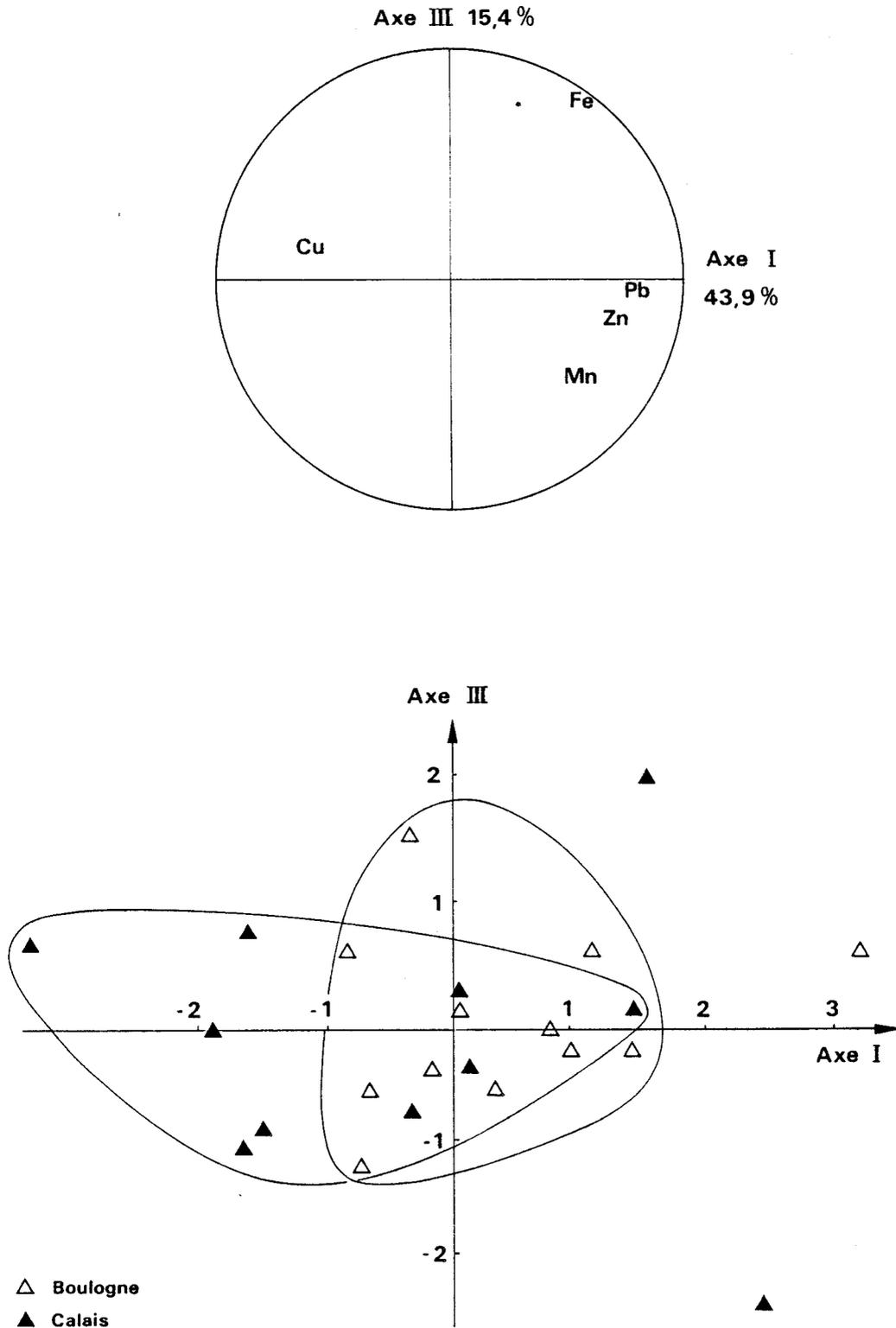


Figure 30 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limandes prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991. (femelles de 2 ans).

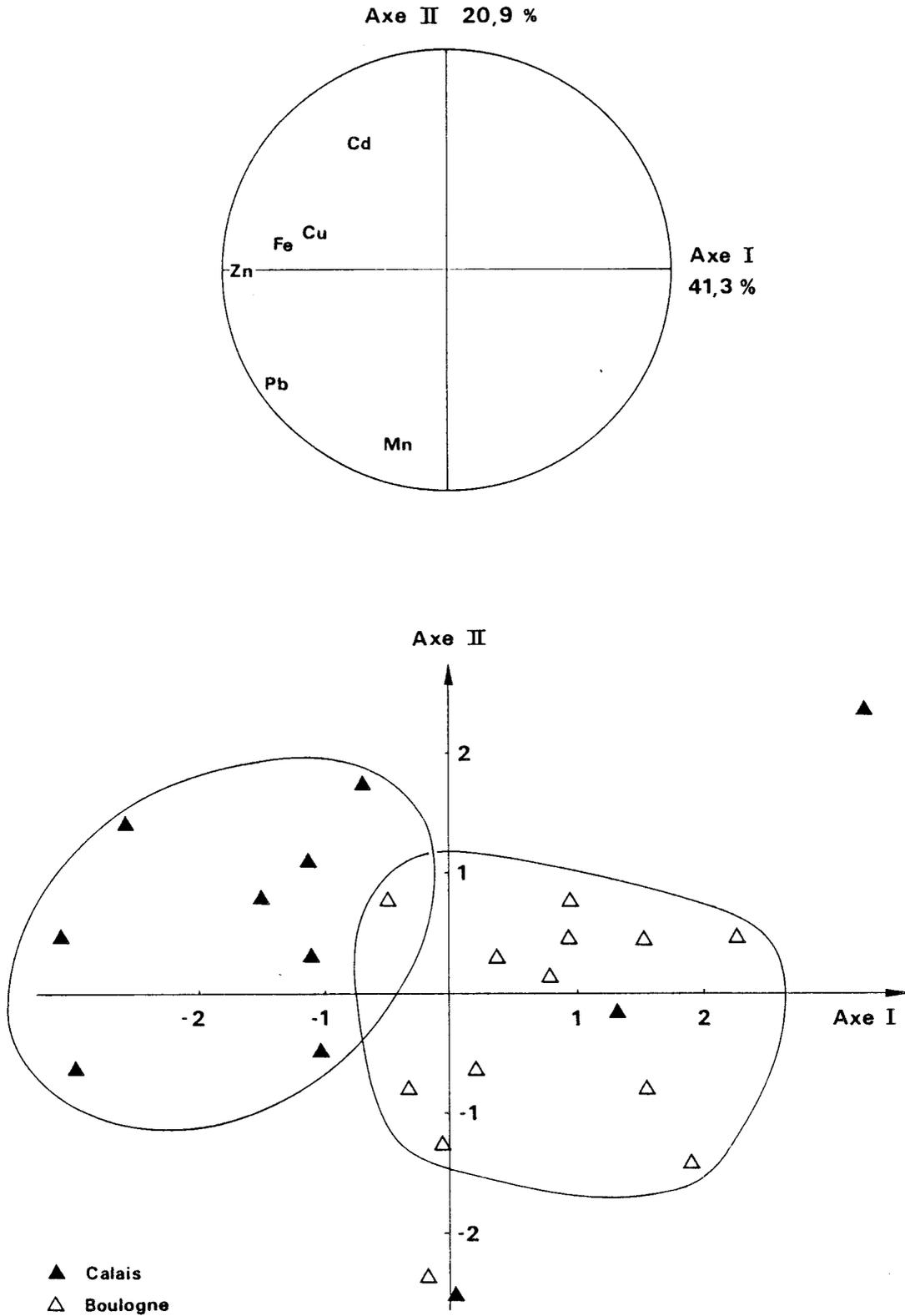


Figure 31 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de limande-soles prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991.

Ces observations sont confirmées par des différences significatives entre les teneurs métalliques moyennes des deux groupes d'individus (figure 1 annexe).

En ce qui concerne l'ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limandes (figure 30), les deux nuages de points sont peu dissociés par rapport aux axes 1 et 2 (déterminés respectivement par (Mn-Fe-Zn-Pb) et Cu) (projection dans le plan 1-2 non présentée). Toutefois, quelques individus pêchés à Calais présentent davantage de Cu que ceux de Boulogne. Cette tendance est confirmée sur la projection dans le plan 1-3 (l'axe 3 étant déterminé par le Fe) et les individus prélevés à Boulogne tendent à avoir des teneurs en Fe plus importantes. Cependant, aucune teneur métallique n'est significativement différente entre les deux groupes d'individus (figure 1 annexe).

- Chez les limande-soles prélevées en 1991 à Calais et à Boulogne, le facteur "sexe" de l'individu ne doit pas intervenir car la proportion de mâles est du même ordre de grandeur dans les deux groupes d'individus (respectivement 3 mâles sur 11 et 2 mâles sur 9 individus prélevés à Calais et à Boulogne).

L'âge n'a pas été déterminé par lecture des otolithes pour ces échantillons mais les individus pêchés à Boulogne sont plus grands, donc plus vieux, que ceux de Calais (28+1,3 cm à Calais contre 34,7+2,8 cm à Boulogne).

Sur la figure 31 traitant les teneurs métalliques des branchies, il apparaît que le Zn est corrélé en priorité au Fe puis au Pb puis au Cu et ces quatre métaux définissent l'axe 1 qui représente 41,3% de la variance totale. Les teneurs en (Cu-Zn-Fe-Pb) des branchies de limande-soles sont plus importantes lorsque les individus proviennent de Calais plutôt que de Boulogne. Cette observation est confirmée par le fait que les teneurs en Zn et Fe sont significativement différentes (figure 2a annexe). Les deux nuages d'individus se distinguent peu le long de l'axe 2, déterminé par Cd et Mn. Toutefois, il apparaît que les teneurs en Mn ont tendance à être plus importantes chez les individus prélevés à Boulogne.

Les teneurs métalliques des foies de limande-soles prélevées à Calais sont plus élevées que celles des individus prélevés à Boulogne (figure 32) ; seul le Mn n'est pas significativement différent entre les deux échantillonnages (figure 2b annexe). L'étude concernant l'influence de l'âge sur les teneurs hépatiques en métal a mis en évidence que les teneurs en Fe sont plus importantes chez les individus les plus jeunes

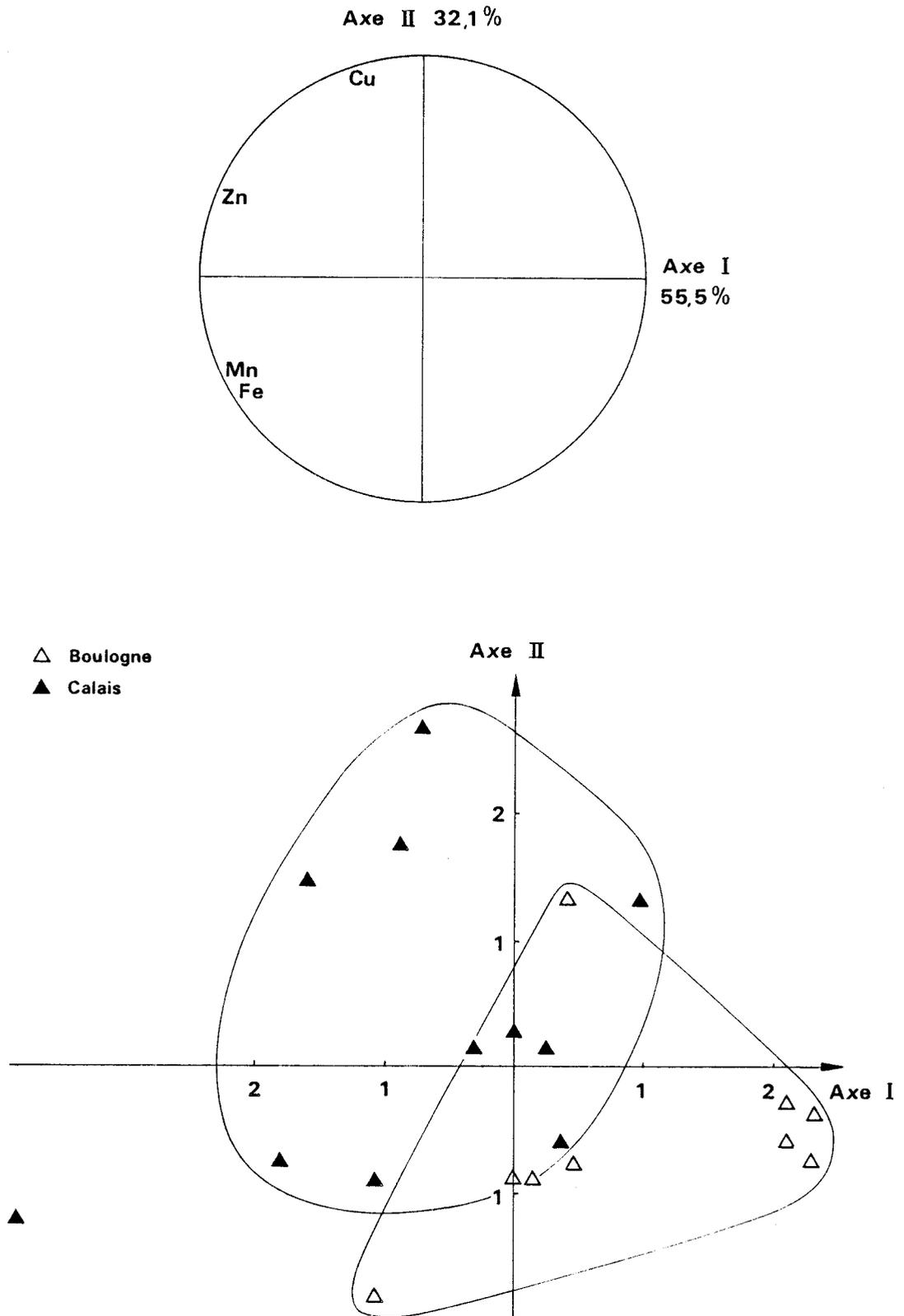


Figure 32 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limande-soles prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991.

Axe II 31,8%

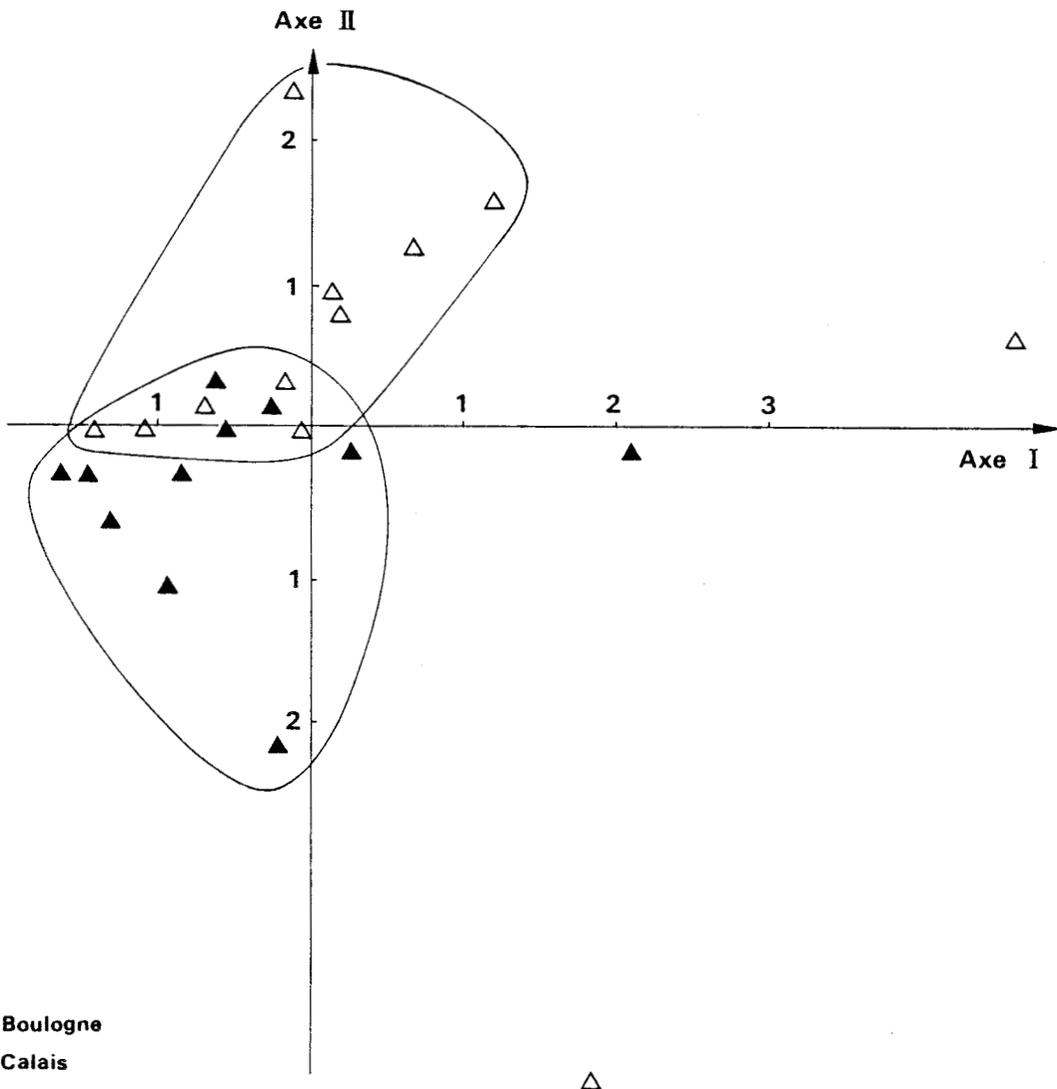
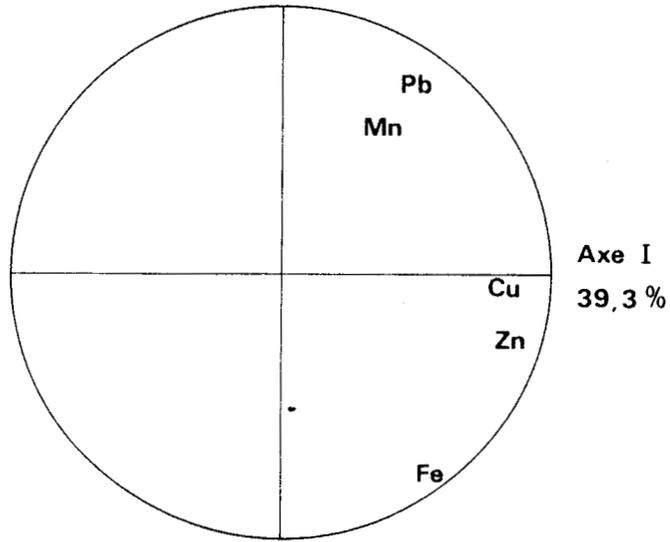


Figure 33 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limande-soles prélevées à Calais et Boulogne au printemps 1991

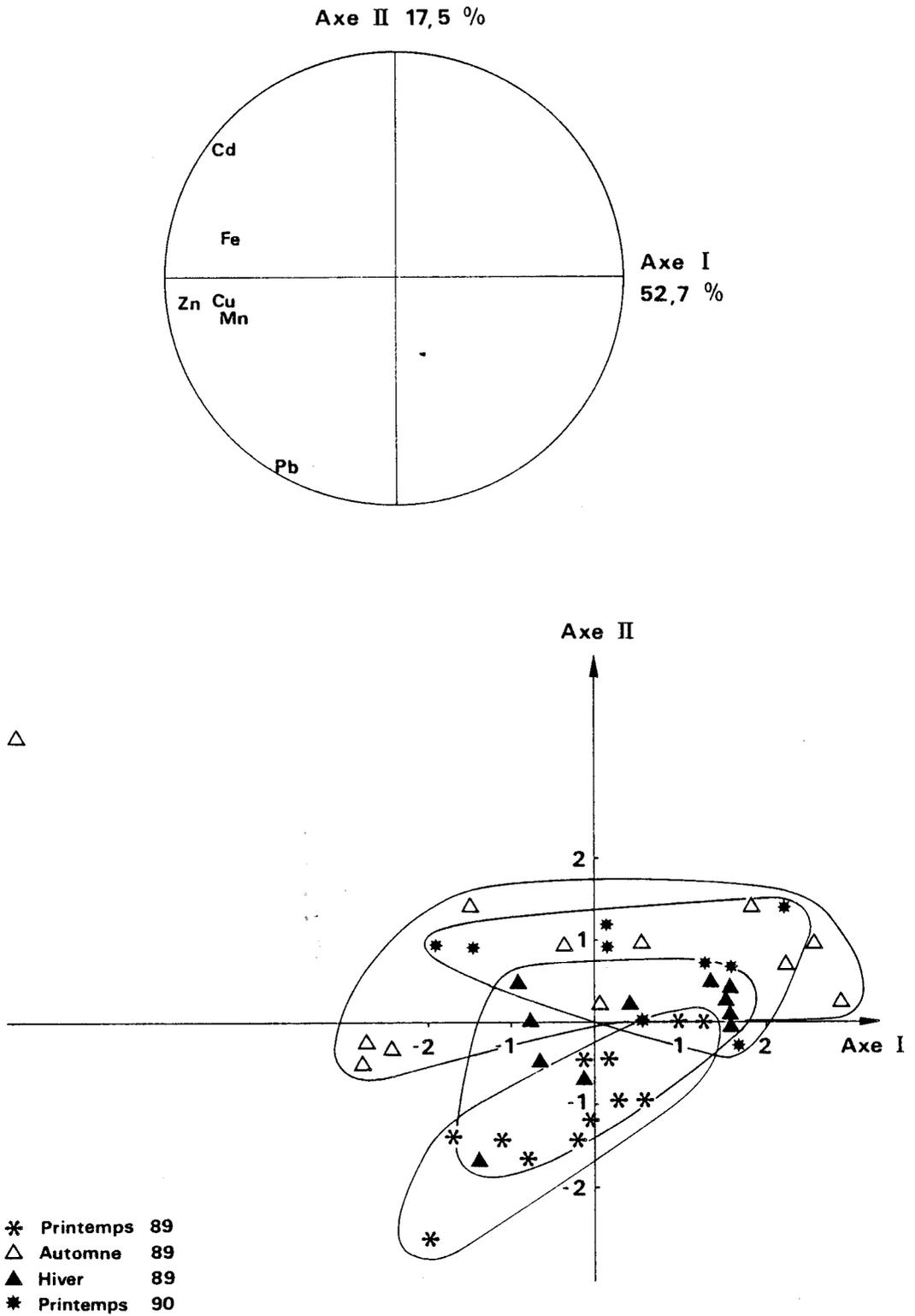


Figure 34 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de limandes prélevées à différentes saisons.

mais n'a pas montré une relation entre l'âge et les teneurs en Zn et Cu. Les teneurs métalliques plus importantes chez les individus de Calais sont donc essentiellement liées au facteur "site de prélèvement" et probablement au facteur "âge" secondairement.

Sur l'ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles (figure 33), les variables Cu et Zn définissent l'axe 1 (Ctb = 39,3%) et sont reliées par un coefficient de corrélation $r = 0,50$. Les variables Pb, Mn et Fe déterminent l'axe 2 (Ctb = 32%) et Pb-Mn s'opposent au Fe sur cet axe. Le nuage de points représentant les individus prélevés à Boulogne s'étire vers les variables (Pb-Mn). Les échantillons du site de Boulogne semblent présenter des teneurs métalliques globalement plus élevées que ceux du site de Calais mais seules les teneurs moyennes en Mn sont significativement différentes entre les deux groupes de poissons (figure 2c annexe).

Il a été montré que les individus les plus jeunes possèdent davantage de métal, notamment de Zn. Or, les teneurs métalliques sont plus élevées chez les individus pêchés à Boulogne, c'est-à-dire chez les poissons les plus âgés. Le facteur "site de prélèvement" doit donc être le paramètre le plus influant dans cette analyse, pourtant la charge métallique des sédiments tend à être plus faible sur le site de Boulogne.

2.1.6. Comparaison des teneurs métalliques des organes de poissons prélevés à différentes saisons

- Branchie

Chez la limande (figure 34), les teneurs en Cu, Zn, Mn et Fe évoluent dans le même sens puisqu'elles déterminent l'axe 1 (Ctb = 52,3%), les variables (Cu-Zn) et (Zn-Mn) sont les mieux corrélées ($r = 0,59$). Le Pb a un comportement indépendant de celui des autres variables car il détermine l'axe 2. Les individus prélevés en automne se répartissent le long de l'axe 1 et par rapport à l'axe 2 s'opposent à la variable Pb. Ces échantillons présentent donc des teneurs variées en (Fe-Zn-Cu-Mn) et faibles en Pb. Les échantillons pêchés en hiver constituent un nuage dense sans tendance particulière. Le nuage représentant les individus prélevés au printemps 89 est positionné en direction de la variable Pb mais ces teneurs relativement importantes en Pb ne doivent pas être liées à un phénomène saisonnier puisqu'au printemps 90, les individus ne sont pas discriminés par rapport à cette variable.

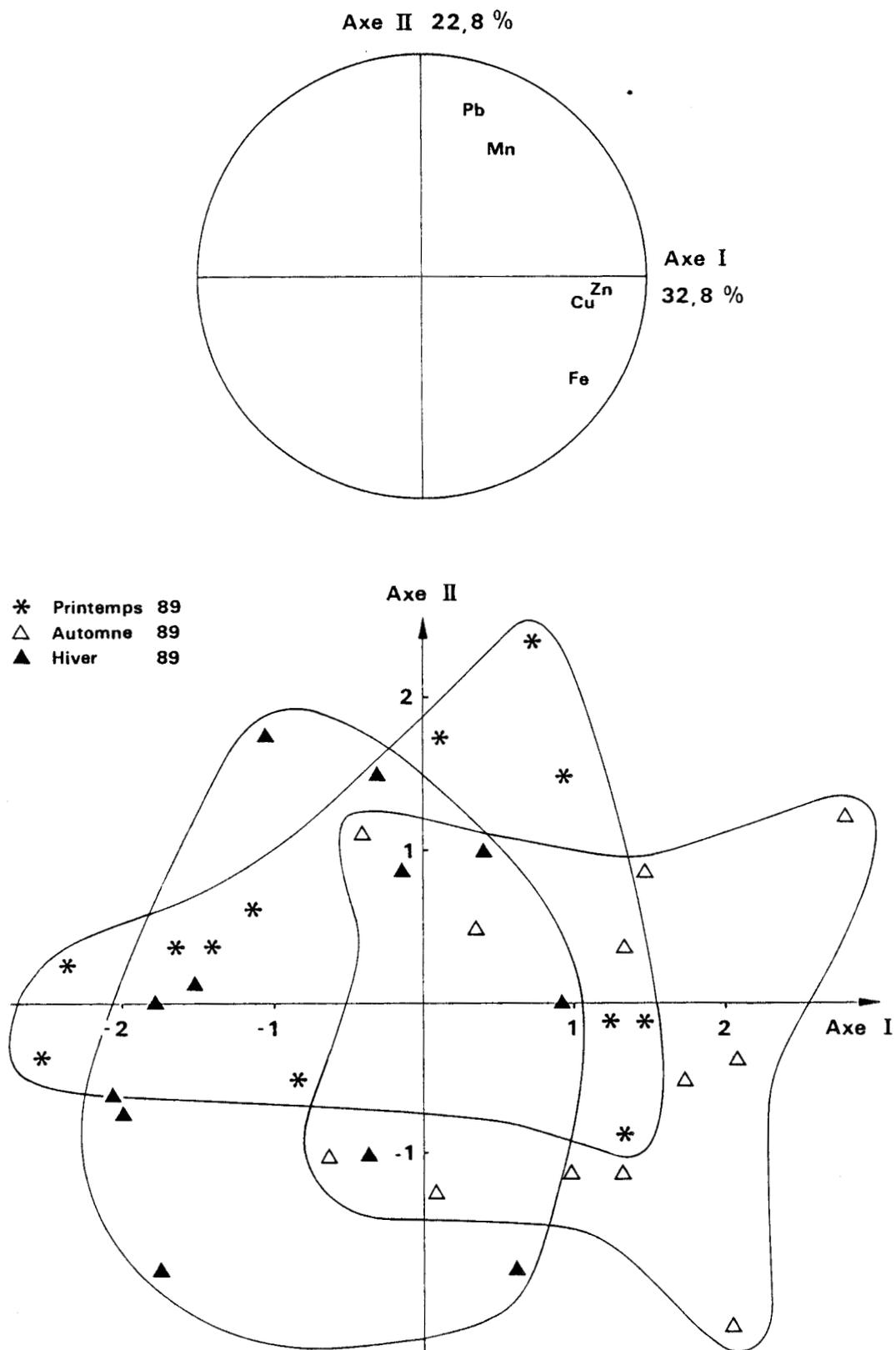


Figure 35 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de limande-soles prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

Le milieu environnant a dû présenter au printemps 1989 des concentrations plus importantes en Pb car les facteurs "âge" et "sexe" n'affectent pas les teneurs en Pb des branchies.

En résumé et comme le montre la figure 3 (annexe), les teneurs métalliques des branchies, excepté celles du Pb, varient très peu au cours du temps.

Pour l'analyse concernant la limande-sole (figure 35), les variables Zn et Fe sont les mieux corrélées ($r = 0,47$) puis (Cu-Zn) et ces trois variables déterminent l'axe 1 (Ctb = 32,8%) ; le Pb et le Mn déterminent l'axe 2 (23%) et sont en opposition sur l'axe 3. Les trois nuages correspondant aux individus prélevés aux trois saisons se distinguent les uns des autres essentiellement le long de l'axe 1. Les individus prélevés en automne ont tendance à posséder davantage de (Cu-Zn-Fe) que les individus prélevés aux autres saisons (notamment en hiver) et les échantillons prélevés en hiver semblent avoir des teneurs en Mn inférieures à celles des autres échantillons (position du nuage par rapport à l'axe 3) (projection dans le plan 1-3 non présentée).

La comparaison des teneurs métalliques moyennes des trois groupes d'individus confirme ces tendances (figure 3 annexe).

Seul le paramètre saison doit intervenir sur les teneurs métalliques car les facteurs "sexe" et "âge" n'influencent pas les teneurs métalliques.

Pour la morue (figure 36), les variables (Mn-Fe-Pb-Cd) déterminent l'axe 1 (Ctb = 40%) ; le Cu détermine l'axe 2 (Ctb = 24%) et le Zn l'axe 3. Le Pb et le Cd sont corrélés de façon significative ($r = 0,725$).

Le nuage représentant les individus prélevés au printemps 89 est homogène et positionné vers les valeurs négatives de l'axe 1 donc marqué par des teneurs faibles en ces métaux.

Les individus prélevés en automne sont positionnés vers les valeurs négatives de l'axe 1 mais plusieurs points situés près de la variable Cu, (Mn-Fe) ou Zn entraînent une dispersion du nuage. Dans ce cas, la comparaison des teneurs moyennes des échantillonnages n'apporte aucune information exploitable.

Les teneurs des branchies de morue en (Fe-Mn-Pb-Cd) semblent être plus importantes en hiver mais la figure 3 (annexe) permet de préciser que ce sont essentiellement les teneurs en (Mn-Fe) qui augmentent durant cette saison.

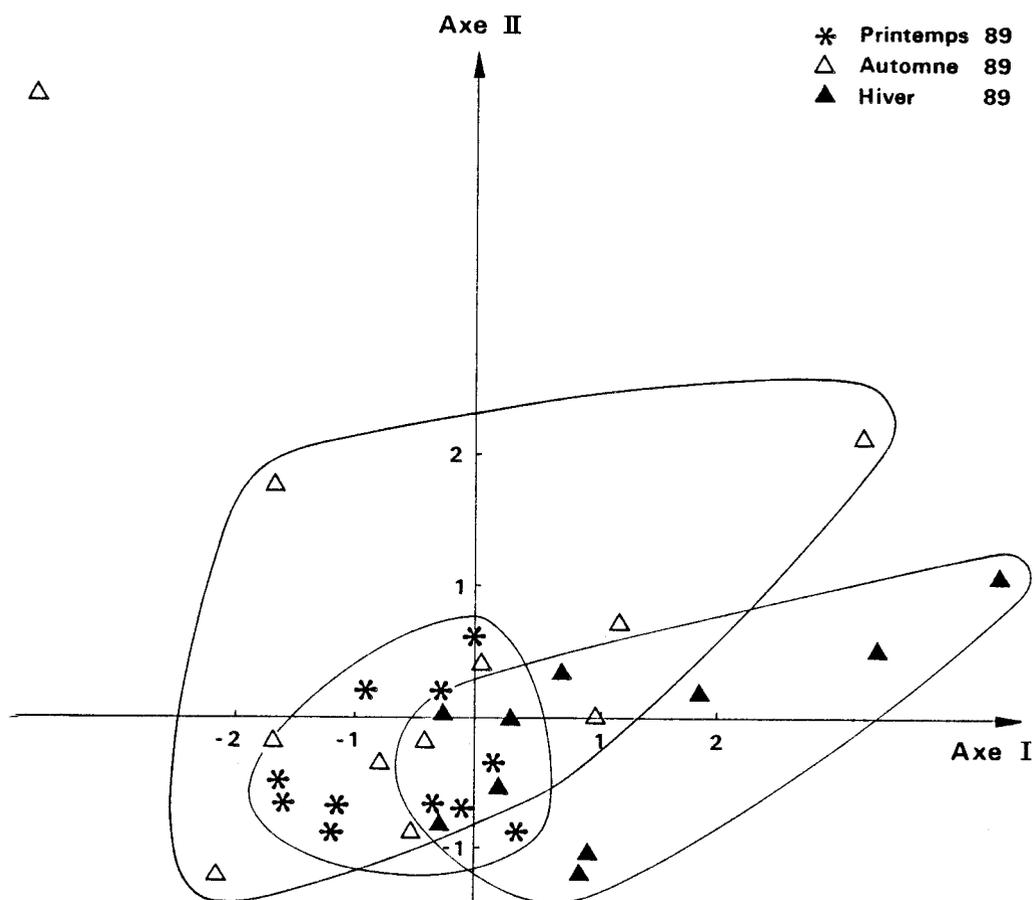
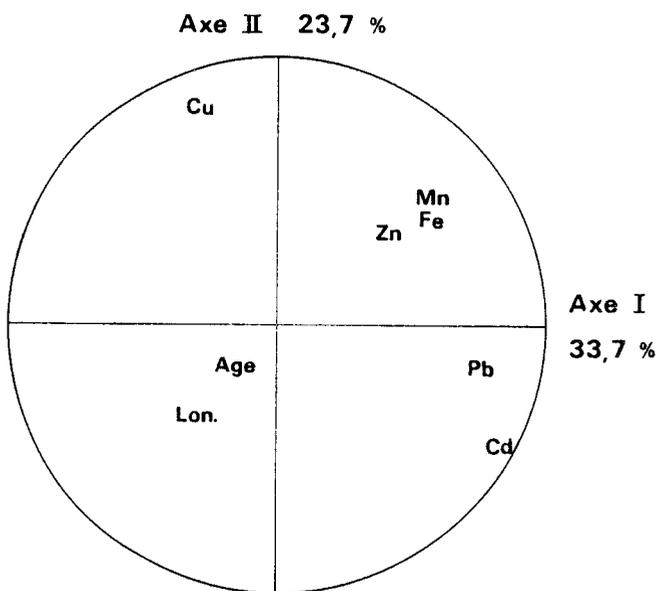


Figure 36 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des branchies de morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

Les teneurs métalliques des morues pêchées en hiver sont supérieures à celles des poissons prélevés au printemps ; pourtant les deux groupes sont constitués d'individus dont la moyenne d'âge est identique (2,54 ans) ; si on exclut, dans l'échantillonnage de l'automne, les individus s'écartant du centre du nuage, les teneurs métalliques moyennes sont peu élevées. L'âge moyen de ce groupe est inférieur à ceux des deux autres groupes (2,27 ans) ; or, les teneurs métalliques des branchies ont tendance à être supérieures chez les individus les plus jeunes. Les différents niveaux de contamination des échantillonnages présentés ici ne sont donc pas liés au facteur âge, mais doivent plutôt être représentatifs de variations de qualité du milieu au cours du temps.

En résumé, c'est en hiver que toutes les espèces ont les teneurs les plus faibles en (Cu-Zn). Les teneurs en Fe sont faibles également pendant cette période chez la limande et la limande-sole alors que chez la morue, ils sont abondants.

C'est au printemps 1989 que le Pb est le plus abondant chez la limande et la limande-sole. Chez la morue, les métaux sont présents en faibles quantités.

En automne, les teneurs en (Cu-Zn-Fe-Mn) sont les plus importantes et le Pb est présent en plus faible quantité chez la limande-sole. Chez la limande, les teneurs en Pb sont également faibles durant cette saison. Chez la morue, les individus étant dispersés sur le diagramme, les teneurs métalliques sont très variées.

- Foie

Chez la limande (figure 37), les variables (Zn-Mn-Fe) déterminent l'axe 1 (Ctb = 57,7%), et le Cu définit l'axe 2 (Ctb = 24,6%). Le coefficient de corrélation le plus élevé est celui reliant les variables Zn et Mn ($r = 0.66$). Les individus prélevés aux printemps 1989 et 1990, constituent des nuages éclatés le long de l'axe 1 ; les teneurs en (Zn-Mn-Fe) sont donc variées chez les individus de ces deux groupes. Les limandes prélevées en hiver forment un nuage plus compact, présentant des caractéristiques comparables aux deux précédents mais moins marquées. Lorsqu'elles sont prélevées en automne, les limandes possèdent les teneurs hépatiques en (Zn-Mn-Fe) les plus faibles mais le nuage est attiré le long de l'axe 2 vers la variable Cu.

Les résultats apparaissant sur la figure 4 (annexe) confirment ces observations : les teneurs moyennes en Fe, Zn et Mn sont plus élevées pour les échantillons prélevés au printemps qu'en hiver, elles-mêmes

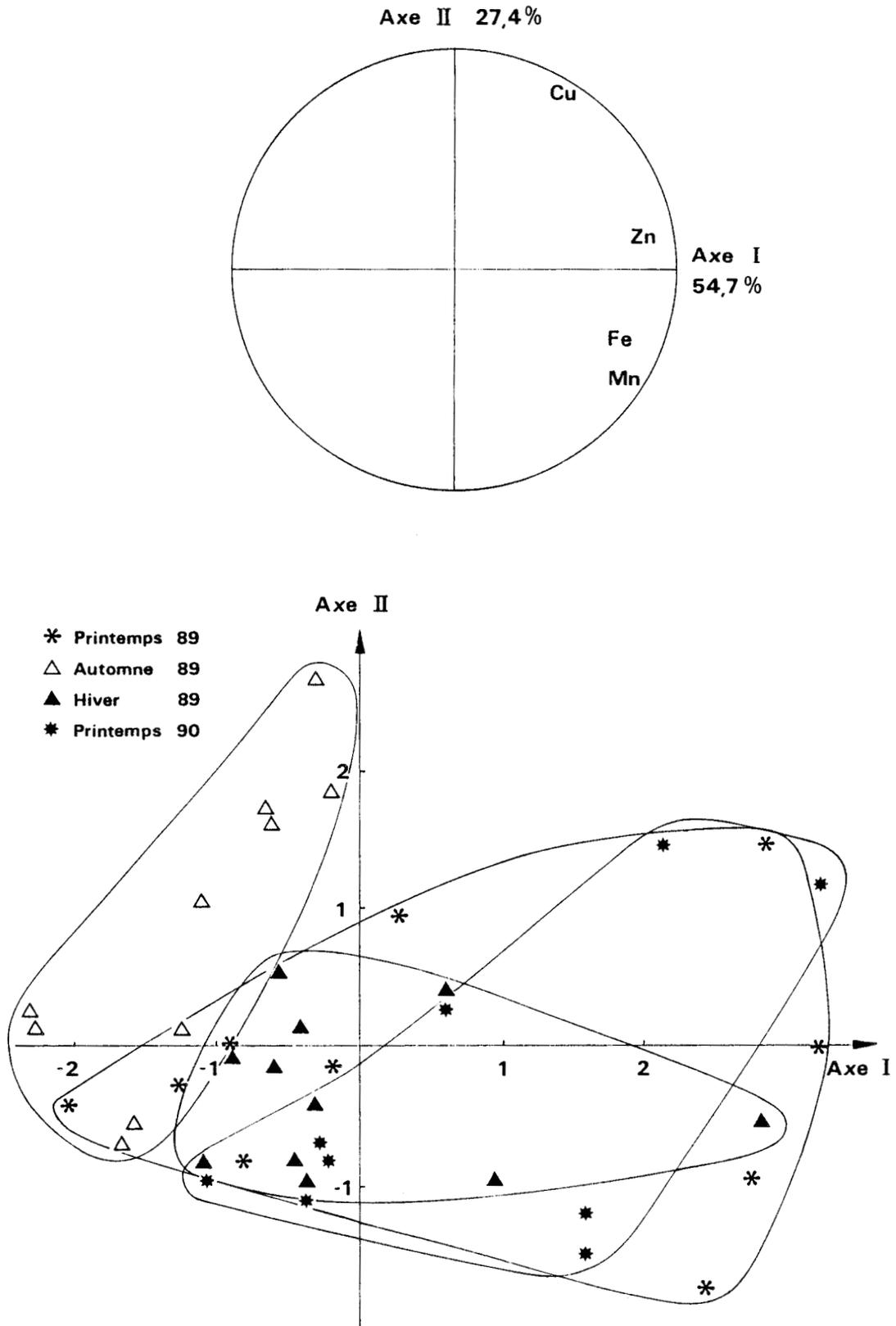


Figure 37 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limandes prélevées à différentes saisons.

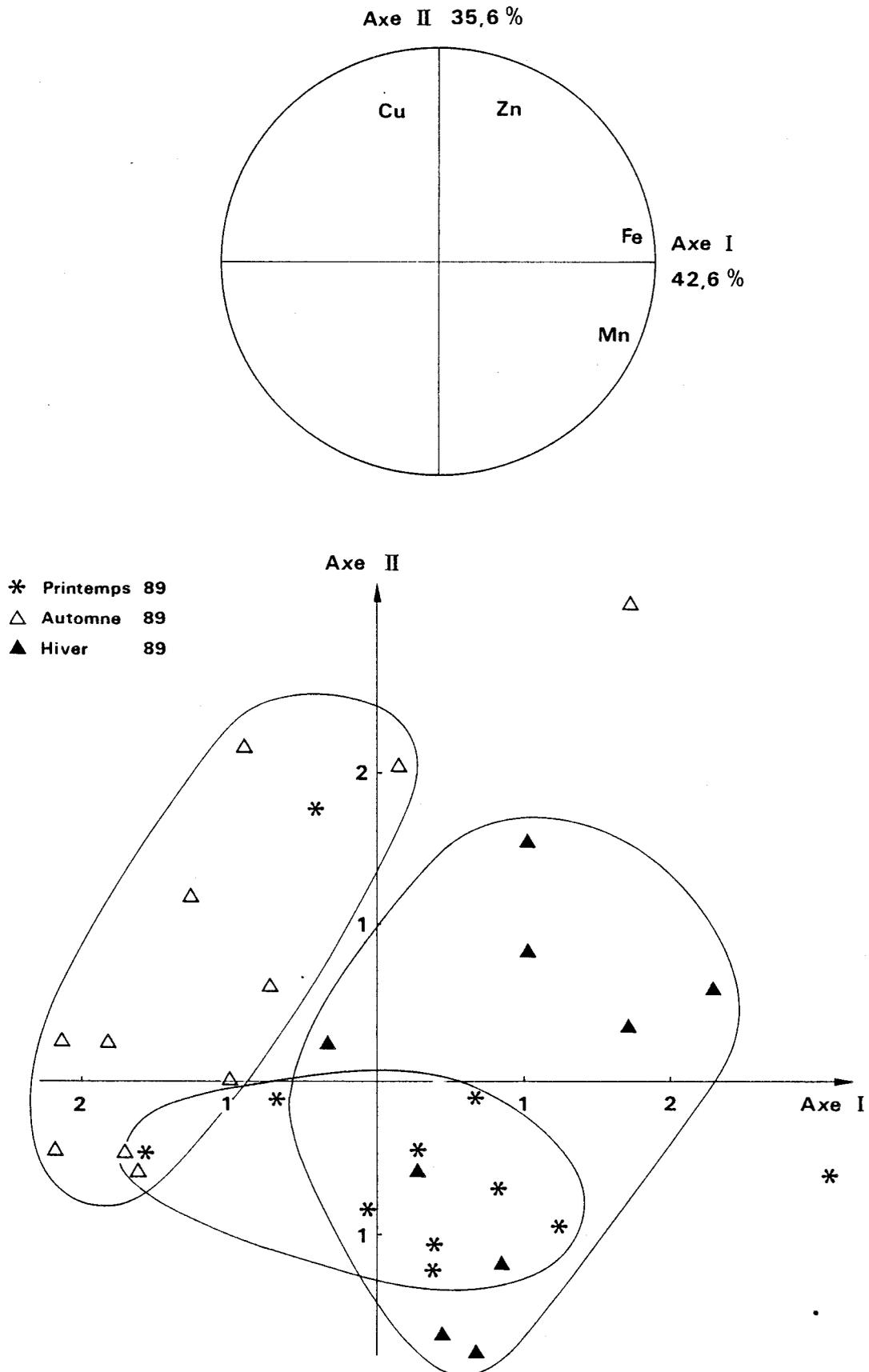


Figure 38 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de limande-soles prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

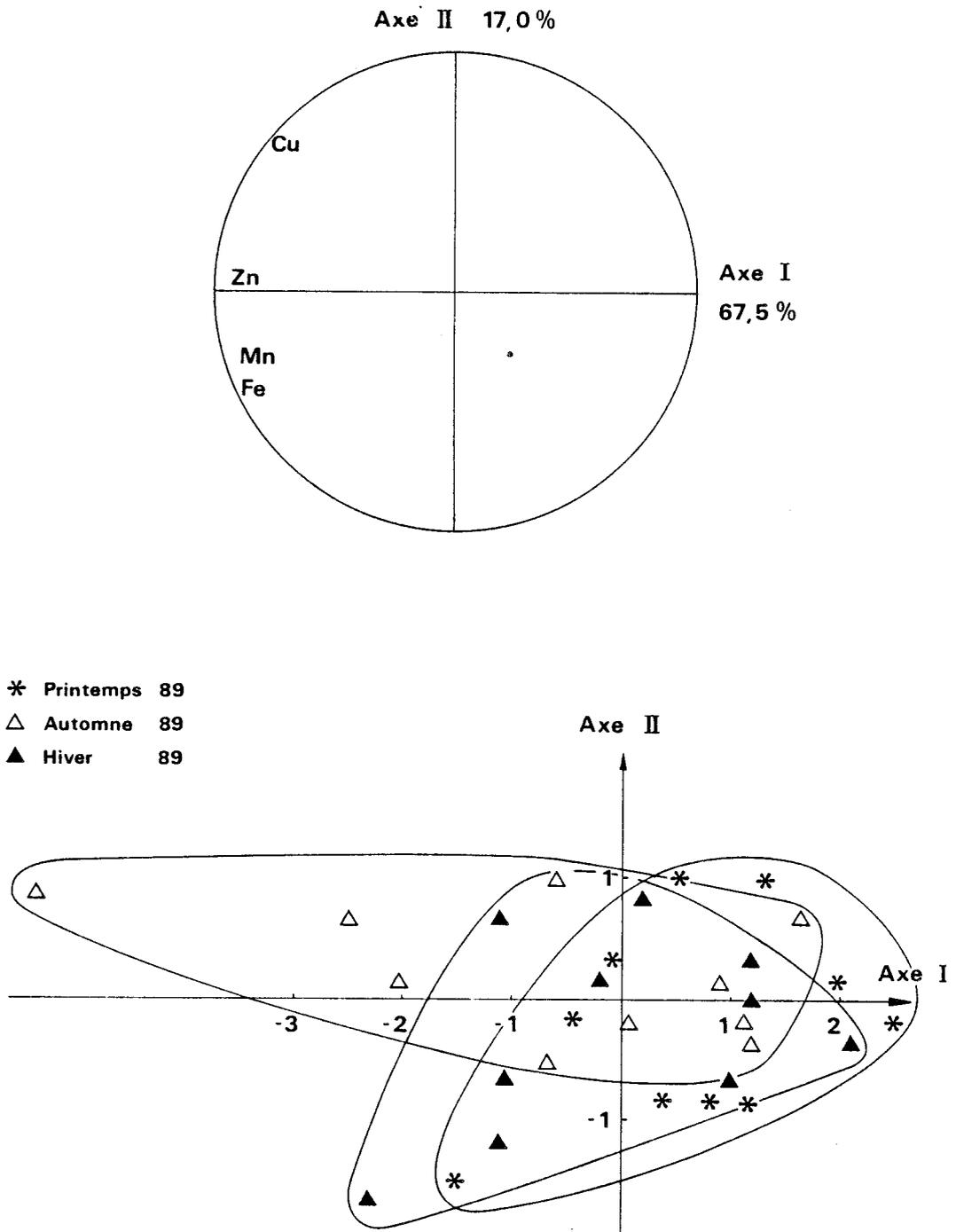


Figure 39 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des foies de morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

supérieures à celles des individus pêchés en automne. Par contre, les teneurs en Cu les plus importantes correspondent à l'échantillonnage d'automne.

Les limandes prélevées en 1989 sont toutes des femelles (excepté 2 individus sur 38); le facteur sexe n'intervient donc pas dans cette analyse.

Les individus prélevés en automne sont plus jeunes que ceux pêchés au printemps ou en hiver (âge moyen = 2,33 ans contre 3,16 et 3,91 ans respectivement) ; on a déterminé que l'âge favorise l'augmentation des teneurs en Fe. Les teneurs importantes en Cu des échantillons prélevés en automne sont donc probablement liées au facteur saisonnier.

Sur l'ACP correspondant aux limande-soles (figure 38), on note que les variables Fe et Mn déterminent l'axe 1 (Ctb = 42,6%) ; ces deux variables présentent le coefficient de corrélation le plus élevé ($r = 0,61$). L'axe 2 est déterminé par le Cu et le Zn (Ctb = 35,6%).

Les limande-soles prélevées en hiver doivent posséder les teneurs les plus élevées en (Fe-Mn) et des teneurs variables en (Cu-Zn) car le nuage de points est situé de part et d'autre de l'axe 1.

Celles prélevées en automne se distinguent par des teneurs faibles en (Mn-Fe) et élevées en (Cu-Zn) tandis que pour l'échantillonnage de printemps, les teneurs en (Mn-Fe) semblent être intermédiaires et les teneurs en (Cu-Zn) les plus faibles.

La figure 4 (annexe) confirme ces tendances générales.

Ni le sexe, ni l'âge ne doivent modifier ces teneurs métalliques. En effet, les individus les plus jeunes possèdent les teneurs en (Mn-Fe) les plus faibles (échantillonnage de l'automne ; âge moyen = 2 ans) ; or l'étude concernant l'influence de l'âge sur les teneurs métalliques a montré que les individus les plus jeunes possèdent les teneurs métalliques les plus élevées. Le facteur saisonnier doit donc avoir une influence prédominante sur les teneurs en métal des échantillons.

Chez les morues prélevées au large (figure 39), les quatre métaux : Fe, Cu, Zn et Mn déterminent l'axe 1 (Ctb = 67,5%) ; les variables (Zn-Mn), (Zn-Fe), (Zn-Mn) et (Cu-Mn) sont bien corrélées ($r = 0,686$; $0,670$; $0,621$ et $0,580$ respectivement).

Les individus prélevés au printemps présentent les teneurs les moins importantes en ces métaux. En hiver, les teneurs en (Mn-Fe) des échantillons tendent à être élevées alors qu'en automne ce sont plutôt les teneurs en (Zn-Cu). Les teneurs métalliques ne diffèrent pas de façon

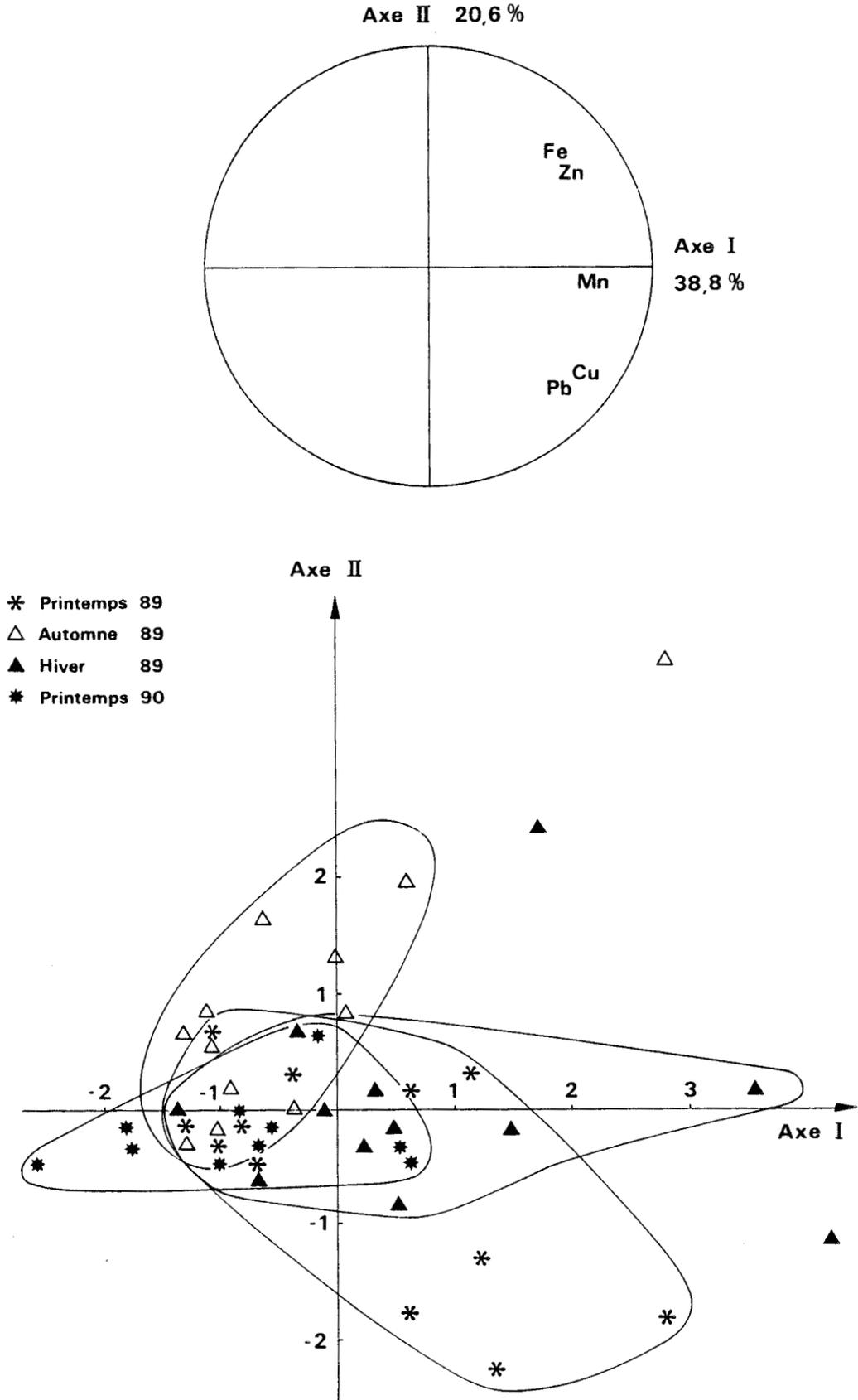


Figure 40 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limandes prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

significative entre ces divers groupes d'individus (excepté les teneurs en Mn entre les échantillonnages de printemps et d'hiver) (figure 4 annexe). Les teneurs en métal les plus importantes sont détectées chez les morues prélevées en automne au large et les teneurs les plus faibles (excepté pour le Cu) correspondent aux morues prélevées à la même saison à la côte.

L'âge des morues n'influence pas les teneurs métalliques hépatiques. Par contre, certains métaux (Mn, Fe, Zn) s'accumulent davantage chez les femelles que chez les mâles ; les proportions de mâles sont du même ordre de grandeur dans ces trois échantillonnages. Le facteur "saison" plutôt que les paramètres purement biologiques doit entraîner des variations au niveau des teneurs métalliques hépatiques.

- On constate donc que les teneurs métalliques des foies de poissons prélevés aux différentes saisons varient, le plus souvent indépendamment des facteurs "âge" et "sexe".

Quelle que soit l'espèce, les individus pêchés en automne se particularisent par des teneurs hépatiques élevées en Cu. Chez la morue prélevée au large et la limande-sole, ces teneurs sont accompagnées par des teneurs élevées en Zn.

-Muscle

Chez la limande (figure 40), les variables Cu et Mn sont les mieux corrélées ($r = 0,42$) et l'ensemble des métaux détermine l'axe 1. La majorité des individus est située au centre du diagramme, c'est-à-dire qu'aucune tendance particulière n'est détectable pour ces échantillons. Cependant l'existence de quelques individus entraîne une dispersion des nuages. De ce fait, on note que les individus prélevés en automne ont tendance à contenir peu de (Pb-Cu) et plus de (Zn-Fe) contrairement à ceux prélevés au printemps. Lorsqu'elles sont pêchées en hiver, les teneurs des muscles de limandes en ces métaux sont intermédiaires mais des teneurs élevées en Mn sont détectées dans certains échantillons. Prélevés au printemps 1990, les individus constituent un nuage homogène présentant les teneurs moyennes les plus faibles.

Ces tendances sont confirmées par l'observation de la figure 5 annexe.

Il a été montré que les teneurs métalliques tendent à être plus importantes chez les individus les plus jeunes. Les teneurs en Fe et Zn plus importantes chez les individus pêchés en automne doivent être liées au facteur "âge". En effet, ce prélèvement constitue le groupe d'âge le

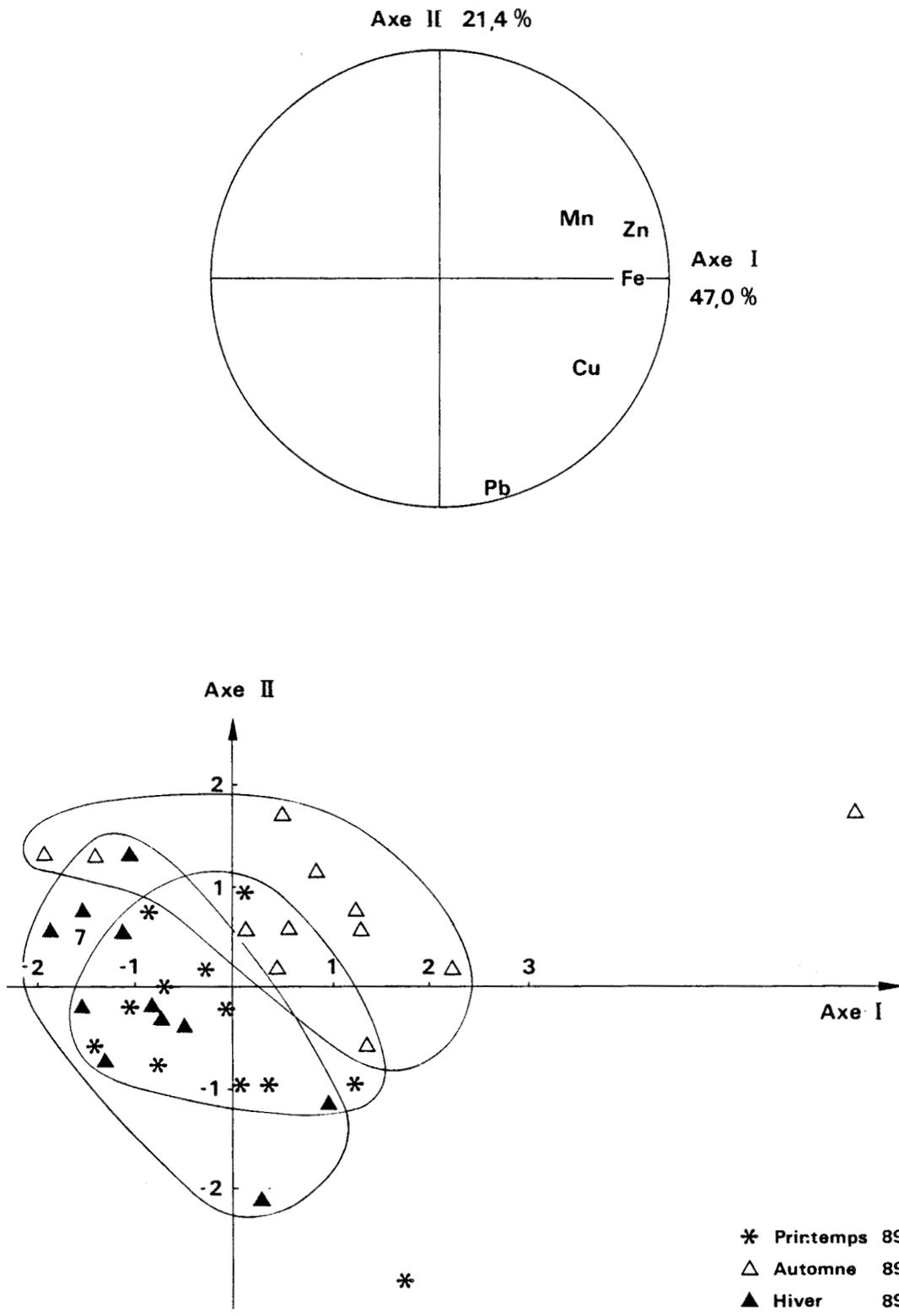


Figure 41 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de limande-soles prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

plus jeune (2,33 ans contre 3,16 et 3,91 ans respectivement au printemps et en hiver).

Chez la limande-sole (figure 41), le Zn est corrélé au Fe ($r = 0,73$). Les variables (Zn-Cu) ($r = 0,426$) et (Zn-Mn) ($r = 0,413$) sont également reliées par des coefficients de corrélation significatifs. L'ensemble de ces variables détermine l'axe 1 (Ctb = 47%). Le Pb évolue indépendamment des autres teneurs métalliques puisqu'il détermine l'axe 2 (Ctb = 21,4%).

Les muscles des limande-soles prélevées en automne sont chargés en (Mn-Zn-Fe-Cu) et peu en Pb. En hiver, le phénomène inverse est observé. Les teneurs en (Mn-Zn-Fe-Cu) des individus prélevés au printemps, sont intermédiaires et les teneurs en Pb sont relativement élevées.

Les teneurs métalliques moyennes des individus montrent les mêmes tendances (figure 5 annexe).

Les teneurs supérieures en (Mn-Zn-Fe-Cu) des échantillons prélevés en automne peuvent être liées au fait que les individus considérés sont les plus jeunes (âge moyen = 2 ans contre 2,92 et 2,75 ans respectivement en hiver et au printemps). En effet, comme chez la limande, les teneurs métalliques tendent à être plus élevées chez les individus les plus jeunes.

De la même manière que pour la limande-sole, on note sur l'ACP concernant la morue (figure 42), que les variables (Fe-Cu-Mn-Zn) déterminent l'axe 1 (Ctb = 54,5%) et le Pb détermine l'axe 2 (Ctb = 21,3%).

Le Zn est corrélé au Mn ($r = 0,654$), au Cu ($r = 0,62$). Le Fe est corrélé au Mn ($r = 0,63$) et au Cu ($r = 0,53$).

Les trois nuages de points correspondant aux individus prélevés aux trois saisons sont superposés. Celui correspondant au printemps est très dispersé ; les teneurs métalliques sont variées mais semblent être globalement plus importantes que celles des échantillons prélevés aux autres saisons, notamment en hiver. Les échantillons prélevés en automne doivent posséder des teneurs métalliques intermédiaires en ce qui concernent les métaux déterminant l'axe 1, mais des teneurs en Pb qui doivent être les plus faibles.

La figure 5 (annexe) confirme ces tendances et permet de préciser que les teneurs varient très peu au cours des saisons. Le facteur "âge" interfère ici encore avec le facteur "époque de prélèvements". En effet, les teneurs les plus importantes détectées au printemps correspondent à

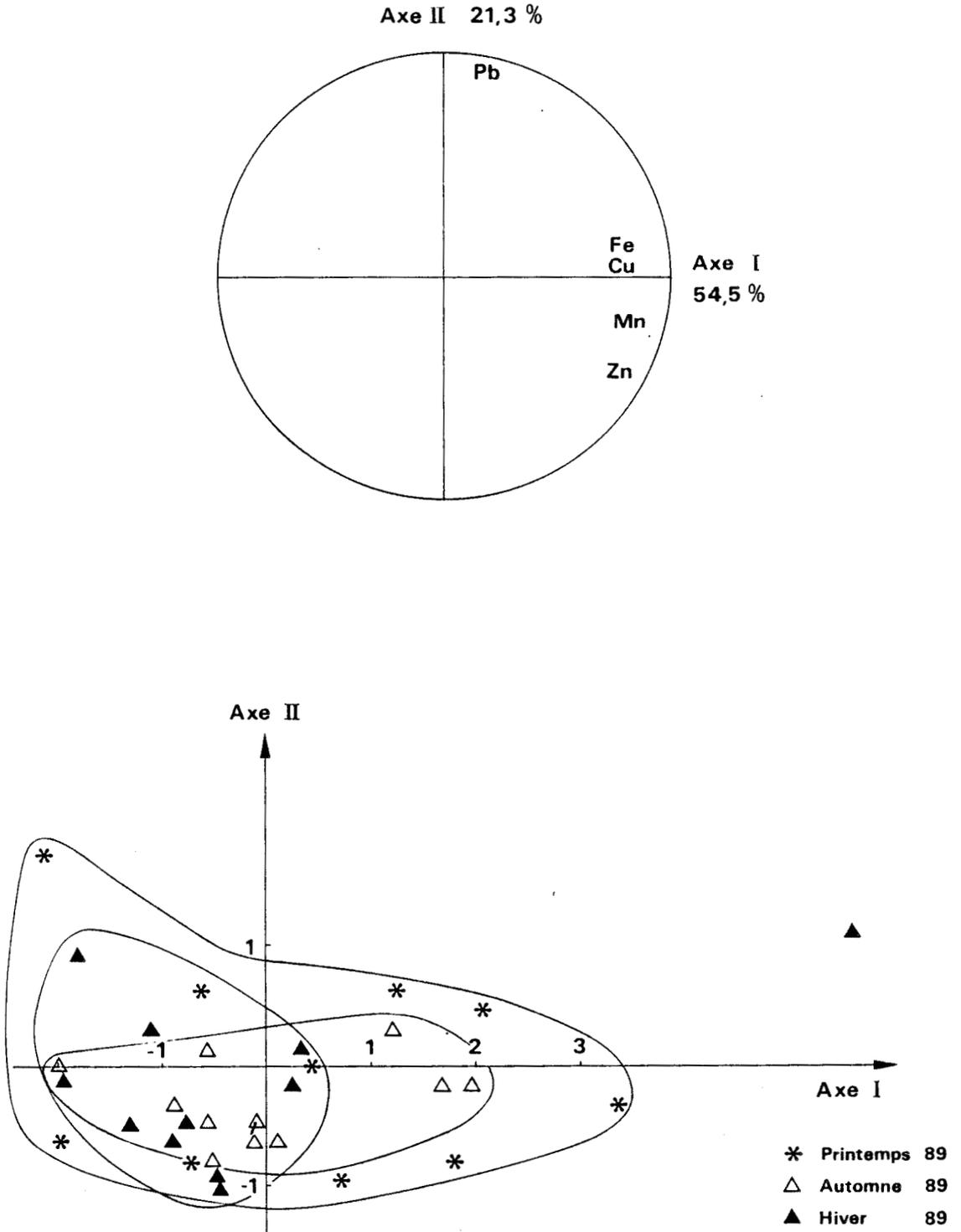


Figure 42 : ACP réalisée sur les teneurs métalliques des muscles de morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

l'échantillonnage constitué des individus les plus jeunes (âge moyen = 2,27 ans au printemps contre 2,54 ans en automne et en hiver).

2.1.7. Bilan concernant les teneurs métalliques des branchies

Cette étude a permis de montrer que:

- chez les trois espèces, le sexe de l'individu n'a pas d'influence sur les teneurs métalliques des branchies ;

- l'âge n'intervient pas de façon notable et distincte sur les teneurs métalliques des branchies de limandes et limande-soles. Les teneurs en Fe, Cu et Zn ont tendance à être plus élevées chez les morues les plus jeunes ;

- quelle que soit l'espèce, les teneurs métalliques des branchies décroissent de la façon suivante : $Fe > Zn > Mn > Pb > Cu$;

- les limandes présentent des teneurs élevées en (Zn-Fe), faibles en Mn, moyennes à faibles en (Pb-Cu) ; par opposition, la limande-sole possède des teneurs importantes en Mn et Pb, moyennes à faibles en (Zn-Fe-Cu). La morue (prélevée au large) présente les teneurs les plus élevées en Cu et les plus faibles en Fe et Zn.

Prélevées sur deux sites différents (côte et large de Calais), les morues provenant du large possèdent davantage de Cu et de Mn que les échantillons pêchés à la côte qui se distinguent, quant à eux, par des teneurs élevées en Fe.

Les branchies de poissons prélevés à la côte présentent donc des teneurs élevées en Fe tandis que chez les poissons du large, les branchies se caractérisent par des teneurs élevées en Mn et Pb.

Le Pb et le Mn pourraient être représentatifs d'un environnement "large" tandis que le Zn et le Fe seraient caractéristiques de l'environnement "côte".

- Les teneurs métalliques des branchies de limandes prélevées à Calais et à Boulogne ne diffèrent pas de façon significative entre les deux échantillonnages. Par contre, les limande-soles prélevées à Calais possèdent des teneurs en Zn, Fe significativement supérieures à celles pêchées à Boulogne. L'âge et le sexe n'intervenant pas sur ces teneurs métalliques, le site de prélèvements doit être le paramètre qui induit ces différences.

- Les variations des teneurs métalliques au cours des saisons sont relativement comparables chez les deux espèces de poissons plats. La

composition de leur milieu environnant doit fluctuer de la même manière. Par contre, la morue se distingue par des variations de teneurs métalliques branchiales différentes de celles des deux espèces benthiques.

Les coefficients de corrélation les plus élevés relient les variables (Cu-Zn) et (Zn-Mn) chez la limande et (Cu-Zn), (Zn-Fe) chez la limande-sole. Chez la morue, ce sont les variables Pb et Cd qui sont corrélées de façon significative.

2.1.8. Bilan concernant les teneurs métalliques hépatiques

Cette étude a permis de montrer :

- que les teneurs métalliques ont tendance à être plus élevées chez les femelles mais que ces différences sont rarement significatives ;

- en fonction de l'âge, seules les teneurs en Fe varient de façon significative chez la limande et la limande-sole. Chez la première espèce, elles augmentent avec l'âge et inversement chez la seconde ;

- pour chaque espèce, les teneurs en Fe et Zn sont les plus importantes, puis ce sont les teneurs en Cu et enfin le Mn ;

- les teneurs en métal des limande-soles sont nettement plus importantes que celles des limandes, elle-mêmes plus importantes que celles des morues.

- Les teneurs métalliques des foies de limandes et limande-soles prélevées à Calais sont supérieures à celles des mêmes poissons prélevés à Boulogne ; de même, chez la morue, ces teneurs sont supérieures lorsque les échantillons ont été pêchés au large plutôt qu'à la côte.

- Les limande-soles et les morues prélevées toutes deux au large, présentent :

- . en hiver, les teneurs en (Fe-Mn) les plus élevées ;

- . au printemps, les teneurs en (Cu-Zn) les plus faibles ;

- . en automne, les teneurs en (Cu-Zn) les plus importantes.

Quant aux limandes, les teneurs en (Fe-Mn-Zn) les plus importantes sont détectées chez les individus prélevés au printemps ; en hiver, ces teneurs métalliques sont intermédiaires et en automne, elles sont les plus faibles alors que les teneurs en Cu sont les plus élevées.

Ces variations non explicitées ou peu par les facteurs "âge" et "sexe", relèvent donc de l'influence de la saison.

2.1.9. Bilan concernant les teneurs métalliques des muscles

Cette étude a permis de montrer que :

- chez aucune espèce, le sexe n'influence les teneurs métalliques des muscles ;

- l'âge intervient rarement de façon significative sur les teneurs métalliques des muscles de poissons. Toutefois, des teneurs métalliques globalement plus importantes sont détectées chez les individus les plus jeunes ;

- les teneurs métalliques dans les muscles de poissons décroissent de la façon suivante : Zn>Fe>Mn>Pb>Cu>Cd ; mais il faut noter que les teneurs moyennes en Mn et Pb des muscles de limandes sont du même ordre de grandeur ;

- chez la limande, les teneurs métalliques ont tendance à être élevées en Cu et Fe, surtout en Pb et Zn et à être faibles en Mn. Les limande-soles présentent les caractéristiques opposées. Les morues pêchées au large possèdent des teneurs en (Cu-Zn-Fe-Pb) intermédiaires et des teneurs marquées en Mn. En ce qui concerne les morues prélevées à la côte, les teneurs en Cu et Mn sont davantage comparables à celles des limandes qu'à celles des morues prélevées au large ;

Des teneurs élevées en Mn dans les muscles des poissons pourraient donc être considérées comme typiques des espèces provenant du large ; mais il faut rappeler que les limandes pêchées en hiver possèdent également des teneurs importantes en Mn.

- Les teneurs métalliques des muscles de morues prélevées au large tendent à être plus élevées que celles de la côte.

Les teneurs en Fe sont supérieures chez les limandes provenant de Boulogne ; par contre, les individus de Calais se distinguent, quant à eux, par des teneurs élevées en Cu.

Les limande-soles présentent des teneurs métalliques globalement plus importantes lorsqu'elles proviennent de Boulogne plutôt que de Calais.

Apparemment, ces différences ne sont pas liées aux facteurs "âge" ou "sexe" ; elles dépendraient donc des facteurs "sites de prélèvements".

- prélevées à différentes saisons, les limandes et limande-soles présentent des teneurs métalliques plus importantes en automne, mais ces tendances sont non seulement liées au facteur "saison" mais également au

facteur "âge". Chez la morue, les teneurs métalliques varient peu entre les différents échantillonnages mais les quelques variations détectées seraient également influencées par le facteur "âge".

2.2. Discussion

Comparaison des teneurs métalliques des différents organes de poissons

L'étude réalisée a montré que dans les différents organes des trois espèces de poissons ainsi que dans les sédiments, les teneurs métalliques décroissent de la façon suivante :

- branchies : Fe>Zn>Mn>Pb>Cu>Cd ;
- foie : Fe>Zn>Cu>Mn>Pb et Cd ;
- muscle : Zn>Fe>Mn>Pb>Cu>Cd ;
- sédiments : Fe>Mn>Zn>Pb>Cu>Cd.

On constate que c'est le cortège métallique des branchies qui reflète le mieux l'importance respective des différents métaux présents dans l'environnement, probablement parce que cet organe est directement en contact avec le milieu extérieur. Cependant, contrairement à ce qui est observé dans les sédiments, le Zn est plus abondant que le Mn dans les branchies des trois espèces étudiées ainsi que chez le flet (*Platichthys flesus*) (DELVAL, 1984). Le Mn étant moins fortement lié aux particules du sédiments que le Zn, ce résultat n'est pas explicité par la disponibilité relative de ces métaux. En dehors de toute contamination, les branchies de poissons contiendraient donc davantage de Zn que de Mn. Ceci peut être lié à l'existence d'enzymes riches en Zn, impliquées dans le mécanisme respiratoire (peroxyde dismutase, anhydrase carbonique).

La répartition des métaux dans les organes observée dans nos échantillons, est comparable aux données de la littérature concernant des poissons prélevés dans la région Nord-Pas-de-Calais. Dans les branchies et les foies de flet, les métaux sont respectivement classés de la façon suivante : Zn>Mn>Cu> et Zn>Cu>Mn (DELVAL, 1984) et chez la morue, dans les branchies : Fe>Zn>Pb>Cu>Cd, dans le foie : Fe>Zn>Cu>Pb>Cd et dans le muscle : Fe>Zn>Pb>Cu>Cd (COLAS, 1980).

La classification des métaux selon leur abondance est comparable dans les muscles et les branchies mais différente dans le foie. En effet, le Cu hépatique est plus abondant que le Mn et le Pb. Chez les trois espèces les teneurs en Cu (ainsi que les teneurs en Zn et Fe chez la limande-sole) sont toujours nettement plus élevées dans le foie que dans les branchies. Il a été constaté chez d'autres espèces (la sole (*Solea*

solea), flet (*Platichthys flesus*), truite (*Salmo gairdneri*)), que le foie est l'organe préférentiel d'accumulation du Cu (METAYER et al., 1982 ; DELVAL, 1984 ; JULSHAMN et al., 1988).

Mis à part pour les éléments précédemment cités, les concentrations métalliques des branchies sont plus importantes que celles des foies, elles-mêmes supérieures à celles des muscles. Chez d'autres espèces (*Carassius auratus*, *Oncorhynchus mykiss*, *Sardina pilchardus*), des teneurs en Cu et Zn, plus importantes dans le foie que les muscles, sont également observées (CARPENE et al., 1991). Par contre chez les trois espèces, le Pb est plus abondant dans le muscle que dans le foie. Le Pb est un métal non-essentiel qui ne fait pas l'objet de régulation. Sa concentration augmente dans les tissus en fonction des teneurs du milieu mais le site de stockage essentiel est constitué par le squelette.

Dans tous les tissus, les rapports Zn/Cu sont supérieurs à 1, ce qui est en accord avec de nombreuses données bibliographiques. A notre connaissance, seule la truite (*Salmo gairdneri*) possède au niveau hépatique davantage de Cu que de Zn (CARPENE et al., 1991 ; OLSSON et al., 1989 ; HOGSTRAND, communication personnelle).

Dans les muscles des trois espèces étudiées, le Pb est plus abondant que le Cu. Cette observation est corroborée par les résultats de COLAS (1980) concernant la morue prélevée dans la région Nord-Pas-de-Calais mais ne correspond pas aux données relatives à cette même espèce capturée sur d'autres sites (par exemple en Islande ; tableau 21) ou à d'autres espèces de poissons. En effet, prélevés en différents secteurs de l'Atlantique Nord, Manche et Mer du Nord, le flet ainsi que la plie (*Pleuronectes platessa*) et le hareng (*Clupea harengus*) présentent, au niveau du muscle, davantage de Cu que de Pb (tableau 22). Ces résultats reflètent probablement la contamination importante par le Pb de notre région (DELABRE, 1985 ; DESSAINT, 1987) ; ils peuvent être également liés au fait que le Pb est potentiellement plus biodisponible que les autres métaux puisque plus facilement extraits des sédiments (voir III.1).

Les teneurs métalliques des échantillons de muscles de morues que nous avons analysées sont inférieures à celles détectées par COLAS (1980) (tableau 21). Cette différence peut être due au fait que les méthodes analytiques utilisées sont différentes ou au fait que le milieu marin dans la région Nord-Pas-de-Calais est actuellement soumis à une pollution moindre qu'à la fin des années 70.

Les valeurs déterminées par cet auteur étaient plus faibles que les

Tableau 21 : Teneurs métalliques moyennes des muscles de morues
(exprimées en µg/g poids frais)

	Zn	Cu	Pb	Cd
1	6,6	0,42	0,35	0,03
2	11	0,6	0,67	0,08
3	5,66 ± 0,92	0,27 ± 0,05	0,38 ± 0,09	*

* : Teneurs non détectables

1 : Echantillons prélevés en Islande

(d'après HERMAN et VANDERSTAPPER, 1976 ; cité par COLAS, 1980).

2 : Echantillons prélevés dans la région Nord-Pas-de-Calais
(d'après COLAS, 1980).

3 : Echantillons prélevés dans la région Nord-Pas-de-Calais
(d'après nos résultats).

Tableau 22 : Teneurs métalliques minimales et maximales du muscle de différentes espèces de poissons prélevées en Atlantique Nord, Manche et Mer du Nord
(exprimées en µg/g poids sec)

		Zn		Cu		Hg		Cd		Pb	
		ATLAS	CIEM	ATLAS	CIEM	ATLAS	CIEM	ATLAS	CIEM	ATLAS	CIEM
Flet	mini	18,1	19,5	0,44	0,49	0,12	<0,05	0,002	0,005	0,03	0,04
	maxi	89,9	48,0	2,43	3,75	2,18	2,60	0,066	0,031	0,21	0,45
Hareng	mini	10,6	22,9	0,86	1,30	0,09	0,02	0,004	0,005	0,03	0,05
	maxi	34,8	112,0	3,36	18,0	0,56	0,30	0,025	0,030	0,05	1,10
Plie	mini	17,7	14,0	0,23	0,42	0,13	0,01	0,002	<0,017	0,03	0,03
	maxi	31,4	30,3	1,50	4,20	0,77	0,90	0,035	1,30	0,31	1,30

ATLAS : Etude menée par IFREMER en Atlantique Nord, Manche et Mer du Nord
(COSSA et al., 1990)

CIEM : Etude des niveaux de référence effectuée en Atlantique Nord par le CIEM
(CIEM, 1988, cité par COSSA et al., 1990)

Tableau 23 : Teneurs métalliques des organes de poissons plats capturés en Mer du Nord
(zone de Calais-Dunkerque) (exprimées en µg/g poids sec)

		Branchie	Foie	Muscle
Flet (1)	Manganèse	30,8 ± 8	6,3 ± 2,2	3,4 ± 1,8
	Plomb	10,1 ± 2	1,6 ± 0,3	2,5 ± 2,3
	Fer	293,4 ± 92,1	328 ± 157,6	18,3 ± 6,7
	Zinc	133,7 ± 31,1	151,9 ± 75	59,6 ± 19
	Cuivre	4,2 ± 0,9	32,7 ± 8,4	1,6 ± 0,5
	Cadmium	1,3 ± 0,9	2,3 ± 3,3	0,4 ± 0,2
Limande (2)	Manganèse	12,90 ± 8,90	3,96 ± 2,35	1,86 ± 0,50
	Plomb	11,5 ± 2	*	2,90 ± 1,10
	Fer	176 ± 51	122,3 ± 55,6	18,4 ± 8,9
	Zinc	107 ± 9	78,7 ± 40,8	39,2 ± 7,5
	Cuivre	4 ± 0,6	17,1 ± 12,1	1,34 ± 0,52
	Cadmium	*	*	*
Limande-sole (2)	Manganèse	24 ± 6,10	5,27 ± 1,55	2,58 ± 0,88
	Plomb	12,50 ± 1,80	*	1,99 ± 0,42
	Fer	119 ± 41	214,4 ± 75,4	16,0 ± 4,6
	Zinc	90,5 ± 17,6	151 ± 12,8	22,5 ± 2,3
	Cuivre	3,60 ± 0,50	24,4 ± 18,2	0,98 ± 0,14
	Cadmium	*	*	*

* : Teneurs non détectables

1 : D'après les données de RICHARD et al., à paraître

2 : D'après nos données ; échantillons prélevés au printemps 1989

données des "tables alimentaires" ; par conséquent, les nôtres le sont également. Actuellement, aucun seuil limite pour les teneurs métalliques des produits destinés à la consommation n'est imposé par la législation, excepté pour le Hg. Cependant, des niveaux de référence ont été établis par le CIEM (CIEM, 1988 cité par COSSA et al., 1990) (tableau 22). On remarque que les teneurs en Cu et Zn de nos échantillons sont comprises dans ces gammes de concentrations tandis que le Pb est nettement plus abondant dans nos échantillons (1,81 ; 2,3 et 1,92 µg/g de poids sec respectivement pour la limande-sole, la limande et la morue.

Les teneurs métalliques des organes de filets prélevés en 1989 ainsi que les teneurs détectées chez les deux pleuronectidés apparaissent dans le tableau 23 : ces teneurs sont du même ordre de grandeur pour les trois espèces. Toutefois, les métaux ont tendance à être présents en plus grande quantité chez le filet, notamment au niveau hépatique. Cette espèce a pourtant été capturée dans la même zone que la limande (site "côte" de Calais). Il faut préciser que le filet présente un caractère de sédentarité beaucoup plus marqué que la limande qui est une espèce venant à la côte lors des périodes de reproduction.

Comparaison des teneurs métalliques chez les différentes espèces

D'une manière générale, les teneurs métalliques des foies sont plus importantes chez les deux espèces de poissons plats que chez la morue. Ceci peut être lié au fait que les espèces vivant sur le fond, souvent en contact avec le sédiment sont soumises à une source de contamination plus importante qu'une espèce vivant dans la colonne d'eau. Les résultats obtenus avec l'anguille et le gardon ont conduit à cette même constatation (BARAK et MASON, 1990). Cependant, les teneurs métalliques des muscles et branchies ne confortent pas toujours cette hypothèse. En effet, pour certains éléments métalliques, la morue présente au niveau muscle et branchies des concentrations métalliques plus élevées que les pleuronectidés.

La contamination des poissons par une nourriture riche en métal se traduit essentiellement par un niveau de contamination plus élevé dans les organes internes que dans les muscles ou les branchies (DALLINGER et al., 1987). Par exemple, chez la carpe (*Cyprinus carpio*), le Co60 assimilé par la nourriture est davantage concentré dans le tractus digestif que dans les branchies et inversement lors de l'intoxication par l'eau (AMIARD et AMIARD-TRIQUET, 1979). Chez la truite, les teneurs en Cu

hépatique sont reliées à la concentration en Cu de la nourriture et à ce titre pourraient, d'après les auteurs, être utilisées comme indicateur de la contamination au Cu (JULSHAMN et al., 1988).

D'après ces données, les teneurs métalliques hépatiques élevées chez les pleuronectidés sont donc bien attribuables au mode de vie des poissons plats mais résultent essentiellement de la composition de leur nourriture. En effet, la morue se nourrit essentiellement de crevettes, de crabes, de vers et de petits poissons (COLAS, 1980) tandis que les poissons de fond vont se nourrir d'espèces benthiques. Ces espèces benthiques ont un niveau de contamination qui est lié à leur régime alimentaire (dépositif, suspensif ou carnivore) (DELVAL et al., 1984). Lors de l'alimentation, ces organismes inévitablement associés à du sédiment sont assimilés par les poissons plats d'où la présence de teneurs métalliques hépatiques élevées. Le sédiment ingéré n'est pas digéré par l'organisme (LUOMA, 1983). Cependant, le métal doit être en partie dissocié des particules de sédiment lors du passage dans le tractus digestif, milieu relativement acide. Les métaux libérés contribuent alors à la charge métallique des organismes. Les pleuronectidés sont donc susceptibles d'assimiler une charge métallique plus importante que le gadidé.

Les rapports entre teneurs métalliques dans les foies et teneurs dans les branchies et les muscles diffèrent selon les espèces. Les concentrations hépatiques les plus élevées ne sont donc pas systématiquement associées aux teneurs les plus élevées dans les autres organes ce qui doit être lié au problème du métabolisme qui peut différer d'une espèce à l'autre.

Les teneurs en Zn hépatiques ne sont supérieures à celles des branchies que chez la limande-sole. Ceci montre que lorsque les conditions environnementales (côte, large) et/ou l'espèce diffèrent, la répartition des métaux dans les organes varie. Chez la sole et le flet prélevés sur un même site ainsi que chez la truite (*Salmo trutta fario*) et le mullet (*Chelon labrosus*), les teneurs en Zn des branchies sont beaucoup plus importantes chez la première espèce mais les teneurs hépatiques sont comparables ou supérieures chez la deuxième espèce (METAYER et al., 1984 ; LEGORBURU, 1988). Chez les flets capturés en 1984 (DELVAL, 1984) et en 1989 (par nos soins, en même temps que les chalutages de limande), le Cu et le Zn sont plus abondants dans le foie

que dans les branchies (tableau 23). La répartition des métaux dans le foie de flet est donc davantage comparable à celle de la limande-sole qu'à celle de la limande.

Le facteur "espèce" est donc le paramètre majeur qui induit des modifications dans les processus d'accumulation métallique.

Parmi les différents organes étudiés, nous avons remarqué que les branchies sont les plus susceptibles d'être représentatifs du cortège métallique présent dans le milieu environnant. La comparaison des teneurs métalliques branchiales chez différentes espèces est délicate étant donné le biais pouvant être introduit par le facteur "espèce". Toutefois, d'après les données concernant les deux espèces de poissons plats et la morue prélevée sur les deux sites de Calais, il apparaît que les sites du large et de la côte sont caractérisés respectivement par une contamination par le Mn (et secondairement par le Pb) et par le Fe (et secondairement par le Zn). En ces stations, les sédiments (sédiment total et fraction fine) sont effectivement chargés en Zn à la côte et en Mn au large. Par contre, le Fe est plus abondant au large qu'à la côte ce qui est en accord avec la théorie qui considère que les teneurs en Mn et Fe dans l'environnement sont corrélées, mais ne permet pas d'expliquer les teneurs élevées de ce métal dans les branchies de poissons provenant de la côte.

Les métaux Zn et Pb sont abondants dans les muscles de limandes; les teneurs en Mn sont élevées dans les muscles de limande-soles ainsi que dans ceux des morues prélevées au large. Les teneurs élevées en Mn ou Zn au niveau des branchies sont donc associées à des teneurs importantes dans les muscles.

. Influence du facteur "âge" sur les teneurs métalliques

Chez les trois espèces, les métaux tendent à être plus abondants dans les muscles des poissons les plus jeunes, notamment le Zn. Cette observation est corroborée par les données de MILNER (1979) et de PENTREATH (1976) concernant la plie. Ce dernier auteur explique ce phénomène par le fait que la croissance de l'individu entraîne une dilution de ce métal dans les tissus.

Au niveau du foie, l'influence du facteur "âge" est difficile à mettre en évidence. Ce facteur agit sur les teneurs en Fe, pas toujours de façon significative et de manière opposée chez les deux espèces de

poissons plats. Les concentrations de Fe diminuent avec l'âge chez la limande-sole mais augmentent chez la limande comme chez la plie et le flet (PENTREATH, 1976; DELVAL, 1984). Nous n'avons pas détecté de variation significative des teneurs des autres métaux en fonction de l'âge du poisson. Pourtant, il a été montré que l'accumulation du Cu dans le foie de perche et du Cd dans *Noemacheilus barbatulus* est inversement proportionnelle au poids du poisson (COLLVIN, 1984 ; DOUBEN, 1989a, 1989b). Par contre, HOGSTRAND et al. (1991) trouvent une corrélation positive entre le poids de la perche et les teneurs en Cu.

Chez l'anguille, les teneurs en Pb du foie sont corrélées à la longueur de l'individu mais non celles du muscle (BARAK et MASON, 1990).

Selon BADSHA et GOLSPINK (1988), le Pb s'accumule dans le foie des gardons femelles avec l'âge des individus. Le facteur de concentration de ce métal est plus élevé dans le muscle que dans le poisson entier.

Nos données ainsi que celles de la littérature montrent donc que la corrélation entre l'âge et les teneurs métalliques varie en fonction de l'organe, du métal, de l'espèce et/ou des sites de prélèvements étudiés. Aucune règle générale ne permet donc d'appréhender l'influence de ce paramètre de façon précise.

Influence des facteurs "sexe" et "période des prélèvements" sur les teneurs métalliques des organes

Le facteur sexe n'influe pas de façon significative sur les concentrations métalliques des muscles et branchies des trois espèces étudiées, ni sur celles des branchies de flets et des muscles de mullet (*mullus barbatus*) (DELVAL, 1985 ; MIRAMAND et al., 1991).

Ce facteur favorise, par contre, l'augmentation des teneurs hépatiques en Fe, Zn et Mn chez les poissons femelles, notamment chez la morue. Ces résultats sont explicités par le fait que les métabolismes des mâles et des femelles diffèrent; ces faits ont déjà été observés chez d'autres espèces de poissons tels que le flet (DELVAL, 1984) et le flet américain (*Pseudopleuronectes americanus*) (FLETCHER, 1978).

Au niveau du foie, les teneurs en Cu augmentent chez les trois espèces en automne ainsi que celles du Zn chez la limande-sole et la morue. Parallèlement, on observe une diminution des teneurs en Fe et Mn chez les deux espèces de poissons plats. Ces variations de teneurs métalliques n'ont pas été observées dans les branchies (excepté l'augmentation des teneurs en Cu et Zn dans les branchies de limande-

soles); elles ne sont donc pas liées à des modifications de la composition métallique des milieux environnants mais seraient plutôt attribuables à des variations au niveau des processus métaboliques.

En effet, le cycle de reproduction influence les teneurs métalliques hépatiques.

Bien que les rapports gonadosomatiques n'aient pas été calculés lors de nos prélèvements, les individus prélevés en automne (Octobre-Novembre) étaient visiblement en début de période de maturation des gonades. Les données concernant la biologie de la limande signalent, qu'effectivement, la période de vitellogénèse s'étale entre Octobre et Mars et que la ponte a lieu de Mars à Avril en Mer du Nord (TASSEL, 1985).

Chez le mullet (*Mullus barbatus*), il existe une augmentation significative des concentrations de Cu et Zn dans les foies des femelles, durant le cycle de reproduction. Des transferts de métaux qui ont un rôle métabolique dans le développement embryogénique surviennent au niveau du foie; ces changements interviennent avant et pendant la période de reproduction, entre la mise en réserve dans le foie et le développement des gonades. Chez les mâles, les variations des teneurs métalliques pendant le cycle de reproduction existent également mais sont moins marquées (MIRAMAND et al., 1991). Chez le flet femelle, les teneurs hépatiques en Zn et Mn sont plus élevées en Novembre qu'en Avril, l'automne correspond chez cette espèce, prélevée en Mer du Nord, au début du développement des gonades (DELVAL, 1984). Chez l'anguille et le gardon, l'influence saisonnière est surtout détectée au niveau des teneurs métalliques hépatiques (BARAK et MASON, 1990). Chez la blennie (*Blennius pholis*), les teneurs en Cu des foies varient chez la femelle pendant le cycle de reproduction mais les teneurs maximales sont mesurées, non pas pendant la période de vitellogénèse mais pendant la période de ponte (SHACKLEY et al., 1981).

On constate donc, d'après la littérature, que les modifications des teneurs métalliques hépatiques varient selon les espèces et la nature du métal. Toutefois, l'ensemble de ces variations est relié au cycle saisonnier de reproduction. Dans notre étude, la limande est la seule espèce dont l'échantillonnage est constitué exclusivement de femelles. C'est également la seule espèce pour laquelle les teneurs en Cu sont significativement plus élevées en automne qu'en hiver et inversement pour le Zn, le Fe et le Mn. Le métabolisme de cette espèce serait à comparer à

celui du flet américain pour lequel on observe parallèlement une diminution des teneurs hépatiques en Zn et une augmentation dans les gonades (FLETCHER, 1978). La diminution des teneurs en Fe et Mn durant le cycle de reproduction, serait caractéristique des poissons plats car elle n'est pas observée chez la morue.

Nous avons montré que les variations des teneurs hépatiques ne sont pas liées à celles des branchies.

Chez les trois espèces, les variations des teneurs hépatiques ne sont généralement pas associées à des modifications de concentrations des mêmes éléments métalliques dans les muscles. Les teneurs métalliques des muscles varient donc indépendamment du cycle de reproduction. Ces données sont confirmées par les résultats de MIRAMAND et al. (1991), concernant le mullet.

Seule l'espèce "limande-sole" présente des teneurs métalliques qui évoluent de façon parallèle, au cours du temps, dans les muscles et les branchies. Il est difficile de discerner si le paramètre "saison" agit réellement sur les teneurs métalliques des muscles de poissons car le facteur "âge" intervient également. Les teneurs les plus importantes ne sont pas toujours détectées à la même époque chez les différentes espèces mais correspondent systématiquement à l'échantillonnage dont la moyenne d'âge est la plus faible. Ceci nous permet d'avancer l'hypothèse que le paramètre le plus influant est probablement le facteur "âge". BARAK et MASON (1990) observent dans le muscle d'anguille et de gardon des différences de concentrations métalliques selon l'époque de prélèvement mais suggèrent que la cause de ces variations réside essentiellement dans le fait que la taille moyenne des poissons capturés varie.

Les concentrations métalliques des branchies de limandes évoluent très peu au cours du temps ce qui reflète une relative stabilité de la composition du milieu environnant.

On peut ajouter que ces teneurs évoluent de façon plus similaire chez les deux espèces de pleuronectidés que chez la morue. La composition du milieu environnant des deux espèces de poissons plats doit donc fluctuer de manière comparable, ce qui s'explique par le fait qu'il s'agit d'un environnement benthique tandis que la morue est plus certainement soumise aux variations de la composition de la masse d'eau., d'autant plus que cette espèce présente un comportement migratoire ou tout au moins d'erratisme nutritionnel.

Influence du facteur "site de prélèvements"

Lorsque les poissons sont prélevés sur deux sites différemment contaminés, les teneurs métalliques des foies sont supérieures chez les individus provenant du site le plus pollué. Ces différences sont strictement liées au facteur "site de prélèvement" chez la limande et la morue; chez la limande-sole, elles doivent être influencées secondairement par le facteur "âge". Ces données sont corroborées par les résultats de DELVAL (1984) qui observe de plus fortes concentrations hépatiques chez les flets prélevés à Dunkerque que chez ceux capturés au sud de Boulogne.

Au niveau des branchies, les teneurs varient peu dans les deux échantillonnages de limandes prélevées à la côte de Calais et de Boulogne. Pourtant, chez le flet prélevé au sud de Boulogne et à Dunkerque, les teneurs en Cu et Mn des branchies sont plus élevées chez les individus provenant du site le plus contaminé (Dunkerque) (DELVAL, 1984).

Chez la limande-sole prélevée sur les sites du large, les teneurs les plus élevées sont détectées chez les poissons capturés à Calais. D'après ces résultats, le site du large de Calais serait plus pollué que le site de Boulogne alors que les degrés de contamination des deux sites de la côte seraient davantage comparables. Effectivement, l'analyse des teneurs métalliques du sédiment total confirme ces observations. Seul le Mn tend à être plus abondant dans les branchies des limande-soles provenant de Boulogne, site relativement plus contaminé au niveau du sédiment total par le Mn que par les métaux Zn, Pb et Cd comparativement au site du large de Calais.

Les branchies des morues prélevées au large et à la côte de Calais se distinguent respectivement par des teneurs élevées en Mn et en Fe. Le Mn est effectivement plus abondant dans les sédiments du large que ceux de la côte.

Les modifications du degré de pollution des milieux environnants sont donc globalement reflétées par les teneurs métalliques des branchies et des foies. Au niveau de ce dernier organe, les variations de concentrations seraient amplifiées par rapport à celles du milieu environnant. Au vu de nos résultats, nous ne sommes pas en mesure d'établir une relation entre les teneurs des organes de poissons et la disponibilité des métaux dans l'environnement, évaluée par la quantité de

métal liée à la fraction fine. En effet, les teneurs métalliques des poissons sont davantage fonction de la charge en métaux du sédiment total que de celle de la fraction fine.

Dans les muscles de limande-soles, ce sont chez les individus provenant de Boulogne que l'on détecte les teneurs les plus élevées notamment en Mn. Ce phénomène n'est explicité ni par l'influence du facteur "âge", ni par le facteur "site de prélèvement" puisque Calais est plus pollué que Boulogne. Quant aux muscles de limandes, ils sont davantage chargés en Cu et en Fe chez les individus capturés respectivement à Calais et à Boulogne. Les métaux sont globalement plus abondants dans les muscles de morues prélevées au large de Calais. Seules les teneurs métalliques des muscles de morues sont liées à celles de l'environnement. Cet organe ne reflète donc pas systématiquement le degré de contamination du milieu. Pourtant, MIRAMAND et al. (1991) proposaient d'utiliser le muscle pour estimer le degré de contamination du milieu environnant. Il faut noter que cette suggestion était basée sur le fait que les teneurs de cet organe ne varient pas en fonction du cycle de reproduction du poisson, ce que nous avons également démontré. D'après nos résultats, on peut ajouter que cette condition est insuffisante puisque le rôle premier d'un indicateur de pollution est de permettre de détecter une variation dans le degré de contamination du milieu environnant, ce qui n'est pas le cas des teneurs métalliques des muscles de limandes et limande-soles. Cependant, des résultats récents semblent montrer que le muscle de flet est un bon indicateur de la contamination du milieu, alors que chez d'autres espèces les conclusions sont moins évidentes (COSSA et al., 1989 cité par COSSA et al., 1990). L'espèce "flet" est probablement plus appropriée pour ce type d'études car elle présente un caractère de sédentarité marqué.

Compte tenu des résultats obtenus chez les trois espèces prélevées chacune sur deux sites différemment contaminés, le foie apparaît comme l'organe le plus susceptible d'être indicateur du degré de contamination du milieu. D'ailleurs, dans la littérature, les études concernant les niveaux de pollution auxquels sont soumis les poissons sont très souvent axées sur les teneurs métalliques des foies. En effet, chez une espèce tropicale (*Haemulon sciurus*), et chez la perche prélevées sur des sites différemment contaminés, les teneurs en Cu et Zn hépatiques sont plus importantes chez les individus les plus exposés et reflètent, chez la perche, les concentrations de ces métaux dans l'eau (HOGSTRAND et HAUX,

1990; HOGSTRAND et al., 1992). Chez la truite prélevée en milieu naturel dans des sites contaminés par un mélange de Zn-Cu-Cd, les foies ont tendance à contenir davantage de Cu et Cd mais des teneurs en Zn équivalentes lorsque les poissons sont prélevés sur le site le plus contaminé. Cependant, la variabilité des résultats est telle que la mesure des teneurs métalliques est, d'après les auteurs, un paramètre de mauvaise qualité pour estimer le degré de contamination d'un milieu (ROCH et al., 1982).

La détermination des teneurs métalliques dans les tissus est intéressante car elle permet, d'une certaine manière, d'estimer la charge métallique biodisponible et donc potentiellement toxique. Toutefois, ces données ne permettent pas de détecter si l'organisme est réellement affecté par le polluant. Aussi, il apparaît que l'utilisation d'une méthode biochimique pour évaluer l'impact des métaux lourds sur le biotope pourrait permettre d'interpréter ces effets en terme de santé des individus. Dans le chapitre I, les divers indicateurs biochimiques envisageables ont été présentés. Il a été montré que les métallothionéines semblent être les plus adaptées. Leur rôle dans la détoxification chez des poissons prélevés en milieu naturel est donc intéressant à étudier, ce qui va faire l'objet des chapitres suivants.

CHAPITRE IV

**CARACTERISATION DES METALLOPROTEINES
HEPATIQUES DE POISSONS**

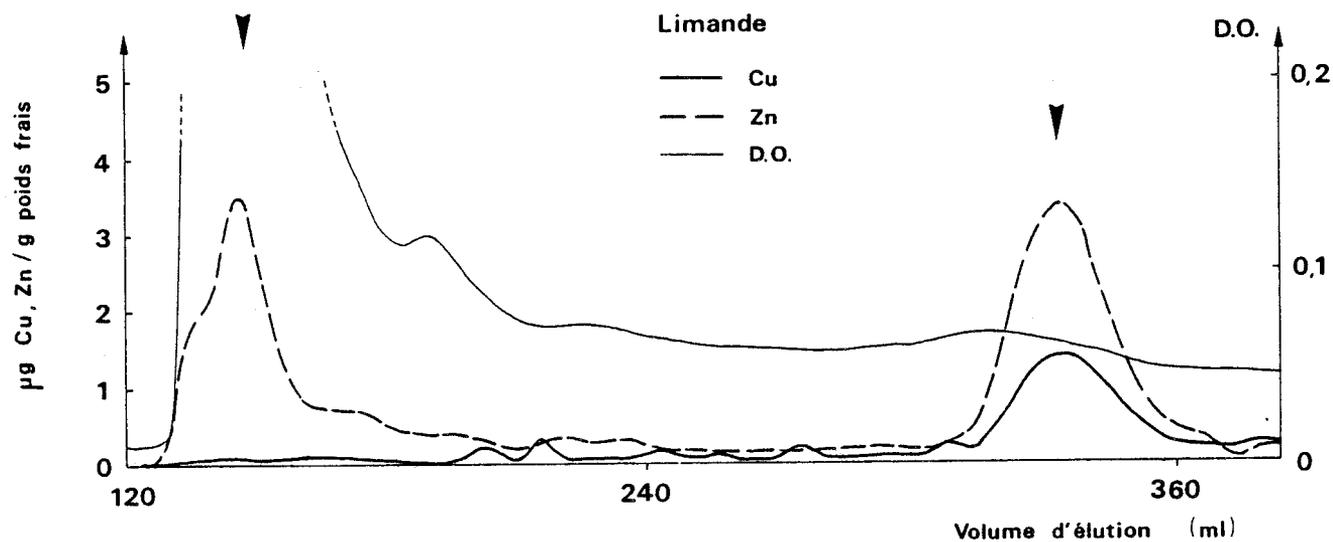
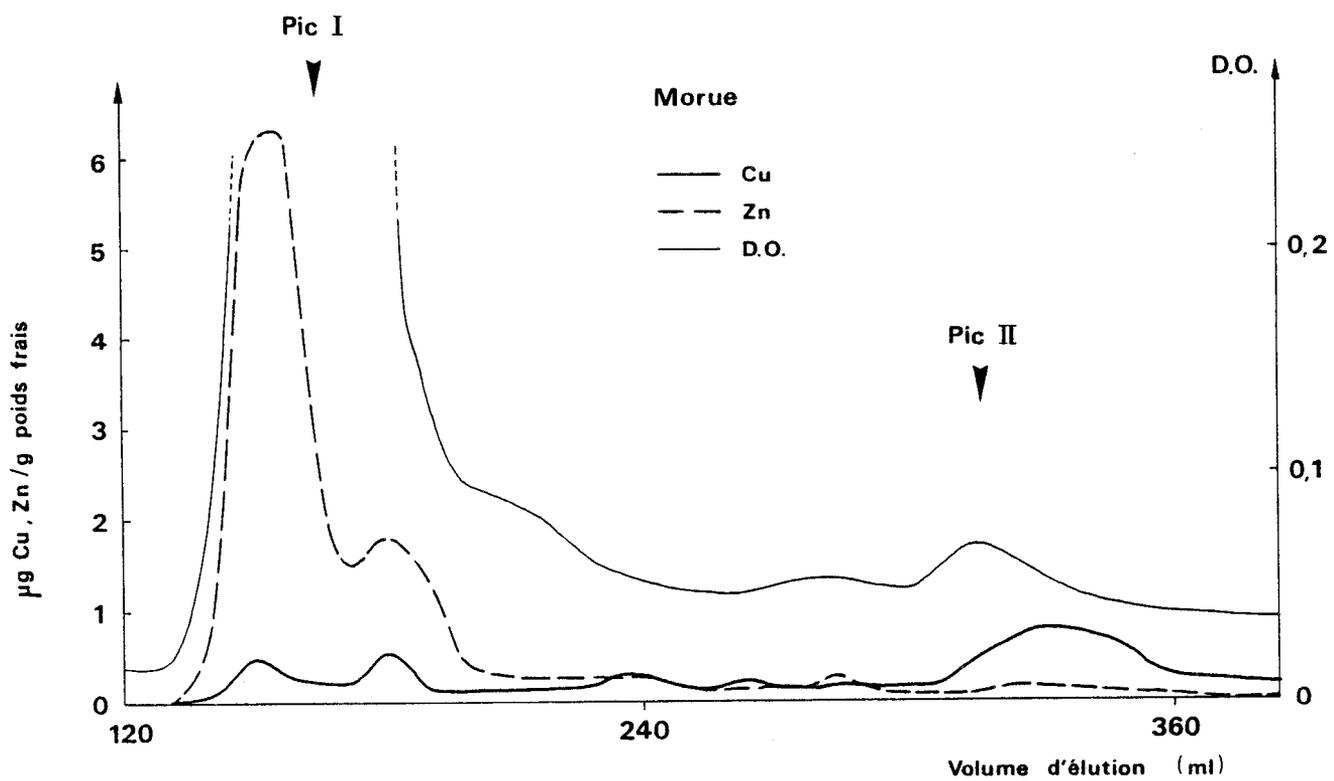


Figure 43 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 de surnageants hépatiques de morue et limande prélevées en milieu naturel.

CHAPITRE IV : CARACTERISATION DES METALLOPROTEINES HEPATIQUES DE POISSONS

L'existence des métallothionéines (MT), métalloprotéine de poids moléculaire de 10 kDa environ, est liée à la présence d'éléments métalliques. Diverses recherches ont eu pour but de caractériser ces protéines chez des organismes variés, suite à des intoxications en laboratoire. Si les études mettant en oeuvre des intoxications en laboratoire par voie artificielle (injection de sels métalliques) sont nombreuses, elles ne peuvent en aucun cas être considérées comme une simulation des phénomènes intervenant en milieu naturel. D'autres données concernent les métalloprotéines synthétisées par des poissons intoxiqués par voie naturelle (eau ou nourriture) mais relativement peu de recherches ont été axées sur l'animal prélevé dans son milieu. Cette étude a été entreprise afin de décrire les métalloprotéines hépatiques de 10 kDa environ des limandes, limande-soles et morues prélevées en milieu naturel et de les comparer avec celles des poissons contaminés en laboratoire par injections intrapéritonéales de Cd. Signalons que tout au long de cette étude, nous avons employé le terme "métalloprotéine" pour identifier ces protéines de poids moléculaire égal à 10 kDa environ liant les métaux, même lorsqu'elles présentaient diverses caractéristiques des métallothionéines (MT). En effet, nous sommes partis du principe que seules les analyses d'acides aminés prouvaient réellement l'existence des MT et ces analyses n'ont présenté un réel intérêt qu'après les dernières étapes de caractérisation.

1. Résultats

1.1. Caractéristiques des protéines isolées par chromatographie de filtration sur gel Sephadex G75

Les surnageants hépatiques de poissons ont, dans un premier temps, été chromatographiés par filtration sur gel Sephadex G75. Les concentrations métalliques (Cu, Zn ou Cd selon la nature de l'échantillon analysé), dosées dans les fractions éluées, sont représentées sur les profils d'élué. L'absorbance à 254 nm figure également sur ces profils. Cette mesure d'absorbance n'est exploitée qu'en tant que paramètre qualitatif car elle a été enregistrée afin de localiser les pics correspondant aux protéines de différentes gammes de

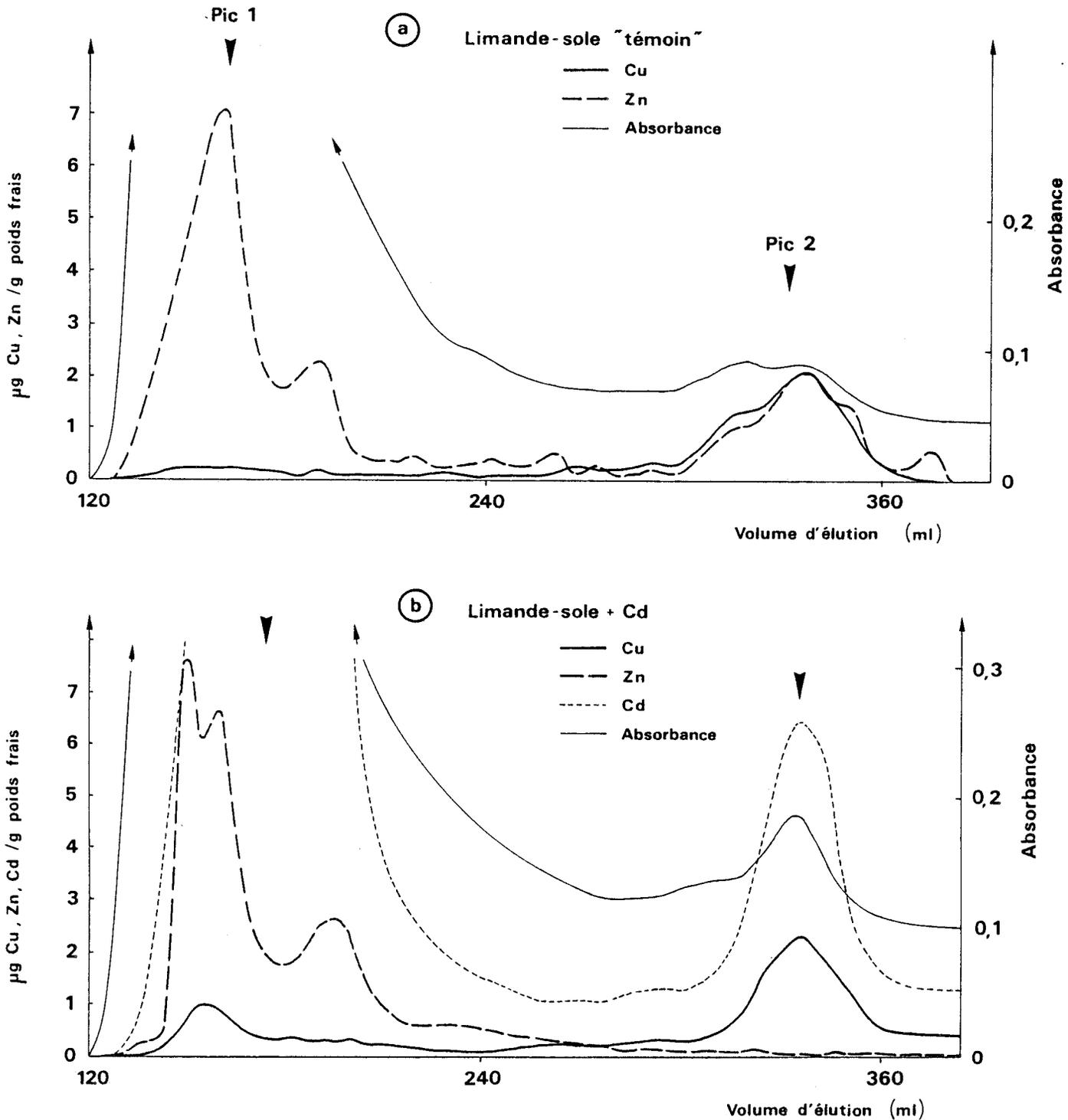


Figure 44 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 d'un surnageant hépatique de limande-sole prélevée en milieu naturel "témoin" et saturé par du Cd.

Pic2 : Cu ~ 12,6 $\mu\text{g/g}$ foie soit ~ 0,2 atome
 (Tém.) Zn ~ 12,2 $\mu\text{g/g}$ foie soit ~ 0,19 atome
 R (sommet pic2) = 1,57

Pic2 : Cu ~ 11,2 $\mu\text{g/g}$ foie soit ~ 0,18 atome
 (+Cd) Cd ~ 22,5 $\mu\text{g/g}$ soit ~ 0,2 atome
 Zn non détectable
 R (sommet pic2) = 2,27

poids moléculaire (PM). Les profils obtenus présentent tous trois pics d'absorption à 254 nm. D'après la chromatographie réalisée avec des échantillons standards :

- le premier pic (pic1) correspond au volume d'élution des molécules dont le PM est supérieur à 60 kDa; les fractions contiennent des macromolécules, des métalloenzymes...

- le deuxième pic contient des protéines dont le PM est compris entre 8 et 12 kDa environ (défini sous le terme PM moyen). L'ensemble des fractions constituant ce pic, nommé pic2, contient les métalloprotéines qui nous intéressent.

- le troisième pic correspond aux protéines dont le PM est inférieur à 5 kDa. Il est composé d'un mélange de polypeptides, de molécules biologiques de petite taille telles que le glutathion, etc...

1.1.1. Echantillons provenant de poissons prélevés en milieu naturel

Les figures 43 et 44a représentent les profils d'élution de chromatographie de filtration sur gel de surnageants hépatiques provenant de limande, limande-sole et morue prélevées en milieu naturel (poissons "naturels"). On note qu'au niveau du pic1, le Zn est abondant alors que le Cu l'est beaucoup moins. Au niveau du pic2, ces 2 métaux sont présents en proportions variables, parfois non détectables. Au niveau du pic3, les concentrations métalliques sont, la plupart du temps, inférieures au seuil de détection, c'est pourquoi ce pic n'a pas été représenté sur les profils figurant dans ce chapitre (voir V).

La variabilité des teneurs métalliques liées aux pics 1 et 2 chez différents individus de la même espèce est importante. Ces résultats sont présentés dans le chapitre VI.

La composition en acides aminés de diverses fractions contenant des protéines de PM moyen éluées au niveau du pic2 ont été déterminées (tableau 24). Ces fractions contiennent peu de cystéine (maximum 7.5%), et les pourcentages de cystéine ont tendance à être plus importants dans les fractions correspondant au sommet du pic2. Certaines fractions ne contiennent pas de cystéine ou en quantité non détectable. D'autre part, tous les échantillons analysés possèdent des proportions importantes d'acides glutamique et aspartique (16 à 25% environ).

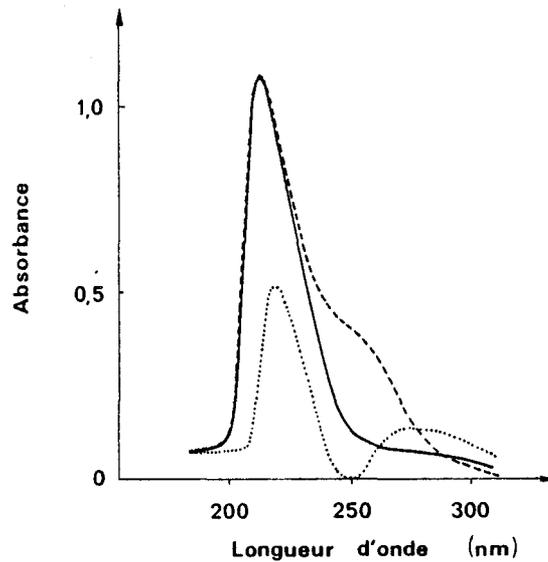


Figure 45 : Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre de 200 à 300 nm d'une fraction contenant des protéines de PM moyen, d'un surnageant hépatique de poisson prélevé en milieu naturel.

(— : fraction pure ;----: fraction saturée par du Cd ;
..... : fraction acidifié).

Tableau 24 : Composition en acides aminés de fraction constituant les pics 2 des profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 de surnageants de foies (exprimée en %).

	Limande-sole		Limande					Morue	
			Echantillon 1		Echantillon 2				
	a			a			a		a
Asp	10,5	10,6	10,4	7,9	10,3	10,3	9,9	10,8	11,0
Thr	6,9	6,2	3,0	0,6	8,1	7,8	6,9	11,3	11,0
Ser	5,9	5,9	4,4	2,0	5,0	5,5	6,8	3,6	3,8
Glu	12,2	13,0	13,6	13,1	12,5	12,2	11,8	13,1	12,7
Pro	4,6	5,7	14,9	11,0	3,6	4,3	6,7	1,1	1,5
Gly	8,9	9,4	10,6	11,7	8,3	8,5	9,1	7,5	8,2
Ala	7,8	8,3	17,6	10,5	5,0	5,3	6,1	4,1	4,0
Cys*	0,7	0,3	0	0	2,1	3,9	7,5	0,2	0,4
Val	7,6	7,4	7,5	8,6	6,5	6,2	5,6	8,9	8,4
Mel	1,8	1,6	0,1	0	3,5	3,0	1,1	2,2	2,5
Ile	4,4	4,4	6,9	5,9	6,5	3,6	3,9	3,6	3,7
Leu	7,3	7,0	7,3	8,2	6,2	5,9	5,3	4,7	5,0
Tyr	2,0	2,1	0,1	0	1,6	1,5	1,3	1,3	1,4
Phe	3,5	2,9	3,5	1,3	4,1	3,6	2,6	4,7	4,6
His	1,7	1,3	1,1	14,7	1,1	1,1	1,2	0,6	0,7
Lys	10,1	8,8	15,6	3,4	12,2	11,9	9,6	19,1	18,2
Arg	3,7	3,3	3,0	0	2,6	2,6	3,2	2,8	2,9
Trp	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

a : Fraction correspondant au sommet du pic 2 visualisé sur le profil d'élution

* : Déterminé sous forme de cystéine réduite

Les MT possèdent des propriétés d'absorbance caractéristiques; l'absorbance de la Cd-thionéine est importante à 254 nm (dûe à la liaison Cd-SH), faible à 280 nm (dûe à l'absence d'acides aminés aromatiques) et la liaison métal-thionéine est réversible (KAGI et NORBERG, 1979). L'absorbance de 200 à 300 nm des fractions éluées au niveau des pics 2 ont été mesurées au spectrophotomètre ; elles ont été de nouveau mesurées après ajout de Cd en milieu neutre puis après ajout d'acide (pH = 2 environ). On observe, pour l'échantillon présenté sur la figure 45, une augmentation de l'absorbance à 254 nm après l'ajout de Cd et une diminution suite à l'acidification par rapport à l'absorbance initiale, ce qui doit donc refléter la présence de MT.

Les poissons prélevés en milieu naturel ne présentent pas de contamination spécifique au Cd et la présence de MT peut être détectée en exploitant la capacité des MT à lier les métaux de façon réversible. Le Cd étant plus fortement lié aux MT que le Zn peut le déplacer, non seulement "in vivo", mais également "in vitro" (WINGE et MIKLOSSY, 1982) d'où une augmentation de l'absorbance à 254 nm.

On note que le Zn présent, à l'origine au niveau du pic2 (fig. 44a), disparaît pour être remplacé par du Cd quand il y a eu ajout de ce métal dans le surnageant (fig 44b). Le Cu est peu affecté par le traitement. La relation stœchiométrique, lors de l'échange du Zn par le Cd est de 1/1 (SUZUKI et al., 1977), ce qui est vérifié pour l'exemple présenté puisque les quantités de Cd et de Zn éluées au niveau du pic2 sont équivalentes à 0.2 atome environ.

Les rapports d'absorbance (R) (abs.254 nm/abs.280 nm) sont caractéristiques des MT car liés à la présence de la liaison Cd-mercaptan (abs.254 nm) et à l'absence d'acides aminés aromatiques (abs.280 nm). La saturation du surnageant par le Cd provoque une augmentation de l'absorbance à 254 nm et des rapports R, des protéines contenues dans les fractions du pic2 (figure 44).

1.1.2. Echantillons provenant de poissons contaminés en laboratoire

Afin de pouvoir disposer d'une MT de référence lors de la séparation des MT hépatiques de poissons prélevés en milieu naturel, des

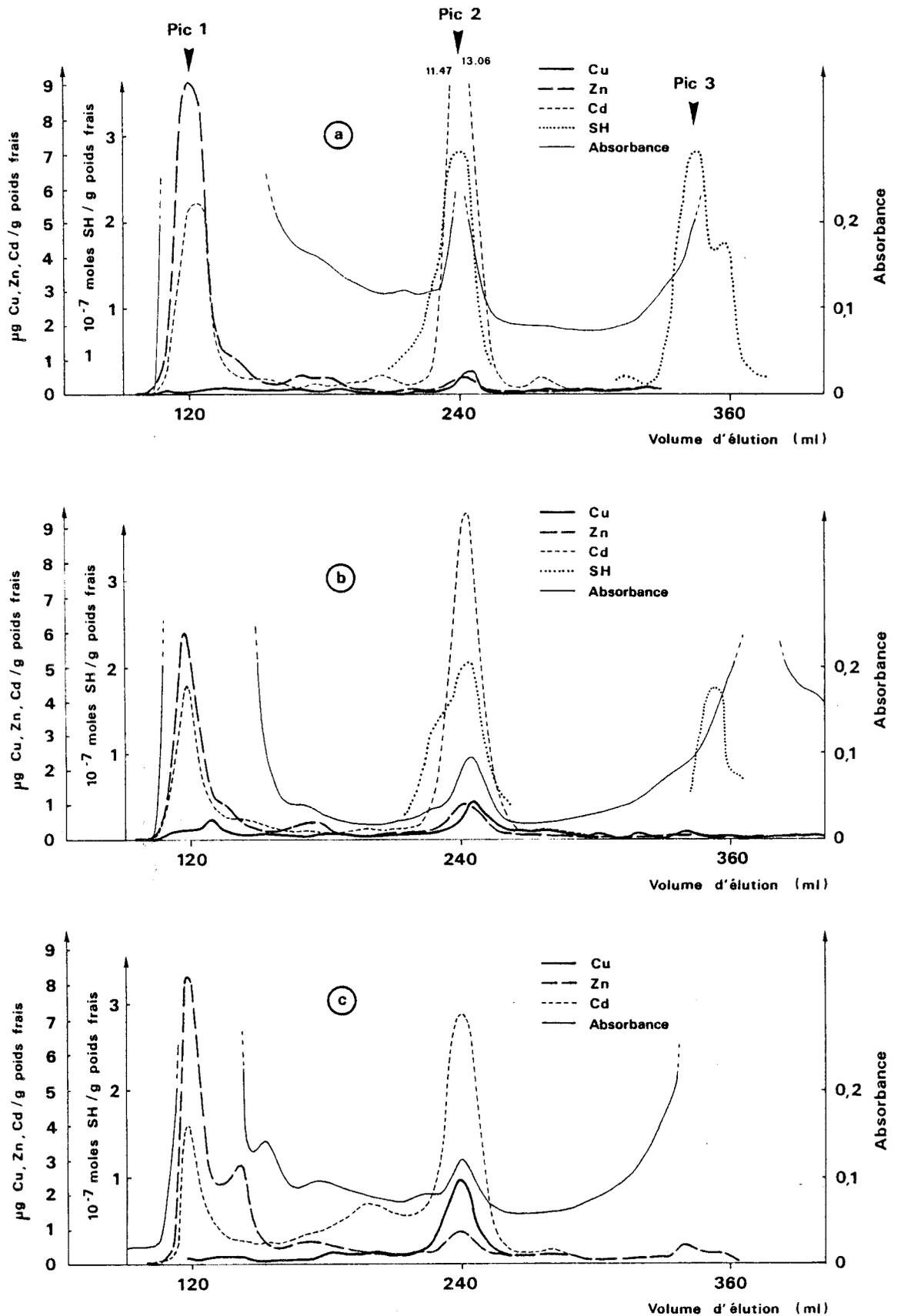


Figure 46 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 de surnageants hépatiques de limandes (a et b) et de limande-sole (c) contaminées en laboratoire.

limandes et limande-soles ont été contaminées en laboratoire par injections intrapéritonéales de Cd (poissons "contaminés").

Les profils d'élution présentés sur la figure 46 montrent que pour les échantillons provenant des deux espèces, le Cd est élué au niveau des pics 1 et 2 ; le Zn est toujours abondant au niveau du pic1 ; peu de Cu et de Zn sont dosés dans les fractions du pic2.

Les concentrations élevées de Cd dans les fractions du pic2 sont associées à une absorbance à 254 nm importante. Les fractions du sommet du pic2, contenant les quantités maximales de Cd, présentent des rapports d'absorbance R supérieurs à ceux des fractions de début ou de fin de pic (tableau 25).

Sur les trois profils de la figure 46, l'échantillon de limande-sole (profil c) présente les teneurs en Cd les moins élevées au niveau des fractions du pic2 ainsi qu'une augmentation du rapport R moins marquée que pour les deux autres échantillons.

Pour les échantillons de limandes, les teneurs en SH ont été mesurées dans les fractions correspondant aux pics 2 et 3. Au niveau du pic2, les teneurs en SH les plus importantes sont bien associées aux teneurs en Cd les plus élevées, ce qui démontre l'existence de métallothionéines. Les teneurs en Cu, Zn, Cd et SH dosées dans les fractions éluées au niveau du pic2 apparaissent dans le tableau 26 ; les contenus en MT ont été déduits d'une part à l'aide des rapports métal/MT (Cu = 12 atomes/mole de MT ; Cd et Zn = 7 atomes/mole de MT) et d'autre part à l'aide du contenu en cystéine des MT (20 moles de SH/mole de MT). On remarque que les teneurs en MT estimées par ces deux méthodes sont du même ordre de grandeur (300 et 324 μg MT/g foie pour des valeurs déduites des teneurs métalliques contre respectivement 289 et 355 μg MT/g foie pour des valeurs déduites des teneurs en SH). La comparaison des teneurs en MT estimées par ces deux méthodes a été réalisée sur un nombre d'échantillons trop restreint pour définir si les résultats obtenus sont corrélés de façon significative.

Les fractions éluées au début du pic3 présentent également des teneurs élevées en SH qui ne sont pas associées à du métal. Ce volume d'élution correspondant à celui du glutathion, les résidus SH détectés doivent probablement être liés à la présence de ce peptide.

Tableau 25 : Rapports d'absorbance (abs.254 nm/abs. 280 nm) des fractions éluées au niveau du pic2 par filtration sur gel Sephadex G75 des surnageant hépatiques de limandes (a et b) et limande-sole (c) contaminées en laboratoire
(profils d'élutions présentés sur la figure 46)

	1		2		3	
a	1,67	3	3,29	2,42	1,9	
b	1,45	3,75	3,95	3,2	2,09	
c	1,15	1,66	2,06	2,03	1,59	

Fraction éluées en début (1), au sommet (2) et en fin (3) de pic2

Tableau 26 : Teneurs en MT hépatiques de surnageants de limandes contaminées en laboratoire, estimées par les teneurs en métal et en SH des fractions éluées au niveau des pics 2 par filtration sur gel Sephadex G75.

(MT et métal en $\mu\text{g/g}$ foie frais, SH en moles/g foie frais)
(échantillons correspondant aux profils a et b de la figure 46)

Echant	Cu	MT	Cd	MT	Zn	MT	MT (métaux)	SH $\times 10^{-8}$	MT (SH)
a	1,19	10,27	35,65	294	1,38	19,63	324	109,35	355
b	6,9	60	24	198	2,9	41,4	300	88,86	289

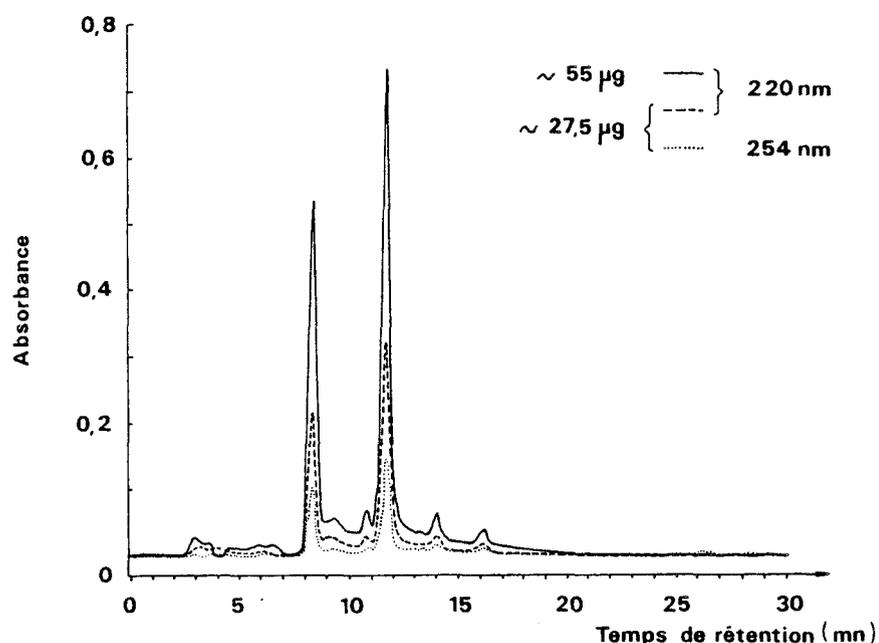


Figure 47 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne DEAE de MT commerciale de foie de lapin composée de 2 isoformes (environ 55 μg — et 27,5 μg de protéines analysées).

2.1. Caractéristiques des protéines isolées par chromatographies

HPLC

Les protéines de PM de 10 kDa environ (fractions G75) ont été chromatographiées par HPLC. Les pics obtenus par chromatographie HPLC sont visualisés par leur absorbance à 220 nm qui est liée à la quantité de protéines totales. En effet, pour la MT commerciale de foie de lapin analysée par chromatographie sur colonne DEAE, les surfaces des pics correspondant aux deux isoformes sont multipliées approximativement par un facteur 2 lorsque la quantité déposée est doublée (figure 47).

La relation absorbance à 220 nm/contenu en MT diffère lorsque l'échantillon est analysé en milieu neutre ou en milieu acide (figure 45); cette observation est confirmée par les données de KAY et al. en 1986.

Dans ce chapitre, les quantités de protéines éluées au niveau des différents pics seront évaluées par comparaison des surfaces de pics d'absorbance à 220 nm. Cette estimation n'est réalisée que dans le but de comparer différents pics d'un même type de chromatogramme ; les valeurs citées n'ont donc qu'un intérêt relatif.

2.1.1. Echantillons analysés sur colonne DEAE

- Protéines hépatiques de limandes

- Les profils d'éluion obtenus par chromatographies sur colonne DEAE d'échantillons de limandes "contaminées" montrent plusieurs pics auxquels sont associées des teneurs en Cd et une absorbance à 254 nm élevées. Ces pics sont au nombre de 3, localisés après 9,5 à 10, 10,5 et 12,5 minutes de rétention et dénommés A, B et C (figure 48a). Pour certains échantillons, le pic B peut parfois être presque inexistant ; le pic A devient alors plus important. Le maximum d'absorbance à 254 nm et les quantités de Cd éluées les plus importantes se situent généralement au niveau du pic C.

- Pour les échantillons de limandes "naturelles", le Cu et le Zn sont élués simultanément au niveau des pics localisés aux temps 9,5 à 10 et 12,5 minutes de rétention (figure 48b), c'est-à-dire au niveau des pics notés A et C précédemment. Par contre, l'absorbance à 254 nm enregistrée au niveau de ces pics est nettement plus faible que lorsqu'il s'agit d'échantillons de poissons contaminés en laboratoire. Cette

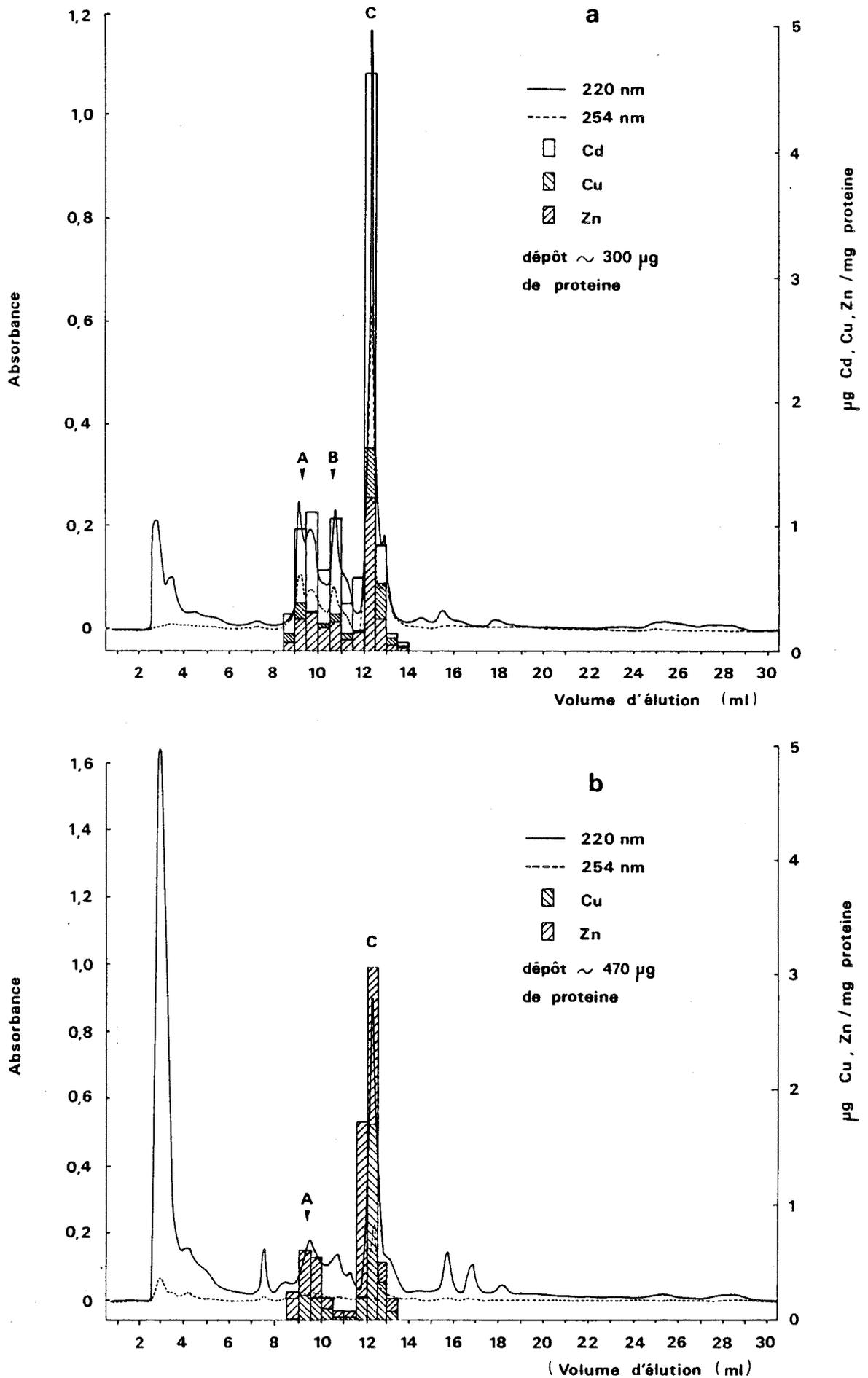


Figure 48 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen de surnageants hépatiques de limande contaminée en laboratoire (a) et prélevée en milieu naturel (b).

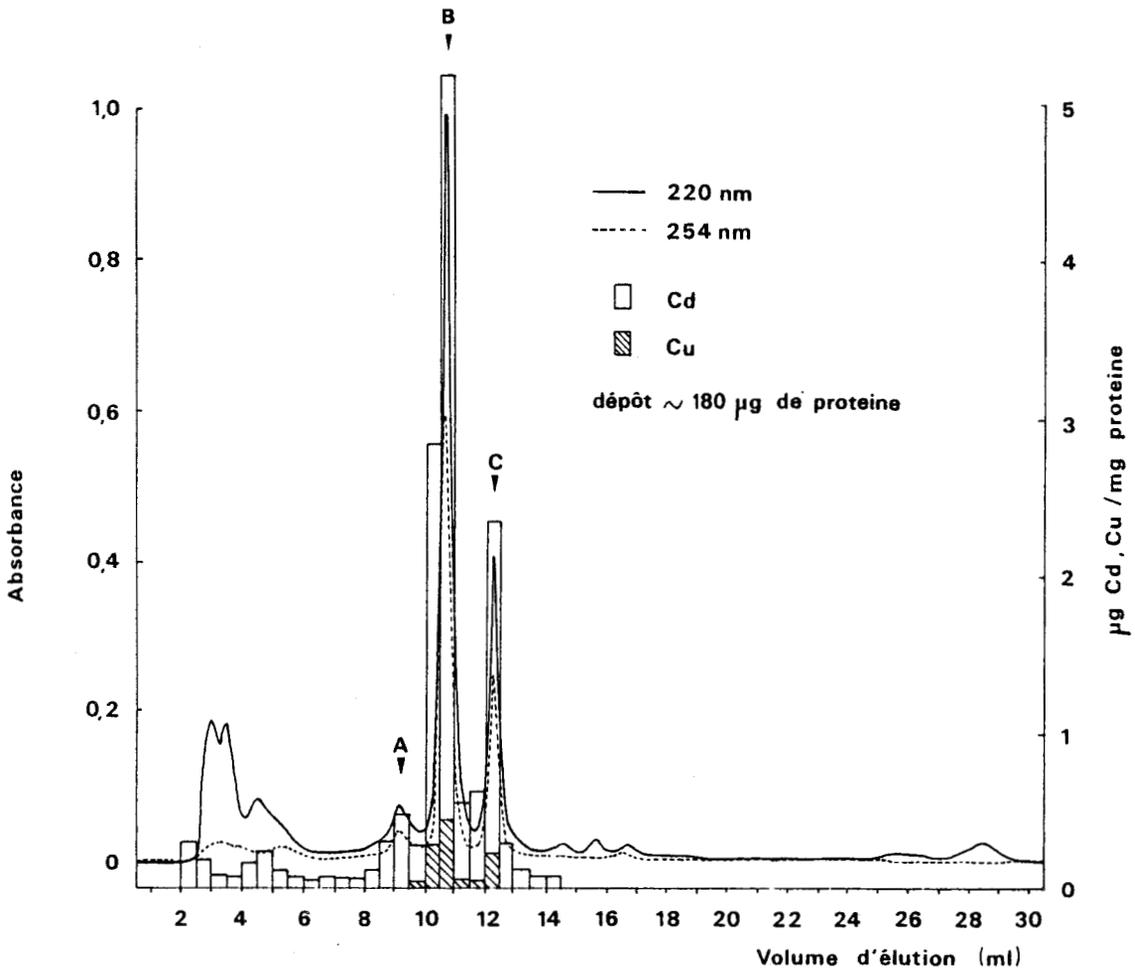


Figure 49 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen d'un surnageant hépatique saturé par du Cd provenant d'une limande prélevée en milieu naturel.

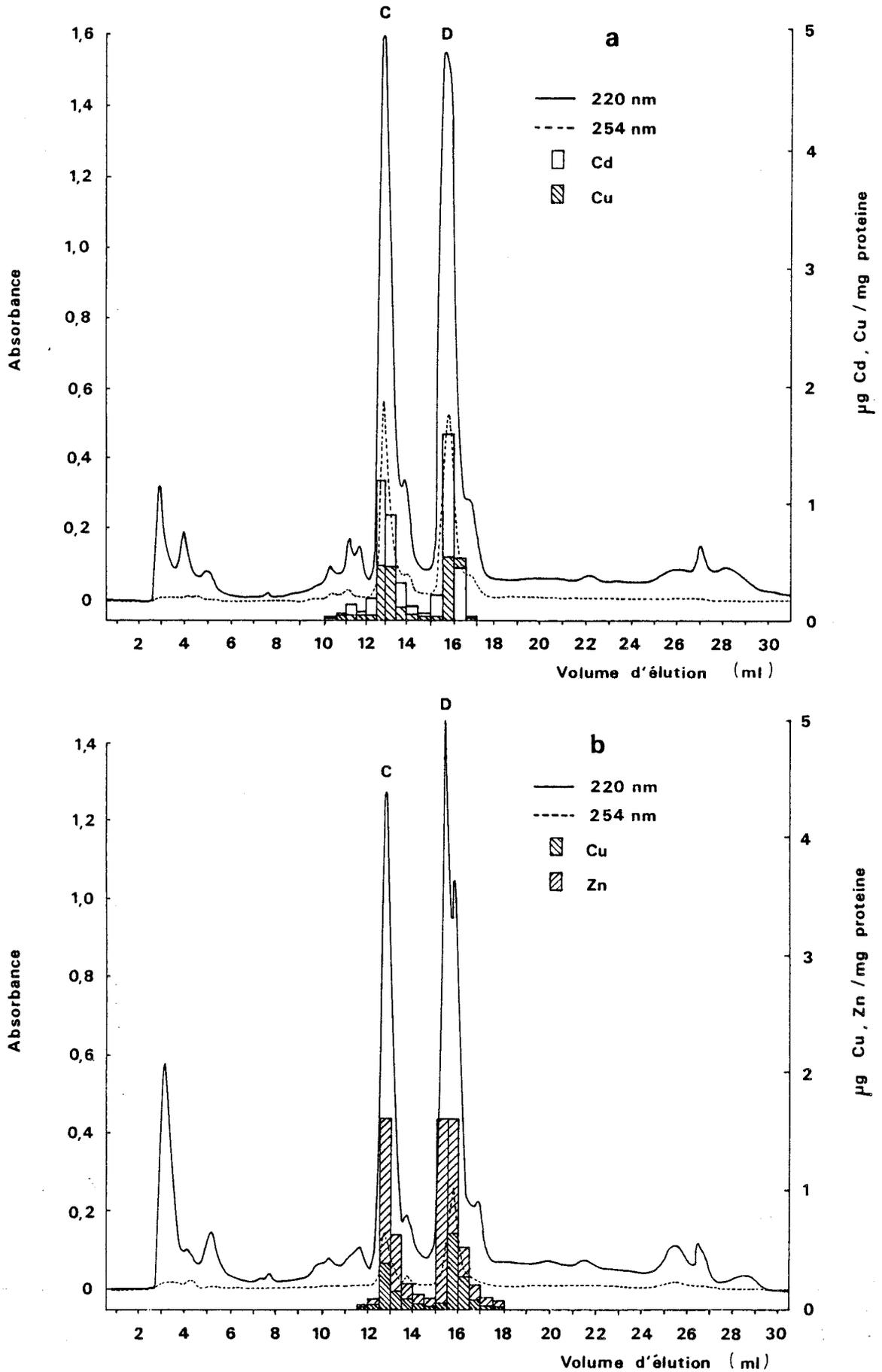


Figure 50 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen de surnageants hépatiques de limande-soles contaminée en laboratoire (a) et prélevée en milieu naturel (b).

observation est explicitée par le fait que ce sont essentiellement les métaux Cu et Zn qui sont présents.

On a constaté que les profils d'éluion obtenus à partir d'échantillons de poissons jeunes ou plus âgés (1 an ou 3 ans) sont comparables.

D'autre part, lorsqu'il y a eu ajout de Cd dans les surnageants de limandes avant chromatographie, l'importance du pic A diminue fortement, celle du pic C a également tendance à diminuer, tandis que le pic noté B apparaît et devient soit le pic majeur (figure 49), soit d'importance équivalente au pic C. Trois pics d'importances inégales sont donc séparés et leurs temps de rétention sont comparables à ceux des échantillons de poissons contaminés en laboratoire. La saturation du surnageant par le Cd provoquerait une redistribution du métal élué à l'origine au niveau du pic A essentiellement et du pic C vers le pic B. La charge ionique d'une ou de plusieurs protéines contenues dans les fractions éluées en position A et C serait modifiée et ferait apparaître un pic élué en position B chez les poissons prélevés en milieu naturel.

D'après ces observations, on peut émettre l'hypothèse que les échantillons de limandes "contaminées" possèdent, non pas trois isoformes de métalloprotéine comme le laissent supposer les profils chromatographiques obtenus sur DEAE, mais seulement deux, le troisième pic ne représentant qu'une combinaison de(s) métalloprotéine(s) initiale(s) du fait de la présence du Cd, d'où une charge ionique intermédiaire. Le fait que l'importance du pic B soit liée à celle du pic A pourrait également s'expliquer par un problème d'oxydation des protéines.

Que les échantillons proviennent de surnageants de limandes "naturelles" qui ont été saturés par le Cd ou de limandes "contaminées", les teneurs maximales de Cd apparaissent aux mêmes temps d'éluion. Les similitudes entre les protéines complexant les métaux chez ces poissons sont donc importantes. Le type de contamination ("naturelle" ou artificielle) n'interviendrait donc pas sur la nature des métalloprotéines. Par contre, selon le métal considéré, la charge ionique des protéines pourrait être modifiée.

- Protéines hépatiques de limande-soles.
- Les échantillons de limande-soles "contaminées", analysés sur

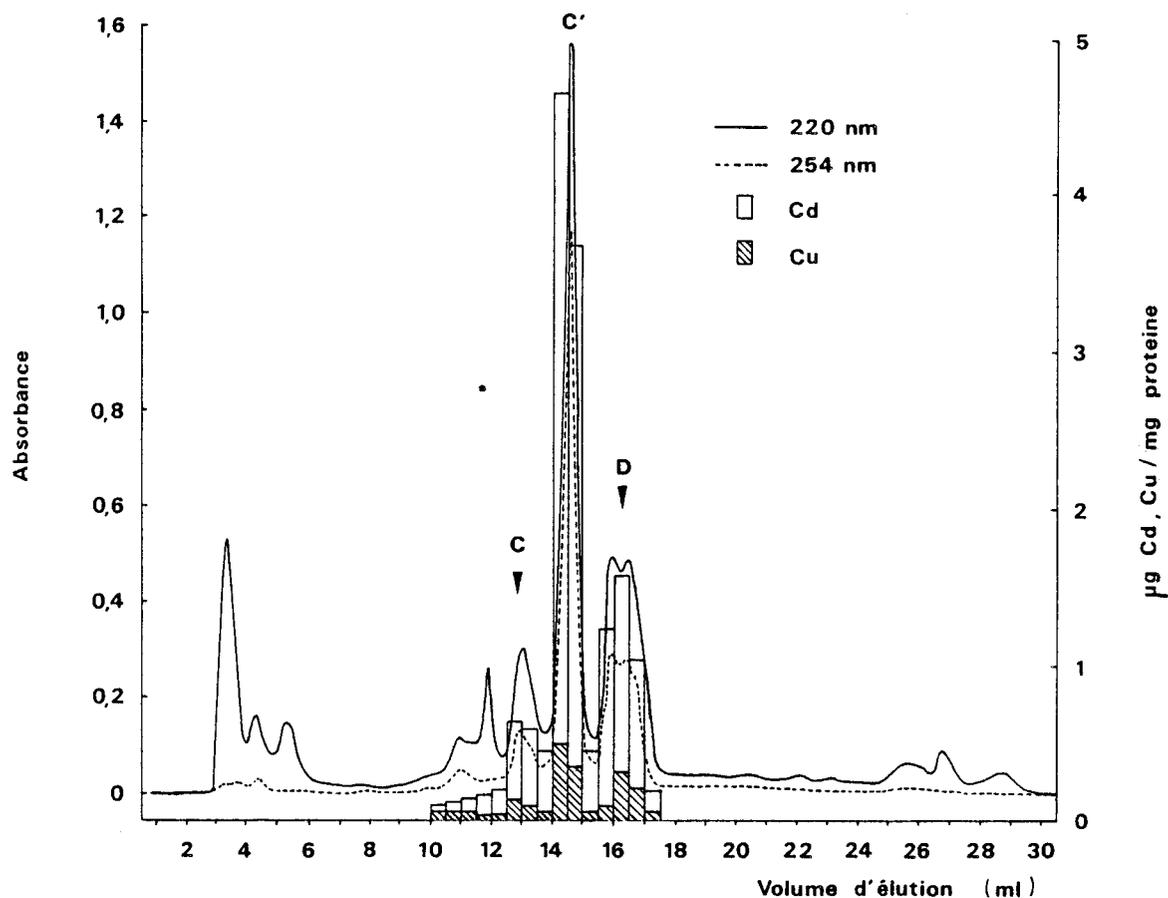


Figure 51 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen d'un surnageant hépatique de limande-sole (prélevée en milieu naturel) ayant été saturé par du Cd.

(Contenu en Cd, Cu et protéines de l'échantillon analysé ~ 11,4 µg ; 1,4 µg et 590 µg. Cd et Cu quantifiés après l'étape DEAE ~ 9,0 µg et 1,07 µg soit 79% et 76,4%).

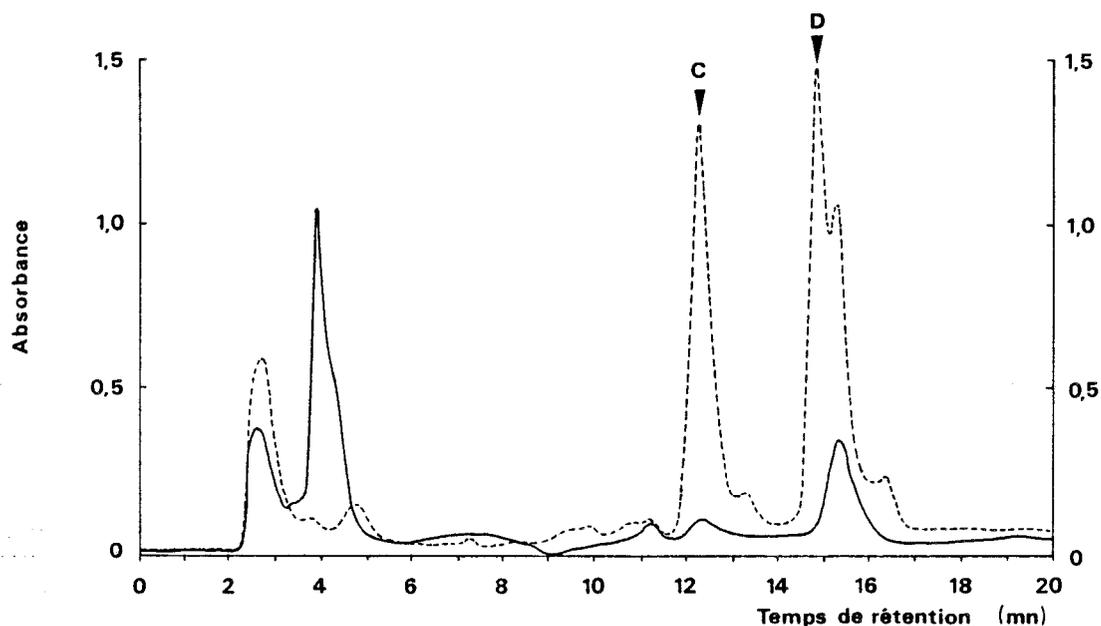


Figure 52 : Profils d'élution obtenus par chromatographies HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen de surnageants hépatiques de limande-sole

(surnageant "témoin" ----; surnageant + Cd + β-mercaptoéthanol —).

colonne DEAE, présentent deux pics majeurs au niveau desquels les métaux apparaissent et l'absorbance à 254 nm est importante. Ces pics ont des temps de rétention respectifs de 12,5 à 13 minutes et 15,5 à 16 minutes et sont notés C et D (figure 50a).

- Les profils chromatographiques obtenus avec les échantillons de limande-soles "naturelles" (figure 50b) sont comparables à ceux des poissons "contaminés" puisque le Cu et le Zn sont dosés également au niveau des pics C et D.

L'oxydation des protéines est un problème susceptible d'intervenir lors des étapes de chromatographie; il se traduirait par la formation de ponts disulfures et par la modification de la position des pics sur les profils d'élution en DEAE. Par ajout de β -mercaptoéthanol 5 mM dans le surnageant et dans les tampons utilisés pour les chromatographies (filtration sur gel et DEAE), nous avons vérifié que les MP éluées en position C et D n'ont pas subi ce phénomène d'oxydation. Les MP de limande-soles existent donc sous deux formes distinctes qui correspondent réellement à deux isoformes puisque les résultats obtenus à partir d'échantillons analysés avec ou sans réducteur sont comparables. Ces deux isoformes présentent des caractéristiques identiques (temps de rétention, capacité à lier les métaux) quel que soit le type de contamination subie par le poisson.

L'ajout de Cd dans ces mêmes surnageants de limande-soles "naturelles" entraîne l'apparition d'un pic intermédiaire aux pics C et D (élué au temps 14 minutes et noté C'), au niveau duquel la majorité du Cd est localisée (figure 51). Ces observations sont comparables aux résultats concernant les échantillons de limande. La substitution du Zn qui est associé aux métalloprotéines natives, par le Cd provoquerait une modification de la charge ionique d'une ou plusieurs de ces métalloprotéines et, par conséquent, modifierait le temps de rétention du composé résultant. Ces données sont confirmées par le fait que l'ajout de β -mercaptoéthanol 5 mM dans ce surnageant contenant du Cd et dans les tampons inhibe l'apparition du pic C' ; les temps de rétention des métalloprotéines sont alors comparables à ceux des protéines natives. Les profils d'élution de ces chromatographies sont présentées sur la figure 52.

D'autres échantillons avaient été chromatographiés dans ces

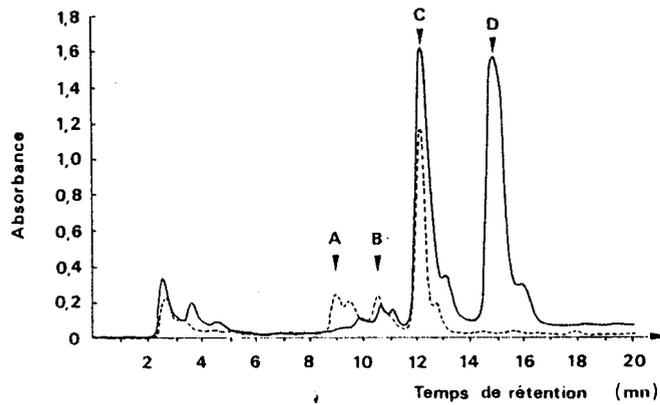


Figure 53 : Profils d'élué de chromatographies HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen de surnageants hépatiques de limande (-----) et de limande-sole (—) contaminées en laboratoire.

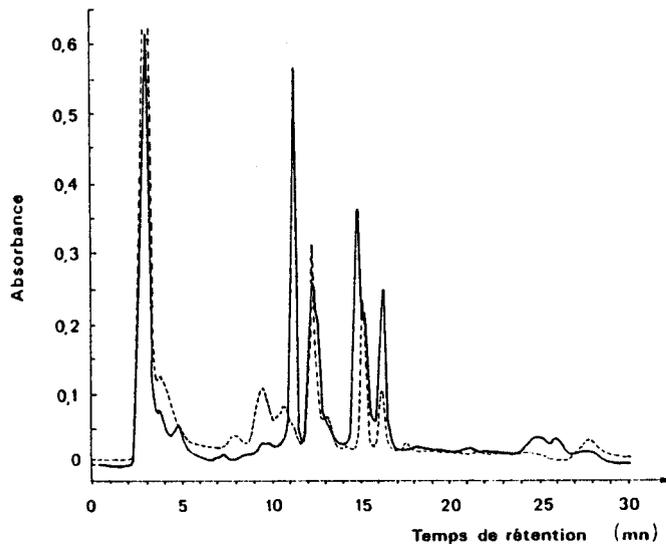


Figure 54 : Profils d'élué de chromatographies par HPLC sur colonne DEAE de fractions éluées, par filtration sur gel, au début du pic contenant les protéines de PM moyen (échantillons provenant de limande (-----) et de limande-sole (—) prélevées en milieu naturel).

Tableau 27 : Récapitulatif de la position des métalloprotéines éluées en DEAE après filtration sur gel Sephadex G75 pour différents types d'échantillons hépatiques de poissons

Pic	Temps de rétention (en minutes)	Limande			Limande-sole		
		"Contaminée"	"naturelle"	"naturelle" saturée Cd	"Contaminée"	"naturelle"	"naturelle" saturée Cd
A	9,5 à 10	X +	X	X			
B	10,5	X -		X			
C	12,5 à 13	X	X	X	X	X	X
C'	14						X
D	15,5 à 16				X	X	X

conditions, mais peu de résultats sont exploitables car nous avons été confrontés à des problèmes de redissolution des échantillons qui devaient être lyophilisés entre les deux étapes de chromatographie.

D'autre part, on note sur la figure 51 qu'environ 78% des métaux contenus dans l'échantillon à analyser sont retrouvés après cette étape de chromatographie. Ces pertes doivent être liées au passage sur la colonne et au fait que les dosages de métaux n'ont été réalisés qu'au SAA en flamme, c'est-à-dire avec des seuils de détection relativement élevés. D'après nos résultats, les teneurs en MT d'un tissu, évaluées par les concentrations de métal ou de résidus SH des fractions éluées par chromatographie (filtration sur gel, DEAE) sont donc sous-estimées. Cette méthode est pourtant utilisée par certains auteurs qui obtiennent de meilleurs résultats (WOFFORD et THOMAS, 1984).

- Comparaison des protéines hépatiques de limandes et de limande-soles isolées par filtration sur gel et DEAE.

Lorsque les poissons ont été contaminés en laboratoire, les profils d'élution obtenus après chromatographies de filtration sur gel et DEAE montrent que deux isoformes de métalloprotéines sont présents chez ces deux espèces de poissons benthiques. Ils sont élués en position A ou B et C chez la limande et en position C et D chez la limande-sole (figure 53 et tableau 27). L'isoforme C est donc commun aux deux espèces.

Lorsque les poissons ont été prélevés en milieu naturel, l'isoforme C est toujours commun aux deux espèces (tableau 27). En effet, chez la limande, les métalloprotéines complexant le Zn et le Cu sont localisées en position A et C; chez la limande-sole, c'est en position C et D qu'elles sont éluées.

Chez l'une ou l'autre espèce, l'ajout de Cd entraîne la substitution du Zn lié aux protéines par le Cd et modifie la charge ionique d'une ou plusieurs métalloprotéines natives faisant apparaître un pic supplémentaire sur les profils.

- Chez la limande, le profil d'élution devient alors comparable à celui des échantillons de limandes contaminées en laboratoire ; c'est pourquoi, on émet l'hypothèse que chez la limande "contaminée", seuls deux isoformes existent élués en position A et C.

- Chez la limande-sole, la présence de ce pic est inhibée par l'ajout d'un réducteur ; les temps d'élution des deux métalloprotéines

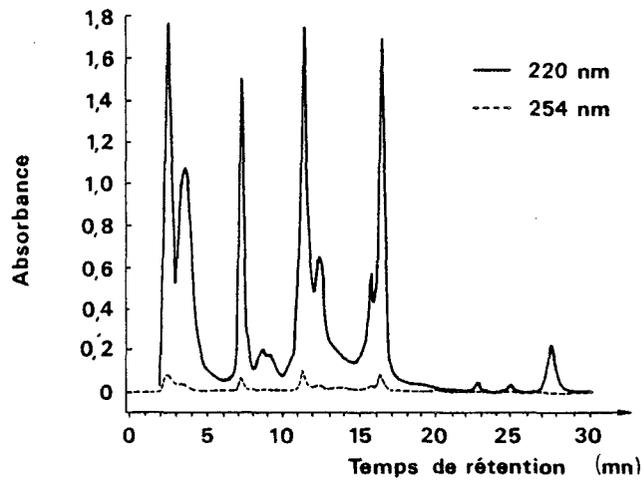


Figure 55 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne DEAE des protéines de PM moyen d'un surnageant hépatique de morue prélevée en milieu naturel.

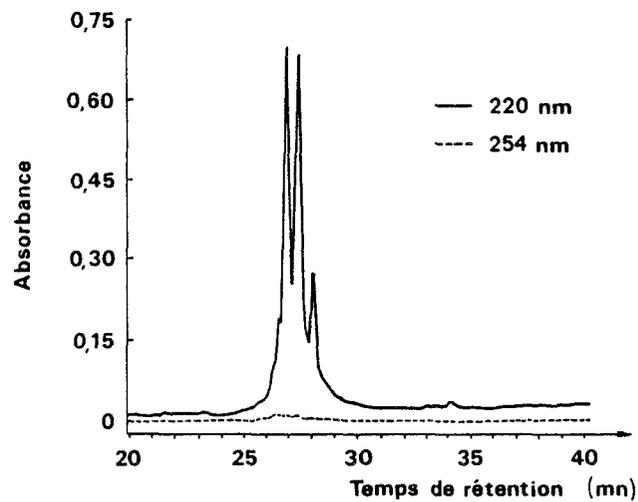


Figure 56 : Profil d'élution de chromatographie par HPLC sur colonne de phase inverse de MT commerciale de foie de lapin.

sont alors identiques à ceux des échantillons contaminés par injection ou prélevés en milieu naturel.

On a constaté que chez les deux espèces, la capacité des deux isoformes à lier le Zn est similaire. Ces résultats ont été obtenus en comparant les quantités de métaux dosés au niveau de chacun des pics d'absorbance à 220 nm par rapport à la surface respective de ces pics. Les résultats concernant le Cu sont moins nets car les concentrations plus faibles ont été dosées de façon moins précise que le Zn au SAA flamme.

Le fait que la charge ionique des isoformes soit différente, ne modifie pas leur affinité pour les métaux et que les deux isoformes de métalloprotéines ne se distinguent pas par une liaison préférentielle pour un métal en particulier.

Si l'on utilise les rapports métal/MT et en admettant que les MP sont réellement des MT, la quantité de MT de l'échantillon de limande "naturelle" (figure 48b) est de 31 µg de MT alors que pour l'échantillon de limande "contaminée" (figure 48a), elle est de 99 µg de MT (pour une même quantité de protéine analysée). Ceci démontre que la synthèse de MT a bien été induite lors des contaminations artificielles.

D'autres pics sont visibles sur les profils de chromatographie sur colonne DEAE ; les fractions les constituant ne présentent pas d'absorbance à 254 nm et ne contiennent pas de métal. Ils apparaissent à des temps de rétention différents selon l'espèce considérée (15, 16 et 18 minutes chez la limande et 11,5 à 12 minutes chez la limande-sole (figure 54)). Ces pics sont plus importants lorsque les échantillons analysés proviennent des fractions G75 situées au début du pic 2 et non au sommet. Ces constituants ne sont pas éliminés par le chauffage car les profils d'élution obtenus à partir d'échantillons de référence (non chauffés) et chauffés de limande-soles "contaminées" sont identiques. Bien que la résistance à la chaleur soit une caractéristique des MT (CHERIAN et GOYER, 1978), d'autres composés seraient également persistants, ce qui est confirmé par les observations de LEHMAN et KLAASSEN (1986).

- Protéines hépatiques de morue

Les protéines de PM moyen de surnageant de morue "naturelle" sont séparées en différents pics sur colonne DEAE (figure 55) (élués après 7;11,5 et 15 minutes de rétention). Cependant, parmi ces pics, les

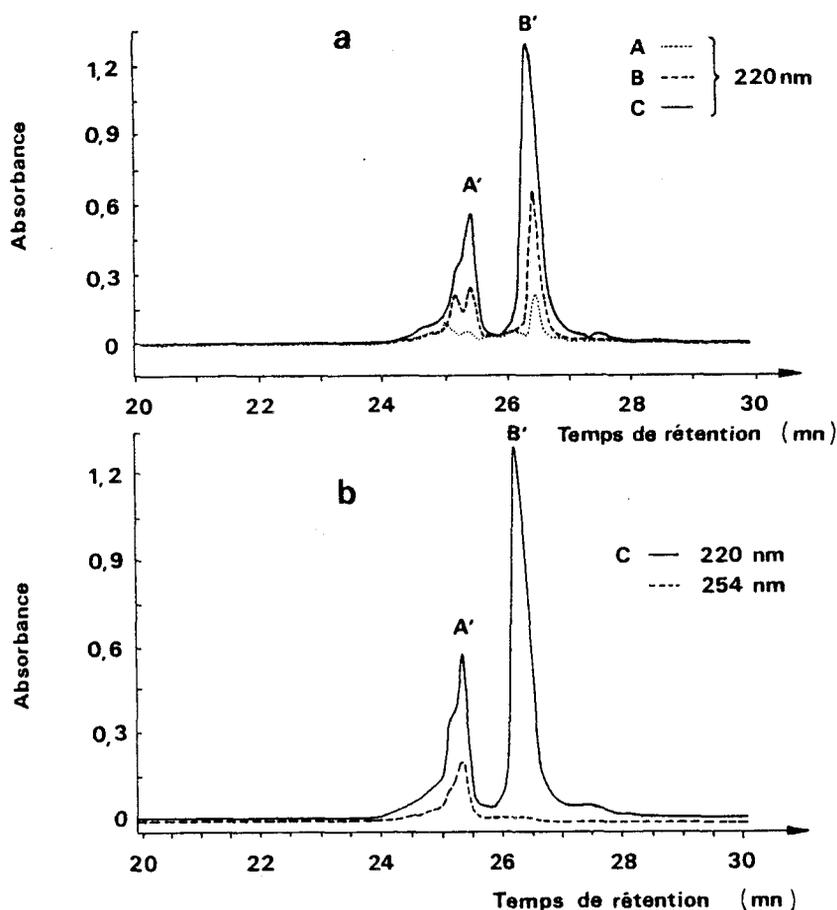


Figure 57 : Profils d'élution de chromatographies par HPLC sur colonne de phase inverse des métalloprotéines de limande contaminée en laboratoire et séparée sur colonne DEAE en position A,B et C (a) et en position C (b).

Tableau 28 : Composition en acides aminés des fractions éluées sur colonne de phase inverse provenant des isoformes 1 et 2 de métalloprotéines hépatiques séparées sur colonne DEAE. (exprimée en %)

	Limande		Limande-sole					
	Isoforme 2		Isoforme 2			Isoforme 1		
			Echantillon 1		Echantillon 2	Echantillon 1		
	A'	B'	A' 1	A' 2	B'	A'	A' 1	A' 2
Asp	9,75	9,52	9,08	12,89	9,49	9,22	8,85	7,58
Thr	5,57	8,03	10,68	7,63	10,05	7,14	9,38	8,41
Ser	16,33	13,26	11,63	10,15	8,25	13,86	12,59	8,89
Glu	12,48	7,11	5,47	15,89	7,66	11,56	8,63	11,03
Pro	4,94	6,92	7,25	9,28	8,09	5,49	6,87	7,59
Gly	20,48	12,70	13,11	16,00	10,15	19,34	13,52	9,52
Ala	5,34	2,96	2,68	7,03	2,76	5,38	4,45	4,59
Cyst*	7,70	22,49	24,73	0	26,89	9,58	17,03	17,96
Val	3,48	2,36	2,14	5,82	3,19	3,96	2,99	4,14
Met		0,87	0,52		1,24		1,13	0,83
Ile	1,83	0,56	0,22	2,33	0,61	1,61	1,01	1,83
Leu	2,50	0,64	0,64	4,31	1,23	2,29	2,02	4,60
Tyr	0	0	0	0	0	0	0,77	1,73
Phe	0	0	0	0	0	0	0,75	1,16
His	1,47	0,61	0,32	0	0,52	3,52	0,72	0,53
Lys	6,73	10,93	9,67	8,67	9,86	7,05	8,59	5,56
Arg	0	0	0	0	0	0	0,19	4,03

* : déterminé sous forme de cystéine réduite

métalloprotéines n'ont pu être repérées par le traceur "métal" car le contenu métallique des échantillons analysés était toujours trop faible.

2.1.2. Echantillons analysés sur colonne en phase inverse

Les fractions constituant les pics visualisés sur les profils d'élution obtenus par chromatographie sur colonne DEAE, ont été chromatographiées sur colonne en phase inverse en milieu acide. Les concentrations métalliques n'ont pu alors être déterminées dans ces fractions. L'utilisation de l'Anticorps (Ac) anti-MT de perche ainsi que les dosages par polarographie à impulsions différentielles (DPP) et les analyses d'acides aminés permettent de caractériser les protéines éluées. Il faut préciser que la réactivité de l'Ac et la détermination du contenu en cystéine par DPP sont exprimées en terme de "MT" bien que cette appellation soit employée de façon abusive.

La MT commerciale de foie de lapin est séparée en trois pics dépourvus d'absorbance à 254 nm sur colonne en phase inverse lorsqu'elle est analysée dans les mêmes conditions que nos échantillons (figure 56) ; elle peut également être éluee en cinq pics quand les conditions d'analyse sont modifiées (durée de la chromatographie).

· Protéines hépatiques de limandes

Les fractions éluées au niveau des pics notés A, B et C en DEAE chez la limande contaminée par injection présentent des profils d'élution comparables en phase inverse (figure 57a). Deux pics majeurs sont élués. Le premier dénommé A' (élué après 25 minutes de rétention) présente toujours une absorbance à 254 nm alors qu'au niveau du second pic (pic B' élué après 26 à 27 minutes de rétention), l'absorbance à 254 nm n'est plus détectable (figure 57b). On remarque que le pic A' a tendance à se subdiviser en 2 à 3 pics ; à ce stade de purification, différentes protéines n'ont toujours pas été séparées. Le pic B' est symétrique et semble n'être constitué que d'une seule protéine.

La réactivité de l'Ac, la composition en acides aminés et la quantification de la cystéine ont été déterminées pour les fractions provenant de l'isoforme 2 (élué en position C sur le profil DEAE) séparé en deux pics A' et B' sur colonne en phase inverse.

La quantité de "MT" contenue dans les fractions du pic A', estimée

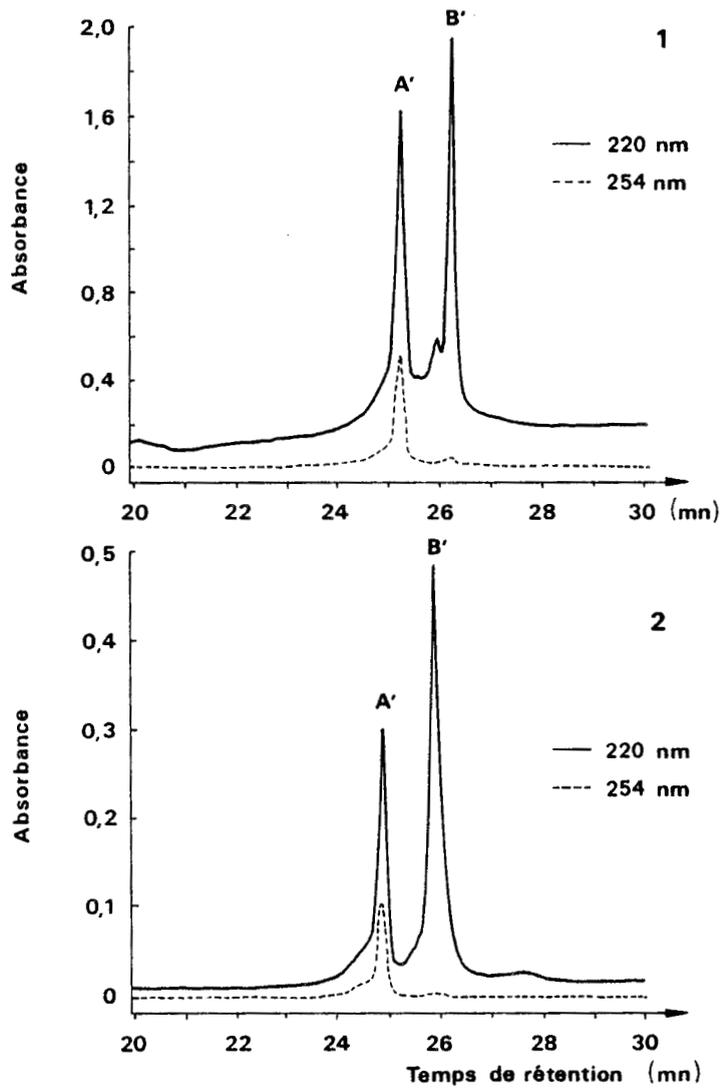


Figure 58 : Profils d'éluion de chromatographie par HPLC sur colonne de phase inverse des metalloprotéines de limande prélevée en milieu naturel, séparées sur colonne DEAE en position A (1) et C (2).

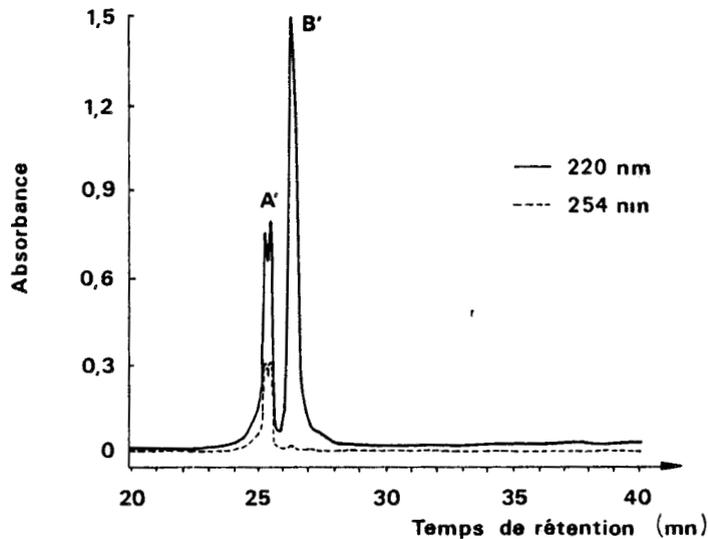


Figure 59 : Profil d'éluion de chromatographie par HPLC sur colonne de phase inverse de metalloprotéines de limande-sole contaminée en laboratoire, séparées sur colonne DEAE en position D.

par réactivité de l'Ac, est de 221 ng contre 556 ng dans le pic B'. D'après les quantités de protéines évaluées par la mesure de l'absorbance, si l'Ac réagissait de façon similaire vis-à-vis des protéines des deux pics, 385 ng de "MT" devraient être détectées dans les protéines du pic A'.

D'après les résultats d'analyses d'acides aminés, le pic B' possède 22,5% de cystéine alors que le pic A' n'en contient que 7,7% (tableau 28). Aucun acide aminé aromatique (Tyrosine, Phenylalanine) n'est détecté dans ces échantillons.

Le pic élué en position B' doit être exclusivement constitué de MT puisque pour 7,25 µg de protéines environ, environ 7,15 µg de "MT" sont dosées par DPP. Par contre, seulement 1,59 µg de "MT" sont détectées par RIA. Le dosage par immunologie sous-estime donc les quantités réelles de MT. Cette différence est due au fait, qu'en milieu acide, les MT devenues des apo-thionéines, dépourvues de métal, perdent leurs propriétés d'immunoréactivité (voir chapitre V).

Les protéines éluées en position A et B sur les profils DEAE (isoforme 1) présentent après chromatographies sur colonne en phase inverse des profils d'éluion identiques à celles de l'isoforme 2. La nature de ces protéines doit donc être comparable, bien que leurs charges ioniques soient différentes.

Pour les échantillons provenant de limande "naturelle", les métalloprotéines séparées sur colonne DEAE en position A et C, présentent des profils d'éluion en phase inverse qui sont comparables entre eux et à ceux obtenus à partir de limandes "contaminées" (figure 58) : en position A', un pic apparaît possédant une absorbance à 254 nm ; ce pic symétrique semble être constitué d'une seule protéine. En position B', un pic apparaît dépourvu d'absorbance à 254 nm.

L'importance respective de ces deux pics peut varier selon l'échantillon de poisson analysé. On a constaté que ces variations ne sont pas liées à l'âge du poisson.

La métalloprotéine éluée en position B sur colonne DEAE lorsque le surnageant a été saturé par du Cd, se sépare également en deux pics A' et B', comparables à ceux des échantillons de référence (non saturés par du Cd).

Nous avons également vérifié avec plusieurs échantillons que le contenu en cystéine (déterminé par DPP) des fractions éluées en A' et B'

est supérieur dans le pic B' alors que les teneurs en protéines sont supérieures dans le pic A'. La protéine contenue dans le pic B' est donc plus riche en cystéine que celles du pic A'.

En conclusion, on peut noter que chaque isoforme de métalloprotéine (A ou B et C) séparé sur colonne DEAE, possédant donc une charge ionique différente, n'est pas constitué par une seule protéine mais par deux ou davantage, éluées au niveau des pics A' et B' en phase inverse. Le temps de rétention du pic B' est supérieur à celui du pic A'. La protéine contenue dans les fractions du pic B' est donc plus hydrophobe que celle(s) du pic A'. Les données concernant les propriétés d'absorbance et d'immunoréactivité ainsi que le contenu en cystéine (déterminé par analyse d'acides aminés ou par DPP) convergent toutes et prouvent que le pic B' est constitué de MT. Les caractéristiques chromatographiques des protéines éluées au niveau des pics A' et B' sont les mêmes quel que soit l'isoforme d'origine.

- Protéines hépatiques de limande- soles

Chez les limande-soles ("contaminées" ou "naturelles"), les fractions constituant les deux isoformes de métalloprotéines, élués au niveau des pics C et D sur les profils chromatographiques en DEAE, présentent des profils d'éluion qui sont comparables après chromatographie sur colonne en phase inverse (figure 59). Chaque isoforme est séparé en deux pics majeurs qui sont dénommés A' et B' car leur temps de rétention sont similaires à ceux des échantillons de limandes. Les propriétés d'absorbance à 254 nm et la tendance à se subdiviser de ces pics A' et B' sont également comparables à ceux des échantillons de limandes.

Les fractions du pic B' sont toujours plus riches en cystéine que celles du pic A' (déterminées par DPP). Les teneurs en cystéine de ces protéines varient entre 70 et 100 % d'"équivalent MT" dans le pic B' contre une quantité non détectable à 40 % dans le pic A'.

La réactivité de l'Ac vis-à-vis des protéines du pic A' et B' d'une limande-sole "contaminée" a été testée sur des fractions provenant du pic D séparé sur colonne DEAE. Le pic A' de cet échantillon, se subdivisant nettement, le dosage RIA a été réalisé sur la première et la seconde partie du pic indépendamment. Par rapport aux contenus de ces fractions en protéines, l'Ac reconnaît davantage les protéines du pic B' puis

celles de la première partie du pic A', enfin celles de la seconde partie du pic A' (286 ng, 358 ng et 196 ng de "MT" estimées dans ces 3 échantillons contenant respectivement environ 1,2 µg, 4,32 µg et 3,20 µg de protéines).

D'après les analyses d'acides aminés réalisées sur ces mêmes échantillons (tableau 28), la cystéine représente 27% des acides aminés dans l'échantillon du pic B', 25% dans la fraction de la première partie du pic A' et n'est pas détectable dans la seconde partie du pic A'. Dans tous les cas, les protéines ne contiennent pas d'acides aminés aromatiques.

Les analyses d'acides aminés de différents échantillons de protéines du pic A' ont donné des résultats variables quant à la teneur en cystéine (9.5% et 17%).

Comme chez la limande, chaque MP de limande-sole élue en position C ou D sur colonne DEAE est constituée par deux protéines ou davantage, séparées au niveau des pics A' et B' en phase inverse, qui présentent les mêmes caractéristiques quel que soit l'isoforme d'origine. Le pic B' est constitué par une MT contenant 27% de cystéine ; le pic A' est constitué de plusieurs protéines dont probablement une MT étant donné les teneurs en cystéine relativement élevées.

- Comparaison des protéines hépatiques de limandes et de limande-soles

Les MP séparées sur colonne DEAE chez les deux espèces présentent des profils d'élution qui sont comparables sur colonne en phase inverse ; plusieurs pics sont élués en position A' et B'. Chacun des pics séparés sur colonne DEAE est donc constitué par plusieurs protéines dont les polarités sont différentes. Chez les deux espèces, la protéine contenue dans le pic B' est constituée par de la MT : en effet, en milieu acide, les métaux liés aux MT sont remis en solution et la Cd-thionéine devenue apo-thionéine n'absorbe plus à 254 nm comme la MT commerciale de foie de lapin. L'Ac réagit davantage vis-à-vis de cette protéine que vis-à-vis de celles contenues dans le pic A'. Le contenu en cystéine, déterminé par DPP, de cette fraction est souvent supérieur à celui des fractions du pic A'. Enfin, les analyses d'acides aminés ont permis de confirmer qu'il s'agissait bien de MT puisque chez la limande, cette protéine contient 22% de cystéine et que chez la limande-sole, elle en contient 27%. Il est

possible que l'une des protéines du pic A' soit également une MT ; la présence de protéines "contaminantes" expliquerait les teneurs faibles ou variables des échantillons analysés, à moins qu'il ne s'agisse de protéines relativement chargées en cystéine.

D'autre part, lorsque les fractions éluées en DEAE qui ne présentent pas d'absorbance à 254 nm et ne contiennent pas de métal, sont analysées sur colonne en phase inverse, les pics apparaissent tardivement: le temps de rétention de la protéine de limande apparaissant après 15 minutes en DEAE est de 32 minutes sur phase inverse ; chez la limande-sole, la protéine éluée après 11,5 à 12 minutes en DEAE a un temps de rétention de 37 minutes. La ou les protéine(s) constituant ces pics présentent une très faible réactivité avec l'Ac (les 23 µg ou 5 µg de protéines de ces pics ne sont pas reconnues par l'anticorps). Ce résultat montre que l'Ac présente une spécificité marquée vis-à-vis des protéines complexant les métaux.

2. Discussion

Dans les surnageants hépatiques de limandes et limande-soles contaminées en laboratoire par injections intrapéritonéales de Cd, la majorité du Cd est dosée au niveau des protéines de poids moléculaire (PM) égal à environ 10 kDa (pic2), ce qui correspond au PM des métallothionéines (MT). Simultanément, on observe une absorbance à 254 nm importante et un rapport abs.254 nm/abs.280 nm qui augmente quand les fractions contiennent davantage de métal, ce qui est dû aux liaisons Cd-thionéines (KAGI et NORDBERG, 1979). Le contenu de ces fractions en groupements SH (caractéristiques des MT dont 30% des acides aminés sont constitués par de la cystéine) augmente parallèlement avec le contenu métallique. D'après ces divers résultats, on émet l'hypothèse que les métalloprotéines (MP) de ces poissons contaminés en laboratoire sont probablement des MT, hypothèse qui sera à confirmer lors des étapes ultérieures de caractérisation. On peut préciser qu'à ce stade de purification, chez le flet (*Platichthys flesus*) contaminé par injection de Cd, les protéines de PM de 10 kDa environ isolées par filtration sur gel, peuvent contenir jusqu'à 20% de cystéine (RICHARD et al., à paraître).

Après filtration sur gel, les surnageants hépatiques de poissons

provenant du milieu naturel présentent au niveau des pics 2 des teneurs en Zn et Cu qui varient selon les individus et les espèces et une absorbance à 254 nm qui augmente quand il y a eu ajout de Cd (dans les surnageants ou les fractions éluées). Nous avons vérifié la réversibilité de la liaison Cd-thionéine puisqu'en milieu acide, l'absorbance à 254 nm n'est plus détectable. La saturation par le Cd des surnageants a permis également de montrer que l'affinité des métaux pour les groupements sulfhydryles diffère selon les éléments métalliques puisque le Zn est substitué par le Cd de façon stœchiométrique mais pas le Cu. Cette hiérarchie dans la capacité des métaux à se lier aux MT, due aux valeurs des constantes d'affinité (WAALKES et al., 1984), a d'ailleurs été exploitée pour quantifier les MT par la technique de saturation par le Cd ou le Hg radioactifs (EATON et TOAL, 1982 ; ONOSAKA et CHERIAN, 1982). Bien que ces propriétés d'absorbance et de compétition entre les métaux pour la liaison avec les protéines soient caractéristiques des MT, la présence de MT est difficile à détecter, par les analyses d'acides aminés, lorsque les protéines sont uniquement séparées en fonction de leur PM.

D'autre part, les teneurs élevées en cystéine détectées au niveau des protéines de faible PM (pic3) doivent correspondre au glutathion. Ce composé n'est pas associé à du Cd, comme le constatent également WOFFORD et THOMAS (1984) dans le foie de mullet (*Mugil cephalus*). Chez cette espèce, les teneurs en glutathion augmentent en même temps que la synthèse des composés de 10 kDa environ, tandis que dans les foies de rat, une relation inverse est observée entre les teneurs en MT et celles du glutathion (WONG et KLAASSEN, 1981). Ces auteurs suggèrent que l'augmentation du taux de MT peut être un mécanisme compensatoire pour maintenir un niveau constant de groupements sulfhydryles après la diminution du taux de glutathion dans les rats exposés au Cd ; or, la synthèse de MT n'est pas précédée par une diminution des teneurs en glutathion. La relation entre ces deux types de composés reste donc à éclaircir.

- Quelle que soit l'espèce et le type de contamination subie par le poisson, les composés isolés par filtration sur gel puis par DEAE sont séparés en deux pics essentiellement (un troisième pic est parfois visualisé pour les échantillons de limandes "contaminées" comme chez le

flet (RICHARD et al., à paraître). Au niveau de ces deux pics, les différents métaux sont élués simultanément et l'absorbance à 254 nm est toujours élevée lorsqu'il s'agit d'échantillons de poissons contaminés au Cd. A ce stade de purification, les MP synthétisées par injection de sels métalliques (Zn ou Cd) chez diverses espèces de poissons sont identifiées comme étant des MT (OVERNELL et al., 1988 ; OLSSON et HAUX, 1985 ; KITO et al., 1986).

D'après nos résultats, le type de contamination subie par les limandes et limande-soles n'intervient pas sur la nature des MP induites car les charges ioniques des deux protéines sont identiques pour les échantillons de poissons contaminés en laboratoire par du Cd et prélevés en milieu naturel. Chez le flet contaminé par injections de Cd, le temps d'éluion des deux MP majeures séparées en DEAE sont également identiques à ceux des deux MP de flet "sain" (RICHARD et al., à paraître). Il était, cependant, nécessaire de vérifier l'homologie des MP chez les poissons "contaminés" et "naturels" car si la contamination par injection de Cd ou de Zn induit la synthèse de MT chez de nombreux organismes, l'intoxication par des voies naturelles n'aboutit pas systématiquement à la synthèse de MT. En effet, chez la truite (*Salmo gairdneri*), des MP différentes des MT peuvent être synthétisées, en réponse à la concentration et à l'élément métallique présent dans l'eau (THOMAS et al., 1983 ; KAY et al., 1986). Pourtant, d'après OLSSON et al. (1988), la synthèse de MT est induite par le Cd chez cette même espèce exposée à du Cd dans l'eau. On peut également ajouter que chez l'anguille et la perche ayant subi des intoxications chroniques en milieu naturel, le Cd se lie aux MT (NOËL-LAMBOT et al., 1978 ; OLSSON et HAUX, 1986).

L'un des deux pics visualisé sur les profils DEAE est commun aux limandes et limande-soles (pic C) ; il est donc constitué de protéines dont la charge ionique est identique chez les deux espèces. Les protéines constituant ces pics sont qualifiées d'isoformes de métalloprotéines. Dans la littérature, le terme isoforme est employé pour faire la distinction entre les différentes MT, en fonction de leur position sur le profil d'éluion quand elles sont chromatographiées sur colonne échangeuse d'anions.

Chez les deux espèces de poissons plats, les isoformes hépatiques sont donc présents au nombre de deux, ce qui est le cas chez de

nombreuses espèces : le foie de lapin présente également deux isoformes de MT dont les charges ioniques sont plus faibles que celles des MP de poisson. Le rat, le crabe (*Scylla serrata*), la truite (*Salmo gairdneri*) et le poisson rouge (*Carassius auratus*) possèdent également deux isoformes, tandis que le poisson-chat, la petite roussette et le carrelet n'en présentent qu'un seul (RICHARDS et COUSINS, 1977 ; OLAFSON et al., 1979 ; OLSSON et HAUX, 1985 ; YAMAMURA et SUZUKI 1983 ; CHATTERJEE et MAITI, 1987 ; OVERNELL et COOMBS, 1979 ; HIDALGO et FLOS, 1986). D'après KLAVERKAMP et al. (1984), ces variations pourraient être liées à des procédures d'isolement différentes.

SUZUKI et YAMAMURA constatent, en 1980, que les proportions relatives des deux isoformes varient et suggèrent que ces variations sont attribuables à des fonctions métaboliques différentes. En fait, les proportions relatives des différentes isoformes de MT dépendent de l'espèce, du tissu, de l'état physiologique et de l'exposition métallique mais l'isoforme MT2 est souvent prédominant (DUNN et al., 1987). Nos résultats sont en accord avec ces données car les isoformes 2 de limande-sole (pic D) et plus particulièrement de limande (pic C) sont plus importants que les isoformes 1.

Dans le foie de rat, les isoformes 1 et 2 ont une affinité différente pour la liaison du Zn (WINGE et MIKLOSSY, 1982). Pourtant, d'après nos résultats, les deux isoformes de MP ont la même affinité pour le Zn et ne lient pas préférentiellement un métal ou un autre.

L'utilisation de β -mercaptoéthanol est préconisée afin d'éviter les problèmes d'oxydation des MT (MINKEL et al., 1980). La protéine oxydée peut être éluée à une force ionique plus faible que la protéine native, ceci à cause de la formation de ponts disulfures. La force ionique de la molécule peut également devenir supérieure à celle d'origine ; dans ces conditions, l'oxydation des groupements sulfhydryles conduit à la formation d'acide cystéique (OVERNELL, 1984). D'après cet auteur, les MT d'invertébrés, tels que le crabe (*Cancer pagurus*), sont toutefois plus sensibles que les MT de vertébrés. En effet, les MT de limande-soles ne sont pas sujettes à ce phénomène d'oxydation puisque les résultats d'analyses réalisées avec ou sans β -mercaptoéthanol sont identiques. Par contre, chez la limande contaminée par injection de Cd, un troisième pic

apparaît parfois (en position B), dont le temps de rétention est intermédiaire à celui des deux autres pics ; il est associé également à une absorbance à 254 nm élevée et à des teneurs métalliques importantes. Ce troisième pic n'est pas considéré comme un troisième isoforme ; il doit plutôt correspondre à un transfert d'une partie des MP préexistantes, dû à la nature du métal complexé et/ou à un éventuel problème d'oxydation (ce qui n'a pû être vérifié).

Les profils d'éluion obtenus en DEAE à partir de surnageants de limande et limande-sole nâtifs ("témoins") et saturés par du Cd, sont différents. Chez la limande-sole, les échantillons "témoins" présentent deux isoformes en DEAE ; lorsqu'ils sont saturés par du Cd, un troisième pic apparaît en position intermédiaire. L'ajout de β -mercaptoéthanol inhibe l'apparition de ce troisième pic ; son existence doit donc être liée à un phénomène d'oxydation ou de modification de charge ionique provoquée par l'ajout de Cd. Les composés de ce pic correspondent probablement à des formes modifiées de l'une ou plusieurs métalloprotéines nâtives.

Des phénomènes comparables ont été mis en évidence à partir de MT de rat. Les surnageants hépatiques de rat dont le Zn lié aux MP a été substitué par du Cd ajouté "in vitro" présentent en DEAE, trois pics au lieu de deux détectés pour l'échantillon natif ; le pic supplémentaire a un temps de rétention intermédiaire à ceux des deux isoformes de MT. Etant défini qu'il existe deux isoformes de MT chez les rongeurs, les auteurs en déduisent que le troisième pic correspond uniquement à un artéfact (LEHMAN et KLAASSEN, 1986). La substitution du Zn lié aux MT par le Cu provoque une oxydation intramoléculaire des groupements SH des MT et les MT oxydées sont réduites par le β -mercaptoéthanol (SUZUKI et MAITANI, 1981). D'autre part, d'après BAER et THOMAS (1991), la nature des MP d'ovaires est différente chez les deux espèces de poissons (*Micropogonias undulatus* et *Cynoscion nebulosus*). Or la première espèce a été contaminée en laboratoire alors que la seconde a été prélevée en milieu naturel et les échantillons ont été saturés par du Cd "in vitro". Il est donc probable que la différence établie concernant la nature des MP de ces deux espèces soit liée au fait que les échantillons n'ont pas subi le même traitement.

La saturation des surnageants par le Cd est donc utile pour détecter la présence de MT dans des échantillons provenant du milieu naturel analysés par filtration sur gel. Cependant, alors qu'elle est utilisée par les auteurs cités précédemment, cette méthodologie ne nous semble pas adaptée à la chromatographie sur DEAE, puisqu'elle entraîne l'apparition de pics supplémentaires.

D'autre part, les profils d'élution obtenus par chromatographie HPLC sur colonne DEAE d'échantillons de limandes jeunes et plus âgées sont comparables. Pourtant, l'âge peut affecter les proportions relatives des deux isoformes de MT. Dans le foie du fœtus de rat, l'isoforme 2 de MP est prédominant alors que chez les adultes, les deux MP sont d'importance équivalente (WHANGER et al., 1981). Chez la grenouille (*Rana catesbeiana*), les proportions des deux isoformes s'inversent entre larves et adultes (SUZUKI et AKITONI, 1983). Il est probable que si l'âge peut avoir une influence sur les proportions des isoformes de métalloprotéines de poissons, ce phénomène n'a pu être mis en évidence car les poissons les plus jeunes étaient quand même âgés de 1 an.

Lorsque les isoformes de MP sont chromatographiés sur colonne en phase inverse, deux pics sont élués (en position A' et B'). Les temps de rétention de ces deux pics sont similaires quel que soit l'échantillon analysé (isoforme 1 ou 2 provenant de limande ou de limande-sole), ce qui est en accord avec les données de RICHARD et al. (à paraître) concernant le flet.

Que les MP de poissons soient éluées sous forme de deux pics distincts en phase inverse n'est pas surprenant puisque nous avons remarqué que dans les mêmes conditions, la MT commerciale de foie de lapin est séparée en trois pics. Ces pics peuvent être subdivisés davantage lorsque les conditions chromatographiques sont modifiées, ce qui est confirmé par les données de WAALKES et PERANTONI en 1986.

Les propriétés chromatographiques de la MT de lapin sont plus proches, de celles de la MP éluee en position B' que de celles des constituants du pic A' (temps de rétention, absorbance à 254 nm).

Les analyses d'acides aminés des fractions du pic B' révèlent un contenu de 22% de cystéine pour l'isoforme 2 de limande (pic C en DEAE) et 27% pour l'isoforme 2 de limande-sole (pic D en DEAE). Ces protéines sont dépourvues d'acides aminés aromatiques (Tyr et Phe), et les acides aminés

Serine et Glycine sont relativement abondants (environ 15 à 20% cumulés). Cette composition d'acides aminés est similaire à celle de la MT de rein de cheval et aux MT isolées chez différentes espèces de poissons (tableau 29).

Tableau 29 : Composition en acides aminés des MT de différents organismes et de la chélatine de rat (exprimées en moles %)

Acides aminés	Limande	Limande-sole	Carpe 1		Truite 2		Cachalot 3	Rat 4		Cheval 1	Rat 5
	Foie MT2	Foie MT2	Foie		Foie		Foie MT	Foie		Rein MT	Foie Chélatine
			MT1	MT2	MT1	MT2		MT1	MT2		
Asp	9,52	9,49	8,47	9,10	10,1	12,5	12,4	7,11	6,74	5,0	11,8
Thr	8,03	10,05	7,10	8,47	6,8	7,3	5,3	6,22	3,86	1,8	7,8
Ser	13,26	8,25	11,23	10,13	14	15,8	8,2	16,38	14,07	11,9	6,4
Glu	7,11	7,66	3,11	3,50	4,2	3,5	10,2	2,79	6,32	4,7	13,6
Pro	6,92	8,09	4,89	4,16	3,1	3,0	3,3	3,99	4,86	2,9	3,4
Gly	12,70	10,15	10,64	11,13	9,6	9,8	11,1	9,71	7,34	9,2	9,4
Ala	2,96	2,76	5,82	5,59	4,8	4,9	9,2	5,56	8,14	11,6	8,0
Cyst*	22,49	26,90	34,24	31,90	32,8	28,4	12,1	29,3	27,2	33,9	6,8
Val	2,36	3,19	1,98	2,35	1,9	1,7	4,6	3,17	2,37	4,5	6,1
Met	0,87	1,24	1,01	1,68	1,3	2,2	0	1,99	1,75	1,5	0,4
Ileu	0,56	0,61	0,11	0,99	0	0,1	1,9	0,34	1,75	0	2,0
Leu	0,64	1,23	0	0	0	0,1	4,3	0,25	1,03	0	6,5
Tyr	0	0	0	0	0	0	0,3	-	-	0	0,5
Phe	0	0	0	0	0	0	2,05	0,15	0,54	0	3,5
His	0,61	0,52	0	0	0	0	0	-	-	0	0,9
Lys	10,93	9,86	11,37	10,09	10,4	10,8	12,6	11,86	12,49	11,7	11,4
Arg	0	0	0	0	0	0	2,4	0,15	0	1,9	1,8

* : Déterminé sous forme d'acide cystéique

- 1 : D'après KITO et al., 1986
- 2 : D'après OLSSON et HOGSTRAND, 1987
- 3 : D'après RIDLINGTON et al., 1981
- 4 : D'après BREMNER et DAVIES, 1975
- 5 : D'après IRONS et SMITH, 1977

On remarque, d'après le tableau 28, que l'ensemble des échantillons analysés présente également de fortes teneurs en acides aspartiques et glutamique (environ 25% cumulés); ces proportions ont tendance à diminuer lorsque les échantillons s'enrichissent en cystéine. Ces acides aminés, notamment l'acide aspartique sont généralement bien représentés dans les MT hépatiques de poissons (carpe, truite) (KITO et al., 1986 ; OLSSON et HOGSTRAND, 1987). L'acide glutamique est l'acide aminé prédominant dans les MP de gonades de mammifères (WAALKES et PERANTONI, 1986) et les MP d'ovaires de poissons contiennent peu de cystéine et beaucoup d'acides aspartique et glutamique (BAER et THOMAS, 1991). D'après JACOBSON et TURNER (1980) (cités par BAER et THOMAS, 1991), le Zn peut interagir avec les groupements carboxyliques mais avec une avidité moindre que pour la cystéine. Des protéines riches en ces acides aminés pourraient donc être

qualifiés de MP. RIDLINGTON et al., ont remarqué, en 1981, que les MP de différents organismes marins possèdent parfois une composition en acides aminés qui se rapproche davantage de celle de la chélatine que de celle des MT. Cette similitude est établie du fait que la chélatine est une protéine riche en acides aminés dicarboxyliques (WINGE et al., 1975 ; IRONS et SMITH, 1977).

La teneur en cystéine du pic élué en position A' peut varier même lorsqu'il s'agit d'échantillons provenant du même isoforme (tableau 28). Il semblerait donc qu'une MT combinée à d'autre(s) protéine(s) seraient éluées à ce niveau, d'où des teneurs en cystéine plus faibles que dans le pic B', et une absorbance à 254 nm toujours persistante. On pourrait également envisager, comme l'a fait RIDLINGTON et al. (ci-dessus) que ces composés soient des protéines plus proches de la chélatine que des MT, du fait de leur richesse en acides aminés dicarboxyliques. Cependant, le fait qu'elles soient éluées simultanément aux MT en DEAE et qu'elles présentent parfois un contenu élevé en cystéine chez la limande-sole (25%) font que cette hypothèse est peu vraisemblable. Des études complémentaires seraient nécessaires afin de caractériser plus précisément ces protéines.

CHAPITRE V

TECHNIQUES DE QUANTIFICATION
DES METALLOTHIONEINES

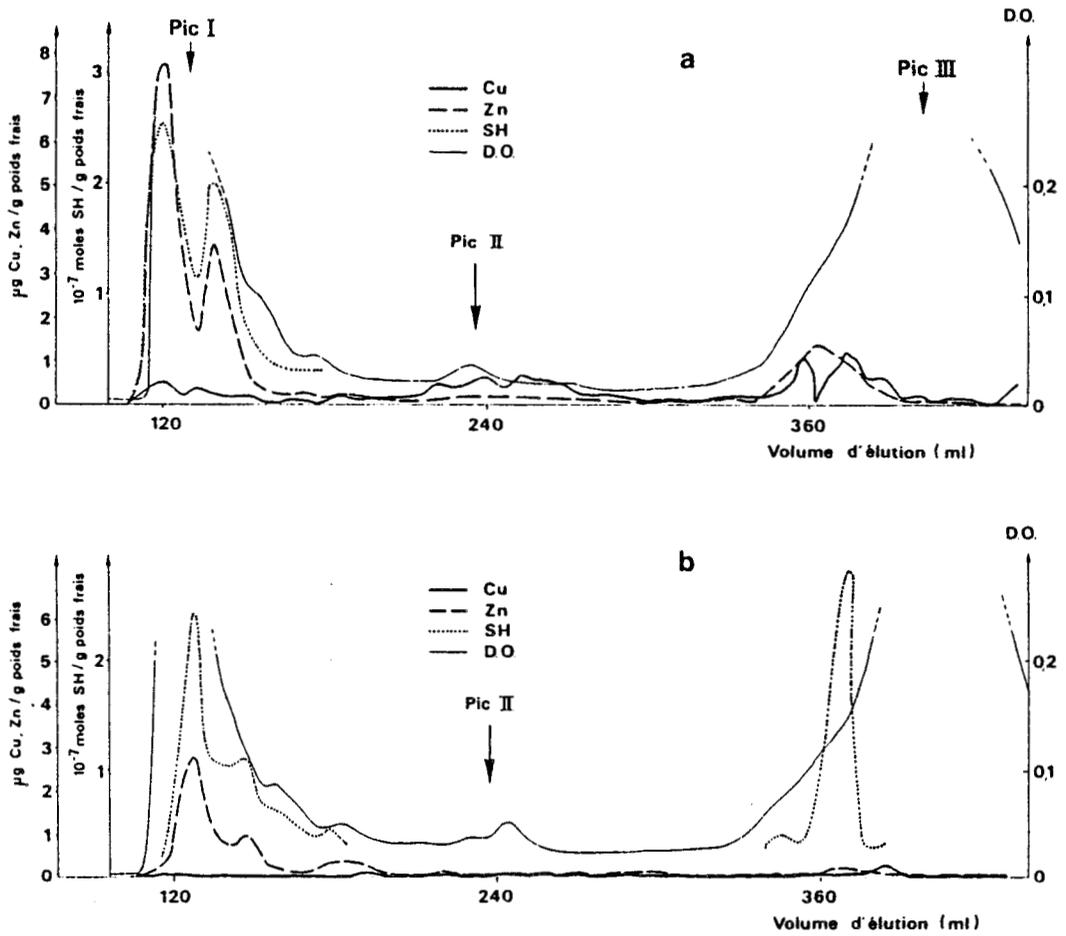


Figure 60 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 de surnageants hépatiques de poissons prélevés en milieu naturel.

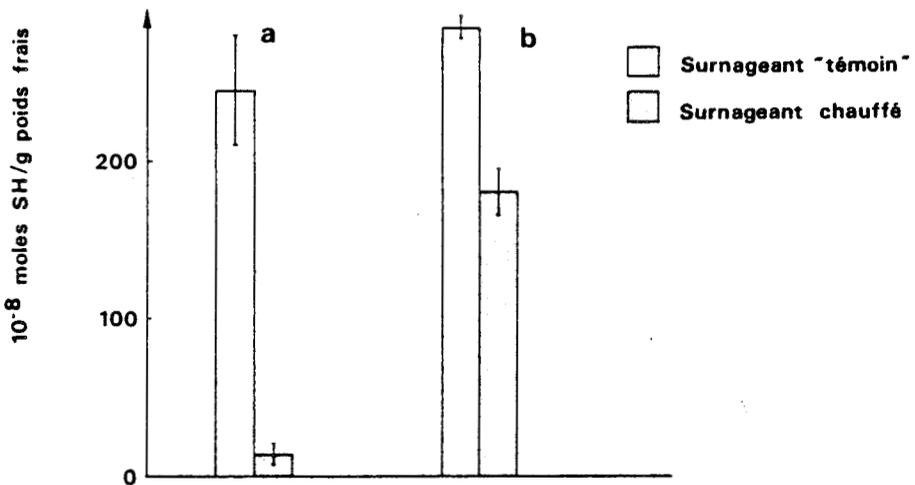


Figure 61 : Teneurs en groupements SH, déterminés par colorimétrie, de surnageants hépatiques "témoins" et chauffés provenant de poissons prélevés en milieu naturel. (Les surnageants "témoins" correspondent aux échantillons présentés sur la figure 60).

CHAPITRE V : TECHNIQUES DE QUANTIFICATION DES METALLOTHIONEINES

Dans ce chapitre, sont présentées les différentes techniques utilisées pour la quantification des MT. Le but de cette étude était d'utiliser une méthode rapide, facile à mettre en oeuvre car susceptible d'être employée ultérieurement dans le cadre de réseaux de surveillance de la qualité du milieu naturel. Les techniques pour lesquelles les étapes de chromatographie sont indispensables ou ne permettant pas de quantifier l'ensemble des MT (telle que la technique de saturation des MT par le Cd) ont donc été exclues. Les méthodes ne nécessitant, préalablement au dosage, que la préparation de surnageants apparaissaient donc être les plus intéressantes.

1. Résultats

1.1. Dosage des MT par mesure colorimétrique des SH

Le but de ce dosage est de quantifier directement les groupements thiols présents dans des échantillons de surnageants hépatiques. Afin de doser exclusivement les groupements SH des MT, les surnageants sont chauffés puis filtrés. Parallèlement aux dosages des SH dans les différents types de surnageants ("témoin", chauffé, chauffé et filtré), ces mêmes échantillons sont chromatographiés par filtration surgel et le dosage colorimétrique est réalisé dans chaque fraction afin de contrôler la répartition des résidus SH dans les différentes gammes de PM.

Deux surnageants hépatiques chromatographiés sur colonne de gel filtration (figure 60) possèdent au niveau des molécules de haut poids moléculaire (pic1) de fortes teneurs en groupements sulfhydryles. La dénaturation à la chaleur va avoir pour but d'éliminer ces grosses molécules. La figure 61 illustre le fait que ce traitement provoque effectivement l'élimination d'une grande partie des groupements SH contenus dans les surnageants. Le premier échantillon (figure 60a) ne possède pas de SH en quantité détectable dans les fractions contenant des molécules de PM moyen (pic2) et faible (pic3), c'est pourquoi l'échantillon chauffé (figure 61a) contient très peu de SH par rapport à l'échantillon témoin. Par contre, le deuxième échantillon analysé (figure 60b) présente des teneurs élevées en SH dans les fractions du pic3. Ces groupements SH doivent persister après le chauffage et correspondre aux teneurs élevées dosées dans

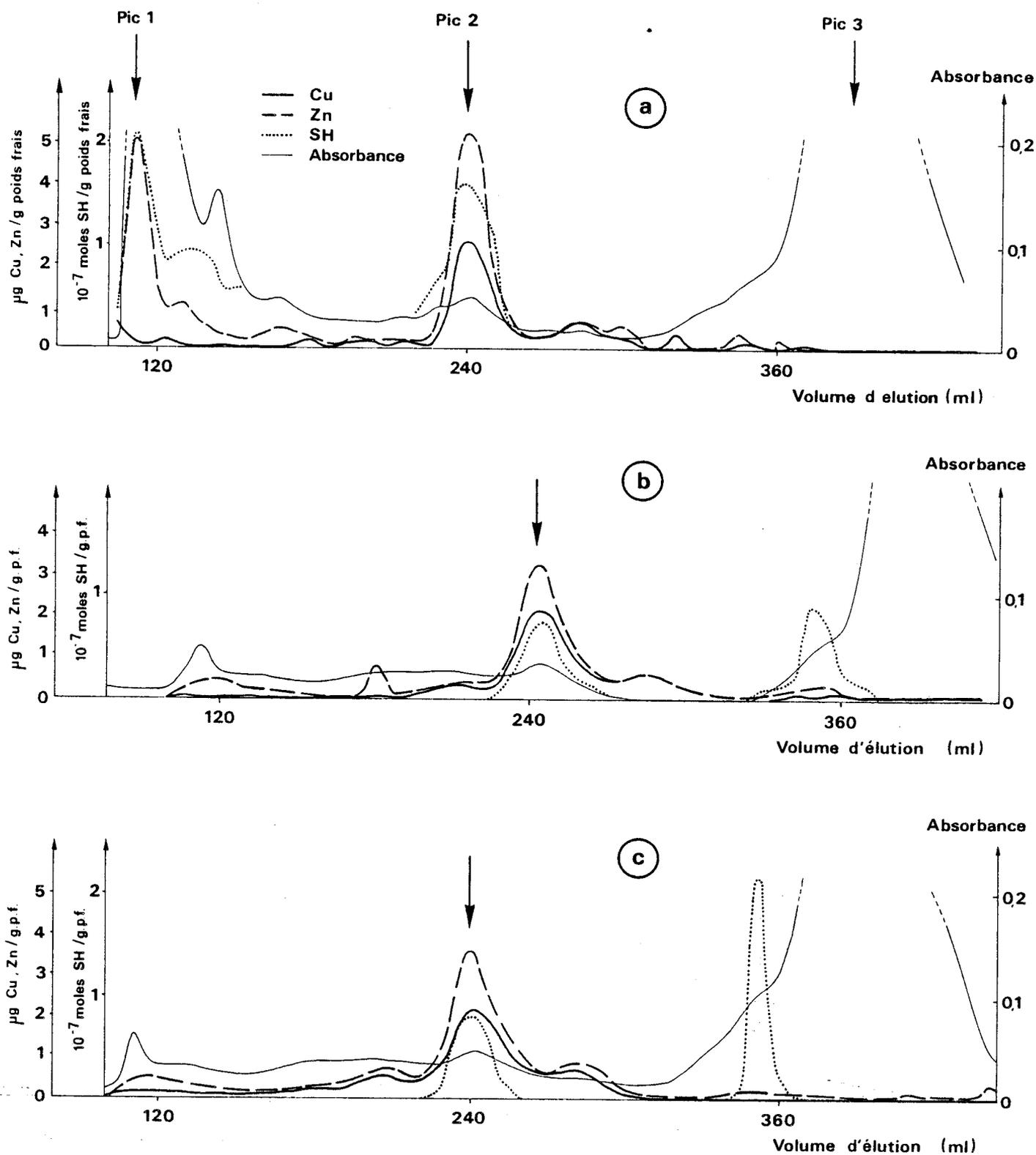


Figure 62 : Profils d'élution de chromatographies de filtration sur gel Sephadex G75 d'un surnageant hépatique de limande.

- a- Surnageant "témoin"
- b- Surnageant chauffé
- c- Surnageant chauffé et filtre.

le surnageant chauffé (figure 61b). Dans ces deux échantillons, les quantités de groupements SH représentant les MT sont en dessous du seuil de détection qui est de l'ordre de 0.62 µg de MT/ g de foie soit, dans le cas de ces échantillons chromatographiés, environ 14 µg de MT/g de poids frais par fraction analysée.

Sur la figure 62, les profils d'éluion de chromatographies de surnageants "témoin", "chauffé" et "chauffé + filtré" sont représentés. Le chauffage élimine bien les protéines de haut PM mais provoque l'apparition de groupements thiols dans le pic3 probablement par dégradation des molécules de haut PM (figure 62b) ; or ces groupements SH ne sont pas éliminés par la filtration (figure 62c).

Cette technique de filtration par centrifugation sur système Centrisart n'est pas adaptée pour les surnageants qui, bien que chauffés et limpides, colmatent la membrane. N'ayant pu disposer de système de filtration plus performant pour ce type d'analyse, la quantification des MT par dosage des groupements thiols n'a pas été poursuivie.

1.2. Dosages des MT en immunologie

Les expériences de radioimmunologie (RIA) ont été réalisées d'après le protocole et avec l'anticorps (Ac) qui a été utilisé pour le dosage des MT hépatiques de perche par HOGSTRAND et HAUX (1990). L'utilisation de ce même Ac en ELISA a nécessité la mise au point de la technique dans notre laboratoire.

La première étape consiste, bien sûr, à vérifier que l'Ac anti-MT de perche peut être utilisé pour quantifier les MT hépatiques de limandes, limande-soles et morues. L'utilisation de cet Ac pour doser des MT d'autres espèces de poissons sous-entend de se référer aux courbes étalons des espèces étudiées. Les teneurs en MT des échantillons destinés à réaliser les courbes standards en immunologie ont été déterminées par DPP.

1.2.1. Dosages en RIA.

D'après la figure 63, les courbes de dilution des surnageants des trois espèces (limande-sole et morue) révèlent que l'Ac reconnaît bien les MT de ces poissons tout en présentant une réactivité beaucoup plus importante vis à vis des MT de perche.

En ce qui concerne les caractéristiques de la courbe standard d'échantillon

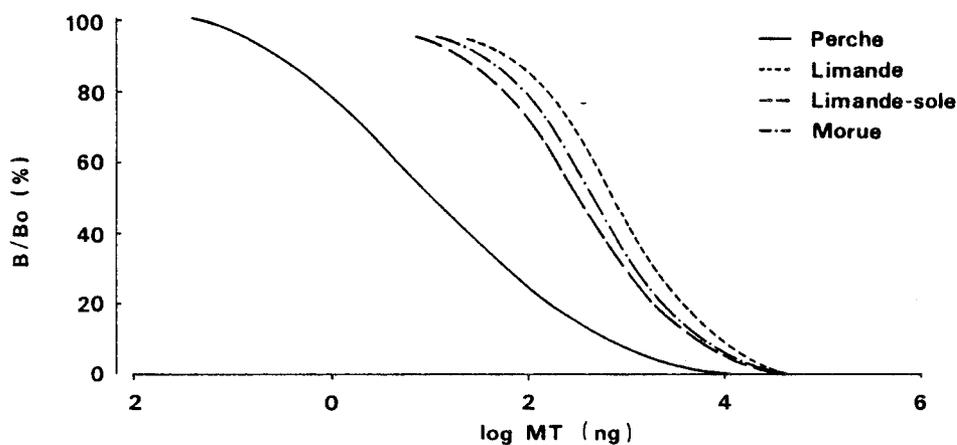


Figure 63 : Courbe de dilution de surnageant hépatique de perche en RIA et inter-réactivité de l'Ac anti-MT de perche avec les MT hépatiques de limande, limande-sole et morue. Données exprimées en % de B/Bo, en fonction du log des MT contenues dans les échantillons. B = quantité de traceur liée à l'Ac en présence d'Ag ; Bo = quantité de traceur liée à l'Ac en l'absence d'Ag.

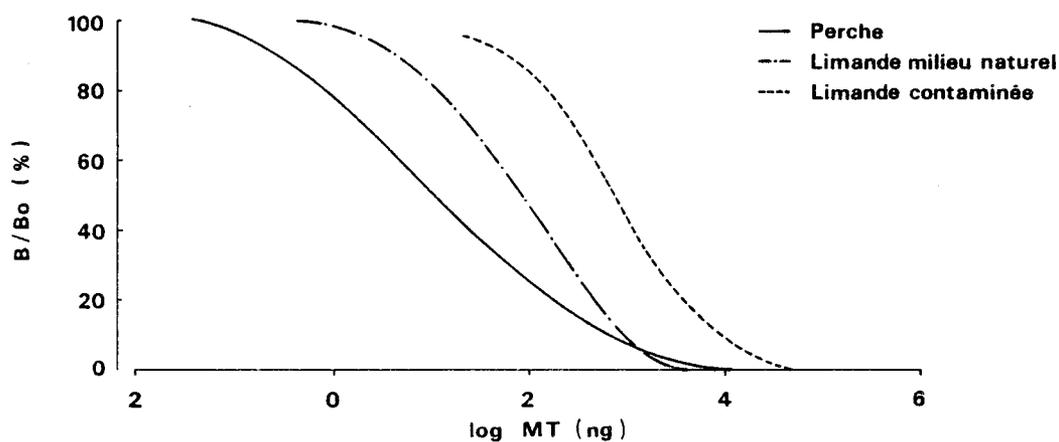


Figure 64 : Courbes de dilutions de surnageants hépatiques de perche et limande provenant du milieu naturel et de limande contaminée en laboratoire.

Espèce	DE 50	DE 50	Gamme d'utilisation	Teneur minimale de MT détectée
Perche	log 1	10	0,15 à 250	9 ng/g
Limande	log 2,9	794	167 à 3633	10 µg/g
Limande-sole	log 2,5	316	60 à 1880	3,6 µg/g
Morue	log 2,7	500	96 à 2323	5,8 µg/g

Tableau 30 : Caractéristiques des courbes de dilutions de surnageants hépatiques de perche, limande, limande-sole et morue, obtenues en RIA. (DE 50 et gammes d'utilisation exprimées en ng de MT).

de perche, la "dose effective 50%" ou DE 50 et la gamme d'utilisation sont respectivement de log1 (soit 10 ng) et de 0.15 à 250 ng de MT (HOGSTRAND et HAUX, 1990). La courbe standard de perche apparaissant sur la figure 63 possède les mêmes caractéristiques, ce qui prouve que nos expériences de RIA ont bien été réalisées dans les mêmes conditions.

Les courbes étalon des trois autres espèces (figure 63) présentent des DE 50 dont les valeurs varient entre log 2.5 et log 2.9 environ. Les quantités de MT correspondant aux DE 50 et les gammes d'utilisation sont citées dans le tableau 30. Les teneurs minimales de MT hépatiques que l'on peut détecter sont donc de l'ordre de 10 µg/g de poids frais de foie chez la limande, 3.6 µg/g pour la limande-sole et 5.8 µg/g poids frais pour la morue contre 9 ng/g de foie pour la perche.

Les MT de limande, limande-sole et morue sont donc dosées avec une sensibilité et une précision moindres que les MT de perche. Les caractéristiques des courbes standards sont, néanmoins, suffisamment satisfaisantes pour utiliser cet Ac, d'autant plus que les teneurs en MT de nos échantillons s'avéreront être bien supérieures aux limites de détection définies. Elles pourront donc être quantifiées sans problème.

D'après la figure 64, on remarque que lorsque le poisson provient du milieu naturel ou lorsqu'il est issu d'une contamination en laboratoire, la réactivité de l'Ac vis-à-vis des MT hépatiques est différente. Alors que le DE 50 de la courbe de dilution du surnageant hépatique de l'échantillon provenant d'une contamination en laboratoire est 794 ng de MT (log 2.9), celle de l'échantillon prélevé en milieu naturel est de 100 ng de MT (log 2). La gamme de détection des MT dans ce second échantillon varie entre 11.22 ng et 457 ng environ. La quantité minimale de MT hépatiques détectée est de l'ordre de 0.67 µg/g de poids frais chez la limande prélevée en milieu naturel contre 10 µg/g de poids frais pour la même espèce intoxiquée en laboratoire.

Il convient de rappeler que l'Ac utilisé est spécifique des MT hépatiques de perche injectée par du Cd et du Zn, or l'échantillon de limande injectée par du Cd est essentiellement chargé en Cd tandis que l'échantillon de limande du milieu naturel est riche en Cu et Zn.

Le type de contamination subie par le poisson, c'est-à-dire la composition métallique des MT, influencerait donc la réponse immunologique. Par conséquent, l'optimisation de la quantification des MT hépatiques de

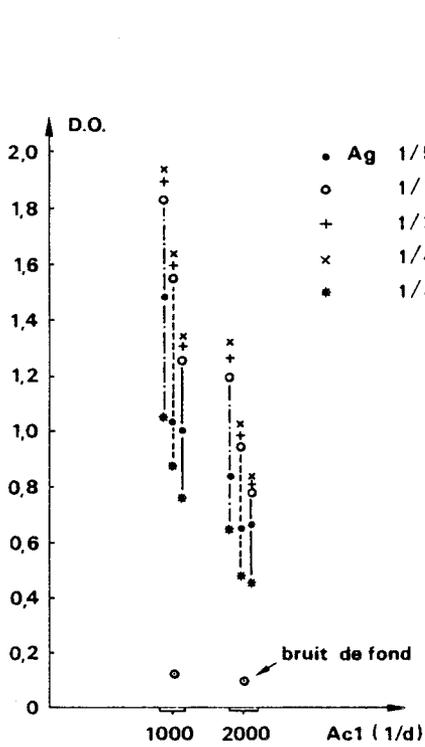


Figure 65a : Optimisation de la dilution de l'Anticorps 2. (D.O. mesurées en fonction de la dilution de l'Ac1, pour plusieurs dilutions d'Ag et d'Ac2).

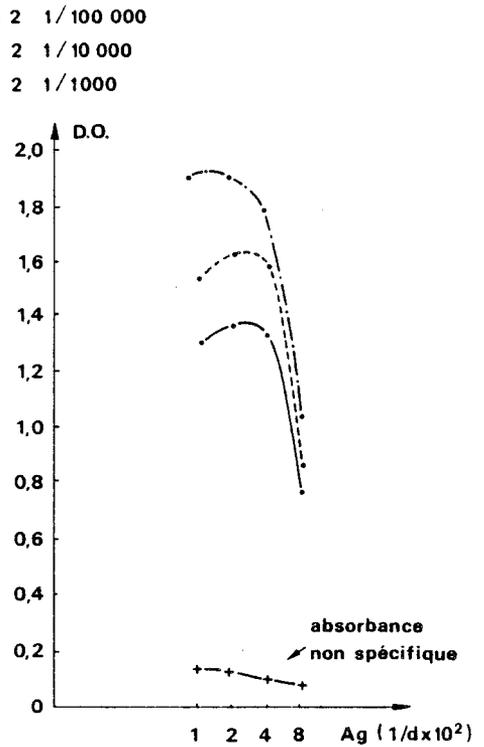


Figure 65b : Optimisation de la dilution de l'Anticorps 2. (D.O. mesurées en fonction de la dilution de l'Ag, pour plusieurs dilutions d'Ac2, l'Ac1 étant dilué au 1/1000).

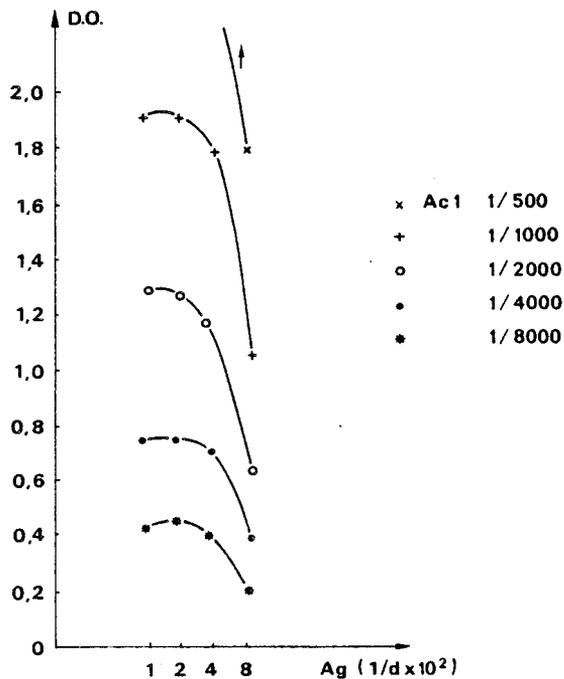


Figure 66 : Optimisation de la dilution de l'Anticorps 1. D.O. mesurées en fonction de la dilution de l'Ag pour plusieurs dilutions d'Ac1, l'Ac2 étant utilisé à une dilution au 1/1000.

poissons par dosage immunologique nécessite de se référer à une courbe de dilution de surnageant qui provienne, non seulement de l'espèce étudiée, mais aussi d'échantillons ayant subi le même type d'intoxication que les échantillons à doser. Or pour des raisons techniques, les teneurs en MT de nos échantillons provenant du milieu naturel, ont été déduites de courbes étalons réalisées à partir d'échantillons de poissons injectés en laboratoire. Etant donné le décalage entre les courbes de dilution des deux échantillons de limandes (figure 64), les teneurs en MT ont été surestimées. Cependant, ces valeurs sont fiables et comparables dans leur ensemble puisqu'elles ont toutes été déterminées dans les mêmes conditions.

D'autre part, nous avons montré (chapitre IV) que l'immunoréaction est faible vis-à-vis des protéines de PM égal à 10 kDa environ, ne complexant pas les métaux, et ayant été séparées des MT par chromatographies HPLC sur colonnes DEAE et phase inverse ce qui démontre la spécificité de l'Ac pour les MT.

1.2.2. Dosages en ELISA

- Mise au point de la technique ELISA

Afin de sélectionner les conditions optimales du dosage en ELISA, des combinaisons variées de différentes concentrations des deux Ac ont été testées avec le même échantillon de surnageant hépatique de limande (l'Ac1 correspond à l'Ac anti-MT de perche et l'Ac2 est un Ac anti-Immunoglobuline G de lapin marqué à la peroxydase).

Des dilutions de 1000, 10 000 et 100 000 de l'Ac2 ont été testées. L'Ac1 était utilisé au 1/2000 en RIA ; plusieurs dilutions, comprises entre 1/500 et 1/8000 ont été testées. L'ensemble des combinaisons croisées des différentes dilutions des deux Ac n'apparaît pas sur les figures 65 et 66. Les courbes présentées ont été sélectionnées pour la clarté des explications, parmi celles ayant amené au choix définitif des dilutions des deux Ac. La mesure de l'absorbance reflète directement la quantité de complexes Ag-Ac formés dans le puits.

Les résultats obtenus montrent que l'amplitude des variations de l'absorbance qui est mesurée en fonction de la concentration de l'Ac1 (figure 65a) et de l'Ag (figure 65b), est plus importante lorsque l'Ac2 est dilué au 1/1000. Le même phénomène est observable lorsque l'Ac1 est dilué au 1/1000 (figure 66).

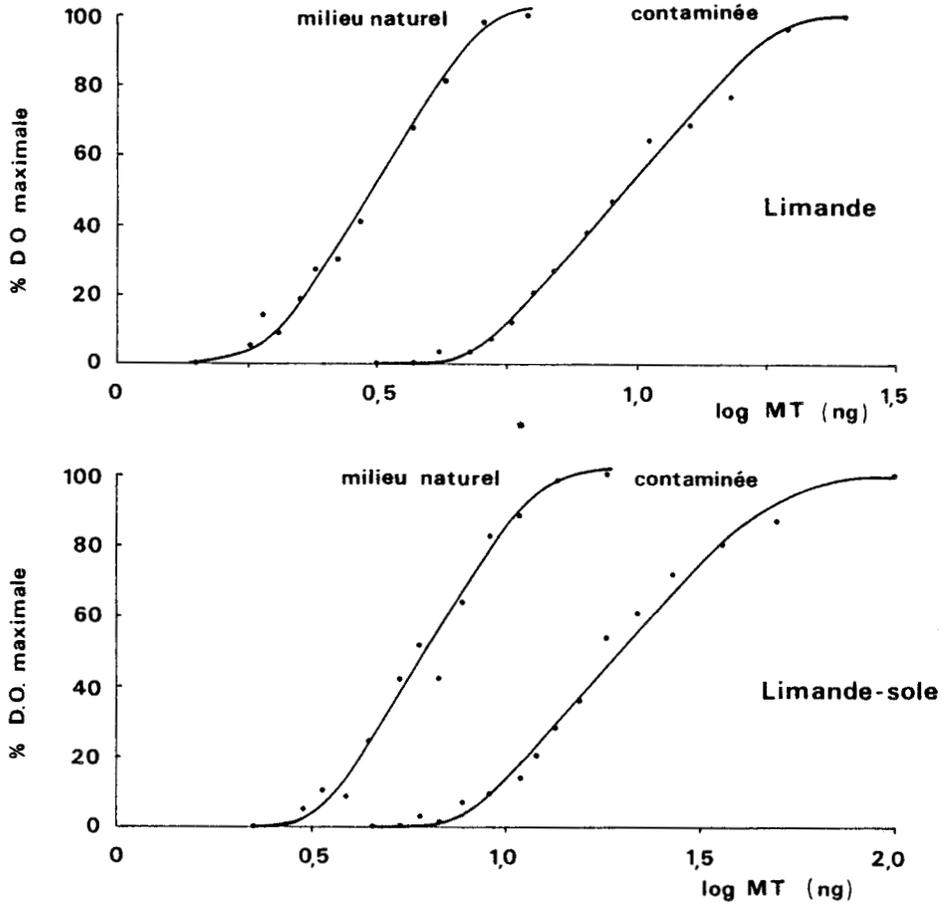


Figure 67 : Courbes de dilutions en ELISA de surnageants hépatiques de poissons prélevés en milieu naturel et contaminés en laboratoire. Résultats exprimés en % de l'absorbance maximale à 405 nm en fonction du log des MT contenues dans les échantillons.

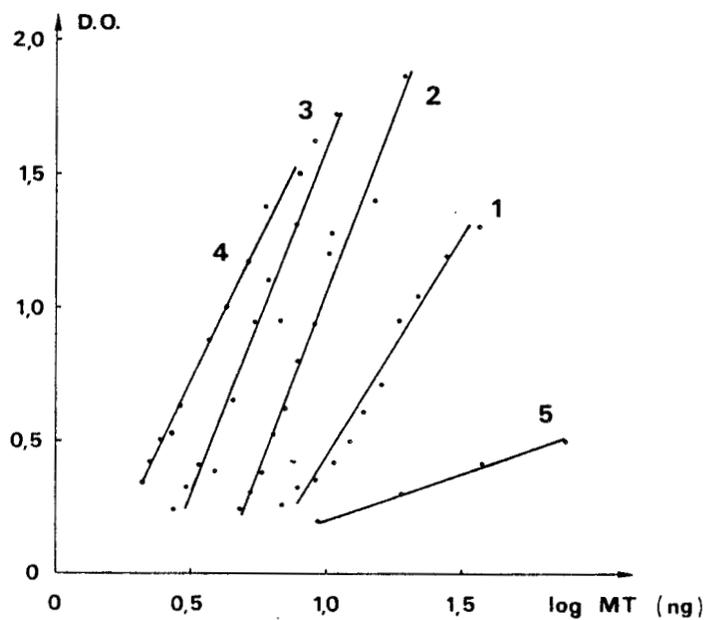


Figure 68 : Droites de régression des courbes standards obtenues en ELISA (présentées sur la figure 67) et inter-réactivité du sérum avec la MT commerciale de foie de lapin (surnageants de limande-sole (1) et de limande (2) contaminées en laboratoire, surnageants de limande-sole (3) et de limande (4) prélevées en milieu naturel, MT de foie de lapin).

Les bruits de fond dûs à l'Ac1 dilué au 1/1000 et au 1/2000 (réactivité de l'Ac1 révélée par l'Ac2 sans Ag "coaté") sont du même ordre de grandeur (0.13 et 0.10) (figure 65a). On note les valeurs de l'absorbance non spécifique de l'Ag sur la figure 65b.

Les dilutions des Ac ont été sélectionnées en fonction de la pente de la courbe de dilution de l'échantillon dans sa partie linéaire. Si cette pente est faible, de faibles variations d'absorbance entraînent de fortes variations dans les quantités de MT déterminées. A l'inverse, les mêmes variations d'absorbance ne permettront pas de doser des quantités très différentes de MT. Lors des essais présentés sur les figures 65 et 66, l'échantillon utilisé contenait des quantités de MT variant entre 3 et 30 ng environ. Ces gammes de détection étant en accord avec celles citées dans la littérature, nous avons sélectionné des dilutions aux 1/1000 pour les deux Ac. Dans ces conditions, l'amplitude des variations de l'absorbance permet de quantifier les MT avec le maximum de précision.

Lors des dosages en ELISA, les échantillons vont être dilués de telle sorte que leurs teneurs puissent être déduites de la partie linéaire des courbes standards, réduite à la zone située entre 20 et 80% des limites supérieure et inférieure. Afin de procéder de façon comparable aux dosages faits en RIA, les teneurs seront déduites des courbes standards réalisées avec des échantillons de poissons contaminés en laboratoire.

- Caractéristiques du dosage en ELISA

L'analyse de plusieurs surnageants hépatiques provenant de la même espèce (limandes ou limande-soles) ayant été affectée par une contamination du même type (contamination artificielle en laboratoire ou due à l'exposition en milieu naturel) a permis de constater que la réactivité de l'Ac vis-à-vis des MT présente une certaine variabilité. Toutefois, le comportement reproduit le plus souvent est explicité sur la figure 67 (a et b). Pour une valeur de DO fixée, la quantité de MT correspondante dans des échantillons provenant du milieu naturel est inférieure à celle des échantillons ayant été contaminés en laboratoire par du Cd. L'Ac anti-MT de perche a donc une affinité plus importante pour les MT hépatiques d'échantillons prélevés en milieu naturel puisqu'il détecte des quantités plus faibles. La même observation a été faite lors des expériences RIA réalisées avec des échantillons de limande.

Tableau 31 : Caractéristiques des courbes standards des surnageants hépatiques de limandes et limande-soles, obtenues en ELISA.

Type d'expositon	Espèce	Gamme d'utilisation (ng)	Teneur minimale de MT détectée (ng/g)
contamination en laboratoire	limande	4,5 à 17	450
	limande-sole	6,8 à 36,3	680
milieu naturel	limande	2,2 à 7,5	206
	limande-sole	2,7 à 14	271

Tableau 32 : Comparaison des teneurs en MT hépatiques déterminées par DPP chez des limandes contaminées en laboratoire et prélevées en milieu naturel. (teneurs exprimées en µg/g de foie frais).

Type d'exposition	MT	$\bar{X} \pm \sigma$ MT
Contamination en laboratoire	600	527 ± 95
	434	
	456	
	618	
Milieu naturel	270	136 ± 91
	112	
	93	
	70	

Tableau 33 : Rapports des teneurs en MT déterminées par DPP dans des surnageants contenant des proportions différentes de foie. (100 mg, 200 mg ou 1g de foie dans 2 ml de tampon, soit 5 %, 10% ou 50% (poids/volume))
R1 = 10% / 5% R2 = 50% / 5%

R	Echant. 1	Echant. 2	Echant. 3	Echant. 4	Echant. 5	n	$\bar{X} \pm \sigma$ R
R1	0,852	0,963	1,081	0,800	1,042	5	0,95 ± 0,12
R2	ND	ND	ND	0,995	1,036	2	1,01 ± 0,28

D'autre part, la réaction immunologique réalisée avec des MT contenues dans des fractions éluées par chromatographie de filtration sur gel est plus importante lorsque les MT sont natives (contamination par le milieu naturel) que lorsqu'elles sont issues de surnageants hépatiques ayant été saturés par du Cd ($DO = 0,671 \pm 0,030$ contre $0,263 \pm 0,016$ pour une même quantité de protéines analysée). Ces résultats confirment donc le fait que l'affinité de l'Ac pour les protéines est différente selon la nature de la teneur métallique des MT.

Les valeurs des gammes d'utilisation représentées par les droites de régression (figure 68) et des teneurs minimales de MT détectées apparaissent dans le tableau 31. Il faut préciser que ces valeurs correspondent à celles des échantillons présentés sur les figures 67 et 68. En effet, elles peuvent varier pour différents échantillons de même nature mais restent de cet ordre de grandeur. Par exemple, la gamme d'utilisation de l'échantillon de limande-sole "naturelle", présenté ici varie entre 2.7 et 14 ng. Pour un autre échantillon du même type, la gamme varie entre 4.8 et 17.5 ng.

D'autre part, l'immunoréactivité de l'Ac anti-MT de perche vis-à-vis des MT d'autres classes de vertébrés (foie de lapin) est faible (figure 68).

1.3. Dosage des MT par DPP

Les teneurs en MT hépatiques de poissons intoxiqués par le Cd sont supérieures à celles de poissons provenant du milieu naturel (tableau 32) ; l'échantillonnage est faible ($n = 4$) mais il permet, cependant, de constater que la synthèse de MT a bien été induite chez les limandes injectées.

Chez des poissons contaminés en laboratoire, les teneurs en MT hépatiques ont été déterminées dans des surnageants contenant des quantités de foie différentes. D'après les résultats obtenus (tableau 33), on constate que la quantité de foie dans le surnageant n'influence pas la détection des MT par DPP.

1.4. Comparaison des différentes techniques

1.4.1. Comparaison des techniques RIA et DPP

Les teneurs en MT d'une dizaine de surnageants hépatiques de poissons contaminés en laboratoire ont été quantifiées en parallèle en DPP et en RIA.

Tableau 34 : Teneurs moyennes en MT hépatiques déterminées en DPP et en RIA d'échantillons de poissons contaminés en laboratoire et prélevés en milieu naturel. (exprimées en $\mu\text{g/g}$ poids frais).

Nature de la contamination	n	$\bar{X} \pm \sigma$ MT (DPP)	$\bar{X} \pm \sigma$ MT (RIA)	r	P
contaminés en laboratoire	10	448 \pm 158,8	470,8 \pm 153	0,919	< 0,1 %
milieu naturel	3	158 \pm 97	970 \pm 365	0,998	4,23 %

Tableau 35 : Comparaison de la moyenne des teneurs en MT hépatiques déterminées en DPP et en ELISA, de poissons prélevés en milieu naturel et corrélation entre les teneurs déterminées par les 2 techniques. Chaque échantillon a été tripliqué. L'écart type des 3 mesures est représenté par le coefficient de déviation standard intragroupe exprimé en % (les MT sont exprimées en $\mu\text{g/g}$ poids frais).

Espèces	n	MT	$\bar{X} \pm \sigma$ MT	coefficient de déviation standard intragroupe	r	Seuil
Limande	6	DPP	367,7 \pm 72,6	5,22 \pm 2	0,935	P < 1 %
		ELISA	1540 \pm 407	4,43 \pm 2,92		
Limande-sole	6	DPP	365,2 \pm 92,6	4,68 \pm 1,64	0,962	
		ELISA	1751 \pm 326	2,30 \pm 1,79		

Tableau 36 : Comparaison des moyennes des teneurs en MT hépatiques de limandes prélevées en milieu naturel déterminées en DPP, RIA et ELISA (n = 8 ; MT exprimées en $\mu\text{g/g}$ PF).

	\bar{X}	σ	min	max	coefficients de régression
MT DPP	237,5	109	119	379,5	DPP/RIA r = 0,83 (P < 5 %)
MT RIA	605	320	144	914	DPP/ELISA r = 0,89 (P < 1 %)
					RIA/ELISA r = 0,89 (P < 1 %)
MT ELISA	636	196	415	898	RIA/DPP/ELISA R = 0,93 (P < 5 %)

Les teneurs moyennes dosées par DPP et par RIA sont comparables (448 ± 159 $\mu\text{g/g}$ poids frais en RIA et 471 ± 153 $\mu\text{g/g}$ PF ou DPP) (tableau 34).

Lorsque ces teneurs mesurées par RIA sont représentées en fonction des teneurs obtenues par DPP (figure 69), le coefficient de régression linéaire est significatif ($r = 0.919$; $p < 0.1\%$) et l'équation de la droite s'écrit $\text{RIA} = 0.95 \text{ DPP} - 0.47$. Les techniques RIA et DPP permettent donc de quantifier les MT hépatiques de poissons contaminés en laboratoire de façon corrélée et avec une spécificité et une précision comparables. Ces résultats corroborent également le fait que l'Ac anti-MT de perche se lie exclusivement aux MT. En effet, les molécules de PM élevé ont été dénaturées par la chaleur pour le dosage par DPP et non pour la RIA mais les teneurs en MT obtenues par les deux techniques sont comparables.

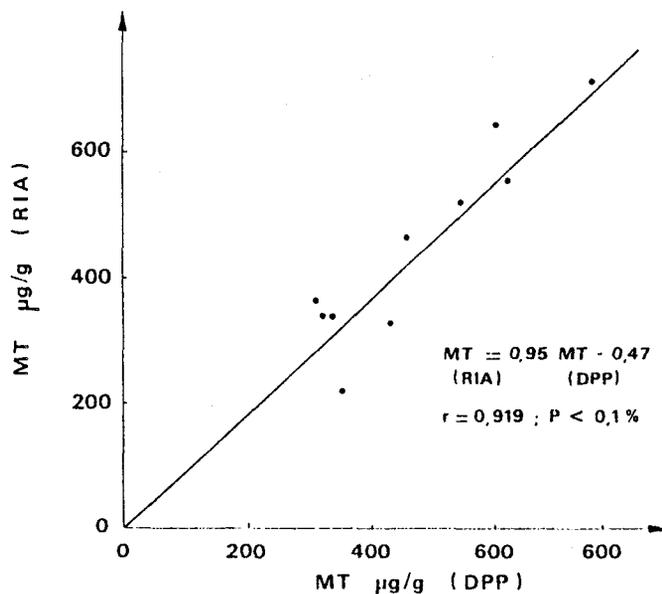


Figure 69 : Relation entre les teneurs en MT hépatiques de poissons contaminés en laboratoire déterminées en RIA et en DPP. (Teneurs en MT exprimées en $\mu\text{g/g}$ poids frais).

Lorsque les dosages sont effectués par DPP et RIA dans des surnageants de foies de poissons provenant du milieu naturel, le coefficient de régression obtenu est également significatif ($r = 0.998$; $P < 5\%$), ce qui confirme la validité de ces deux types de dosages. Par contre, les teneurs moyennes obtenues par DPP sont très inférieures à celles obtenues par RIA (158 ± 97 contre $970 \pm 365\mu\text{g/gPF}$) (tableau 34). Bien que les valeurs des MT déterminées par les deux techniques soient corrélées, elles ne sont donc pas

détectées dans les même gammes de concentration.

Lors de la première comparaison des teneurs en MT obtenues en DPP et en RIA, les surnageants hépatiques provenaient de poissons contaminés en laboratoire. Pour la seconde comparaison, il s'agissait d'échantillons du milieu naturel. La nature des éléments métalliques liés aux MT est donc différente dans les deux types de surnageants.

Les différences observées entre les teneurs en MT déterminées par DPP et par RIA sont attribuables au dosage immunologique puisqu'il est défini que la composition métallique d'un échantillon n'intervient pas dans le dosage des MT par DPP (voir I-5). Ces résultats confirment les variations observées au niveau de l'immunoréactivité de l'Ac vis-à-vis de MT possédant des compositions métalliques différentes (voir V-1-2).

1.4.2. Comparaison des techniques ELISA et DPP

Les seuils de détection des MT hépatiques sont plus élevés en DPP (environ 370 ng de MT en DPP contre 2 à 7 ng en ELISA) mais les teneurs en MT déterminées par ces deux méthodes sont corrélées de façon significative pour les échantillons de limandes ($r = 0.935$; $P < 1\%$) et de limande-soles ($r = 0.962$; $P < 1\%$) (tableau 35). Les coefficients de déviation standards intra-essais ont tendance à être plus élevés également en DPP. Les teneurs moyennes déterminées en DPP sont inférieures à celles déterminées en ELISA ; cette différence a été observée précédemment lors des comparaisons de dosages RIA/ DPP et a été expliquée par le fait que l'affinité de l'Ac diffère selon la composition métallique des MT.

1.4.3. Comparaison des techniques RIA et ELISA

La technique ELISA permet de détecter des quantités de MT hépatiques plus faibles que la technique RIA chez les espèces limande et limande-sole contre lesquelles l'anticorps n'est pas spécifique (167 ng de MT contre 4.5 ng pour la limande et 60 ng contre 6.8 ng chez limande-sole). Par contre, les teneurs moyennes obtenues par les deux techniques immunologiques sont du même ordre de grandeur (605 pour RIA contre 636 pour l'ELISA).

Par rapport aux teneurs de MT hépatiques des autres poissons, celles de perche, quantifiées en RIA, sont très faibles. Il n'a pas été possible de vérifier si leur seuil de détection est également plus faible en ELISA. (des problèmes techniques de surgélation à la station durant l'été 90 ont

entraîné la perte des échantillons d'Ac et de surnageants de perche ramenés de Suède. Le Dr C. HOGSTRAND n'a pu nous réexpédier que des échantillons d'Ac suite à des problèmes similaires de conservation).

1.4.4. Comparaison des techniques RIA, ELISA et DPP

Les trois méthodes utilisées pour quantifier les MT : DPP, RIA et ELISA, ont été comparées pour l'analyse de MT hépatiques de limandes prélevées en milieu naturel (tableau 36).

Une régression linéaire multiple réalisée avec les valeurs obtenues par les différentes techniques donne un coefficient de régression significatif ($R = 0.93$ - $P < 5\%$).

2. Discussion

Diverses techniques ont dû être utilisées afin de quantifier les MT hépatiques d'échantillons de limandes, limande-soles et morues, prélevées en milieu naturel. Il est donc intéressant de les comparer.

Il aurait été possible de quantifier par colorimétrie l'ensemble des groupements SH contenus dans des surnageants comme l'ont fait certains auteurs (WOFFORD et THOMAS, 1984 ; SPRY et WOOD, 1989). Cependant, l'intérêt de la méthodologie testée était de parvenir à différencier les thiols des MT et les thiols provenant des composés de petit poids moléculaire (glutathion, cystéine, produits de dégradation des molécules de PM élevés résultant de la dégradation à la chaleur...). L'essai de séparation des molécules appartenant à ces deux gammes de PM par un système de filtration par centrifugation n'a pas donné de résultats satisfaisants. En effet, des résidus SH ont encore été détectés après cette étape dans les fractions contenant des composés de faible PM, obtenues par chromatographie de filtration sur gel.

Les résultats obtenus en DPP, RIA et ELISA ont montré que ces techniques présentent différents avantages et inconvénients pour le dosage des MT. Lors des dosages immunologiques, nous avons utilisé un Ac anti-MT de perche (*Perca fluviatilis*) pour doser les MT de limande, limande-sole et morue.

Alors que la DE 50 de la courbe de dilution de surnageant hépatique de perche est égale à log 1, les valeurs des DE 50 varient entre log 2.5 et log 2.9 pour nos trois espèces. Néanmoins, les caractéristiques des courbes

standards obtenues avec ces trois espèces étaient suffisamment satisfaisantes pour doser les MT avec l'Ac dirigé contre les MT de perche. Les valeurs des DE 50 sont d'ailleurs comparables à celles obtenues avec des échantillons de foie de *Haemulon sciurus*, de *Haemulon aurolineatum* et de truite pour lesquels les DE 50 varient entre log 2.2 et log 2.8 environ (HOGSTRAND et al., 1989a). Même chez le poisson-écureuil (*Holocentrus rufus*) dont la DE 50 est égale à log 4.3, les MT ont été dosées par RIA (HOGSTRAND et al., 1989a ; HOGSTRAND et HAUX, 1990). Les limites de détection des MT hépatiques déterminées en RIA sont de l'ordre de 167 ng pour la limande, 60 ng pour la limande-sole et 100 ng pour la morue alors qu'elle est de 0.15 ng de MT pour la perche. L'Ac est donc plus sensible et averse pour le dosage des MT de perche que pour celles d'autres espèces. Le dosage RIA perd donc de son intérêt, d'un point de vue limite de détection et précision, lorsque l'Ac est utilisé pour quantifier les MT d'espèces vis-à-vis desquelles il n'est pas dirigé à l'origine.

Les quantités minimales de MT hépatiques déterminées en ELISA sont de 4.75 ng chez la limande et 6.8 ng chez la limande-sole. Les seuils de détection atteints en ELISA sont donc inférieurs à ceux déterminés en RIA. Les gammes de linéarité varient entre ces valeurs minimales et 17 ng pour la limande et 36 ng pour la limande-sole en ELISA ; en RIA, elles varient entre 60 et 1880 ng pour la limande-sole et entre 167 et 3633 ng de MT pour la limande. L'utilisation de l'Ac anti-MT de perche en RIA permet de détecter de 20 à 2000 ng de MT dans les foies de *Haemulon sciurus* et de 80 à 5000 ng de MT dans les foies de truite (HOGSTRAND et HAUX, 1990 ; HOGSTRAND et al., 1989). En ELISA, l'Ac anti-MT de moule détecte des quantités variant de 1.06 à 21.2 ng de MT dans les branchies de moule (ROESIJADI et al., 1988) et l'Ac anti-MT de foie de rat détecte de 0.5 à 25 ng de MT dans le plasma et les lysats d'hématies de l'Homme (GHAFAR et al., 1989). Les gammes de détection que nous avons déterminées sont donc en accord avec celles de la littérature, bien que l'Ac utilisé ne soit pas spécifique des espèces testées.

L'immunoréactivité de l'Ac anti-MT de perche n'a pu être testée sur des échantillons de perche en ELISA ; il aurait été intéressant de contrôler si l'utilisation de cette technique permet d'abaisser le seuil de détection des MT de perche comme il l'a été pour les échantillons de limande et limande-sole.

Les portions linéaires des courbes standards des échantillons de surnageants couvrent des gammes de dilution qui sont plus importantes en RIA qu'en ELISA et qui sont également plus importantes pour les échantillons de limande-sole que pour les échantillons de limande. L'Ac permet donc de doser les MT d'échantillons de limande-sole avec davantage de précision que celles des limandes (les limites inférieures et supérieures des zones linéaires des courbes standards diffèrent d'un facteur 10 pour les MT de limande et 30 pour les MT de limande-sole en RIA, et d'un facteur 4 et 5.5 environ pour les MT de ces mêmes espèces en ELISA).

Quelques données bibliographiques concernent la comparaison des deux techniques. Selon ROESIJADI et al. (1988), l'Ac anti-MT de moule utilisé en ELISA quantifie les protéines complexant le métal dans les branchies de moule avec des limites de détection comparables à celles déterminées en RIA par GARVEY et al. (1982). Or, les seconds auteurs quantifient des MT de rat avec un Ac spécifique. 0.5 à 25 ng de MT contenues dans le plasma ou les lysats d'hématies de l'Homme peuvent être quantifiées en ELISA avec un Ac dirigé contre les MT de rat, alors qu'environ 0.1 ng de MT peuvent être détectées chez le rat avec le même Ac en RIA (MEHRA et BREMNER, 1983 ; GHAFAR et al., 1989). Ici encore, la comparaison des deux techniques pose un problème puisque les MT dosées ne proviennent pas des mêmes organismes. Par contre, des MT de foie de lapin peuvent être dosées en ELISA et en RIA avec des limites de détection comparables (les gammes sont comprises entre 0.31 et 20 ng de MT) (GARVEY et al., 1982 ; THOMAS et al., 1986). Globalement, la technique RIA est toujours sensiblement équivalente ou plus précise que la technique ELISA. Or, dans notre cas, les limites de détection atteintes en ELISA sont inférieures à celles obtenues en RIA. Les méthodologies utilisées en ELISA sont nombreuses et les protocoles utilisés dans la littérature citée sont basés sur des méthodes compétitives ; la technique ELISA que nous avons utilisée est une méthode non compétitive, d'où peut-être, l'explication des différences observées lors de la comparaison des deux techniques immunologiques.

Que ce soit en RIA ou en ELISA, l'Ac est plus avide vis-à-vis des MT d'échantillons provenant de poissons prélevés en milieu naturel que de poissons intoxiqués en laboratoire par du Cd. La composition métallique des MT influence donc la réactivité de l'Ac anti-MT de perche quand il est

utilisé pour quantifier les MT hépatiques chez des espèces autres que la perche. Or, pour doser les protéines contre lequel il est dirigé, la composition métallique des MT n'influence pas ou peu sa réponse. En effet, l'Ac anti-MT de perche présente la même réactivité envers les MT de perche injectées par du Zn du Cd ou du Cu (HOGSTRAND et HAUX, 1990). L'inter-réactivité du sérum pour les apo-thionéines et holo-thionéines de poisson-chat (*Heteroptneus fossilis*) fait suggérer que les métaux n'interviennent pas dans la nature des déterminants antigéniques (CHATTERJEE et al., 1990). Chez la truite, les MT contenant des éléments métalliques différents (apo-protéines, holo-protéines ou protéines recombinées par complexation avec le Cd) indiquent que la réactivité de l'Ac n'est pas dépendante de la présence ou de la nature des métaux liés aux MT (NOREY et al., 1990). L'observation des courbes obtenues montrent pourtant que les MT recomplexées avec du Cd n'ont pas un comportement strictement identique à celui des autres MT. GHAFFAR et al. (1989), signalent que l'Ac anti-MT de rat est utilisable pour doser les MT liées à des formes métalliques différentes mais qu'il est spécifique pour l'isoforme MTI du rat, ce qui sous-entendrait que la réactivité de l'Ac est modifiée par la nature des éléments métalliques liés aux MT. D'après ces divers résultats, il apparaît donc délicat d'affirmer que la composition métallique intervient toujours ou non sur la réactivité des Ac anti-MT.

Cependant, d'après nos résultats, la composition métallique de la protéine influence la réactivité du sérum. Il est donc nécessaire, afin d'optimiser le dosage, d'utiliser des échantillons ayant subi le même type de contamination que les échantillons à doser, pour réaliser les courbes standards. Lors du dosage par RIA de MT hépatiques d'espèces tropicales prélevées en milieu naturel, les courbes standards ont été réalisées avec des échantillons de poissons injectés par du Cd chez certaines espèces et avec des échantillons provenant du milieu naturel pour d'autres. Il est probable que ces deux techniques ont induit des réponses immunologiques différentes qui ne s'expliquent pas systématiquement par l'influence du facteur espèce (HOGSTRAND et HAUX, 1990). L'Ac anti-MT de perche inter-réagit avec les MT hépatiques de diverses espèces de poissons mais présente une très faible avidité vis-à-vis des MT de foie de lapin. Cette observation est confirmée par les données de HOGSTRAND et HAUX (1990) et par d'autres données bibliographiques (voir I.5).

Ces résultats s'expliquent par le fait que les MT de différentes espèces poissons sont relativement proches d'un point de vue immunologique mais différent de celles des mammifères. Les changements survenus au cours de l'évolution, au niveau de la structure primaire des MT, se répercutent directement sur la nature des déterminants antigéniques situés essentiellement dans la partie N- terminale de la protéine. Les MT de diverses classes de vertébrés présenteront une réactivité différente envers un même sérum.

La DPP est utilisée depuis de nombreuses années pour quantifier les MT dans les tissus biologiques mais elle est moins sensible pour la détection des MT que les techniques immunologiques. Effectivement, les quantités minimales de MT quantifiées en DPP sont d'environ 10 µg/g foie frais alors qu'elles sont de l'ordre de quelques ng en immunologie (9 ng MT/g de foie chez la perche en RIA).

A notre connaissance, aucune donnée bibliographique ne signale l'exploitation de résultats de dosages par DPP pour lesquels les MT hépatiques sont présentes en aussi faibles quantités. La sensibilité de la DPP a été suffisante pour doser les MT hépatiques des espèces étudiées ici; elle a été également suffisante pour doser les MT de foie de perche prélevées en milieu naturel (OLSSON et HAUX, 1986). Chez les mammifères, la DPP a été utilisée pour quantifier les MT dans les foies, reins et duodénum de souris; par contre, les MT contenues dans le sang et le plasma de perche n'ont pu être détectées par cette technique (OLAFSON, 1981; OLAFSON, 1983 cités par HOGSTRAND et HAUX, 1992).

Bien que le seuil de détection des MT soit plus élevé en DPP qu'en immunologie, le dosage des MT hépatiques de poissons peut donc être réalisé en DPP. Compte tenu des teneurs minimales détectées en RIA dans nos échantillons, les caractéristiques du dosage en DPP méritent que l'on porte à cette technique un intérêt tout à fait justifié. Les moyennes et déviations standards obtenues par DPP et RIA sont comparables et les teneurs en MT des échantillons déterminées par les deux techniques sont corrélées. Les teneurs en MT dosées en ELISA et en DPP sont également corrélées. Si la technique électrochimique est moins performante que la RIA, d'un point de vue sensibilité (quand l'Ac utilisé est spécifique de l'espèce étudiée) ou de l'ELISA, sa précision est comparable. Ces observations sont confirmées par d'autres auteurs (HOGSTRAND et HAUX, 1992). Les teneurs en MT

de foies de perches injectées déterminées en DPP sont corrélées à celles mesurées en RIA ($r = 0.92$; $P < 0.1\%$). Les seuils de détection diffèrent d'un facteur 1000 entre les deux techniques (7.2 $\mu\text{g/g}$ contre 9 ng/g PF) mais les moyennes et les déviations standards sont comparables.

En conclusion, parmi les quatre techniques testées, le dosage des SH par colorimétrie n'a pas donné de résultats satisfaisants. La méthode DPP convient au dosage des MT dans des tissus contenant suffisamment de ce type de protéines. Les techniques immunologiques sont plus délicates à employer et limitées dans leur utilisation étant donné la spécificité de l'Ac; l'immunoréactivité d'un sérum vis-à-vis des MT d'une même classe de vertébrés permet, cependant, de les quantifier de façon satisfaisante. Ces techniques, notamment l'ELISA, permettent d'atteindre des seuils de détection plus bas que la DPP.

CHAPITRE VI

**TENEURS HEPATIQUES EN METAL ET
METALLOTHIONEINES
DES DIFFERENTES ESPECES DE
POISSONS**

CHAPITRE VI : TENEURS HEPATIQUES EN METAL ET METALLOTHIONEINES DES DIFFERENTES ESPECES DE POISSONS

Dans cette étude, la liaison des MT hépatiques avec le Cu et le Zn a été étudiée plus particulièrement car la région Nord-Pas-de-Calais est contaminée par une multiplicité d'éléments métalliques plutôt que par une contamination spécifique et le Cu y est relativement abondant (DELABRE, 1985 ; DESSAINT, 1987).

D'autre part, chez des organismes qui ne sont pas soumis à une contamination particulière, les MT sont impliquées dans la liaison du Zn et du Cu et interviennent dans la régulation de l'homéostasie cellulaire (DUNN et al., 1987).

1. Résultats

Les teneurs en métallothionéines (MT) hépatiques des poissons prélevés en milieu naturel aux différentes saisons de l'année 1989 ont été déterminées en RIA avec un anticorps anti-MT de perche ; les MT des individus prélevés en 1991 ont été quantifiées à l'aide du même anticorps, mais les dosages ont été réalisés en ELISA.

Les résultats concernant les teneurs métalliques hépatiques de poissons ont été présentés dans le chapitre III ; elles sont reprises ici et sont définies sous le terme de métal total (Cu total, Zn total...).

Les concentrations en Cu, Zn et Cd contenus dans la fraction soluble (compartiment cellulaire des MT), définies sous le terme métal soluble (Cus, Zns, Cds), ont été déterminées par dosage au SAA en flamme (Cus et Zns) et en four (Cds).

Les ACP sont présentées de la même manière que dans le chapitre III (cercle des corrélations des descripteurs et projection dans le plan 1.2. présentés ; matrice des corrélations non présentée).

1.1. Comparaison des teneurs en métal et MT des trois espèces

L'ACP de la figure 70 a été réalisée en prenant en compte l'ensemble des individus de chaque espèce prélevés en 1989, caractérisés par leurs teneurs en MT et en métal total soluble.

On note, sur le cercle des corrélations, que les variables représentant les teneurs métalliques déterminent l'axe 1 (Ctb = 42%), excepté le Cd soluble (corrélé à l'axe 3), alors que la variable MT est indépendante puisqu'elle détermine l'axe 2 (Ctb = 17%). D'ailleurs, dans

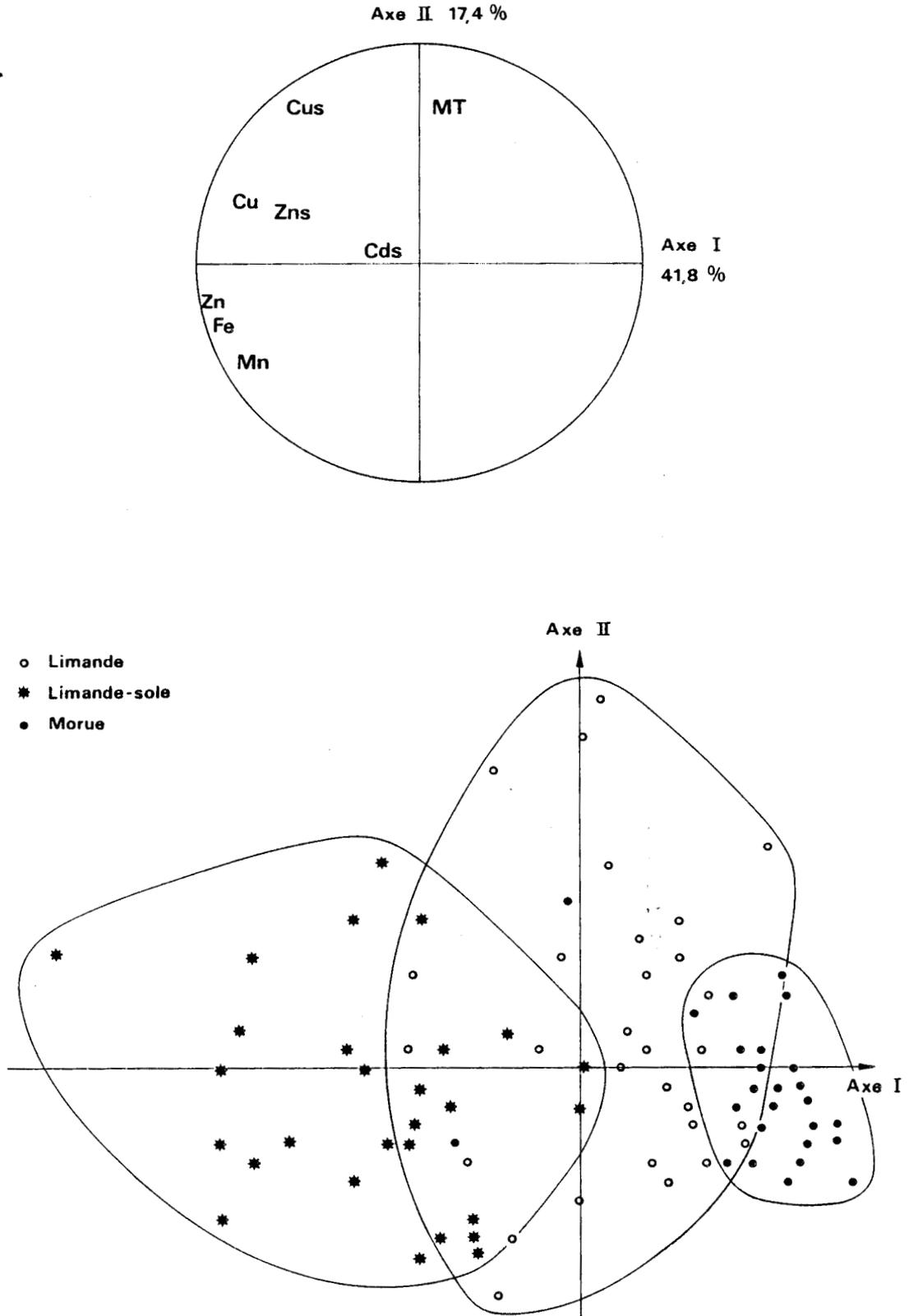


Figure 70 : ACP réalisée sur les teneurs en métal et MT de l'ensemble des individus des trois espèces prélevées en 1989. (n = 36 individus environ par espèce). (limande-soles et morues provenant du large et limandes de la côte , site de Calais)

la matrice des corrélations (non présentée), les coefficients de corrélation, concernant la relation entre la variable MT et les différents métaux sont faibles, même vis-à-vis du Cu et du Zn qui, parmi les éléments métalliques étudiés, sont pourtant ceux qui sont liés préférentiellement aux MT d'après la littérature.

D'après l'observation de la répartition des nuages d'individus des trois espèces sur le diagramme (projection dans le plan 1-2), les limande-soles présentent les teneurs métalliques les plus élevés, les morues présentent les teneurs métalliques les plus faibles tandis que le nuage de points représentant les limandes est situé en position intermédiaire sur l'axe 1 et est "attiré" par la variable "MT", le long de l'axe 2.

Le fait que les trois espèces soient intégrées dans cette analyse explique donc que les coefficients de corrélation entre les variables "MT" et "métal" soient faibles car les rapports teneurs en MT/teneurs en Cu ou Zn diffèrent selon l'espèce.

D'après la figure 71, on note que les teneurs moyennes en MT hépatiques des limandes sont significativement plus élevées que celles des autres espèces ; les morues ont tendance à posséder plus de MT que les limande-soles.

Qu'elles soient dosées dans les fractions totales ou solubles, les teneurs métalliques les plus importantes sont détectées chez la limande-sole et les teneurs les plus faibles apparaissent chez la morue. Les teneurs moyennes en métal soluble se répartissent donc de manière comparable aux teneurs en métal total chez les différentes espèces. Les teneurs métalliques moyennes des limandes, limande-soles et morues sont souvent significativement différentes, excepté pour le Cd ; il faut remarquer qu'étant donné la variabilité des mesures, d'éventuelles tendances seraient difficiles à mettre en évidence.

Le Cu et le Zn solubles représentent respectivement environ 79% et 33% du Cu et Zn total chez la morue, 69% et 43% chez la limande-sole, 70% et 65% chez la limande.

En résumé, l'espèce qui contient le maximum de MT (limande) ne correspond pas à celle qui contient le maximum de métal (limande-sole). L'analyse des teneurs hépatiques en Cd total ne permet pas de modifier cette observation car le nombre d'individus ayant du Cd en quantité supérieure à la limite de détection en SAA flamme est du même ordre de grandeur chez les deux espèces (voir III.2).

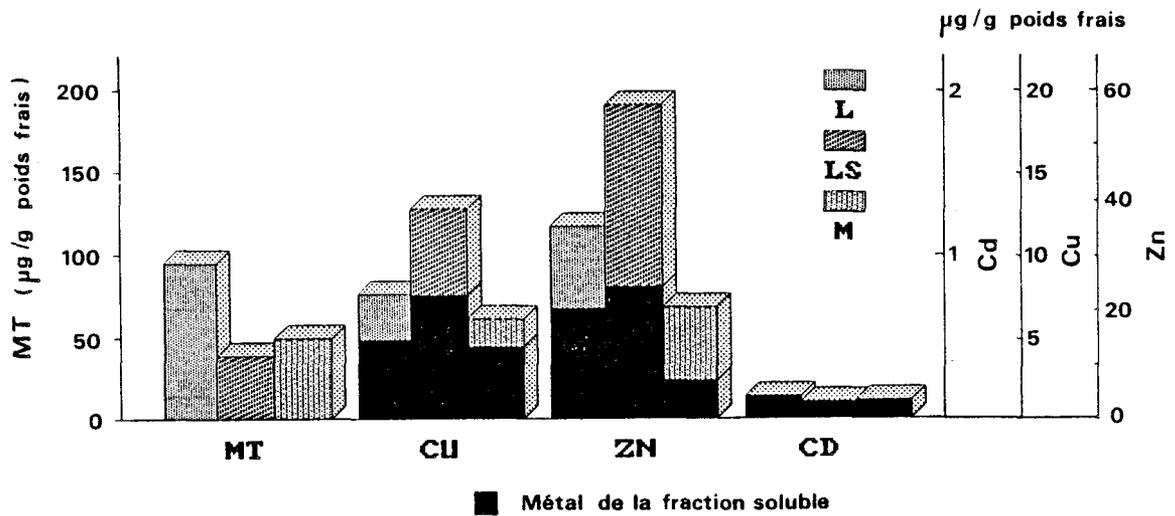


Figure 71 : Teneurs hépatiques moyennes en MT, métal total et métal soluble de limandes (L), limande-soles (LS) et morues (M) prélevées en 1989. (n = 36 individus environ par espèce).

Tests t significatifs au seuil de 5% (O)

	MT	Cu	Zn	Cus	Zns	Cds
Limande/limande-sole	O	O	N	O	N	N
Limande-sole/morue	N	O	O	O	O	N
Limande/morue	O	O	O	N	O	N

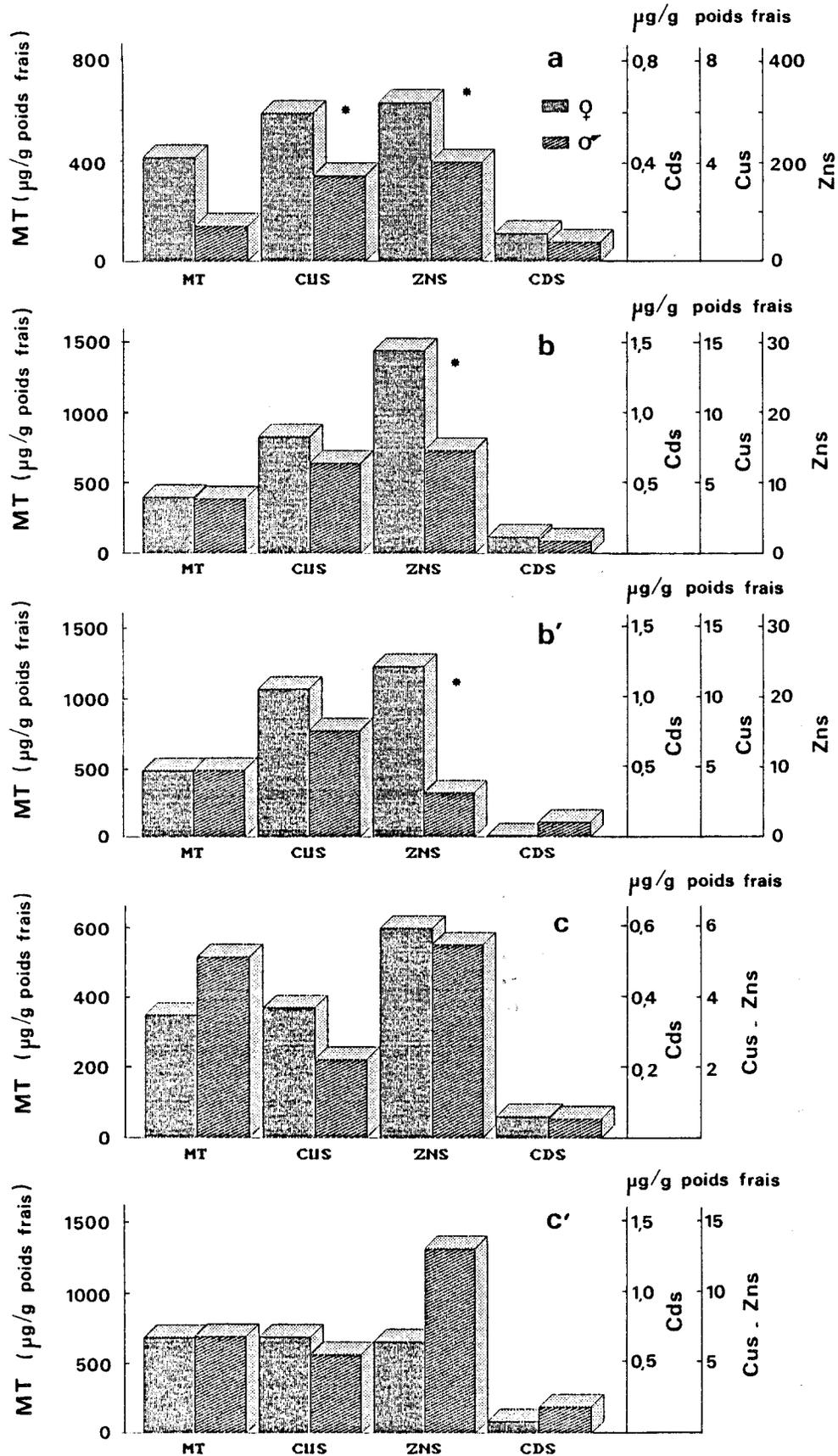


Figure 72 : Influence du sexe sur les teneurs en MT et métal soluble de limandes (a), de limande-soles (b,b') et de morues (c,c') (a et c : printemps 1989 ; b' et c' : hiver 1989 et b : aléatoire dans le temps). (* t significatif au seuil de 5%).

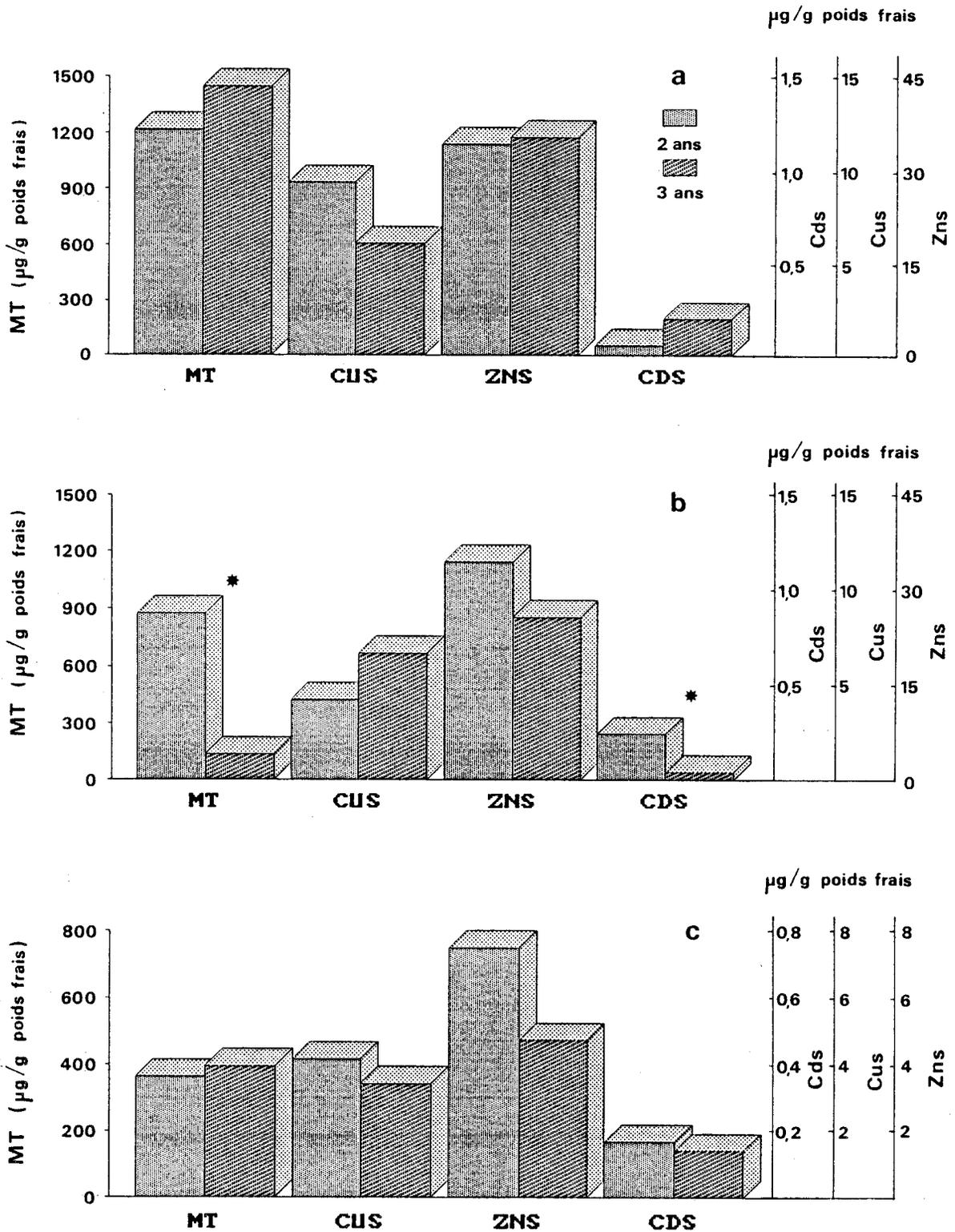


Figure 73 : Influence de l'âge sur les teneurs hépatiques en MT et métal soluble de femelles, de limandes (a), limande-soles (b) et morues (c). (prélevées en automne 1989 (a), au printemps 1989 (b) et en hiver 1989 (c)). (*t significatif au seuil de 5%).

1.2. Influence du sexe sur les teneurs en métal et MT

Nous avons constaté que chez la limande et la limande-sole, le sexe n'influence pas de façon significative les teneurs en métal total (voir III). Pour les mêmes échantillonnages, les teneurs en Zns et Cus chez la limande ainsi que les teneurs en Zns chez la limande-sole sont significativement supérieures chez les femelles (figure 72 b et b'). Chez la morue, il a été montré que les teneurs en Zn, Mn et Fe total peuvent être plus importantes chez les femelles que chez les mâles. Pour ces mêmes groupes d'individus, aucune différence significative n'est mise en évidence en ce qui concerne les teneurs en Cu, Zn et Cd soluble et MT (figure 72 c et c').

1.3. Influence de l'âge sur les teneurs en métal et MT

L'influence de l'âge sur les teneurs en métal total des foies de poissons a été étudiée dans le chapitre III.2.

Les limandes femelles de 3 ans possèdent des teneurs en Fe significativement plus élevées que celles de 2 ans, mais les teneurs en métal soluble et MT ne diffèrent pas significativement (figure 73).

Les limande-soles femelles présentent non seulement des teneurs en Fe significativement plus élevées chez les individus les plus jeunes, mais également des teneurs en MT et Cd soluble plus importantes (figure 73).

Le facteur "âge" étudié à partir de morues femelles n'a d'influence ni sur les teneurs en métal total, ni sur les teneurs en métal soluble et MT (figure 73).

1.4. Comparaison des teneurs en métal et MT de poissons prélevés sur différents sites

L'influence du facteur site de prélèvement sur les teneurs hépatiques en métal et MT a été testée chez des morues prélevées en automne 1989 à la côte et au large de Calais ainsi que chez les limandes et limande-soles, capturées simultanément sur les sites de Boulogne et de Calais en 1991.

Chez la morue (figure 74), davantage de métal a été détecté dans les foies des individus prélevés au large (voir III.1.2); ces mêmes échantillons présentent aussi des teneurs en MT et métal soluble plus importantes mais seul le Cu soluble est significativement plus abondant.

Au printemps (figure 75), les limandes femelles se répartissent

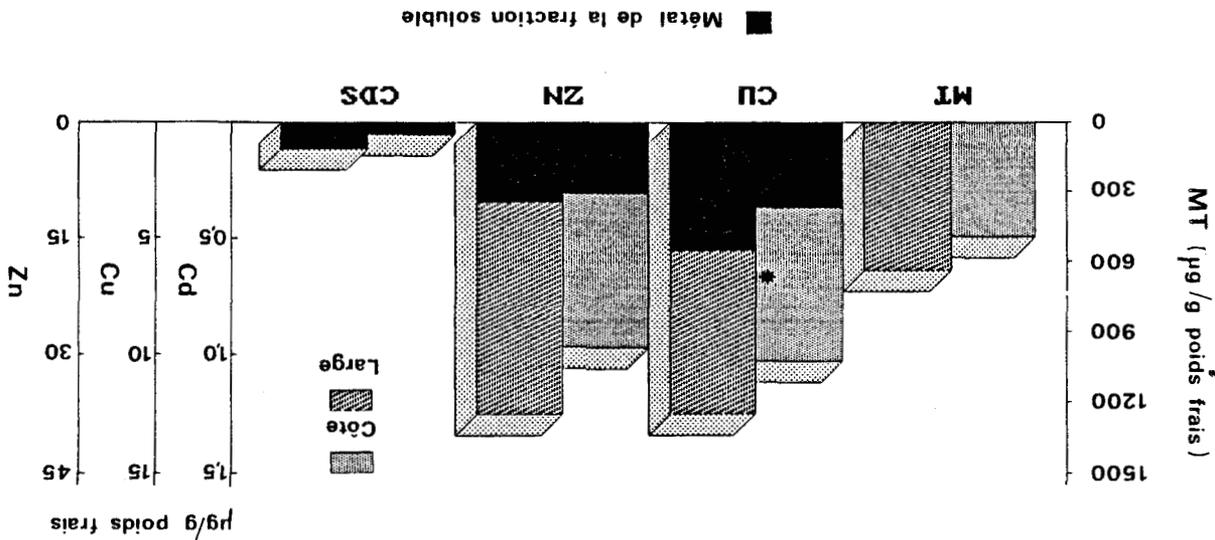


Tableau 37 : Proportions de métal soluble par rapport au métal total dans les foies des poissons plats prélevés à Calais et Boulogne au printemps 1991. (exprimées en %)

Espèce	Site	n	Cu	Zn
Limande	Calais	10	86 ± 36 *	93 ± 14 *
	Boulogne	5	91 ± 21	83 ± 18
Limande-sole	Calais	11	77 ± 38 *	88,5 ± 15 *
	Boulogne	9	83 ± 32	92 ± 15

* : t significatif au seuil de 5%

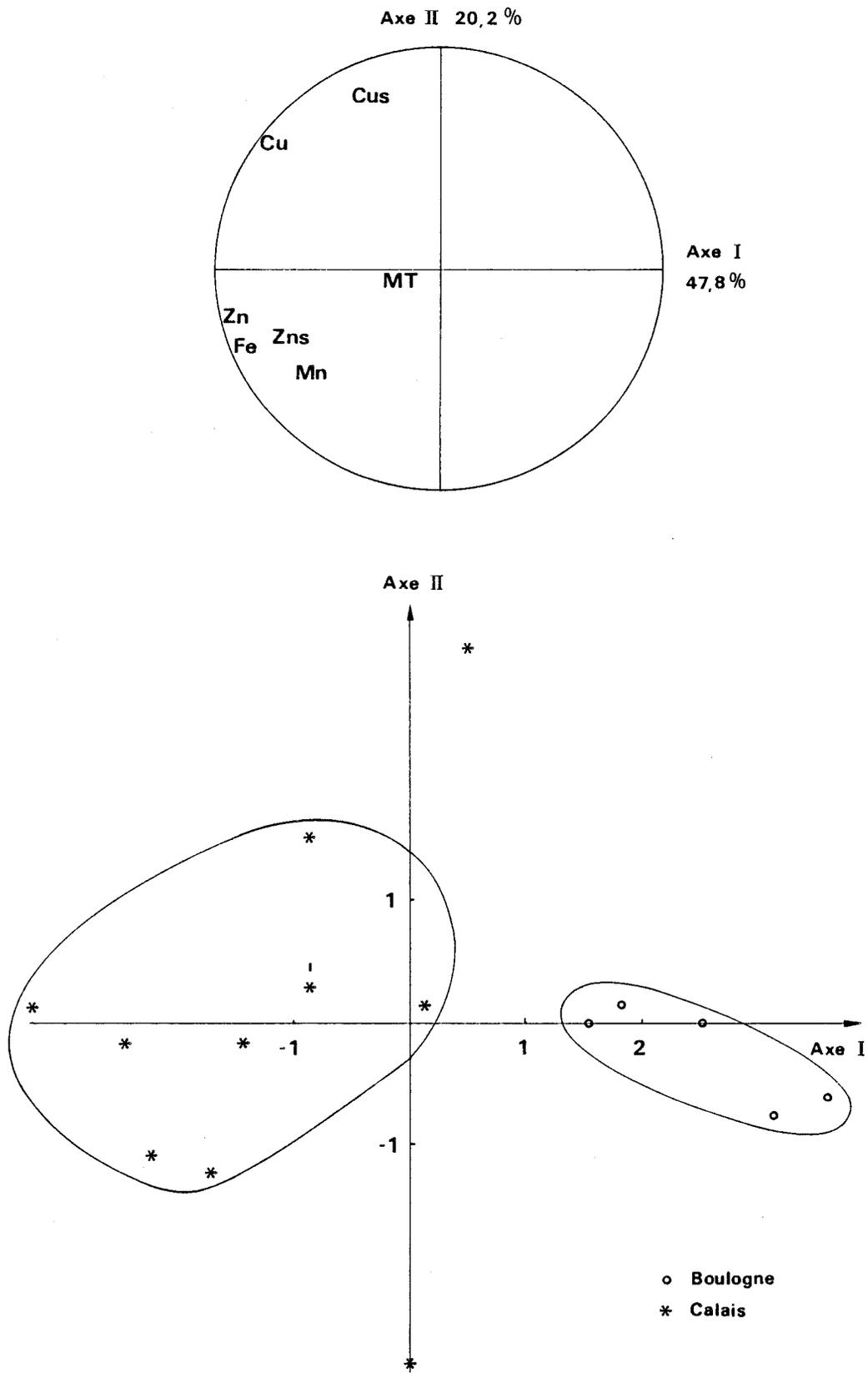


Figure 75 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en MT et métal (total et soluble) des limandes prélevées au printemps 1991 sur les sites de Calais et Boulogne.

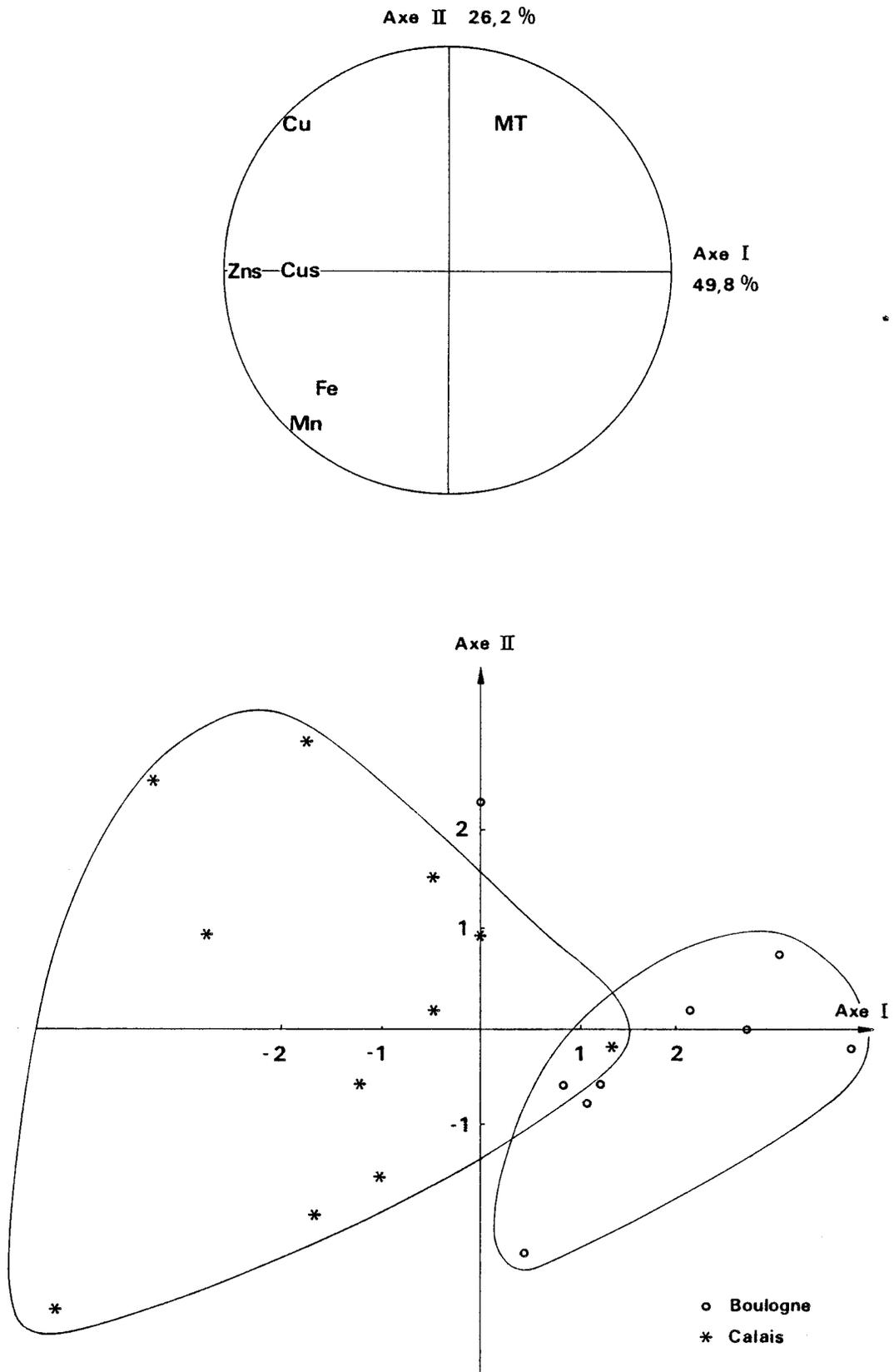


Figure 76 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en métal (total et soluble) et MT des limande-soles prélevées au printemps 1991 sur les sites de Calais et Boulogne.

essentiellement le long de l'axe 1 (déterminé par les teneurs en métal total et Zn soluble ; Ctb = 48%) ; le Cu soluble détermine l'axe 2 (Ctb = 20%). Les points représentant les limandes prélevées à Calais se positionnent vers les variables "métal" à l'opposé de celles provenant de Boulogne. Quant à la variable MT, elle détermine l'axe 3. Les nuages de points se distinguent peu par rapport à cet axe (projection dans le plan 1.3 non représentée). Les teneurs métalliques (métal total et métal soluble) des individus prélevés à Calais, sont significativement plus élevées que celles des individus provenant de Boulogne ; cependant, les proportions de métal soluble par rapport au métal total sont du même ordre de grandeur pour les échantillons des deux sites (tableau 38). Les teneurs moyennes en MT ont également tendance à être supérieures pour les échantillons prélevés à Calais (figure 6 annexe).

Chez la limande, les teneurs en MT et métal soluble n'étant pas affectées par l'âge des individus, les variations des teneurs sont donc liées au facteur "site de prélèvements".

Par ailleurs, les limandes prélevées en 1991 présentent des teneurs en MT qui sont corrélées à celles du Cu soluble et du Zn soluble (notamment en automne) ; les teneurs de ces deux métaux présents dans la fraction soluble sont également corrélées.

En ce qui concerne les échantillons de foies des limande-soles (figure 76), on note sur le diagramme que les échantillons prélevés à Calais se répartissent vers les variables "métal" et que ce nuage de points s'oppose à celui des individus prélevés à Boulogne.

Les teneurs en MT ne sont corrélées ni à celles du Cu et Zn total, ni à celles du Cu et Zn soluble.

D'après la figure 6 (annexe), bien que les teneurs métalliques soient significativement plus élevées (excepté le Mn) chez les individus prélevés à Calais, les teneurs en MT sont du même ordre de grandeur, voire plus élevées chez les poissons provenant de Boulogne. D'autre part, les proportions de métal soluble sont du même ordre pour les deux groupes d'individus (tableau 38).

Le facteur "sexe" de l'individu ne doit pas intervenir puisque la proportion de mâles est comparable dans les deux échantillonnages (voir III.2). On a déterminé que les teneurs en MT sont plus importantes chez les individus les plus jeunes. La prédominance des teneurs en MT dans les échantillons provenant de Boulogne n'est donc pas liée au facteur "âge" car les individus sont plus âgés que ceux de Calais. Les teneurs

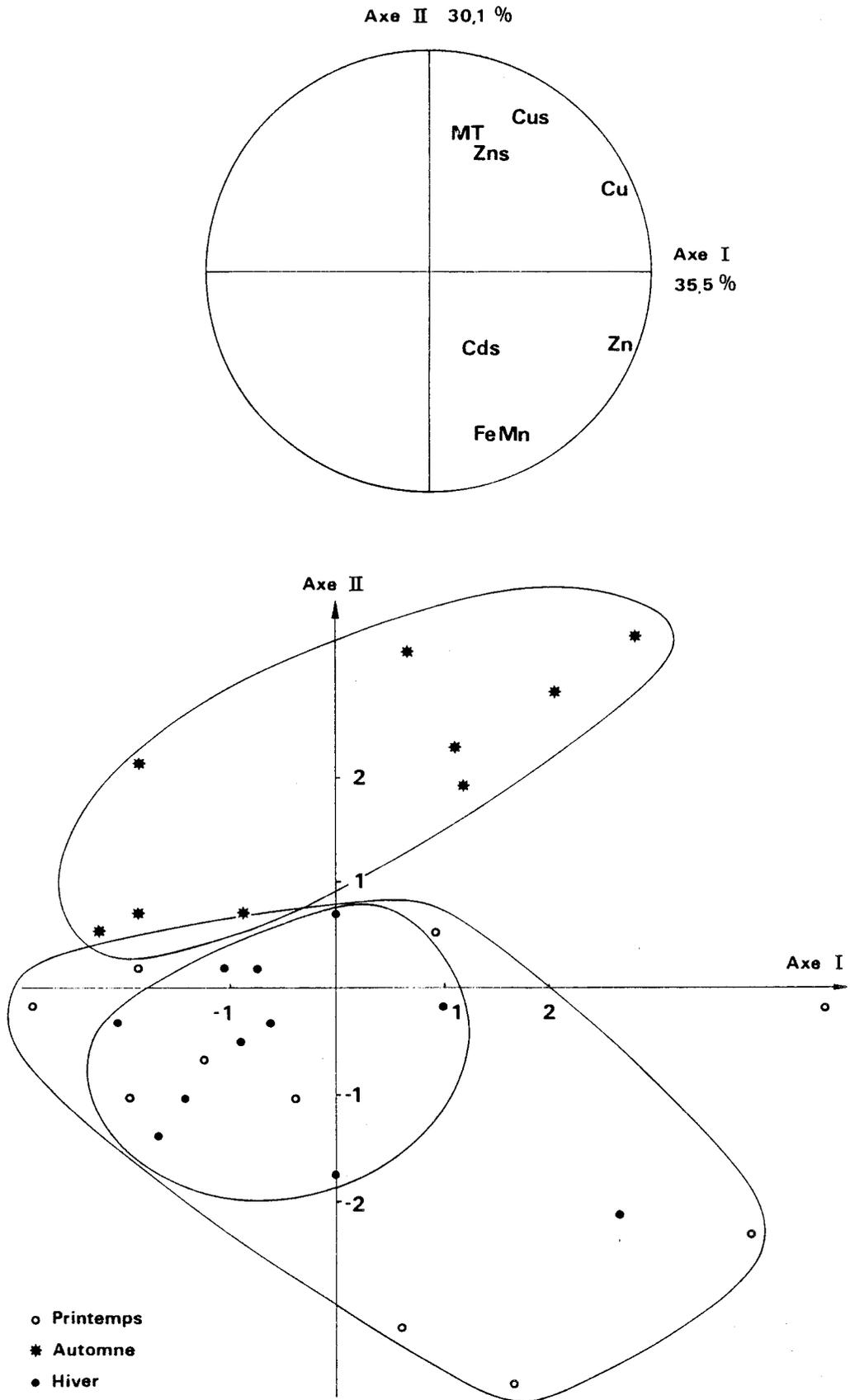


Figure 77 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en MT et métal (total et soluble) des limandes prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

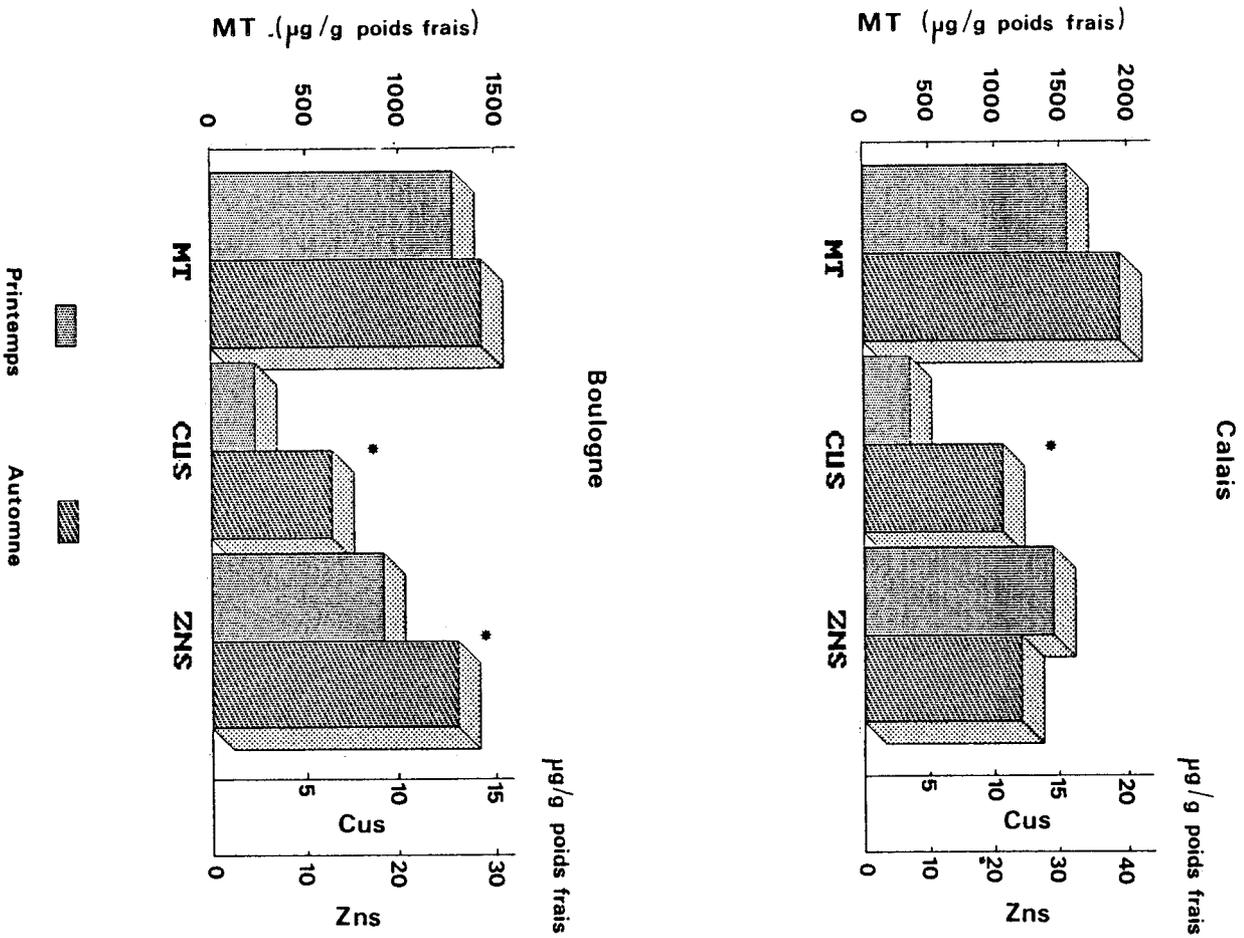


Figure 78 : Teneurs hépatiques moyennes en MT et métal soluble des limandes femelles prélevées en 1991 au printemps et en automne, à Calais et Boulogne.

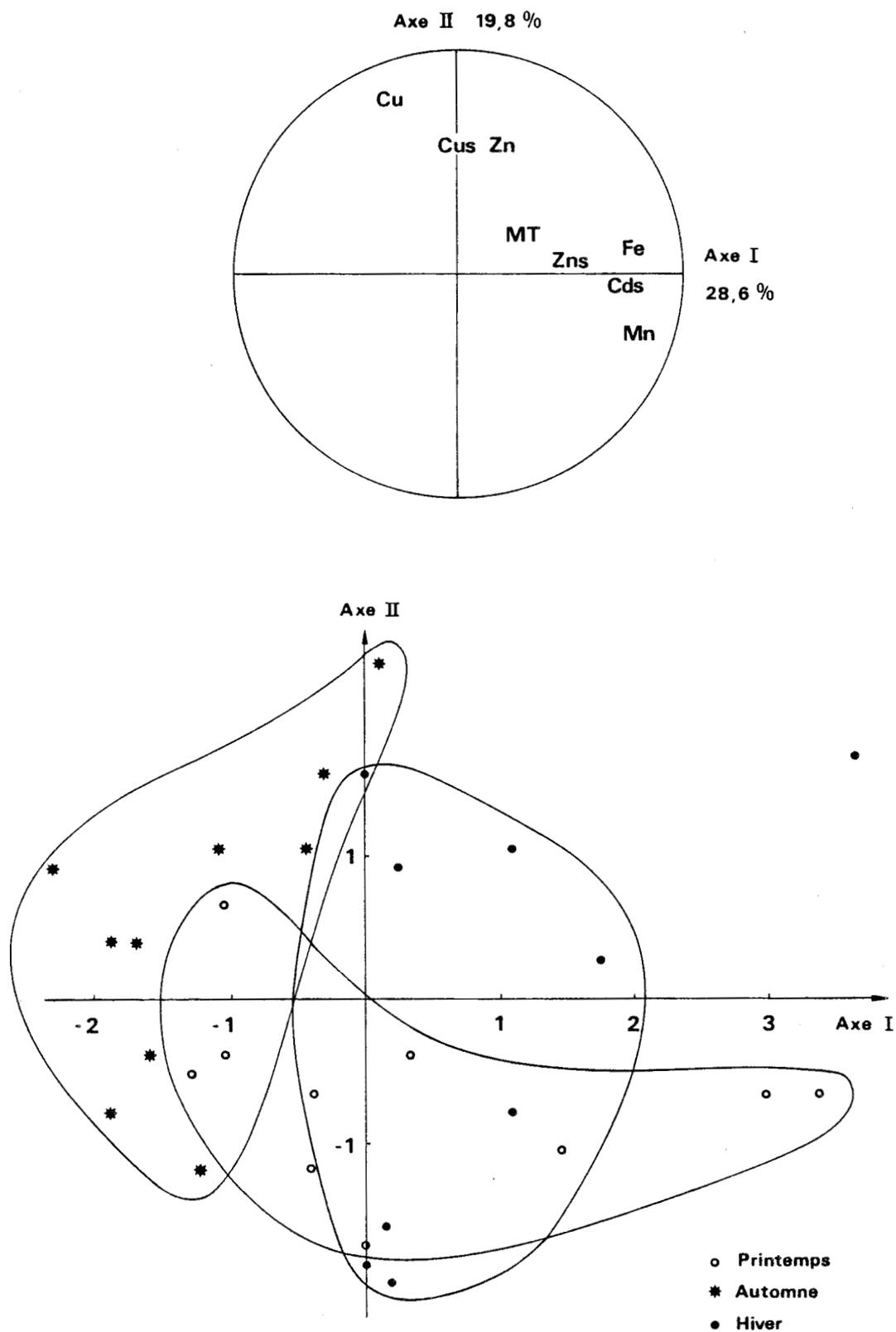


Figure 79 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en MT et métal (total et soluble) des limande-soles prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

métalliques plus importantes chez les individus de Calais seraient liées en priorité au facteur "site de prélèvements" mais aussi secondairement au facteur "âge" qui favorise l'augmentation des teneurs en Fe et Cds chez les individus les plus jeunes.

1.5. Variations des teneurs en métal et MT en fonction de l'époque de prélèvements

Les ACP présentées ont été réalisées sur les teneurs en métal (total et soluble) et MT des poissons prélevés à diverses saisons de l'année 1989.

Sur l'ACP (figure 77) concernant les limandes, les variables Cu et Zn déterminent l'axe 1 (Ctb = 35%). Les variables MT et Cu soluble évoluent de façon opposée aux variables Fe et Mn : l'ensemble de ces paramètres détermine l'axe 2 (Ctb = 30%). Les variables (Cu et Cus), (Cu et Zn), (MT et Cus) sont corrélées significativement deux à deux (respectivement $r = 0,707$; $P < 0,1\%$; $r = 0,508$; $P < 1\%$; $r = 0,504$; $P < 1\%$) ainsi que (Mn-Fe-Zn). D'après la répartition des nuages d'individus, les limandes prélevées en automne auraient tendance à posséder des teneurs élevées en MT, Cus et Cu et faibles en Zn, Mn, Fe contrairement aux échantillons prélevés au printemps et en hiver. Cette augmentation des teneurs en Cu et MT durant l'automne ne peut être liée au facteur âge puisqu'il n'influence pas ces paramètres.

Les teneurs moyennes en MT hépatiques des limandes prélevées en 1991 ont tendance à être plus élevées en automne qu'au printemps quel que soit le site de prélèvements (Calais ou Boulogne) (figure 78). Les teneurs en Cu soluble sont supérieures à cette époque également (t significatif au seuil de 1%) ainsi que les teneurs en Zn des échantillons de Boulogne. Les teneurs en métal total ne sont pas présentées car elles n'ont pas été déterminées pour les prélèvements d'automne. Pour les échantillons prélevés à Calais, les teneurs en MT et Cu soluble sont corrélées de façon significative ($r = 0,505$; $P < 5\%$).

Pour l'ACP (figure 79) concernant la limande-sole, la variable MT, qui n'est corrélée significativement qu'au Cd soluble ($r = 0,39$; $P < 5\%$), détermine l'axe 4 (Ctb = 15%) (projection dans le plan 1.4 non présentée), alors que les variables "métal" déterminent les trois premiers axes (les variables Mn, Fe et Cds sont liées). Sur la projection correspondant aux axes 1 et 2, les limande-soles prélevées en automne

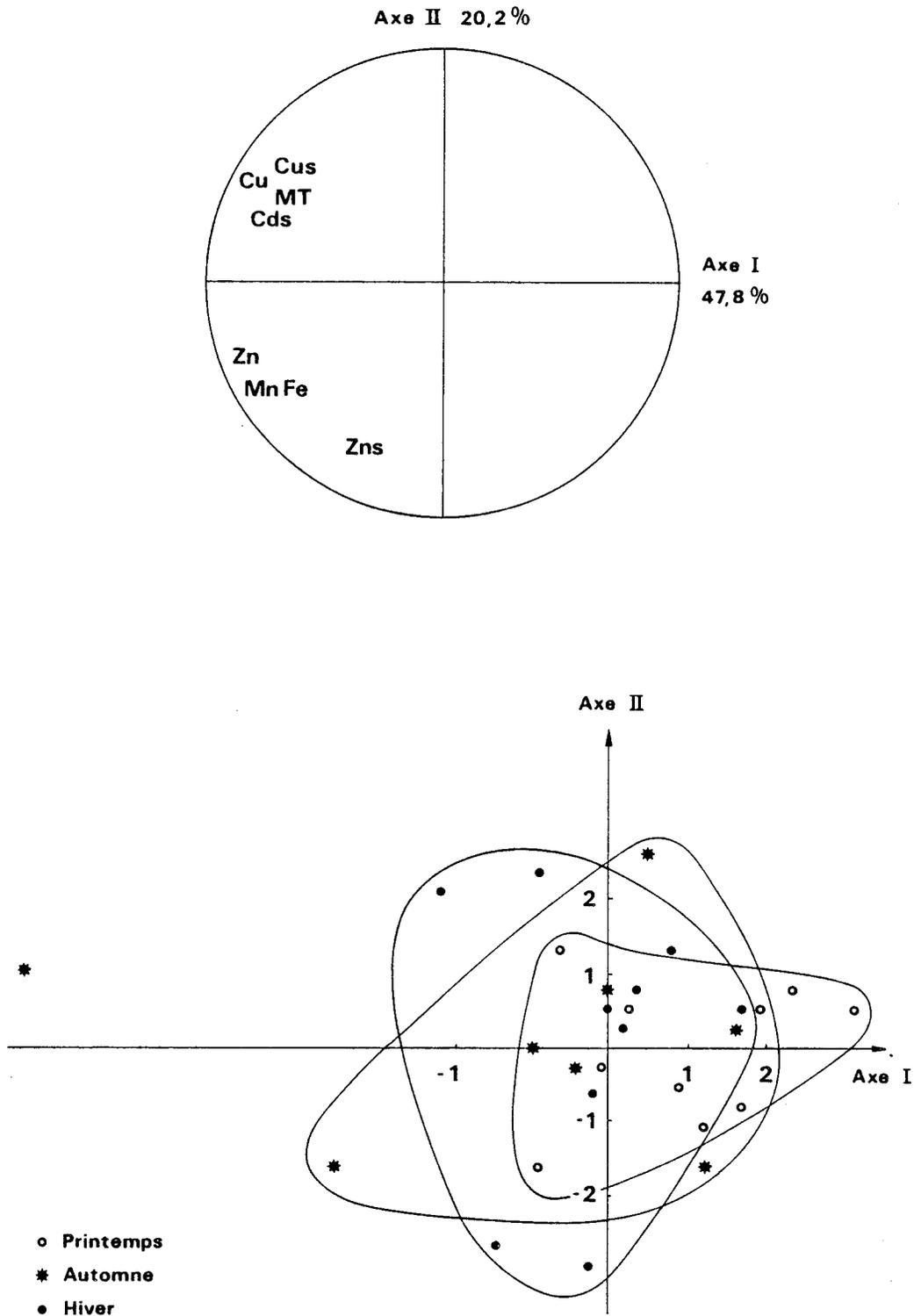


Figure 80 : ACP réalisée sur les teneurs hépatiques en MT, métal (total et soluble) des morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

possèdent des teneurs hépatiques en Cu et Cus variées mais globalement plus importantes que les individus prélevés en hiver ou au printemps. On a constaté que ni l'âge ni le sexe ne modifient ces teneurs. Les points ne sont pas discriminés par rapport à l'axe 3 (projection dans le plan 1.3 non présentée) ; les individus ne se différencient donc pas par des teneurs en Zn soluble particulières.

Chez la morue (figure 80), le Zns détermine l'axe 2 (Ctb = 20%) et les autres variables déterminent l'axe 1 (Ctb = 48%). Les MT sont corrélées en priorité au Cu et Cus ($r = 0,56$; $P < 1\%$) puis au Zn ($r = 0,465$; $P < 5\%$) et au Cds ($r = 0,38$; $P < 5\%$). Des coefficients de corrélation significatifs relient toujours les variables Fe, Mn et Zn ainsi que les teneurs en métal total (Cu et Zn) aux teneurs en métal soluble (Cus et Zns) (Cu-Cus : $r = 0,672$ $P < 0,1\%$; Zn-Zns : $r = 0,546$ $P < 1\%$). Les variables Cu et Zn sont également corrélées de façon significative ($r = 0,536$; $P < 1\%$).

Les nuages des individus se démarquent peu en fonction de leur époque de prélèvements. Les individus prélevés au printemps semblent toutefois posséder les teneurs en métal et MT les moins élevées. Ces variations de teneurs ne sont influencées ni par le facteur âge ni par le facteur sexe:

. nous avons montré que l'âge n'influe pas sur les teneurs en métal et MT de foies de morues ;

. dans ces groupes d'individus, le paramètre sexe n'intervient pas car les trois échantillonnages sont constitués de proportions comparables de mâles et femelles (3, 2 et 4 mâles sur 11 individus respectivement pour les échantillonnages de printemps, d'automne et d'hiver).

L'observation de la figure 81 montre que :

- pour chaque espèce, l'automne (prélèvements en Octobre et Novembre) est la saison pour laquelle les teneurs en MT sont les plus élevées et ceci de façon significative par rapport aux échantillons prélevés en hiver.

- pour chaque espèce, les teneurs moyennes en Cu total et Cu soluble évoluent parallèlement au cours des saisons ; elles sont toujours maximales durant l'automne.

- selon les saisons, les proportions de Cu soluble par rapport au Cu total varient peu chez la limande-sole et la morue. Par contre, chez la limande, cette proportion est plus importante en automne ($95 \pm 45\%$ contre $53 \pm 31\%$ au printemps et $70 \pm 30\%$ en hiver).

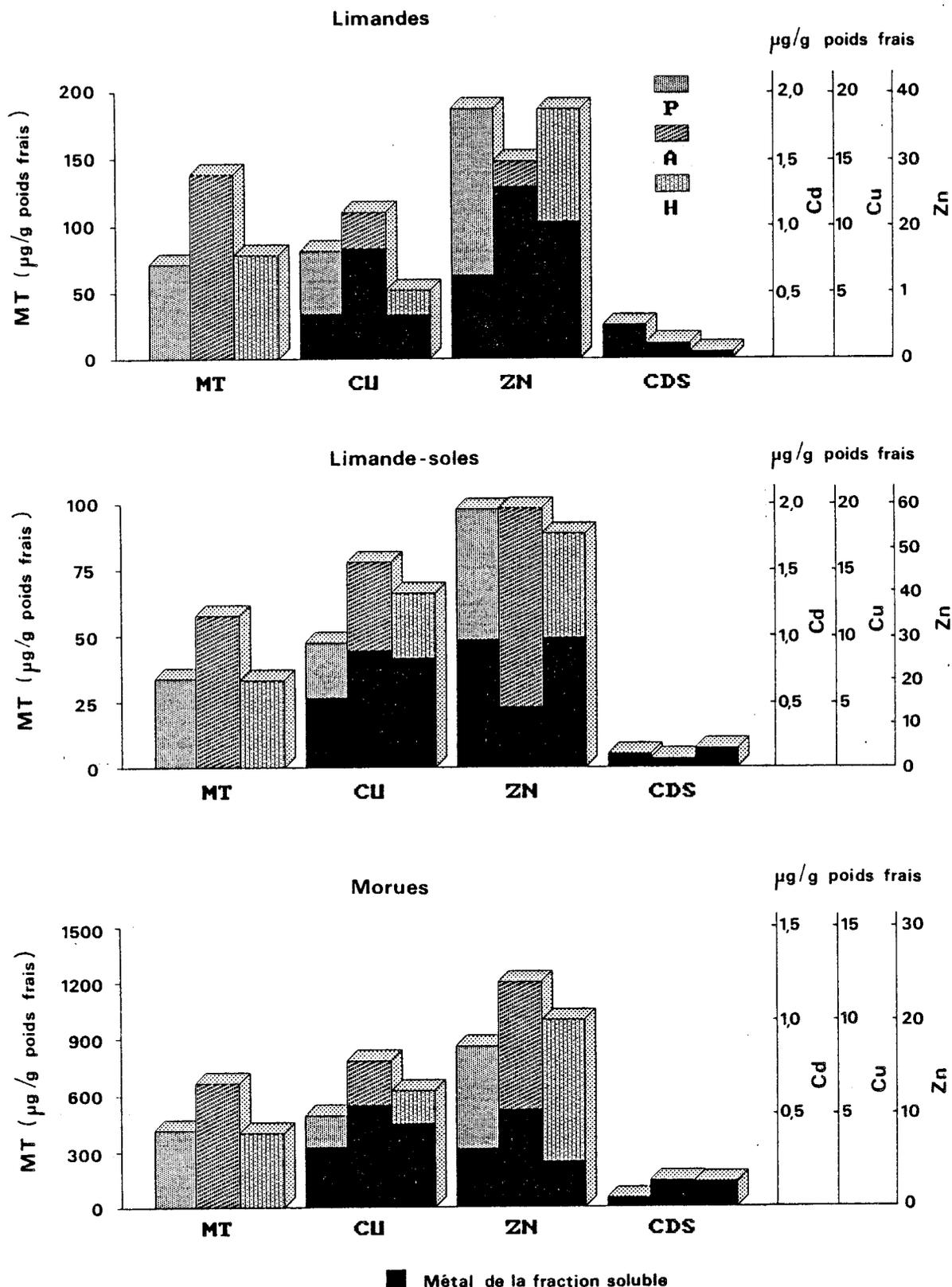


Figure 81 : Teneurs hépatiques moyennes en MT et métal (total et soluble) des limandes, limande-soles et morues prélevées au printemps (P), en automne (A) et en hiver (H) de l'année 1989. (n = 12 individus environ par échantillonnage).

Tests t : significatifs au seuil de 5% (0)

		MT	Cu	Zn	Cd	Zn	Cd
printemps/automne	Limande	○	N	N	○	○	N
	Limande-sole	N	○	N	○	○	N
	Morue	N	○	N	○	○	N
automne/hiver	Limande	○	○	N	○	N	N
	Limande-sole	○	N	N	N	○	N
	Morue	○	N	N	N	○	N

- l'évolution des teneurs en Zn (Zn total et Zn soluble) au cours des saisons diffère selon l'espèce considérée.

Chez la morue, ces teneurs ont tendance à être plus importantes en automne.

Chez la limande-sole, le Zn soluble est significativement moins abondant en automne qu'aux autres saisons alors que les variations du Zn total sont peu marquées.

Chez la limande, le minimum de Zn total détecté en automne, correspond au maximum de Zn soluble ; la proportion de ZnS est significativement plus élevée en automne qu'au printemps.

Les variations des teneurs métalliques ne sont pas liées à des modifications des composés du foie puisque les rapports poids frais/poids sec sont stables au cours du temps (tableau 39).

En résumé, on constate que chez les trois espèces, les variations globales des teneurs en MT, en Cu total et Cu soluble sont liées : elles augmentent en automne (MT est corrélé à Cu chez la morue, à CuS chez la morue et la limande).

Les teneurs hépatiques en MT, en Zn total et Zn soluble évoluent de façon plus indépendantes. Seule la corrélation entre MT et Zn chez la morue est significative ($r = 0,465$; $P < 5\%$). Le Zn soluble n'est pas corrélé aux MT de façon significative mais c'est chez la limande que la liaison des deux variables est la plus marquée, surtout en automne. D'autre part, le Cu est corrélé de façon significative au Zn chez la limande et chez la morue.

Le Cd dosé dans les surnageants (Cd soluble) est corrélé de façon significative (au seuil de 5%) aux MT chez la limande-sole et la morue.

La morue représente donc l'espèce pour laquelle les variables étudiées sont les mieux corrélées ; la limande-sole représente l'espèce pour laquelle les teneurs en MT sont peu corrélées aux métaux.

1.6. Comparaison des résultats concernant les prélèvements de l'année 1989 et 1991

Il existe des similitudes entre les résultats obtenus à partir des échantillons prélevés à Calais et ceux prélevés à Boulogne en 1989 et 1991.

Prélevées simultanément sur le site de Calais, les limande-soles ont toujours des teneurs métalliques supérieures et des teneurs en MT

Tableau 38 : Rapports poids frais/poids sec des foies de limandes, limande-sole et morues prélevées à différentes saisons de l'année 1989.

Espèce	n	Printemps	n	Automne	Rapport moyen
Limande	2	2,13 ± 0,01	4	2,08 ± 0,50	2,1
Limande-sole	2	2,7 ± 0,21	5	2,57 ± 0,52	2,6
Morue	15	1,55 ± 0,26	11	1,63 ± 0,28	1,6

Tableau 39 : Quantité minimales et maximales de Cu et de Zn liées aux pics 1 et 2 isolés par chromatographie de filtration sur gel Sephadex G75.
(exprimées en µg/g foie frais)

Espèce	n	Métal	Pic 1		Pic 2		% du métal lié au pic 2
			min	max	min	max	
Limande	13	Zn	6,22	33,9	ND	23,63	0 à 29
		Cu	ND	1,99	1,07	18,67	60 à 100
Limande-sole	6	Zn	12,96	37,07	ND	11,95	0 à 24
		Cu	ND	6,92	3,76	13,04	72 à 100

Tableau 40 : Corrélations entre les teneurs hépatiques en MT et métal de différents compartiments cellulaires, de limandes prélevées en milieu naturel.
(n = 8),
(métal total (t), métal soluble (s), métal lié aux protéines du pic 2 (2)).

	Coefficient de corrélation	P (en %)		Coefficient de corrélation	P (en %)
MT/Cut-Cus-Cu ₂	R = 0,92	4,56	MT/Znt-Zns-Cus	R = 0,35	59
MT/Cut	r = 0,68	6,02	MT/Znt	r = 0,40	30
MT/Cus	r = 0,86	0,67	MT/Zns	r = 0,47	24
MT/Cu ₂	r = 0,72	4,20	MT/Zn2	r = 0,23	59
Cus/Cut	r = 0,66	7,32	Zns/Znt	r = 0,12	76
Cu ₂ /Cut	r = 0,55	15	Zn2/Znt	r = 0,55	15
Cus/Cu ₂	r = 0,95	0,04	Zns/Zn2	r = 0,25	55

inférieures à celles des limandes ;

Les teneurs des foies de limandes en MT et en Cu soluble sont toujours plus élevées en automne qu'au printemps (Cu total non dosé pour les prélèvements d'automne 1991) ;

Les corrélations obtenues sont du même type pour les limande-soles prélevées à Calais en 1989 et en 1991 : les MT ne sont pas corrélées au métal (total et soluble) ;

Quelle que soit l'année de prélèvement, les teneurs en MT sont corrélées à celles du Cu chez les limandes. En automne 1991, elles sont également corrélées à celles du Zn. En 1989, cette corrélation n'était pas significative mais les deux variables avaient tendance à être davantage liées en automne qu'aux autres saisons.

On constate donc que les corrélations entre MT et métaux, et que les variations observées en fonction des espèces et de la saison sont bien reproductibles au cours du temps ce qui démontre une relative stabilité des phénomènes que régissent ces tendances.

Par contre, d'un point de vue quantitatif, des différences sont observées entre les résultats des prélèvements de 1989 et ceux de 1991. Chez les deux espèces, les teneurs en métal total sont du même ordre de grandeur pour les prélèvements faits à Calais durant l'année 1989 et l'année 1991. Par contre, les teneurs en métal soluble ont tendance à être plus élevées en 1991.

Les teneurs moyennes des échantillons de limande-soles prélevées aux printemps 1991 et 1989 sont respectivement de $7,1 \pm 3,6$ µg/g poids frais (PF) contre $5,4 \pm 2,6$ µg/g PF pour le Cu soluble et $54,7 \pm 8,6$ µg/g PF contre $29,2 \pm 11,7$ µg/g pour le Zn soluble.

Chez la limande, en automne, les teneurs moyennes de Cu soluble sont de $10,61 \pm 5,92$ µg/g en 1991 contre $8,41 \pm 6,69$ µg/g en 1989 et celles de Zn soluble, au printemps, sont de $28,8 \pm 4,5$ µg/g contre $12,6 \pm 6,7$ µg/g PF en 1989.

Les teneurs en MT sont également plus importantes pour les échantillons prélevés en 1991 que pour ceux de 1989. Ces teneurs supérieures peuvent être liées, en partie, à l'augmentation des teneurs en métal soluble.

Cependant, il faut signaler que la durée du stockage entre les prélèvements et l'analyse des teneurs en métal soluble et en MT a été beaucoup plus longue pour les échantillons prélevés en 1989 que pour ceux prélevés en 1991. Les composés du cytoplasme ont pu subir une altération, ce qui expliquerait les teneurs inférieures en MT et métal soluble

observées pour les prélèvements de 1989.

D'autre part, les teneurs en MT ont été déterminées en RIA pour les prélèvements de 1989 et en ELISA pour ceux de 1991. Nous avons bien montré que ces 2 techniques donnent des résultats corrélés (voir V), à partir d'échantillons de limandes. Cependant, il ne faut pas exclure l'éventualité que les différences observées au niveau des limande-soles puissent être liées, en partie, aux méthodologies utilisées.

1.7. Répartition des métaux dans différentes gammes de poids moléculaire

La chromatographie de filtration sur gel Sephadex G75 des surnageants hépatiques permet de déterminer la répartition des métaux (Cu et Zn) définis précédemment sous le terme de métal soluble, dans les différentes gammes de poids moléculaire (PM).

Quelle que soit l'espèce, les molécules de PM élevé (PM > 60 kDa, éluées au niveau du pic1) lient toujours beaucoup plus de Zn que de Cu. La proportion de Cu lié au pic2 (pic contenant des protéines de 8 à 12 kDa environ, PM des MT) est toujours beaucoup plus importante que celle du Zn : elle varie entre 53 et 100% pour le Cu et d'une quantité non détectable à 29% pour le Zn.

Chez la morue, c'est essentiellement du Cu qui est élué au niveau du pic2 alors que chez les deux espèces de pleuronectidés, le Cu et le Zn sont liés au pic2 en proportions variables.

Les teneurs moyennes en Cu soluble sont significativement plus importantes chez les limande-soles que chez les limandes alors que les teneurs de Zn varient peu entre les deux espèces (voir figure 71).

L'analyse des profils d'élution des échantillons des deux espèces montre que la limande-sole a tendance à contenir des quantités plus importantes de Cu que de Zn au niveau du pic2 et inversement chez la limande (7 profils d'élution sur 13 chez la limande présentent, en effet, une dominance des quantités de Zn liées au pic2 par rapport aux quantités de Cu contre 1 seul profil sur 6 chez la limande-sole) (voir tableau 40). Ces différences sont, toutefois, trop peu marquées pour expliquer la prédominance des MT chez la limande.

Pour certaines chromatographies réalisées avec des échantillons de limandes et limande-soles prélevées en automne 1991, les proportions de Cu et de Zn éluées au niveau du pic2 sont différentes de celles décrites précédemment.

D'après ces résultats, l'augmentation de la proportion de Zn soluble chez la limande en automne serait accompagnée par une augmentation de la proportion de Zn liée au pic2 (40 et 56%). L'augmentation des teneurs en métal soluble (et des proportions par rapport au métal total) selon les saisons, se répercuterait donc au niveau des teneurs métalliques du pic2. Bien que les MT ne soient pas corrélées significativement au Zn soluble chez la limande, c'est chez cette espèce cependant que le coefficient de corrélation est le plus élevé, notamment en automne.

Chez la limande-sole, bien que la proportion de Zn soluble diminue en automne par rapport aux autres saisons (déterminé pour les échantillons prélevés en 1989), des quantités de Zn supérieures à celles du Cu sont liées au niveau du pic2 : le contenu en Cu des pics 2 est important (environ 15 µg/g foie) mais celui en Zn l'est encore davantage (24 et 37 µg/g de foie soit 45 et 68%). Ces échantillons ont été prélevés en automne 1991 et c'est dans ces échantillons que les teneurs de Cus sont présents en quantités plus importantes (12,61 µg/g).

Chez la morue, la proportion de Zn lié au pic2 est plus faible que chez les deux autres espèces (maximum 11%). Les teneurs en Cu soluble sont faibles comparées à celles d'autres espèces mais une quantité importante est liée au pic2 (52,8 à 100%).

Les rapports Znt/Cut et Zns/Cus sont environ de 3,33 et 1,63 pour la morue ; 4,61 et 4,05 pour la limande ; 4,48 et 3,20 pour la limande-sole. On remarque que ces valeurs illustrent le fait que la proportion de Cu par rapport au Zn, disponible pour se lier au pic2, est plus importante chez la morue que chez les deux autres espèces.

A partir d'un échantillonnage constitué de 8 limandes prélevées en 1989, les corrélations entre les teneurs en métal total, métal soluble, métal lié au pic2 et MT ont été étudiées (tableau 41). Les résultats obtenus montrent que les MT sont corrélées au Cut-Cus-Cu2 ($R = 0,92$; $P = 4,56\%$) mais pas à l'ensemble Znt-Zns-Zn2, ni au Cds. Les teneurs en MT ne sont pas corrélées significativement aux teneurs de Cu de la fraction totale, mais le sont vis-à-vis des teneurs en Cu de la fraction soluble (et des teneurs en Cu lié au pic2). En ce qui concerne le Zn, aucune de ces corrélations n'est significative. Ces résultats sont en accord avec les données obtenues lors de l'étude des corrélations entre métal total, métal soluble et MT, réalisée sur les prélèvements de 1989. Ils montrent également que les quantités de Cu liées au pic2 sont

proportionnelles aux teneurs en Cu soluble et aux MT alors que pour le Zn aucune de ces corrélations n'est significative.

2. Discussion

- Comparaison des teneurs moyennes en métal et MT des trois espèces de poissons

Les teneurs hépatiques moyennes en MT sont différentes chez les trois espèces étudiées. En effet, les teneurs en MT des limandes, espèce prélevée à la côte, sont plus élevées que celles des limande-soles et des morues, espèces prélevées au large. De nombreux auteurs ont montré que l'exposition des poissons à un environnement pollué provoque une augmentation des teneurs en MT dans les tissus (HAMILTON et MEHRLE, 1986). D'après nos résultats, les limandes seraient exposées à un environnement plus contaminé que les limande-soles et les morues. Or, les poissons présentant les teneurs en MT les plus élevées ne correspondent pas à ceux possédant les teneurs métalliques les plus importantes : en effet, les teneurs en métal des foies de limande-soles sont plus importantes que celles des limandes, elles-mêmes supérieures aux teneurs des morues.

La comparaison du taux de MT chez des espèces différentes ne suffit donc pas pour estimer le degré de contamination du milieu auquel elles ont été soumises puisqu'il apparaît que le rapport teneur en MT/teneur en métal varie selon l'espèce considérée.

D'ailleurs en milieu tropical, le poisson-écureuil (*Holocentrus rufus*) possède des teneurs moyennes en MT hépatiques nettement plus élevées que deux autres espèces prélevées sur le même site : *Haemulon sciurus* et *Haemulon aurolineatum*. Même chez ces deux espèces qui sont très proches phylogénétiquement, les teneurs moyennes en MT diffèrent : elles sont respectivement égales à $196 \pm 145 \mu\text{g MT/g}$ foie pour *Haemulon sciurus* et à $345 \pm 25 \mu\text{gMT/g}$ foie pour *Haemulon aurolineatum* (HOGSTRAND et HAUX, 1990).

Chez une même espèce (*Salmo gairdneri*), provenant de deux zones considérées comme saines et dont les teneurs en MT ont été déterminées par la même technique de dosage, les teneurs moyennes en MT hépatiques varient également (respectivement $26 \pm 4 \text{ nmole MT/g}$ et $52 \pm 8 \text{ nmole/g}$ foie) (ROCH et MC CARTER, 1984b ; OLSSON et al., 1988).

Les teneurs en MT diffèrent donc d'une espèce à l'autre et il

apparaît que chez une même espèce, les quantités varient également. Pour comparer des teneurs en MT, il est donc nécessaire de se référer à une espèce précise prélevée dans des conditions semblables.

Bien que les proportions de métal soluble par rapport au métal total dans les foies varient selon le métal et l'espèce considérés, la répartition des teneurs métalliques solubles est globalement comparable à celle des teneurs métalliques totales. Chez d'autres espèces les mêmes remarques ont été faites : les teneurs des foies en Zn total sont plus importantes chez *Haemulon sciurus* que chez *Haemulon aurolineatum*. Il en est de même pour les teneurs en Zn soluble et inversement pour les teneurs en Cu de la fraction totale et soluble (HOGSTRAND et HAUX, 1990).

- Influence de différents paramètres (âge, sexe, saison) sur les teneurs en métal et MT

A partir d'échantillons prélevés au printemps et en hiver, il a été montré que chez les trois espèces les teneurs en MT ne sont pas affectées par le sexe de l'individu.

Chez la limande et la morue, comme chez la perche (HOGSTRAND et al., 1991), les teneurs en MT ne varient pas en fonction de l'âge (limande et morue) ou de la taille (perche) des poissons. Par contre, chez les limande-soles les plus jeunes, les teneurs en MT sont plus élevées.

Selon l'époque de prélèvements, il existe des modifications au niveau des teneurs métalliques et des MT. Les teneurs en Cu (fractions totales et solubles) et en MT augmentent en automne chez toutes les espèces. A cette époque, chez la limande, les proportions de métal soluble par rapport au métal total augmentent également alors que chez les deux autres espèces, en ce qui concerne le Zn, elles diminuent ou restent stables.

Ces modifications ne peuvent être considérées objectivement comme le résultat d'une pollution ponctuelle car les augmentations des teneurs en métal et MT ont été observées chez les trois espèces et toujours en automne. D'ailleurs, les teneurs métalliques des branchies, organe en contact avec le milieu extérieur et le plus représentatif d'une pollution à court-terme, ne reflètent pas une augmentation des teneurs en Cu du milieu environnant des trois espèces (l'augmentation de ces

teneurs n'est détectable que chez la limande-sole) (voir III).

Si ces variations ne sont pas le résultat d'une augmentation de la contamination dans le milieu environnant, d'autres facteurs (endogènes ou exogènes) doivent influencer les paramètres que nous considérons. Les échantillons ont été prélevés " *in situ*" et la baisse de température du milieu environnant survenant en automne peut entraîner une augmentation des teneurs en MT hépatiques. En effet, ce phénomène a été observé chez la truite et interprété par le fait que des substances endogènes telles que le glucagon ou les glucocorticoïdes provoquent des altérations dans le métabolisme des carbohydrates pendant l'acclimatation à une diminution de température ; ces substances pourraient être des inducteurs potentiels de la synthèse des MT (OLSSON, 1987). Or, dans ce cas, l'élévation des teneurs en MT hépatiques n'est pas accompagnée d'une augmentation des teneurs en Cu et en Zn. Cette hypothèse ne pourrait donc expliquer nos résultats que partiellement. Le cycle de reproduction influence non seulement les teneurs hépatiques en métal (voir III) mais aussi les teneurs en MT.

Chez la truite (*Salmo gairdneri*), les quantités de MT varient entre 160 et 580 µg/g environ pendant le cycle de reproduction de la femelle et augmentent de façon moins significative chez les mâles. Chez cette espèce ainsi que chez *Cynoscion nebulosus*, les teneurs en Zn et MT augmentent simultanément mais les variations des teneurs en Cu n'ont pu être mises en évidence à cause de leur taux et leur variabilité élevées. Chez ces espèces, les MT seraient donc impliquées dans la régulation du Zn pendant le cycle annuel de reproduction. Elles permettraient à l'organisme d'avoir un mécanisme de contrôle pour conserver un pool de Zn disponible en quantité appropriée (OLSSON et al., 1987 ; BAER et THOMAS, 1990).

Certaines hormones modulent les quantités de MT. L'oestradiol, hormone produite par les ovaires, va stimuler la synthèse de vitellogénine au niveau du foie, constituant majeur des ovocytes. Le traitement par cette hormone provoque la synthèse des MT chez la truite juvénile (OLSSON et al., 1989)

Chez le carrelet (*Pleuronectes platessa*), les plus importantes concentrations en MT hépatiques et les plus grandes variations individuelles sont mesurées durant les premiers stades de développement des gonades et de croissance des ovocytes (OVERNELL et al., 1987). Ceci est probablement lié au moment où le taux de synthèse de la

vitellogénine dans le foie est maximal car les teneurs maximales de cette protéine chez le poisson *Leptocottus armatus* sont atteintes quand les ovaires ne représentent que le cinquième de leur taille finale (DE VLAMING et al., 1984).

Nous venons de rappeler que chez les trois espèces, les teneurs en MT et Cu sont plus élevées en automne. Cependant, la limande est l'espèce pour laquelle les augmentations en MT, Cu et proportion de Zn soluble sont les plus importantes et les corrélations entre le Zn soluble et les MT sont les plus marquées, notamment en automne. Les MT ont donc la capacité de séquestrer davantage de Cu et de Zn à cette saison. D'ailleurs, des quantités plus importantes de Zn sont associées aux protéines de moyen PM chez des poissons prélevés en automne. A cette époque, le début de la phase de maturation des gonades provoquerait des changements métaboliques avec une mobilisation des éléments métalliques. Compte tenu des caractéristiques des échantillons prélevés en automne (âge, sexe), nous n'avons pu vérifier si, durant cette saison, les teneurs en MT sont plus importantes chez les femelles.

Cependant, la limande est également la seule espèce pour laquelle l'échantillonnage est constitué presque exclusivement de femelles ce qui nous conforte dans l'idée que les variations des teneurs doivent être liées au phénomène de maturation des gonades. Le facteur "saison" associé au facteur "sexe" de l'individu doit donc induire des modifications des teneurs en métal et MT hépatiques lors du cycle de reproduction.

- Relations entre métal et MT

L'étude de la répartition des métaux de la fraction soluble dans les différentes gammes de poids moléculaire (PM) montre que le Zn est toujours abondant dans les fractions qui correspondent au volume d'élution des protéines de PM élevé (>60 kDa). Chez la morue, ce métal est souvent presque exclusivement distribué au niveau de ces protéines. Par contre, chez les trois espèces, la proportion de Cu liée aux protéines dont le volume d'élution équivaut à un PM moyen (10 kDa environ), est généralement plus importante que celle liée aux plus grosses protéines.

Cette répartition des métaux dans les différentes gammes de PM est comparable à celles observées chez de nombreuses espèces telles que l'anguille (NOEL-LAMBOT et al 1978), la carpe (KITO et al, 1982), le flet (DELVAL, 1984), la perche (OLSSON et HAUX, 1986). Les résultats ont montré que les quantités relatives de Cu et Zn solubles dosées au niveau

des protéines de PM moyen varient selon les espèces et semblent liées au rapport Zns/Cus : les quantités de Zn situées à ce niveau ont tendance à être supérieures à celles du Cu chez la limande (Zns/Cus = 4,05) et inversement chez la limande-sole (Zns/Cus = 3,20).

La composition métallique des MT, chez différentes espèces, peut présenter des variations considérables; elles peuvent être des Cu-thionéines (*Salmo gairdneri*) (OLSSON et HAUX, 1985) ou des Zn-thionéines (*Haemulon sciurus*) (HOGSTRAND et HAUX, 1990). Dans le second cas, les auteurs suggèrent qu'il s'agit d'une Zn-thionéine car le contenu en Zn hépatique est environ 5,5 fois supérieur à celui du Cu.

La morue présente le rapport Zns/Cus le plus faible (1,63) et l'on constate qu'au niveau des protéines de PM moyen, c'est essentiellement du Cu qui est élué. Les MT de morues possèderaient donc des caractéristiques proches de celles des Cu-thionéines.

Chez la limande, la corrélation entre les variables "Cu soluble" et "MT" est significative. La relation entre les teneurs en MT et celles du Zn soluble n'est pas significative mais elle est plus marquée lorsque les individus sont prélevés en automne.

Les quantités de Cu élué au niveau des protéines de PM moyen (environ 10kDa) sont également corrélées aux teneurs en MT, ce qui confirme que les métalloprotéines sont bien des MT. Une augmentation des teneurs hépatiques en Cu soluble entraîne donc une augmentation de l'incorporation du Cu au niveau des MT.

Les quantités de Zn lié aux MT sont souvent supérieures à celles du Cu. Bien que la complexation du Zn soit supposée être liée à un besoin de détoxification de l'organisme ou/et au maintien de l'homéostasie cellulaire, cela n'implique pas que les teneurs soient corrélées à celles des MT.

Chez la morue, les teneurs en Cu total et en Cu soluble sont corrélées significativement aux teneurs en MT ($P < 1\%$) ainsi que les teneurs en Zn. Cette dernière relation est toutefois moins marquée que celle observée avec le Cu ($P < 5\%$).

Il apparaît donc que chez ces deux espèces, ce sont les teneurs en Cu qui sont les mieux corrélées aux MT.

Les études concernant les relations entre les MT et les métaux réalisées "in situ" confirment le fait que les teneurs des foies de poissons en MT et en métaux sont plus ou moins fortement liées selon le

métal considéré.

En effet, la perche prélevée dans différents sites de la rivière Gusumsån (Suède) répartis le long d'un gradient de pollution métallique (rejets de Cu et Zn), possède un taux de MT hépatiques corrélé en priorité au Cu hépatique ($r = 0.85$), puis au Zn ($r = 0.75$) et peu corrélé au Cd ($r = 0.48$). L'analyse de la distribution des métaux montre que des niveaux élevés de métaux dans les individus se reflètent par une incorporation plus importante au niveau des MT, en particulier pour le Cu (HOGSTRAND et al., 1991).

Chez le flet (*Platichthys flesus*) et la truite (*Salmo gairdneri*) prélevés dans des sites contaminés à des degrés différents par une pollution métallique non spécifique, les teneurs hépatiques en Cu et MT évoluent de façon plus comparables que les teneurs en Zn et MT (OVERNELL et ABDULLAH, 1988 ; ROCH et al., 1982). Alors que les quantités de Cu complexées aux protéines de PM moyen sont liées aux quantités de MT et sont aussi fonction du degré de contamination métallique à laquelle la truite a été exposée, celles du Zn ne le sont pas. Pourtant, la concentration en Zn de l'eau était 20 fois supérieure à celle du Cu (ROCH et Mc CARTER, 1984). Il faut noter, cependant, que les MT de truite ont été définies comme étant des Cu-thionéines et donc, par définition, elles lieront préférentiellement du Cu plutôt que du Zn (OLSSON et HAUX, 1985).

Une contamination par 10 ppm de Zn dans l'eau provoque une augmentation des quantités de Zn dans les protéines de haut PM et de moyen PM chez la carpe. Cette augmentation des quantités de Zn s'accompagne d'une redistribution du Cu, initialement présent dans les deux types de protéines, vers les protéines de moyen PM exclusivement. L'exposition au Zn stimulerait donc le métabolisme du Cu (KITO et al., 1982).

Par contre, après contamination des carrelets (*Pleuronectes platessa*) par injection de Zn, les teneurs hépatiques en MT et en Zn augmentent et sont corrélées de façon significative (OVERNELL et al, 1987 ; OVERNELL et al, 1988).

Ces divers résultats montrent qu'en milieu naturel, à l'inverse des expériences en laboratoire, les corrélations entre les teneurs en MT et en Zn hépatiques sont rarement mises en évidence, même lorsque le milieu (ROCH et al, 1982) ou les foies (OVERNELL et ABDULLAH, 1988) présentent des concentrations élevées en Zn. Par contre, les corrélations entre les teneurs en MT et en Cu hépatiques sont souvent

significatives. La liaison privilégiée du Cu avec les MT existe chez de multiples espèces, même lorsque le Zn a été le paramètre inducteur de la synthèse des MT. Cette corrélation est liée au problème de compétition entre les métaux pour la fixation au niveau des groupements sulfhydryles des MT et s'explique par le fait que le Cu a une affinité supérieure à celle du Cd, elle-même supérieure à celle du Zn pour la liaison avec les MT (KAGI et NORBERG, 1979).

Chez la limande-sole, les variables Cu et Zn (total et soluble) ne sont pas corrélées de façon significative à la variable MT. Les variations des teneurs en Cu soluble et MT sont toutefois comparables car elles augmentent en automne.

Dans une étude concernant le flet capturé en milieu naturel, il a été montré également que les MT ne sont pas corrélées aux concentrations de Cu dans les organes (ADDISSON, 1988), alors que d'après OVERNELL et ABDULLAH (1988) cités ci-dessus, il existe chez cette espèce une relation entre les teneurs en MT et Cu. L'environnement du poisson influence donc fortement la nature des corrélations mises en évidence qui ne sont pas liées uniquement au facteur "espèce".

Nos résultats ont montré également que les teneurs hépatiques en Cu varient en fonction de celles du Zn chez les limandes et les morues. Lorsque des flets ont été prélevés en milieu naturel dans des sites contaminés par du Cu (BRYAN et GIBBS, 1983) ou du Zn (OVERNELL et ABDULLAH, 1988), les teneurs hépatiques du contaminant augmentent alors que celles des autres métaux restent stables. Ces observations démontrent que les limandes et les morues n'ont pas dû être soumises à un environnement pollué spécifiquement par l'un de ces deux métaux.

Chez les limande-soles prélevées à Calais, les teneurs en Cu et Zn ne sont pas corrélées : cette espèce de fond a dû être soumise à un environnement dont les caractéristiques diffèrent de celui des autres espèces.

Seules les deux espèces prélevées au large (morue et limande-soles) présentent des corrélations significative entre les teneurs en MT et celles en Cd soluble. Cependant, les teneurs hépatiques moyennes en Cd soluble sont du même ordre de grandeur chez les trois espèces et le nombre d'échantillons dont les teneurs en Cd total atteignent le seuil de détection au SAA en flamme est comparable chez les deux espèces de poissons plats. D'après ces résultats, on ne peut attribuer cette

différence à une contamination par du Cd plus prononcée au large qu'à la côte. Pourtant, d'après les bilans du "projet mer" de la Belgique (1976), les concentrations de Cd dans l'eau de mer seraient plus élevées au large qu'à la côte et liées aux apports provenant de la Manche. Le site de chalutage "large" ne doit pas faire partie de la zone contaminée car des concentrations élevées en Cd sont généralement reflétées dans les organismes.

Selon l'hypothèse du "spillover" émise par WINGE et al. (1973), la toxicité des métaux n'intervient que quand la capacité de liaison des MT est saturée car les métaux excédentaires sont alors transférés vers d'autres molécules telles que les enzymes. D'après nos résultats, les limande-soles et les morues présenteraient une tolérance supérieure à celle des limandes vis-à-vis du Cd puisque les teneurs en Cd sont reliées aux teneurs en MT. On sait que l'affinité du Cu pour les MT est supérieure à celle du Cd. Des teneurs hépatiques élevées en Cu peuvent impliquer une complexation importante de ce métal au niveau de la protéine et limiter le nombre de sites disponibles pour la liaison du Cd. Ceci expliquerait que les teneurs en MT ne soient pas corrélées à celles du Cd soluble. Or, c'est précisément l'espèce "limande" qui présente les rapports teneurs en MT/teneurs en Cu les plus élevés et donc une potentialité plus élevée pour la complexation du Cd.

ROCH et MC CARTER (1984) remettent en cause l'hypothèse du "spillover" car, d'après ces auteurs, le taux de synthèse des MT, et non pas leur concentration ni les métaux associés, serait essentiel pour la protection contre la toxicité métallique. En effet, des niveaux élevés de MT sont trouvés chez des animaux qui n'ont pas été acclimatés à une contamination par les métaux lourds (ROCH et MC CARTER, 1984a ; 1984b). Selon cette observation, il est possible que les quantités importantes de MT induites chez les limandes soient liées au fait que cette espèce est moins tolérante vis-à-vis des métaux que les limande-soles .

- Relation entre les teneurs en métal et MT et le degré de contamination des sites de prélèvements

Dans le chapitre III, nous avons montré que les teneurs métalliques des foies de poissons varient lorsque les teneurs du milieu environnant diffèrent, et qu'entre les trois organes étudiés (foie, branchie, muscle), le foie reflète davantage le degré de contamination du milieu.

En effet, les teneurs hépatiques en métal des morues prélevées au large de Calais ont tendance à être plus élevées que celles des individus pêchés à la côte, site relativement moins contaminé que le large.

Le site de Calais est plus pollué que le site de Boulogne et les poissons plats prélevés à Calais présentent davantage de métal total que ceux capturés à Boulogne. Les teneurs hépatiques en Cu et Zn du flet prélevé dans les mêmes zones en 1984 variaient de façon similaire (DELVAL, 1984) (voir III). Lorsqu'ils sont prélevés sur le site de Calais, ces poissons possèdent également des teneurs en métal soluble plus importantes.

Bien que les teneurs en métal total et en métal soluble varient, les proportions de Zn et de Cu solubles par rapport au Zn et au Cu total restent comparables chez les individus d'une même espèce prélevés dans deux sites différents. Chez la perche, la répartition du Cu et du Zn hépatiques dans les différents compartiments cellulaires (isolés par centrifugation et ultracentrifugation) n'est pas modifiée même si le degré de contamination par le Cu et le Zn subi par le poisson varie (HOGSTRAND et al., 1991). L'exposition de *Catostomus commersoni* à des concentrations élevées en Cd, Zn ou Hg ne modifie pas la capacité de liaison du Cd¹⁰⁹ dans les surnageants mais modifie sa répartition au niveau des molécules des différentes gammes de PM (KLAVERKAMP, 1987).

Le degré de contamination du milieu n'intervient donc pas sur la répartition des métaux dans la fraction soluble et totale.

Chez les limandes et les morues provenant des sites les plus contaminés, non seulement les teneurs hépatiques en métal augmentent mais également les teneurs en MT. Les teneurs en métal et MT des poissons prélevés en milieu naturel varient donc avec le degré de contamination du milieu.

Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse émise par divers auteurs démontrant, après intoxication des poissons en laboratoire, que la synthèse des MT est induite par exposition aux métaux lourds et que la quantification de cette protéine devrait être utilisée pour évaluer le degré de pollution du milieu environnant (KITO et al., 1986 ; OLSSON et al., 1987 ; OVERNELL et al., 1988). Quelques études ont eu pour but de vérifier "in situ" si l'utilisation de cet indicateur biochimique est réellement envisageable.

Chez la perche prélevée dans un environnement contaminé par le Cd, la

majorité du Cd hépatique est liée aux MT et l'accumulation du Cd est corrélée avec les teneurs en MT hépatiques (OLSSON et HAUX, 1986). Une relation similaire existe entre les teneurs hépatiques en MT, en Cu et en Zn chez la même espèce capturée dans un secteur contaminé par du Cu et du Zn (HOGSTRAND et al., 1989).

Chez une espèce tropicale (*Haemulon sciurus*), il a été montré que lorsque les concentrations de Cu et de Zn augmentent dans le foie, une proportion plus importante de ces métaux est séquestrée par les MT, ceci en fonction du degré d'exposition (HOGSTRAND et HAUX, 1990).

Chez la truite capturée dans une série de lacs pollués par un mélange de Cu, Zn, et Cd, les teneurs en MT hépatiques sont corrélées à celles du Cu dans le foie et du Zn dans l'eau (ROCH et al., 1982).

On constate donc que chez des individus prélevés en milieu naturel, les teneurs en MT sont plus importantes chez les poissons provenant des sites les plus contaminés. Cependant, selon la nature de la pollution, la relation MT/métal dans les organes n'est pas toujours mise en évidence notamment lorsqu'il s'agit de contamination par le Zn.

D'après nos résultats, il serait envisageable d'utiliser les MT pour estimer le degré de pollution auquel ont été soumises les limandes et les morues. D'ailleurs, rappelons que ce sont chez ces espèces qu'ont été détectées les meilleures corrélations entre les teneurs en MT et celles du Cu et du Zn. D'autre part, chez la limande prélevée sur les deux sites différemment contaminés, les teneurs en Cu et Zn diffèrent de façon significative (d'un facteur 1,7 et 1,44 environ respectivement) mais pas les teneurs en MT (variant d'un facteur 1,21 environ). A l'inverse des tendances observées chez la perche (HOGSTRAND et al., 1991), une augmentation relativement marquée des concentrations métalliques résulte en de faibles variations des teneurs en MT. Chez la morue prélevée sur les sites de "référence" et "contaminé", les teneurs hépatiques moyennes en métal et MT varient d'un facteur équivalent (environ 1,25).

Par contre, chez la limande-sole, bien que les teneurs métalliques soient plus élevées chez les individus prélevés dans le site le plus contaminé, les teneurs en MT sont du même ordre voire plus faibles que chez les individus prélevés dans le site le moins contaminé. Ces résultats ne sont pas expliqués par l'influence de facteurs biologiques tels que le sexe ou l'âge des individus. Il faut noter que chez cette espèce, les relations teneurs en MT/teneurs en métal total et

soluble n'ont pu être mises en évidence. D'autre part, contrairement aux deux autres espèces étudiées, les teneurs métalliques branchiales et hépatiques étaient plus élevées chez les individus du site le plus contaminé mais le muscle présentait des teneurs plus faibles. Des études complémentaires seraient nécessaires afin d'élucider les problèmes soulevés lors de l'analyse des résultats concernant cette espèce.

CHAPITRE VII
BILAN ET CONCLUSIONS

CHAPITRE VII : BILAN ET CONCLUSIONS

Dans ce travail concernant l'impact de la contamination du milieu marin par les métaux lourds sur les organismes vivants, nous nous sommes consacrés à traiter des données provenant de prélèvements "in situ".

Le littoral de Calais à Dunkerque est pollué par des rejets provenant essentiellement de Calais. Cette zone a donc été comparée à celle de Boulogne, secteur défini lors de travaux antérieurs, comme étant moins pollué (DELABRE, 1985 ; DELVAL, 1984). Les concentrations métalliques mesurées dans les sédiments ont confirmé ces données et ont permis de préciser que les degrés de contamination des deux sites du large sont plus différents ceux des deux sites de la côte. D'autre part, les sites du large présentent une charge métallique globalement supérieure à ceux de la côte, résultat probablement lié à l'impact des dépôts de dragages.

L'établissement des niveaux de concentration en contaminants métalliques dans les tissus d'organismes marins avait deux objectifs : le contrôle de la salubrité des produits de la mer qui constituent des vecteurs de substances potentiellement toxiques pour l'homme et le suivi de la contamination du milieu. Le premier objectif peut être facilement atteint puisque le tissu choisi (muscle) est consommé. Cependant, la réalisation du second objectif est plus difficile dans la mesure où il repose sur l'hypothèse de l'existence d'une proportionnalité entre la concentration en éléments métalliques dans l'organisme et celle du milieu environnant.

Les poissons prélevés sur le littoral Nord-Pas-de-Calais se caractérisent par des teneurs particulièrement élevées en Pb au niveau du muscle. Il avait été montré précédemment que dans cette région le Pb est effectivement abondant dans l'environnement ainsi que dans le muscle de morue (COLAS, 1980). D'un point de vue sanitaire, ces résultats sont donc intéressants. En ce qui concerne les autres métaux étudiés, les teneurs mesurées sont dans la gamme des niveaux de référence établis par le CIEM (CIEM, 1988 cité par COSSA, 1990).

Parmi les trois organes considérés (branchies, foie et muscle), c'est le cortège métallique des branchies qui reflète le mieux l'importance respective des différents métaux présents dans l'environnement, observation explicitée par le fait que cet organe est en contact direct avec l'extérieur.

D'autre part, les individus prélevés au large de Calais présentent au niveau des branchies des teneurs élevées en Mn et Pb tandis que le Fe et le Zn sont plus abondants chez les individus provenant de la côte. Ces teneurs (excepté le Fe) sont représentatives de la charge métallique des milieux environnants respectifs.

Les teneurs métalliques des foies varient en fonction du degré de contamination du milieu. En effet, les poissons prélevés sur les sites les plus contaminés présentent les teneurs les plus élevées en métal. D'autre part, les concentrations hépatiques sont globalement plus importantes chez les poissons plats que chez la morue, ce qui est lié au mode de vie des poissons. Les premiers sont en contact avec le fond et sont donc soumis à une source de contamination plus importante que la morue vivant davantage dans la colonne d'eau, observation confirmée par les résultats de BARAK et MASON (1990) concernant l'anguille (*Anguilla anguilla*) et le gardon (*Rutilus rutilus*).

Les teneurs métalliques des muscles ne sont pas liées aux variations des degrés de contamination auquel ont été soumis les deux espèces de poissons plats. Le muscle de flet, espèce présentant un caractère de sédentarité plus marqué que les limandes et limande-soles, est d'après COSSA (1990), un bon indicateur de la contamination du littoral. Le mode de vie des poissons est donc déterminant quant à l'utilisation et à la qualité de l'indicateur "teneurs métalliques du muscle".

Suite à ces analyses, il est donc apparu que les contenus en métal des foies et des branchies sont, dans l'ensemble, liés à la charge en polluants du milieu environnant. Les modifications des teneurs métalliques hépatiques semblent amplifiées par rapport aux variations observées dans les branchies. Ceci s'explique par le fait que le foie est un organe accumulateur (notamment de Cu) et constitue le site ultime de stockage de nombreux métaux. Les branchies constituent une voie de contamination importante pour les métaux en

solution. En effet, une contamination par l'eau se reflète d'abord au niveau des branchies (WESTERNHAGEN et al., 1980 ; LAUREN et MC DONALD, 1985). Les métaux absorbés sont ensuite transférés vers les organes internes tandis que le tractus digestif représente la voie majeure d'assimilation pour les métaux fournis par la nourriture (DALLINGER et al., 1987). En milieu naturel, dans des conditions qui sont assimilables à une "intoxication" chronique via l'eau et la nourriture, le foie et les branchies sont donc impliqués dans l'absorption et doivent être représentatifs de la pollution du milieu environnant.

Le foie est un organe qui intervient non seulement dans l'accumulation des métaux mais également dans la détoxification. La complexation des métaux par des ligands organiques peut les rendre biochimiquement moins actifs. Des protéines intracellulaires spécifiques, les métallothionéines (MT) agissent comme des agents protecteurs vis-à-vis de la toxicité de ces éléments. La présence de MT a été mise en évidence chez de nombreux organismes incluant différentes espèces de poissons (KLAVERKAMP, et al. 1984 ; KRESOSKI et al., 1988). Cependant, il existe des métalloprotéines différentes des MT (STONE et OVERNELL, 1985). C'est pourquoi la caractérisation des protéines complexant les métaux d'un poids moléculaire de 10 kDa a été nécessaire avant d'adopter une technique de dosage adaptée pour déterminer les teneurs hépatiques des métalloprotéines dans l'ensemble des échantillons prélevés en milieu naturel.

Des MT ont été détectées dans les foies de limandes (OVERNELL et MC INTOSH, 1988). Par contre, à notre connaissance, aucune donnée bibliographique ne concerne la présence des MT chez les espèces limande-sole et morue. La caractérisation des métalloprotéines de PM de 10 kDa environ a permis de montrer que chez les pleuronectidés, les métalloprotéines hépatiques sont bien des MT. Comme chez d'autres espèces (*Salmo gairdneri* ; *Carassius auratus*), deux isoformes de MT sont présents chez chacune de ces espèces (OLSSON et HAUX, 1985 ; YAMAMURA et SUZUKI, 1983). D'après la position des pics visualisés sur les profils d'élution obtenus par chromatographie HPLC en DEAE après filtration sur gel Sephadex G75, l'un des deux isoformes est commun aux deux espèces. Ces isoformes sont tous subdivisés en 2 pics majeurs

sur colonne en phase inverse comme chez le flet (*Platycthtys flesus*) (RICHARD et al., à paraître) et l'une des protéines isolées, présentant les propriétés d'absorbance des MT, contient 22% de cystéine chez la limande et 27% de cystéine chez la limande-sole. La teneur en cystéine des protéines contenues dans le second pic varie selon les échantillons. On peut émettre l'hypothèse que ce pic est constitué d'une MT associée à d'autre(s) protéine(s). Cependant, des études complémentaires seraient nécessaires afin de préciser la nature de ces protéines.

A l'inverse de certains résultats obtenus chez la truite (THOMAS et al., 1985 ; KAY et al., 1986), le type de contamination subie par le poisson (contamination artificielle par injection de Cd ou contamination par exposition en milieu naturel) n'intervient pas sur la nature des métalloprotéines induites par le poisson.

Les deux isoformes de MT séparés sur colonne DEAE ne se distinguent pas par une liaison préférentielle pour un élément en particulier car ils complexent aussi bien le Cd que le Cu ou le Zn. Cependant, l'isoforme 2 est souvent prédominant ce qui est en accord avec les données de DUNN et al. (1987).

Les métalloprotéines hépatiques de morue n'ont pas été caractérisées de façon aussi précise que celles des poissons plats. Toutefois, les dosages réalisés par polarographie à impulsions différentielles (DPP) et par immunologie avec un anticorps anti-MT de perche ont montré que des MT sont également présentes chez cette espèce.

Afin de quantifier les MT dans l'ensemble des échantillons prélevés "in situ", nous avons voulu utiliser une technique qui soit adaptée au suivi de "routine" c'est-à-dire susceptible d'être employée ultérieurement dans le cadre de réseaux de surveillance des milieux naturels. La technique idéale devait donc rassembler les avantages suivants : fiabilité, rapidité et facilité de mise en oeuvre. D'après ces critères, les techniques immunologiques paraissent donc, a priori, les plus appropriées, notamment l'ELISA, technique plus rapide que la RIA et ne nécessitant pas l'utilisation de produit radioactif.

La RIA a été la première technique qui a pu être utilisée. Les MT hépatiques des trois espèces de poissons ont été quantifiées avec

un anticorps (Ac) polyclonal anti-MT de perche mis à notre disposition par le Dr C. HOGSTRAND (Suède). Bien que cet Ac présentait une spécificité moindre vis-à-vis des MT hépatiques des trois espèces étudiées que vis-à-vis de celles de perche, les caractéristiques des courbes standards permettaient de quantifier les MT de nos échantillons dans de bonnes conditions. Ultérieurement, cet Ac a été utilisé en ELISA et la méthode que nous avons mise au point a permis d'abaisser le seuil de détection de ces protéines. D'après WINGE et GARVEY (1983), les changements intervenant au niveau de la partie N-terminale de la structure primaire des protéines seraient davantage impliqués dans l'immunoréactivité de l'Ac que la composition métallique des MT. C'est pourquoi les Ac dirigés contre les MT de poissons ne détectent pas les MT de mammifères (NOREY et al., 1990 ; CHATTERJEE et al., 1990), ce que nous avons également vérifié. Cependant, d'après les résultats obtenus en RIA et en ELISA, l'immunoréactivité de l'Ac anti-MT de perche diffère selon la nature des éléments métalliques liés aux MT contrairement à diverses données de la littérature (GHAFAR et al., 1989 ; HOGSTRAND et HAUX, 1990 ; CHATTERJEE et MAITI, 1990 ; NOREY et al., 1990). Dans leurs expériences, ces auteurs disposaient d'Ac dirigés contre les MT analysées. Le fait que nous ayons utilisé un Ac non spécifique lors des dosages des MT peut être un paramètre à prendre en compte pour expliquer ces différences.

L'utilisation de la DPP pour le dosage des MT hépatiques des deux espèces de poissons plats a donné des résultats corrélés à ceux obtenus en RIA, comme chez la perche (HOGSTRAND et HAUX, 1992). Bien que le seuil de détection de la DPP soit plus élevé que celui de la RIA (lorsque l'Ac utilisé est spécifique des MT considérées) et de l'ELISA, cette technique est suffisamment sensible pour détecter les MT présentes dans des tissus tels que le foie ou les reins.

Etant donné que l'utilisation d'un Ac est limitée du fait de sa spécificité et que, d'après nos résultats, l'immunoréaction peut varier selon la nature des éléments métalliques complexés aux MT, la DPP apparaît comme une technique relativement intéressante bien que plus fastidieuse d'un point de vue pratique.

La détermination (par immunologie) des teneurs hépatiques en MT des poissons prélevés en milieu naturel a montré que la comparaison du taux de ces protéines chez des espèces différentes ne suffit pas pour estimer le degré de contamination du milieu auquel elles ont été soumises puisque le rapport teneurs en MT/teneurs métalliques varie selon les espèces. En effet, la limande possède davantage de MT que la limande-sole et la morue ; or, c'est la limande-sole qui présente les plus importantes concentrations métalliques.

Dans cette étude, la liaison des MT hépatiques avec le Cu et le Zn a été étudiée plus particulièrement et ce, pour deux raisons :

- la région Nord-Pas-de-Calais n'est pas polluée par un métal spécifique mais plutôt par une multiplicité d'éléments métalliques ; d'autre part, le Cu y est relativement abondant (DELABRE, 1985 ; DESSAINT, 1987) ;

- chez des organismes qui ne sont pas soumis à une contamination particulière, les MT sont impliquées dans la régulation de l'homéostasie cellulaire du Cu et du Zn (DUNN et al., 1987).

Selon l'époque de prélèvement, les teneurs hépatiques en métal et MT varient : les concentrations en Cu (total et soluble) et MT sont maximales en automne chez les trois espèces ; l'évolution des teneurs en Zn diffère selon l'espèce, le Fe et le Mn diminuent en automne chez les deux espèces de poissons plats. Diverses études ont montré que les teneurs hépatiques en métal et MT sont modifiées durant le cycle annuel de reproduction et que ces variations sont généralement plus marquées chez les femelles (FLETCHER, 1978 ; DELVAL, 1984 ; OLSSON et al., 1987). Des transferts de métaux qui ont un rôle dans le développement embryogénique surviennent au niveau du foie (MIRAMAND et al., 1991) et le traitement par l'oestradiol, hormone provoquant la synthèse de vitellogénine, provoque la synthèse de MT chez la truite juvénile (OLSSON et al., 1989). La limande est la seule espèce dont l'échantillonnage soit constitué presque exclusivement de femelles et la période de maturation des gonades débute en automne (TASSEL, 1985) ; c'est également l'espèce pour laquelle les variations de ces teneurs

sont les plus marquées. Le cycle saisonnier influence donc les teneurs hépatiques en métal et MT par le biais du paramètre "reproduction". Il s'agit d'un facteur important à prendre en compte dans le cadre de suivis réguliers de la qualité des milieux naturels.

D'autre part, nous avons montré que les corrélations entre les teneurs hépatiques en MT et en Zn sont rarement mises en évidence alors que les teneurs en Cu sont généralement liées à celles des MT. Chez diverses espèces de poissons, en particulier lorsqu'ils sont contaminés par voie naturelle ("in situ" ou en laboratoire), la liaison privilégiée du Cu avec les MT existe même lorsque le Zn a été le paramètre inducteur de la synthèse des MT (KITO et al., 1982 ; ROCH et al., 1984). De plus, nous avons observé chez la limande que l'augmentation des teneurs hépatiques en Cu soluble est associée à une augmentation de l'incorporation du Cu au niveau des MT. Ces données sont en accord avec celles d'autres auteurs concernant la perche (*Perca fluviatilis*) et la truite (*Salmo gairdneri*) (HOGSTRAND et al., 1991 ; ROCH et al., 1984).

Ces résultats sont liés au problème de compétition entre les métaux pour la fixation au niveau des groupements sulfhydryles des MT et s'explique par le fait que le Cu a une affinité supérieure à celle du Zn pour la liaison avec les MT (KAGI et NORDBERG, 1979).

Suite à l'induction de la synthèse de MT par intoxication de poissons en laboratoire, différents auteurs ont émis l'hypothèse que la quantification de cette protéine devrait être utilisée pour évaluer le degré de pollution des milieux naturels (KITO et al., 1986 ; OLSSON et al., 1987 ; OVERNELL et al., 1988).

La relation dose-réponse liée au degré de pollution, est un critère indispensable pour l'utilisation d'un biomarqueur. Un bioindicateur doit également être suffisamment sensible pour que sa réponse soit détectable avant que l'ensemble de la population ne soit soumise à des conditions de toxicité trop sévères.

Par rapport aux teneurs hépatiques des poissons provenant des sites de "référence", les limandes et les morues capturées sur les sites les plus contaminés présentent des teneurs en métal et MT plus élevées. Les teneurs hépatiques moyennes en MT et métal (Cu et Zn) des morues

provenant de ces deux sites varient d'un facteur équivalent. Par contre, chez les limandes prélevées sur le site le plus contaminé, les teneurs en métal augmentent davantage que les teneurs en MT.

D'après les résultats exposés, la relation dose-réponse existe et serait propre à chaque espèce.

Chez la morue et la limande, l'augmentation des teneurs en MT est détectable alors que les teneurs en Cu et Zn varient relativement peu (elles ne diffèrent que d'un facteur 1,7 maximum). Le marqueur "MT" est donc relativement sensible. En ce qui concerne l'espèce limande-sole, des études complémentaires seraient nécessaires afin de cerner davantage les phénomènes régissant l'accumulation métallique et la synthèse des MT. En effet, les résultats dont nous disposons n'ont pas permis d'établir, comme chez les deux autres espèces, une relation de cause à effet entre le degré d'imprégnation en polluants du milieu environnant et celui de certains tissus des individus (muscle) ou les teneurs en MT hépatiques.

Enfin, un bioindicateur doit être assez spécifique pour que sa réponse permette d'identifier un toxique ou une catégorie de toxiques. L'influence d'autres paramètres susceptibles d'interférer tels que des facteurs environnementaux ou biologiques doit donc être définie (HAUX et FORLIN, 1988 ; COSSON et al., 1991). Bien que les métaux lourds soient les inducteurs les plus puissants des MT (KLASSEN et LEHMANN-MC KEEMAN, 1989), d'autres paramètres peuvent induire la synthèse de ces protéines chez les poissons tels que le stress physiologique provoqué par un manque de nourriture ou la température du milieu environnant (BREMNER et DAVIES, 1975 ; OH et al., 1978). D'autre part, le cycle de reproduction entraîne des modifications des teneurs de ces protéines (OVERNELL et al., 1987 ; OLSSON et al., 1987 ; OLSSON et al., 1989), ce qui a d'ailleurs été constaté lors de cette étude chez les poissons prélevés en automne, période correspondant au début de la période de maturation des gonades. Chez la limande et la morue, le facteur "âge" ainsi que le facteur "sexe" (testé chez des individus prélevés au printemps ou en hiver) n'influencent pas les teneurs hépatiques en MT.

Différents auteurs ont proposé d'exploiter le bioindicateur "MT" pour le suivi de la contamination des poissons par les métaux

lourds (KLAVERKAMP et al., 1984 ; HAUX et FORLIN, 1988 ; HOGSTRAND et al., 1991). Par rapport aux études antérieures concernant des milieux naturels plus ou moins confinés (voir introduction), ce travail a été réalisé à partir de poissons prélevés en milieu marin dans un secteur soumis à un fort hydrodynamisme. Bien que les polluants rejetés dans l'environnement soient relativement dispersés, les zones d'étude présentaient des degrés distincts de contamination et nous avons montré que les limandes et les morues prélevées sur ces sites présentaient des teneurs variables en MT. Compte tenu de ces résultats, il apparaît que l'utilisation des MT en tant que marqueur de pollution est donc effectivement envisageable. Il faut, cependant, tenir compte du cycle de reproduction des poissons voire exclure le suivi de ce marqueur lors de la période de maturation des gonades. La notion de bioindicateur de la pollution par les métaux lourds a été limitée aux éléments Cu et Zn. Comme les MT sont impliquées dans le mécanisme d'homéostasie du Zn et secondairement du Cu, elles ne peuvent être qualifiées uniquement de protéines de détoxication, ce que COSSON et al. ont d'ailleurs signalé (1991). Ces métaux étant biologiquement essentiels, il est difficile, vu l'état actuel des connaissances, d'interpréter l'augmentation des teneurs en MT en terme d'état de santé des poissons. Des études ultérieures devraient être entreprises pour préciser le diagnostic lié à la valeur du paramètre "MT".

La toxicité des métaux lourds est probablement réduite par complexation avec les MT. Cependant, la liaison de certains métaux qui bouleversent les complexes Zn-MT (tel que le Cd), modifie le pool de Zn maintenu disponible par la présence de cette protéine. Ces déséquilibres peuvent entraîner des perturbations physiologiques.

Les avantages de la détoxication qu'offrent les métallothionéines doivent donc être relativisés, en tenant compte des constantes d'affinité du métal pour les MT (Hg>Cu>Cd>Zn) et des délais de biosynthèse de ces protéines en réponse aux inducteurs.

BIBLIOGRAPHIE

LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	: Analyses en Composantes Principales
DEAE	: Colonne échangeuse d'anions
DPP	: Polarographie à impulsions différentielles
ELISA	: "Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay"
HPLC	: Chromatographie liquide à haute performance
Mes	: Métal soluble
Met	: Métal total
MP	: métalloprotéine
MT	: Métallothionéine
PF	: Poids frais
PM	: Poids Moléculaire
PS	: Poids sec
RIA	: "RadioImmunoAssay"
SAA	: Spectrophotométrie d'Absorption atomique
SH	: Thiols

BIBLIOGRAPHIE

- ADDISON R.F., 1988. Biochemical effects of a pollutant gradient-summary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46 : 775-777.
- AMIARD J.C. & AMIARD-TRIQUET C., 1979. Distribution of cobalt 60 in a mollusc, a crustacean and a freshwater teleost : variations as a function of the source of pollution and during elimination. *Environ. Pollut.*, 20 : 199-213.
- AMIARD-TRIQUET C. & SAAS A., 1979. Modalités de la contamination de deux chaînes trophiques dulçaquicoles par le cobalt 60. II. Contamination simultanée des organismes par l'eau et la nourriture. *Water, Air and Soil Pollut.*, 12 : 141-153.
- AMIARD-TRIQUET C., 1989. Bioaccumulation et nocivité relatives de quelques polluants métalliques à l'égard des espèces marines. *Bull. Ecol.*, 20,2 : 129-151.
- AUBERT M., FERNEX F., REVILLON P. & MATHONNET S., 1987. Métaux lourds en Mer du Nord, Manche et Atlantique. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, Tomes LXXXV-LXXXVI : 20-26.
- BADSHA K.S. & GOLDSPIK C. R., 1988. Heavy metals levels in three species of fish in Tjeukemeer, a Dutch polder lake. *Chemosphere*, 17, 2 : 459-463.
- BAER K. N. & THOMAS P., 1990. Influence of capture stress, salinity and reproductive status on zinc associated with metallothionein-like proteins in the livers of three marine teleost species. *Mar. Env. Res.*, 29 : 277-287.
- BAER K.N. & THOMAS P., 1991. Isolation of novel metal-binding proteins distinct from metallothionein from spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*) and Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) ovaries. *Mar. Biol.*, 108 : 31-37.
- BARAK N.A.E. & MASON C.F., 1990. Mercury, cadmium and lead in eels and roach : the effects of size, season and locality on metal concentrations in flesh and liver. *Sci. Total Env.*, 92 : 249-256.
- BARBIER G., ARNAL O., DELATTRE J.M. , GROSSEL H. & MOREL M., 1986. Le littoral de la région Nord-Pas-de-Calais, qualité du milieu marin. *Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER* : n° 3.
- BEACH L.R. & PALMITER R.D., 1981. Amplification of the metallothionein-I gene in cadmium resistant mouse cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78: 2210-2214.
- BERTHET B., 1989. Caractérisation des formes physico-chimiques de stockage de l'argent soluble chez les mollusques filtreurs. *Oceanis*, 15, 4 : 401-409.
- BOULANGER Y. & ARMITAGE I.M., 1982. ¹¹³Cd RMN study of the metal cluster structure of human liver metallothionein. *J. Inorg. Biochem.*, 17 : 147-153.
- BOULANGER Y., GOODMAN C.M., FORTE C.P., FESIK S.W. & ARMITAGE I.M., 1983. Model for mammalian metallothionein structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 80 : 1501-1505.

- BOUQUEGNEAU J.M., GERDAY C. & DISTECHE A., 1975. Fish mercury-binding thionein related to adaptation mechanisms. *Febs Lett.*, 55 : 173-177.
- BOUQUEGNEAU J.M., MARTOJA M. & TRUCHET M., 1983. Localisation biochimique du cadmium chez *Murex trunculus* (L.) (Prosobranchie néogastéropode) en milieu naturel non pollué et après intoxication expérimentale. *C.R. Acad. Sci.*, 296 : 1121-1124.
- BRADLEY R.W., DUQUENSAY C. & SPRAGUE J.B., 1985. Acclimation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to zinc: kinetics and mechanisms of enhanced toleration induction. *J. Fish. Biol.*, 27: 367-379.
- BRADY F.O. & KAFKA R.L., 1979. Radioimmunoassay of rat liver metallothionein. *Anal. Biochem.*, 98: 89-94.
- BRADY F.O. & WEBB M., 1981. Metabolism of zinc and copper in the neonate. *J. Biol. Chem.*, 256 : 3931-3935.
- BRADY F.O., 1982. The physiological function of metallothionein. Elsevier, *Biomed. Press.*, 143-145.
- BRDICKA R., 1933. Polarographic studies with the dropping mercury cathode. Part. XXXI. A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solutions of ammonium chloride. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 5 : 122-128.
- BRDICKA R., BREZINA M. & KALOVS V., 1965. Polarography of proteins and its analytical aspects. *Talanta*, 12 : 1149-1162.
- BREMNER J., & DAVIES N.T., 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. Isolation of (copper, zinc) thioneins from the livers of copper-injected rats. *Biochem.J.*, 157 : 517-520.
- BREMNER I. & BEATTIE J.H., 1990. Metallothionein and the trace minerals. *Ann. Rev. Nutr.*, 10 : 63-83.
- BRYAN G.W. & GIBBS P.E., 1983. Heavy metals in the Fal estuary, Cornwall: a study of long-term contamination by mining waste and its effects on estuarine organisms. *Mar. Biol. Ass. U.K. Occ. Publ.* 2.
- BUCKLEY J.T., ROCH M., MC CARTER 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.*, 72C, 1 : 15-19.
- CARPENE E, CATTANI O., SERRAZANETTI G.P., FEDRIZZI G. & CORTESI P., 1990. Zinc and copper in fish from natural waters and rearing ponds in Northern Italy, *J. Fish Biol.*, 37, 293-299.
- CHAN K.M., DAVIDSON W.S. & FLETCHER G.L., 1987. Hepatic metallothionein mRNA in the winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *Can. J. Zool.*, 65 : 472-480.
- CHAN K.M., DAVIDSON W.S. & FLETCHER G.L., 1989. Metallothionein messenger RNA : potential molecular indicator of metal exposure. *Aquat. Toxicol.*, 89-109.

CHATTERJEE A. & MAITI J.B., 1987. Purification and immunological characterization of catfish (*Heteropneustes fossilis*) metallothionein. *Mol. Cell. Biochem.*, 78 : 55-64.

CHATTERJEE A. & MAITI J.B., 1990. Comparison of the immunological properties of mammalian (rodent), bird, fish, amphibian (toad) and invertebrate (crab) metallothioneins. *Mol. Cell. Biochem.*, 94 : 175-181.

CHAUSSEPIED M. ARNAL O. GROSSEL H., DELATTRE J.M. & WARTEL M., 1989. Le littoral de la région Nord-Pas-de-Calais, apports à la mer. *Rapports scientifiques et techniques de l'IFREMER* : n° 15.

CHERIAN M.G. & GOYER R.A., 1978. Metallothionein and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci.*, 23: 1-10.

COLAS P., 1980. Analyses de métaux dans le milieu marin : remarques méthodologiques, corrélations entre les paramètres physico-chimiques des sédiments, accumulation par les organismes vivants. Thèse 3ème cycle. USTL (Lille). 176 pages.

COLLVIN L., 1984. Uptake of copper in the gills and liver of perch (*Perca fluviatilis*). *Ecol. Bull.*, 36 : 57-61.

COSSA D., AUGER D., AVERTY B., LUÇON M. MASSELIN P., NOËL J. & SANJUAN J., 1990. Niveaux de concentration en métaux, métalloïdes et composés organochlorés dans les produits de la pêche côtière française. *IFREMER* 57 pages.

COSSON R.P., 1987. Influence des pratiques agricoles sur la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds : approche écotoxicologique. Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences Naturelles. Paris XI (Orsay). 275 pages.

COSSON R.P., AMIARD-TRIQUET C. & AMIARD J.C., 1991. Metallothioneins and detoxification. Is the use of detoxification protein for MTs a language abuse ? *Water, Air and Soil Pollut.*, 57-58 : 555-567.

COUSINS R.J., 1979. Metallothionein synthesis and degradation : Relationship to cadmium metabolism. *Environ. Health Perspect.*, 28 : 131-136.

COUSINS R.J., 1985. Absorption, transport, and hepatic metabolism of copper and zinc : Special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.*, 65 : 238-310.

DALLINGER R. & KAUTZKY H., 1985b. The importance of contaminated food for the uptake of heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) : a field study. *Oecologia*, 67 : 82-89.

DALLINGER R., PROSI F., SEGNER H. & BACK H., 1987. Contaminated food and uptake of heavy metals by fish : a review and a proposal for further research. *Oecologia*, 73 : 91-98.

DELABRE D., 1985. Les métaux lourds dans les sédiments du littoral Nord de la France et leur disponibilité lors des rejets de dragages. Thèse 3ème cycle. USTL (Lille). 151 pages.

DELVAL C., 1984. 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. Thèse 3ème cycle. USTL (Lille). 172 pages.

DELVAL C., DEWARUMEZ J.M. & RICHARD A., 1984. Contamination des espèces vivantes benthiques (vers-mollusques-poissons) par les polluants métalliques (Littoral Nord-Pas-de-Calais). Rapport convention IFREMER-Région Nord-Pas-de-Calais- contrat 516-03. USTL (Lille). 122 pages.

DESSAINT F., 1987. Etude par analyses statistiques multivariées de l'influence de la charge métallique des sédiments sur le peuplement benthique marin (communauté à *Ophélie borealis* des bancs de sables sublittoraux en Manche orientale et en Mer du Nord). Thèse 3ème cycle. USTL (Lille). 130 pages.

DIAZ-CASTANEDA V., 1989. Etude expérimentale *in situ* de la succession écologique lors de la recolonisation d'un sédiment défauné par pollution en Méditerranée et en Mer du Nord. Thèse de Doctorat d'Etat, USTLFA (Lille Flandres-Artois). 553 pages.

DOUBEN P.E.T., 1989a. Uptake and elimination of waterborne cadmium by the fish *Noemacheilus barbatulus* L. (stone loach). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18, 576-586.

DOUBEN P.E.T., 1989b. Lead and cadmium in stone loach (*Noemacheilus barbatulus* L.) from three rivers in Derbyshire. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 18 : 35-58.

DIETER H.H., MULLER L., ABEL J. & SUMMER K.H., 1985. Metallothionein- Determination in biological materials : interlaboratory comparison of 5 current methods, *Exp. Suppl.*, 52 : 351-358.

DUNN M.A., BLALOCK T.L. & COUSINS R.J., 1987. Metallothionein. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185 : 107-119.

DURNAM D.M. & PALMITER R.D., 1981. Transcriptional regulation of the mouse metallothionein-I gene by heavy metals. *J. Biol. Chem.* 256 : 5712-5716.

DURNAM D.M., HOFFMAN J.G., WAITTE C.J., BENDITT E.P., CHEN H.Y. & PALMITER R.D., 1984. Induction of mouse metallothionein-I mRNA by bacterial endotoxin is independent of metals and glucocorticoid hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 : 1053-1056.

EATON D.L. & TOAL B.F., 1982. Evaluation of the Cd/Hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 66 : 134-142.

FALCK Jr F.Y., FINE L.J., SMITH R.G., GARVEY J., SCHORK A., ENGLAND B., MC CLATCHEY K.D. & LINTON J., 1983. Metallothionein and occupational exposure to cadmium. *British J. Industr. medec.* 40 : 305-313.

FELDMAN S.L. & COUSINS R.J., 1976. Degradation of hepatic zinc-thionein after parenteral zinc administration. *Biochem. J.*, 160 : 583-588.

FELDMAN S.L., FAILLA M.L. & COUSINS R.J., 1978. Degradation of rat liver metallothioneins *in vitro*. *Biochem. Biophys. Acta.*, 544 : 638-646.

FELDMAN S.L., SQUIBB K.S. & COUSINS R.J., 1978. Degradation of cadmium-thionein in rat liver and kidney. *J. Toxicol. Environ. Health*, 4 : 805-813.

FLETCHER G.L. & KING M.J., 1978. Seasonal dynamics of Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ca^{2+} and Mg^{2+} in gonads and liver of winter flounder (*Pseudo-pleuronectes americanus*) ; evidence for summer storage of Zn^{2+} for winter gonad development in females. *Can. J. Zool.*, 56, 2 : 284-290.

- GARVEY J.S., VANDER MALLIE R.J. & CHANG C. C., 1982. Radioimmunoassay of metallothioneins. In: *Methods in enzymology*, (Langore J.J. & Van Vunakis H., Eds) Academic Press New York, 84 : 121-138.
- GHAFFAR A., AGGETT P.J. & BREMNER I., 1989. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for metallothionein. Nutrient availability : chemical and biological aspects. *J. Royal Soc. of Chem. and special Publ.*, (eds Sothgate, Johnson & Fenwick) : 74-76.
- GEORGE S.G., 1982. Subcellular accumulation and detoxication of metals in aquatic animals. In : *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity* (Vernberg et al., Eds), Acad. Press New York, 3-52.
- GOERING P.L., MISTRY P. & FOWLER B.A., 1987. Mechanisms of metal-induced cell injury. *Handbook of Toxicol.*, 384-425.
- HAMER D.H., 1986. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.*, 55 : 913-951.
- HAMILTON S.J. & MEHRLE P.M., 1986. Metallothionein in fish : review of its importance in assessing stress from metal contaminants. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 115 : 596-609.
- HERMAN P. & VANDERSTAPPEN R., 1975. Analyse corrélative de facteurs liés à l'évolution de la contamination "in situ" des poissons. *Projet Mer* (Belg.) 9 : contamination des produits de la mer, 49-80.
- HAUX C & FÖRLIN L., 1988. Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish. *AMBIO*, 17, 6.
- HIDALGO J. & FLOS R., 1986. Dogfish metallothionein-I. Purification and characterization and comparison with rat metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83C : 99-103.
- HOGSTRAND C. Induction of metallothionein and subcellular distribution of copper and zinc in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, during long-term exposure to copper. (*manuscrit*).
- HOGSTRAND C., OLSSON P.-E. & HAUX C., 1987. Partial development of a radioimmunoassay for horse metallothionein. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 5 : 777-782.
- HOGSTRAND C. & HAUX C., 1989. Comparison of polarography and radioimmunoassay for the quantification of metallothionein in Perch (*Perca fluviatilis*). *Mar. Env. Res.*, 28 : 187-190.,
- HOGSTRAND C. & HAUX C., 1989. Induction of metallothionein by cadmium in bluestriped grunt (*Haemulon sciurus*). *Mar. Env. Res.*, 28 : 191-194.
- HOGSTRAND C., LITHNER G. & HAUX C., 1989. Relationship between metallothionein, copper and zinc in Perch (*Perca fluviatilis*) environmentally exposed to heavy metals. *Mar. Env. Res.*, 28 : 179-182.
- HOGSTRAND C., OLSSON P.-E. & HAUX C., 1989. A Radioimmunoassay for metallothionein in fish. *Mar. Env. Res.*, 28 : 183-186.
- HOGSTRAND C. & HAUX C., 1990. A radioimmunoassay for perch (*Perca fluviatilis*) metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 103 : 56-65.
- HOGSTRAND C. & HAUX C., 1990. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 1/2 : 137-141.

- HOGSTRAND C. & HAUX C., 1990. Metallothionein as an indicator of heavy-metal exposure in two subtropical fish species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 138 : 69-84.
- HOGSTRAND C. & HAUX C., 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C, 1-2: 137-141.
- HOGSTRAND C., LITHNER G. & HAUX C., 1991. The importance of metallothionein for the accumulation of copper, zinc and cadmium in environmentally exposed perch, *Perca fluviatilis*. *Pharmacol. Toxicol.*, 68 : 492-501.
- HOGSTRAND C. & HAUX C., 1992. Evaluation of differential pulse polarography for the quantification of metallothionein - a comparison with radioimmunoassay. *Anal. Biochem.*, 200 : 388-392.
- IKEBUCHI H., TESHIMA R., SUZUKI K., SAWADA J.-I., TERAO T. & YAMANE Y., 1986. An immunological study of a Pb-thionein like protein in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 136, 2 : 535-541.
- IRONS R.D. & SMITH J.C., 1977. Isolation of a non-thionein copper-binding protein from liver of copper-injected rats. *Chem.-Biol. Inter.*, 18 : 83-89.
- JEREMIAS H.R. KÄGI & Bert L. VALLEE, 1960. Metallothionein : a cadmium-and zinc-containing protein from equine renal cortex. *J. Biol. Chem.*, 235, 12.
- JULSHAMN K. , ANDERSEN K-J., RINGDAL O. & BRENNAN J., 1988. Effect of dietary copper on the hepatic concentration and subcellular distribution of copper and zinc in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*, 73 : 143-155.
- KÄGI J.H.R. & VALLEE B.L., 1960. Metallothionein : a cadmium and zinc-containing protein from equine renal cortex. *The J. Biol. Chem.*, 235,12 : 3460-3465.
- 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 suppl.*, 34, Zürich, July. 17-22, 1978.
- KÄGI J.H.R. & KOJIMA Y., 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein. In: *Experientia. Suppl. Metallothionein II.*, 52 (J.H.R. Kägi & Kojima Y. Eds), Basel : Birkhäuser Verlag: 25-61.
- KÄGI J.H.R. & SCHÄFFER A., 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry.*, 27 : 8509-8515.
- KARIN M., 1985. Metallothionein : proteins in search of function. *Cell.*, 41 : 9-10.
- KAY J., THOMAS D.G., BROWN M.W., CRYER A., SHURBEN D., SOLBE J.F. de L.G. & GARVEY J.S., 1986. Cadmium accumulation and protein binding patterns in tissues of the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Environ. Health perspect.*, 65 : 133-139.
- KAY J., CRYER A., DARKE B.M., KILLE P, LEES W.E., NOREY C. G. & MARSHALL STARK J., 1991. Naturally occurring and recombinant metallothioneins : structure, immunoreactivity and metal-binding functions. *Int. J. Biochem.* 23, 1 : 1-5.

- KITO H., TAZAWA T., OSE Y., SATO T. & ISHIKAWA T., 1982. Formation of metallothionein in fish. *Comp. Biochem., Physiol.*, 73C, 1 : 129-134.
- KITO H., TAZAWA T., OSE Y., SATO T. & ISHIKAWA T., 1982. Protection by metallothionein against cadmium toxicity. *Comp. Biochem. Physiol.*, 73C, 1 : 135-139.
- KITO H., OSE Y. & SATO T., 1986. Cadmium-binding protein (Metallothionein) in carp. *Environm. Health perspect.*, 65 : 117-124.
- KLAASSEN C. D. & LEHMAN-MC KEEMAN L.D., 1989. Induction of metallothionein. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8 : 1315-1321.
- KLAVERKAMP J.F., MC DONALD W.A., DUNCAN D.A. & WAGEMANN R., 1984. Metallothionein and acclimation to heavy metals in fish : a review. In : *Contaminant effects on fisheries* (Caitns et al. Eds), 99-113.
- KLAVERKAMP J.F. & DUNCAN D.A., 1987. Acclimation to cadmium toxicity by white suckers : cadmium binding capacity and metal distribution in gill and liver cytosol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6 : 275-289.
- KREZOSKI S., LAIB J., ONANA P., HARTMANN T., CHEN P., SHAW III C.F. & PETERING D.H., 1988. Presence of Zn, Cu-binding protein in liver of freshwater fishes in the absence of elevated exogenous metal : Relevance to toxic metal exposure. *Mar. Env. Res.*, 24 : 147-150.
- LAUREN D.J. & MC DONALD D.G., 1985. Effects of copper on branchial ionoregulation in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J. Comp. Physiol. B.*, 155 : 635-644.
- LAUREN D.J. & MC DONALD D.G., 1987. Acclimation to copper by rainbow trout, *Salmo gairdneri* : Physiology. *Can. J. Fish Aquat. Sci.*, 44 : 99-104.
- LEGORBURU I. & CANTON L., 1988. Heavy metal analysis in fish-kill cases in rivers in Guipuzcoa (Spain), *Toxicol. & Environ. Chem.*, 23 : 161-167.
- LEGORBURU I., CANTON L., MILLAN E. & CASADO A., 1988. Trace metal levels in fish from Urola river (Spain) Anguillidae, Mugillidae and Salmonidae, *Environ. Technol. Letters*, 9 : 1373-1378.
- LEHMAN L.D. & KLASSEN C.D., 1986. Separation and quantitation of metallothioneins by High-Performance Liquid Chromatography coupled with Atomic Absorption Spectrophotometry. *Analyt. Biochem.*, 153 : 305-314.
- LEY H.L., FAILLA M.L. & CHERRY D.S., 1983. Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 74B,3 : 507-513.
- L'HOPITAUT J.C., 1982. Pollution chimique des moules et des coques du littoral Nord de la France. *Institut Pasteur de Lille*. Monographie : 93 pages.
- L'HOPITAUT J.C. & DELATTRE J.M., 1983. Pollution chimique des sédiments du littoral Nord de la France. *Institut Pasteur de Lille*. Hydrobios II - 15 pages.
- L'HOPITAUT J.C., 1985. Pollution chimique du littoral Nord-Pas-de-Calais. Etude spécifique de secteurs contaminés. *Institut Pasteur de Lille*, Hydrobios III (séminaire "étude intégrée du littoral"), 5 pages.

LORING D.H. & RANTALA, R.T.T., 1990. Sediments and suspended particulate matter : Total and partial methods of digestion. *Tech. Mar. Environ. Sc.*, 9, ICES (Copenhagen, Denmark), 14 pages.

LUOMA S.N., 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms : a review. *Sc. total environ.*, 28 : 1-22.

LUOMA S.N., 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements ? *Hydrobiologia*, 176/177 : 379-396.

MARGOSHES M. & VALLEE B.L., 1957. A cadmium protein from equine kidney. *J. Am. Chem. Soc.*, 79 : 4813-4814.

MC CARTER J.A., MATHESON A.T., ROCH M., OLAFSON R.W. & BUCKLEY J.T., 1982. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper. II Distribution of copper between high and low molecular weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72C: 21-26.

MC CARTER J.A. & ROCH M., 1984. Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper. III. Kinetics of metabolism of metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77, 1 : 83-87.

MC CORMICK C.C., SALATI L.M. & GOODRIDGE A.G., 1991. Abundance of hepatic metallothionein mRNA is increased by protein synthesis inhibitors. *Biochem. J.*, 273 : 185-188.

MEHRA R.J. & BREMMER I., 1983. Development of a radioimmunoassay for rat liver metallothionein-I and its application to the analysis of rat plasma and kidneys. *Biochem. J.*, 213 : 459-465.

MEHRA R.K. & BREMNER I., 1984. Metallothionein-I in the plasma and liver of neonatal rats. *Biochem. J.*, 217 : 859-862.

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. Int. Océanogr. Méd.*, Tomes LXVI-LXVII, 33-45.

MILNER N.J., 1979. Zinc concentrations in juvenile flatfish. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.*, 59 : 761-775.

MINKEL D.T., POULSEN K., WIELGUS S., SHAW C.F. & PETERING D.H., 1980. On the sensitivity of metallothioneins to oxidation during isolation. *Biochem. J.*, 191 : 475-485.

MIRAMAND P., LAFaurie M., FOWLER S.W., LEMAIRE P., GUARY J.C. & BENTLEY D., 1991. Reproductive cycle and heavy metals in the organs of red mullet, *Mullus barbatus* (L.), from the northwestern Mediterranean. *Sc. Total Env.*, 103 : 47-56.

NIELSON K.B. & WINGE D.R., 1984. Preferential binding of copper in the β domain of metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 259: 4941-4946.

NOEL-LAMBOT F., GERDAY C. & DISTECHE A., 1978. Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61C : 177-187.

NORDBERG M. & KOGIMA Y., 1979. Metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. In: *Metallothionein*, Proceedings of the first international meeting on metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins, 17, 22 : 41-117.

NOREY C.G., LEES W.E., DARKE B.M., STARK J.M., BAKER T.S., CRYER A. & KAY J., 1990. Immunological distinction between piscine and mammalian metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B : 597-601.

OH S.H., DEAGEN J.J., WHANGER P.D. & WESWIG P.H., 1978. Biological function of metallothionein. Its induction in rats by various stress. *Am. J. Physiol.*, 234 : E282-E285.

OLAFSON R.W. & THOMPSON J.A.J., 1974. Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrate. *Mar. Biol.*, 28 : 83-86.

OLAFSON R.W. & SIM R.G., 1979. An Electrochemical approach to quantitation and characterization of metallothioneins. *Anal. Biochem.*, 100 : 343-351.

OLAFSON R.W., SIM R.G. & BOTO K.G., 1979. Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B : 407-416.

OLAFSON R.W. & OLSSON P.E., 1990. Electrochemical detection of metallothionein. *U OF C Biosciences*, 1-7.

OLSSON P.E., 1987. Metallothionein in fish: aspects of biochemistry and function. PhD thesis. University of Göteborg.

OLSSON P.E. & HAUX C., 1985. Rainbow trout metallothionein. *Inorg. Chim. Acta*, 107 : 67-71.

OLSSON P.E. & HAUX C., 1986. Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*). *Aquat. Toxicol.*, 9 : 231-242.

OLSSON P.E., HAUX C. & FORLIN L., 1987. Variations in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol. Biochem.*, 3, 1 : 39-47.

OLSSON P.E. & HOGSTRAND C., 1987a. Improved separation of perch liver metallothionein by fast protein liquid chromatography, *J. Chromat.*, 402 : 293-299.

OLSSON P.E., HAUX C. & FORLIN L., 1987. Variations in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish. Physiol. Biochem.*, 3 : 39-47.

OLSSON P.E. & HOGSTRAND C., 1987b. Subcellular distribution and binding of cadmium to metallothionein in tissues of rainbow trout after exposure to ^{109}Cd in water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 6 : 867-874.

OLSSON P.E., LARSSON A. & HAUX C., 1988. Metallothionein and heavy metal levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exposure to cadmium in the water. *Mar. Env. Res.*, 24 : 151-153.

OLSSON P.E., ZAFARULLAH M. & GEDAMU L., 1989b. A role of metallothionein in zinc regulation after estradiol induction of vitellogenin synthesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Biochem. J.*, 257 : 555-560.

OLSSON P.E., ZAFARULLAH M., FOSTER R., HAMOR T. & GEDAMU L., 1990. Developmental regulation of metallothionein mRNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.*, 193: 229-236.

ONOSAKA S. & CHERIAN M.G., 1982. Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicol. Appl. pharmacol.*, 63 : 270-274.

OTVOS J.D. & ARMITAGE J.A., 1980. Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77 : 7094-7098.

OVERNELL J. & COOMBS T.L., 1979. Purification and properties of plaice metallothionein, a cadmium-binding protein from the liver of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem. J.*, 183 : 277-283.

OVERNELL J., 1984. Use of 2-mercaptoethanol during chromatography of crab (*Cancer pagurus*) metallothionein on DEAE cellulose. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77C : 245-248.

OVERNELL J., MC INTOSH R. & FLETCHER T.C., 1987a. The levels of liver metallothionein and zinc in plaice, *Pleuronectes platessa* L., during the breeding season, and the effect of oestradiol injection. *J. Fish. Biol.*, 30 : 539-546.

OVERNELL J., MC INTOSH R. & FLETCHER T.C., 1987b. The enhanced induction metallothionein by zinc and its half-life in the marine fish *Pleuronectes platessa*, and influence of stress factors on metallothionein level. *Experientia*, 43 : 178-181.

OVERNELL J. & ABDULLAH M.I., 1988. Metallothionein and metal levels in flounder *Platichthys flesus* from four field sites and in flounder dosed with water-borne copper. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 46 : 71-74.

OVERNELL J., FLETCHER T.C. & MC INTOSH R., 1988. Factors affecting hepatic metallothionein levels in marine flatfish. *Mar. Env. Res.*, 24 : 155-158.

OVERNELL J. & MC INTOSH R., 1988. The effect of supplementary dietary copper on copper and metallothionein levels in the fish, dab, *Limanda limanda*. *Mar. Environ. Res.*, 26: 237-247.

PATEL B., CHANDY J.P., 1987. Do selenium and glutathion (GSH) detoxify mercury in marine invertebrates? II. Effects on gill adenosine triphosphatase and related blood factors in an arcid clam *Anadara granosa*. *Dis. Aquat. Org.*, 3 : 127-135

PENTREATH R.J., 1973. The accumulation and retention of ⁶⁵Zn and ⁵⁴Mn by the plaice *Pleuronectes platessa* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 12 : 1-8.

PENTREATH R.J., 1976. Some further studies on the accumulation and retention of ⁶⁵Zn and ⁵⁴Mn by the plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 21 : 179-189.

PIOTROWSKI J.K. & SZYMANSKA J.A., 1976. Influence of certain metals on the level of metallothionein-like proteins in the liver and kidneys of rats. *J. Toxicol. Environ. Health*, 1 : 991-1002.

PLACK P.A., PRITCHARD D.J. & FRASER N.W., 1971. Egg proteins in cod serum. Natural occurrence and induction by injections of oestradiol 3-benzoate. *Biochem. J.*, 121 : 847-856.

RASPOR B., PAVICIC J. & BRANICA M., 1989. Cadmium-induced proteins from *Mytilus galloprovincialis*. Polarographic characterization and study of their interaction with cadmium. *Mar. Chem.*, 28 : 199-214.

REID S.D. & MC DONALD D.G., 1991. Metal binding activity of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48 : 1061-1068.

RICHARD A., SOUPLLET A., DEWARUMEZ J.M. & VANDORPE B., 1978. Villes et ports développement portuaire, croissance spatiale des villes, environnement littoral. Second colloque Franco-Japonais de géographie: "Ville et ports" : 489-499.

RICHARD A., DEGROS N. & DEWARUMEZ J.M., 1988. Pollutions métalliques des organismes benthiques du littoral français de la Mer du Nord : influence du régime alimentaire, *Océanis*, 14,4 : 435-446.

RICHARD M.P. & COUSINS R.J., 1977. Isolation of an intestinal metallothionein induced par parenteral zinc. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75 : 286.

RIDLINGTON J.W., CHAPMAN D.C., GOEGER D.E. & WHANGER P.D., 1981. Metallothionein and Cu-chelatin : characterization of metal-binding proteins from tissues of four marine animals. *Comp. Biochem. Physiol.*, 70B : 93-104.

ROCH M., MC CARTER J.A., MATHESON A.T. CLARCK 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. Sci.*, 39 : 1596-1601.

ROCH M. & MC CARTER J.A., 1984a. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I. Exposed to an artificial mixture of zinc, copper and cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77C, 1 : 71-75.

ROCH M. & MC CARTER J.A., 1984b. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). II. Held in a series of contaminated lakes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77C, 1 : 77-82.

ROESIJADI G., UNGER M.E. & MORRIS J.E., 1988. Immunochemical quantification of metallothioneins of a marine mollusc. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45 : 1257-1263.

SABOURIN T.D., GRANT D.B. & WEBER L.J., 1985. The influence of metal and nonmetal stressors on hepatic metal-binding protein production in buffalo sculpin, *Enophrys bison*. *Mar. Pollut. Physiol.*, 247-266.

SANDERS B.M., 1988. The role of the stress proteins response in physiological adaptation of marine molluscs. *Mar. Env. Res.*, 24 : 207-210.

SANDERS B.M., MARTIN L.S., NELSON W.G., PHELPS D.K. & WELCH W., 1991. Relationships between accumulation of a 60kDa stress protein and scope-for-growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations. *Mar. Env. Res.*, 31 : 81-97.

SAYER M.D.J., READER J.P. & MORRIS R., 1991. Effects of six trace metals on calcium fluxes in brown trout (*Salmo trutta L*) in soft water. *J. Comp. Physiol. B*, 161 : 537-542

SHACKLEY S.E., KING P.E. & GORDON S.M., 1981. Vitellogenesis and trace metals in a marine teleost. *J. Fish. Biol.*, 18 : 349-352.

SHAIKH Z.A. & NOLAN C.V., 1987. Comparison of cadmium-saturation assay and radioimmunoassay for the determination of metallothionein concentration in tissues. *Experientia supplementum*, 52 : 343-349.

SHEARS M.A. & FLETCHER G.L., 1984. The relationship between metallothionein and intestinal zinc absorption in the winter flounder. *Can. J. Zool.*, 62 : 2211-2220.

SPRY D.J., HODSON P.V. & WOOD C.M., 1988. Relative contributions of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 45 : 32-41.

SPRY D.J. & WOOD C.M., 1989. The influence of dietary and waterborne zinc on heat-stable metal ligands in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson : quantification by ^{109}Cd radioassay and evaluation of the assay. *J. Fish. Biol.*, 35 : 557-576.

STATHAM P.J., MORLEY N.H. & BURTON J.D. Partitioning of trace metals between dissolved and particulate phases in the Dover Strait. (*manuscript*).

STONE H. & OVERNELL J., 1985. Minireview : Non-metallothionein cadmium binding proteins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80C, 1 : 9-14.

SUZUKI K.T. & MAITANI T., 1981. Metal-dependend properties of metallothionein (replacement in vitro of zinc in zinc-thionein with copper). *Biochem. J.*, 199 : 289-295.

SUZUKI K.T. & AKITOMI, 1983. Difference in relative isometallothionein ratio between adult and larva of cadmium loaded bullfrog *Rana catesbeiana*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C : 211-215.

TAKEDA H. & SHIMIZU C., 1982. Existence of the metallothionein-like protein in various fish tissues. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48 : 711-715.

TASSEL M., 1988. Biologie halieutique de la limande (*Limanda limanda*, L. 1758) en Manche orientale et Mer du Nord. Thèse de Doctorat. USTLFA (Lille-Flandres-Artois). 193 pages.

TESSIER A., CAMPBELL P.G.C. & BISSON M., 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal. Chem.*, 51: 844-851.

THOMAS P., WOFFORD H.W. & NEFF J.M., 1982b. Effect of cadmium on glutathione content of mullet (*Mugil cephalus*) tissues. In: *Physiol. Mechan. Mar. Pollutant toxicity* (Vernberg et al., Eds), Academic Press New York, 109-125.

THOMAS D.G., SOLBE J.F. de L.G., KAY J. & CRYER A., 1983. Environmental cadmium is not sequestered by metallothionein in rainbow trout. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 110 : 584-592.

THOMAS D.G., BROWN M.W., SHURBEN D., SOLBE J.F. DEL G., CRYER A. & KAY J., 1985. A comparison of the sequestration of cadmium and zinc in the tissues of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) following exposure to the metals singly or in combination. *Comp. Biochem. Physiol.*, 82C, 1: 55-62.

THOMAS D.G., LINTON Harry J. & GARVEY J.S., 1986. Fluorometric ELISA for the detection and quantitation of metallothionein. *J. Imm. Meth.*, 89 : 239-247.

THOMPSON J.A.J. & COSSON R.P., 1984. An improved electrochemical method for the quantification of metallothioneins in marine organisms. *Mar. Env. Res.*, 11: 137-152.

TOHYAMA C. & SHAIKH Z.A., 1978. Cross-reactivity of metallothioneins from different origins with rabbit anti-rat hepatic metallothionein antibody. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 84, 4 : 907-913.

TOHYAMA C. & SHAIKH Z.A., 1981. Metallothionein in plasma and urine of cadmium-exposed rats determined by a single-antibody radioimmunoassay. *Fundam. Appl. Toxicol.* 1 : 1-7.

TUKENDORF A. & BASZYNSKI T., 1985. Partial purification and characterization of copper-binding protein from roots of *Avena sativa* grown on excess copper. *J. Plant. Physiol.*, 120 : 57-63.

VALLEE B.L., 1979. Metallothionein : historical review and perspectives. In: *Metallothionein* (J.H.R. Kagi & M. Nordberg, Eds), 19-40.

VANDER MALLIE R.J. & GARVEY J.S., 1978. Production and study of antibody produced against rat cadmium thionein. *Immunochem.*, 15 : 857-868.

VANDER MALLIE R.J. & GARVEY J.S., 1979. Radioimmunoassay of metallothioneins. *J. Biol. Chem.* 254, 17 : 8416-8421.

VERBOST P.M., FLIK G., LOCK R.A.C. & WENDELAAR BONGA S.E., 1988. Cadmium inhibits plasma membrane calcium transport. *J. Membrane Biol.*, 102 : 97-104.

VIARENGO A., PERTICA M., MANCINELLI G., ORUNESU M., ZANICCHI G., MOORE M.N. & PIPE R.K., 1983. Possible role of lysosomes in the detoxication of copper in the digestive gland cells of metal exposed mussels. *Mar. Environ. Res.*, 14 : 469-470.

VIARENGO A., 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Poll. Bulletin*, 16, 4 : 153-158.

VIARENGO A., MOORE M.N., MANCINELLI G., MAZZUCOTELLI A., PIPE R.K. & FARRAR S.V., 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels : the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar. Biol.*, 94 : 251-257.

DE VLAMING V., FITZGERALD R., DELAHUNTY G., CECH J.J., SELMAN K. & BARKLEY M., 1984. Dynamics of oocyte development and related changes in serum oestradiol-17 β , yolk precursor, and lipid levels in the teleostean fish, *Leptocottus armatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 77A : 599-610.

VOLLE M., 1985. Analyse des données, (3ème édition). Collection "économie et statistiques avancées". *Economica*, 108-129.

VON WESTERNHAGEN H., DETHLEFSEN V & ROSENTHAL H., 1980. Correlation between cadmium concentration in the water and tissue residue levels in dab, *Limanda limanda* L., and plaice, *Pleuronectes platessa* L. *J. Mar. Biol.*, 60 : 45-58.

WAALKES M.P., HARVEY M.J. & KLAASSEN C.D., 1984. Relative in vitro affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicol. Letters*, 20 : 33-39.

WAALKES M. & PERANTONI A., 1986. Isolation of a novel metal-binding protein from rat testes. *J. Biol. Chem.*, 261 : 13097-13103.

WALDICHUK M., 1985. Biological availability of metals to marine organisms. *Mar. Poll. Bulletin*, 16, 1 : 7-11.

WEBB M., 1979. The metallothioneins. In: *Chem., Biochem. and Biol. of cadmium*. (Elsevier, Eds), 195-266.

WEBB M. & CAIN K., 1982. Functions of metallothionein. *Biochem.*, 31 : 137-142.

WHANGER P.D., OH S-H. & DEAGEN J.T., 1981. Ovine and bovine metallothioneins : purification, number of species, zinc content and amino acid composition. *J. Nutr.*, 11 : 1207-1215.

WICKLUND A. & OLSSON P.E., 1991. Cadmium influx through the gills of minnows, *Phoxinus phoxinus*, pre-exposed to water-borne cadmium. *Envir. Toxicol. Chem.*, 10: 383-394.

WINGE D., KRASNO J. & Colucci A.V., 1973. Cadmium in rat liver: correlation between bound metal and pathology. In: *Trace elements metabolism in animals* (Hokstra et al., Eds), University Park Press, Baltimore, 500-501.

WINGE D.R., PREMAKUMAR R., WILEY R.D. & RAJAGOPALAN K.V., 1975. Copper-chelatin : Purification and properties of a copper-binding protein from rat liver. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 170 : 253-266.

WINGE D.R. & MIKLOSSY K.A., 1982. Differences in the polymorphic forms of metallothionein. *Archiv. Biochem. Biophys.*, 214 : 80-88.

WINGE D.R. & MIKLOSSY K.A., 1982. Domain nature of metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 257 : 3471-3476.

WINGE D.R. & GARVEY J.S., 1983. Antigenicity of metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80 : 2472-2476.

WOFFORD H.W. & THOMAS P., 1984. Interactions of cadmium with sulfhydryl-containing compounds in striped mullet (*Mugil cephalus* L.). *Mar. Env. Res.* 14 : 119-137.

WONG K.L. & KLAASSEN C.D., 1981. Relationship between liver and kidney levels of glutathione and metallothionein in rats. *Toxicol.*, 19: 39-47.

YAMAMURA M. & SUZUKI K.T., 1984. Characterisation of metallothionein induced in the fish *Carassius auratus langsdorfi*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79C: 63-69.

YOSHIKAWA H. & HOTO H., 1982. Interaction of metals and metallothionein. In : *biological roles of metallothionein*. (Elsevier-North Holland, Inc. Edited by E.C. Foulkes). 13-23.

ZAFARULLAH M., BONHAM K. & GEDAMU L., 1988. Structure of the rainbow trout metallothionein B gene and characterization of its metal-responsive region. *Mol. Cell. Biol.*, 8 : 4469-4476.

ZAFARULLAH M. , OLSSON P-E. & GEDAMU L., 1990. Differential regulation of metallothionein genes in rainbow trout fibroblasts, RTG-2. *Biochem. Biophys. Acta.*, 1049 : 318-323.



ANNEXES

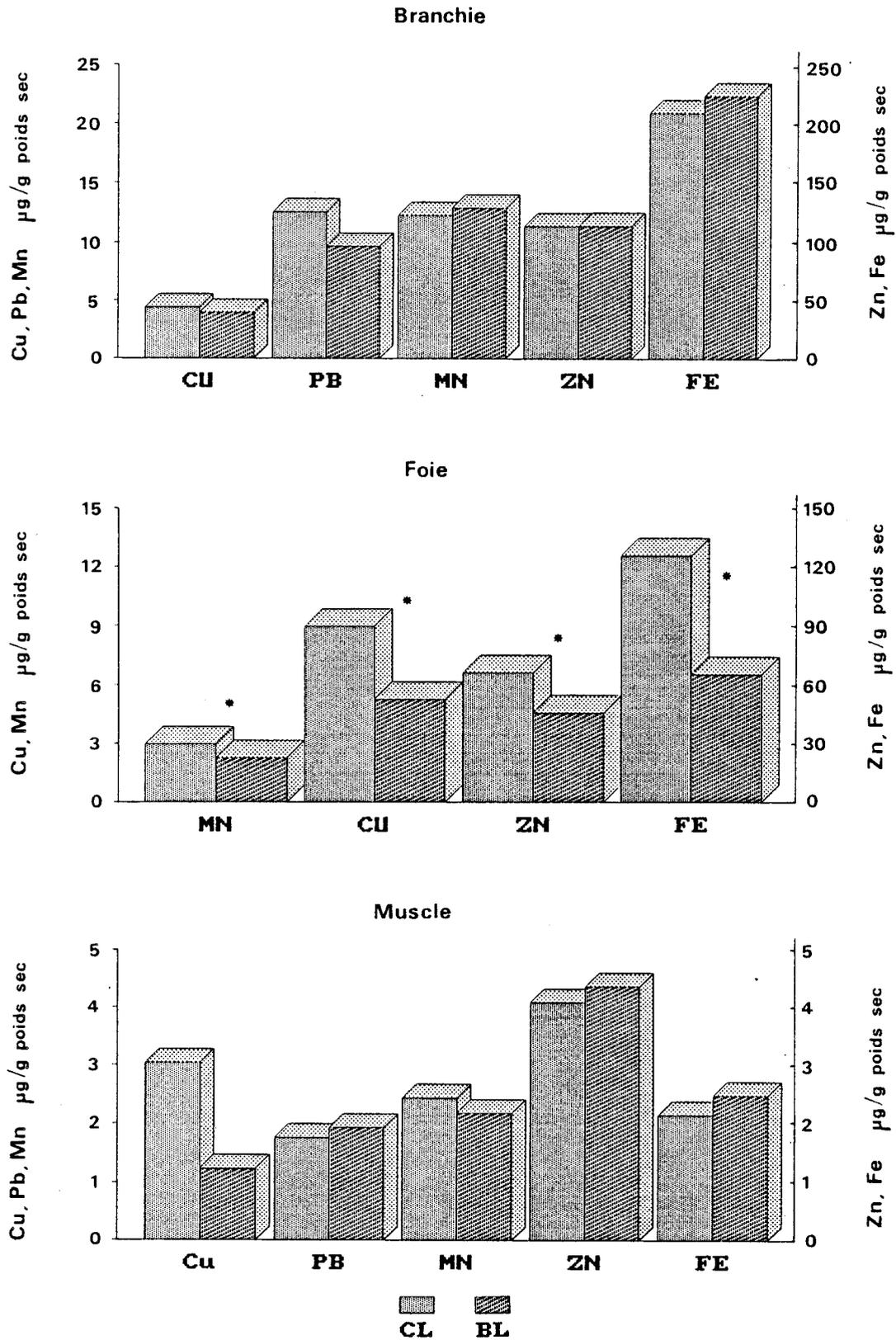


Figure 1 : Teneurs métalliques des organes de limandes annexe prélevées au printemps 1991 à Calais (CL) et Boulogne (BL).
 (* : t significatif au seuil de 5%)

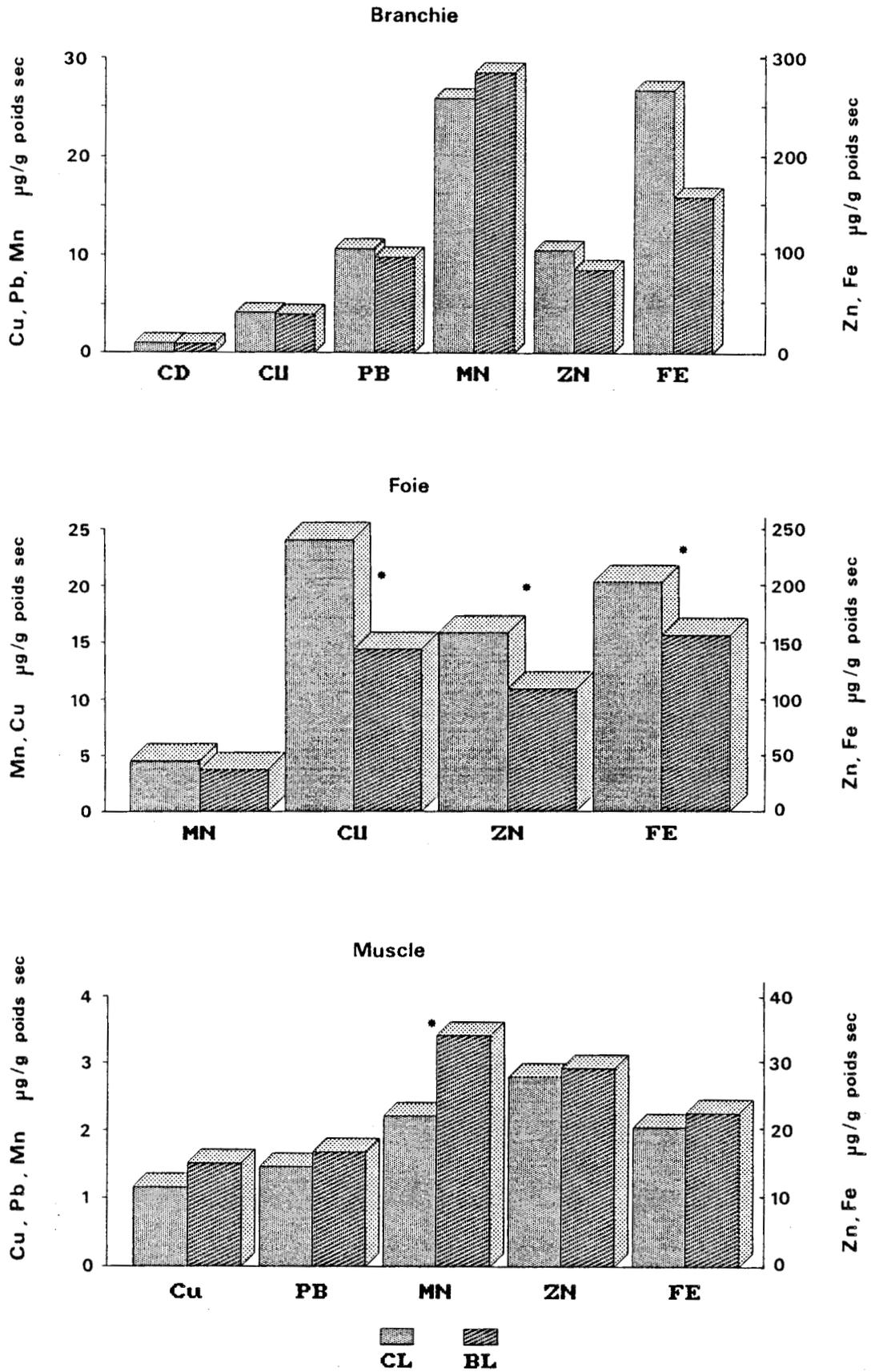


Figure 2 : Teneurs métalliques des organes de limande-soles prélevées au printemps 1991 à Calais (CL) et Boulogne (BL).
 (* : t significatif au seuil de 5%)

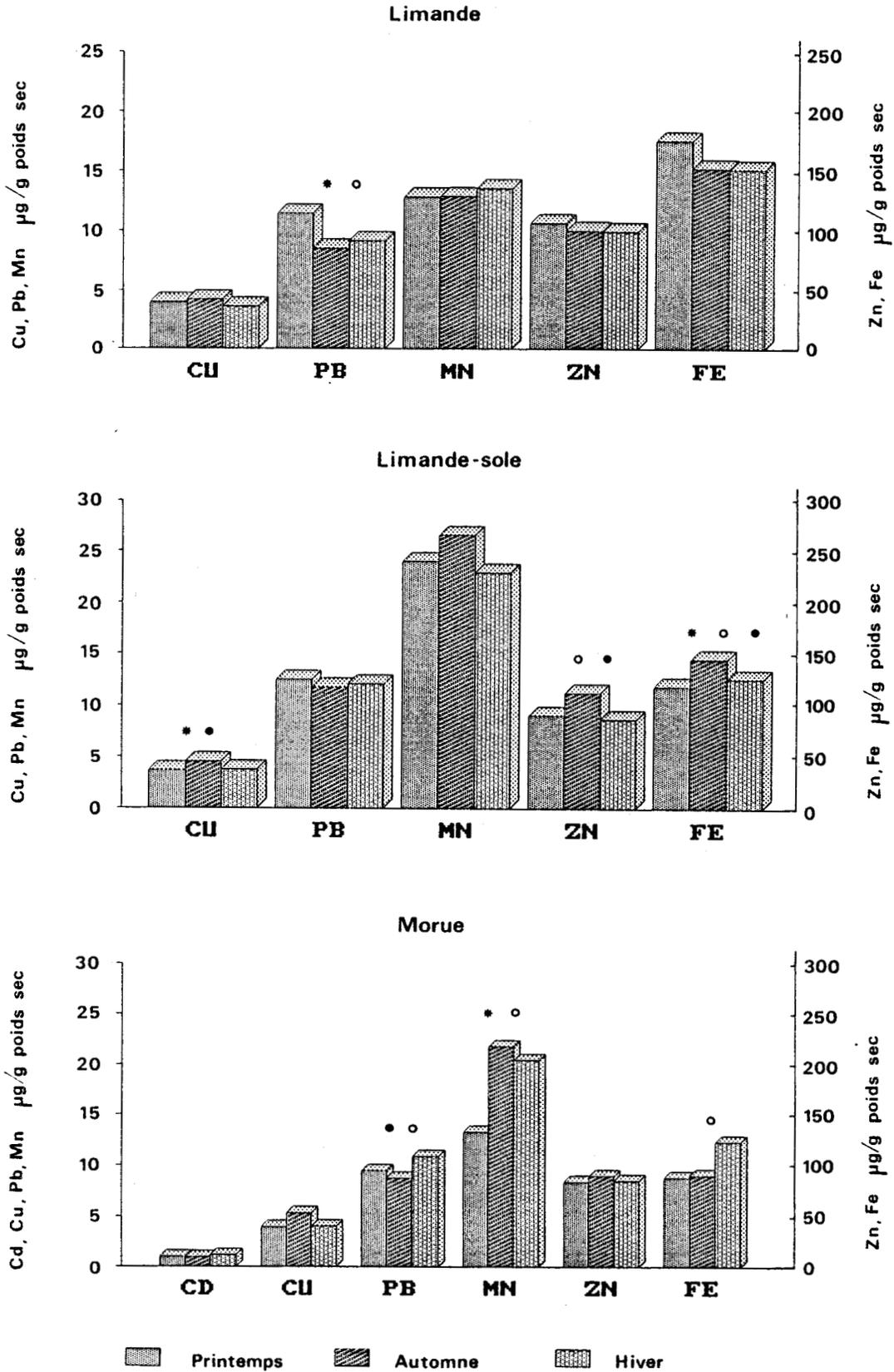
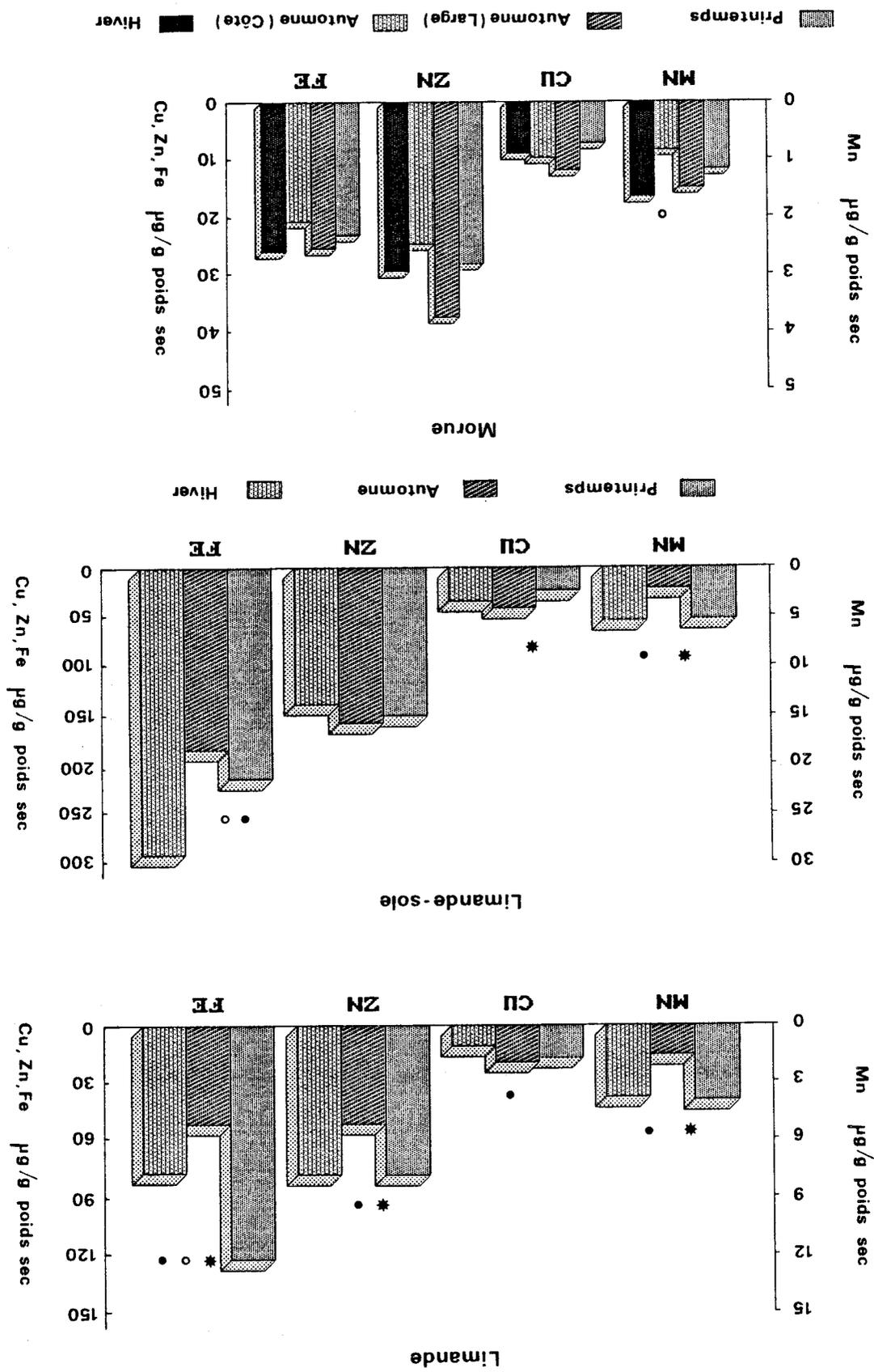


Figure 3 : Teneurs métalliques moyennes des branchies de poissons annexe prélevés à différentes saisons de l'année 1989. (t significatif au seuil de 5% entre printemps et automne * , automne et hiver • , printemps et hiver °).

Figure 4 : Tenueurs métalliques moyennes des foies de poissons prélevés à différentes saisons de l'année 1989. (t significatif au seuil de 5% entre printemps et automne ; automne et hiver •, printemps et hiver o) ; (test t non considéré pour l'échantillonnage de morue "automne-côte").



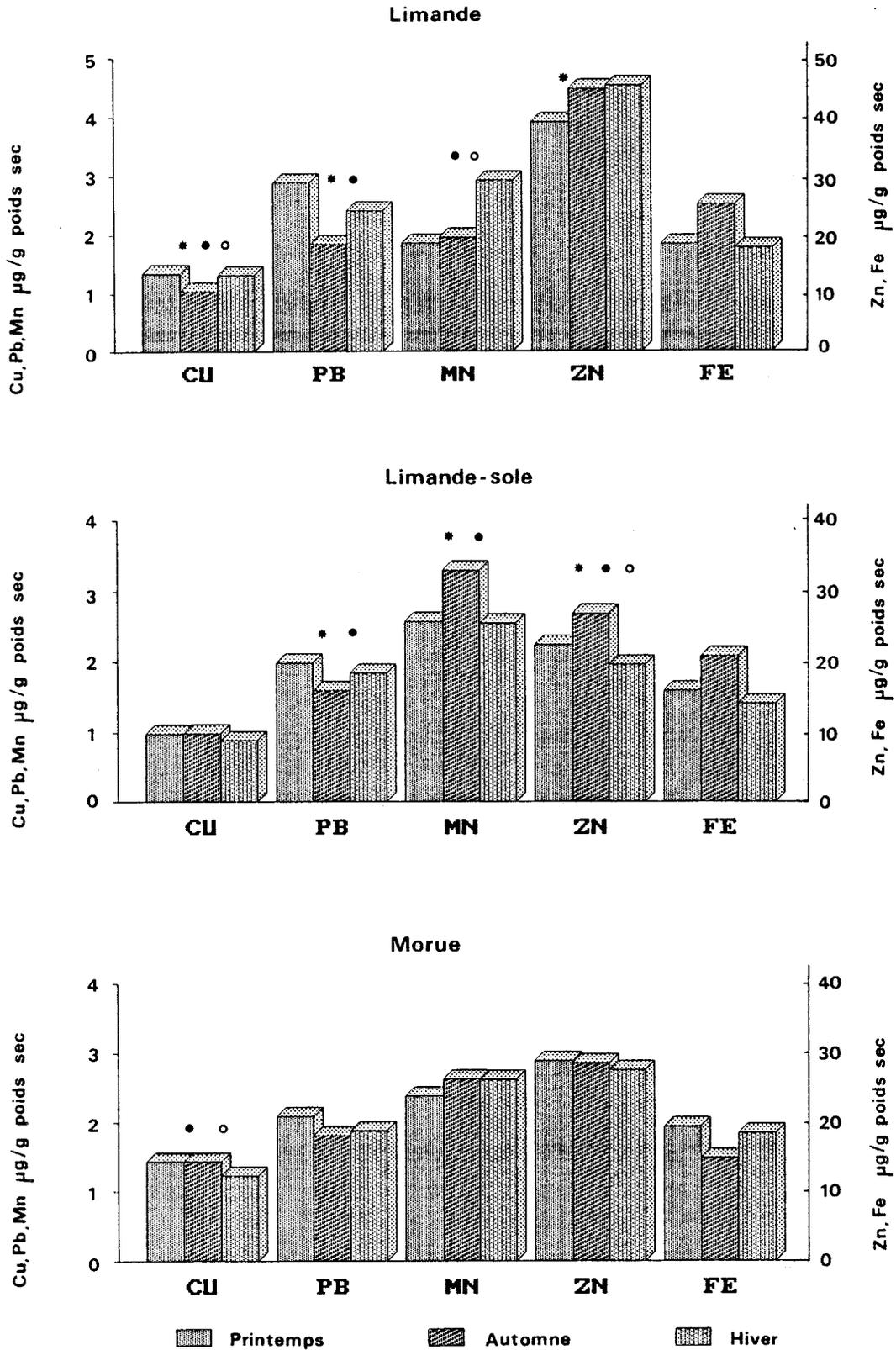


Figure 5 : Teneurs métalliques moyennes des muscles de poissons annexe prélevés à différentes saisons de l'année 1989. (t significatif au seuil de 5% entre printemps et automne * , automne et hiver • , printemps et hiver ◦).

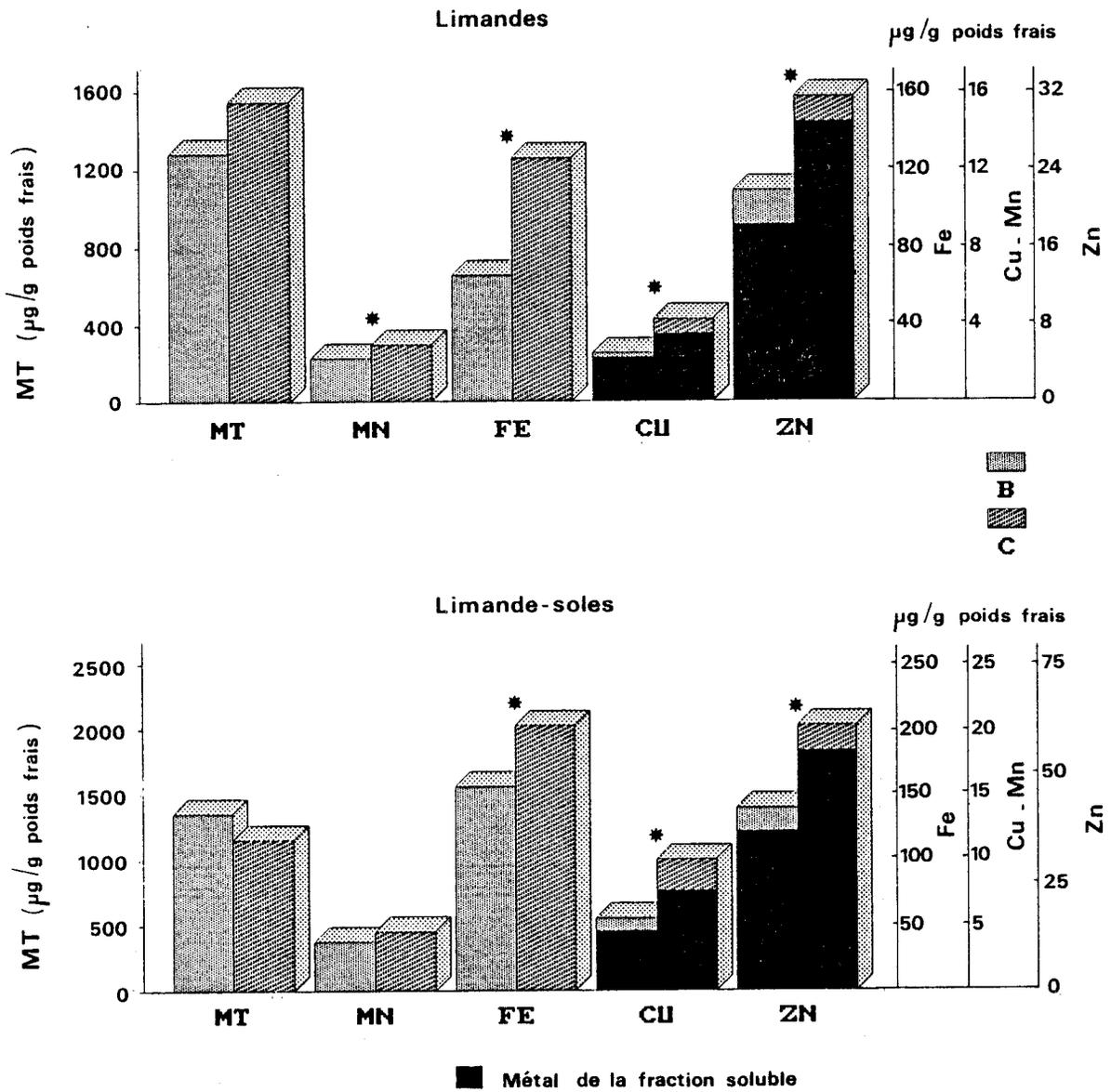


Figure 6 : Teneurs hépatiques moyennes en MT, métal total et métal soluble des limandes et limande-soles prélevées au printemps 1991 sur les sites de Calais (C) et Boulogne (B). (*: t significatif au seuil de 5%)