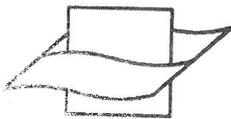


This paper not to be cited without prior reference to the author.

ETUDE DES EFFETS DU MERCURE CHEZ L'ANGUILLE

J.M. BOUQUEGNEAU *

INTRODUCTION.



Vlaams Instituut voor de Zee
Flanders Marine Institute

La littérature abondante traitant de la toxicologie du mercure est en fait très peu documentée en ce qui concerne son action chez les animaux marins. Elle nous apprend néanmoins d'une manière générale que le méthylmercure s'accumule plus vite et est plus toxique au cours d'intoxications chroniques que les autres composés du même polluant. D'autre part, si on examine les cas de pollution les plus sévères, on constate qu'à Minamata par exemple, le mercure se trouvait sous forme de CH_3HgCl provenant de la synthèse de l'acétaldéhyde à partir de l'acétylène (UI, 1971). En Suède, par contre, bien qu'il n'y ait pas du tout de pollution de cette sorte, le méthylmercure est quand même intervenu pour une part importante, et ce du fait de la méthylation des composés inorganiques par des microorganismes (JENSEN et JERNELOV, 1969 ; TONOMURA et KANZAKI, 1969 ; BILLEN et WOLLAST, 1972). L'étude de l'accumulation de cette forme particulière de polluant devait donc compléter celle que nous avons entreprise en 1972 en utilisant du HgCl_2 dans l'eau de mer.

D'autre part, comme nous nous nous l'étions proposé antérieurement (BOUQUEGNEAU, 1972), nous avons comparé l'accumulation ainsi que l'effet du mercure chez quelques espèces de téléostéens marins vivant en Mer du Nord. En outre, nous avons également poursuivi l'étude des effets physiologiques de HgCl_2 et de CH_3HgCl au niveau de la branchie de l'anguille.

* : Laboratoires du Professeur A. DISTECHE - Institut de Zoologie,
Quai Van Beneden, 22, 4000 - LIEGE.

1^{ère} PARTIE : ACCUMULATION ET ELIMINATION DU MERCURE CHEZ L'ANGUILLE.

A. RECHERCHE D'UNE DOSE SUBLETHALE :

Le problème pratiquement insurmontable qui se pose au physiologiste est la limitation dans le temps de ses expérimentations. Comme nous l'avons montré l'an dernier, placer pendant un certain temps une anguille dans de l'eau de mer contenant une certaine concentration en mercure, ou bien la soumettre pendant une plus longue durée à un milieu contenant moins de polluant peut avoir des conséquences tout à fait différentes, même si les teneurs en métal des organes incriminés sont identiques. L'expérimentateur essaye cependant autant que possible de faire des observations de brève durée : quelques heures, quelques jours, quelques semaines, plus rarement quelques mois. Il lui incombe alors d'extrapoler ses résultats afin de leur donner une valeur interprétative au niveau de l'environnement.

Notre premier problème a donc été de déterminer une dose suffisamment forte pour que les mesures puissent s'effectuer sur des laps de temps raisonnables, sans pour autant que les éventuels effets physiologiques de ces doses ne s'éloignent trop de ce qu'on pourrait rencontrer dans la nature. Dans le cas de HgCl_2 , nous savions déjà, par le biais de l'étude des effets de cette substance sur la régulation ionique des anguilles que 0.1 ppm de mercure dans l'eau de mer constituait une dose subléthale pour ce poisson. Cette concentration nous a paru intéressante car elle était susceptible de provoquer une accumulation importante (facilement mesurable) en quelques jours.

Nous avons tout d'abord confirmé cette observation en utilisant une méthode classique décrite notamment par SPRAGUE (1969) et qui consiste à mesurer la mortalité des poissons en fonction du temps et de la concentration en polluant du milieu. L'échelle des temps étant logarithmique, si l'évolution de la mortalité a l'allure d'une droite atteignant 100% d'une manière continue, la dose testée est considérée comme létale. Si par contre on constate après un certain temps une cassure dans la droite, on considère que la concentration utilisée est subléthale. Quatre cas ont été envisagés: 0.1 et 10 ppm de mercure sous forme de HgCl_2 ainsi que 0.1 et 10 ppm sous forme de CH_3HgCl .

Des anguilles d'eau douce (*Anguilla anguilla*) ont été préalablement adaptées à l'eau de mer pendant quinze jours. Elles ont ensuite été intoxiquées dans des sacs en polyéthylène identiques contenant l'eau de mer (celle-ci

provient de l'Atlantique : réserves de l'Aquarium de l'Institut de Zoologie à Liège). à laquelle est ajoutée le polluant. Les autres paramètres sont autant que possible maintenus constants (t° : 15°C ; salinité : 33‰ ; aération de l'eau continue).

Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 1. Notons qu'il n'a pas été tenu compte de la mortalité "normale" (c'est à dire de celle des individus témoins pendant le même temps). Les deux courbes de droite de cette figure (carrés et disques blancs) devraient donc en fait avoir une pente un peu moins élevée. Quoiqu'il en soit, il ressort de ces résultats d'une part que le chlorure de méthylmercure est beaucoup plus toxique que le chlorure mercurique et d'autre part que dans les deux cas, la dose de 0.1 ppm de mercure peut être considérée comme subléthale, alors que celle de 10 ppm est létale. Notons dès à présent les points \otimes de la figure 1 qui confirment notre hypothèse d'une adaptation de l'anguille lorsque celle-ci est soumise à des doses subléthales: un tel traitement provoque un déplacement très net de la courbe de mortalité vers la droite.

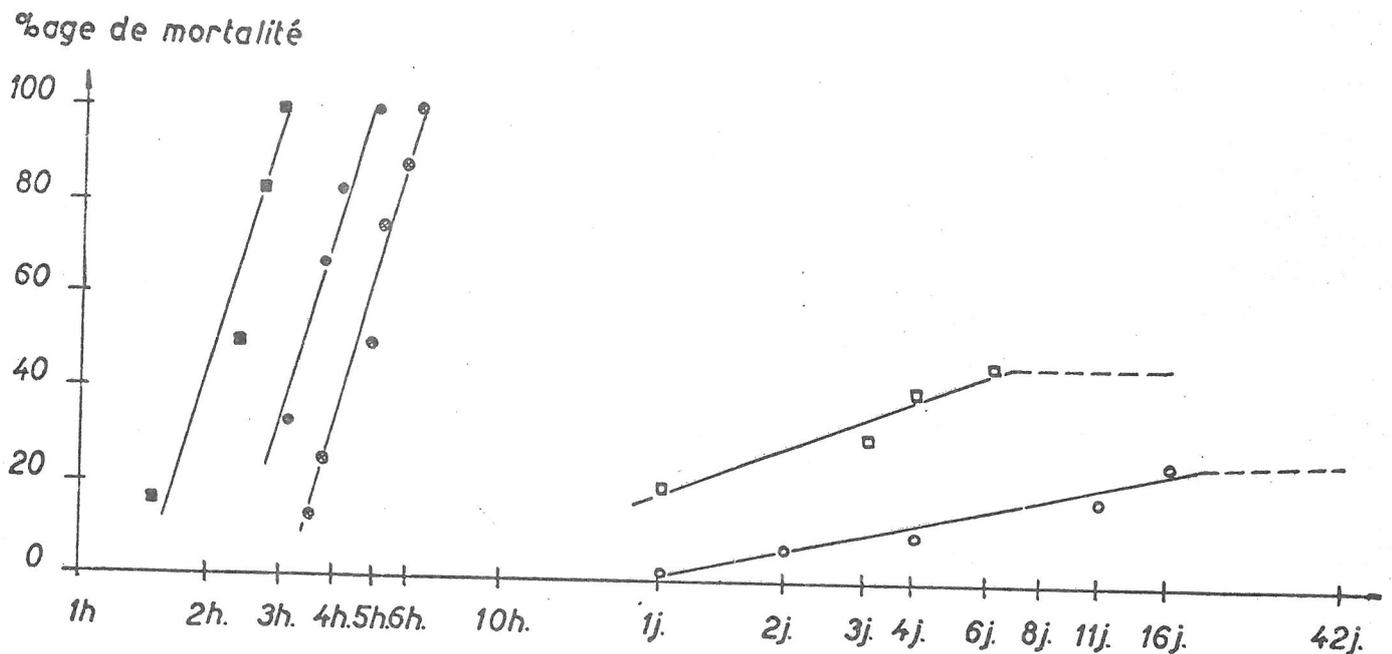


FIGURE 1 : Pourcentages de mortalité chez *Anguilla anguilla* suite à une intoxication directe par deux sels de mercure.

Concentration en Hg dans l'eau:

- 10 ppm (CH₃HgCl)
 - 10 ppm (HgCl₂)
 - 0.1 ppm (HgCl₂)
 - 0.1 ppm (CH₃HgCl)
- \otimes 10 ppm (HgCl₂, mais le traitement a lieu chez des anguilles qui ont été préalablement intoxiquées pendant huit jours dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de mercure sous la même forme).

B. ACCUMULATION DIRECTE DU MERCURE PAR L'ANGUILLE:

B1. Accumulation dans chacun des organes en fonction du temps .

Les résultats sont consignés dans les figures 2 à 11. Les dosages ont été effectués selon une méthode décrite précédemment (BOUQUEGNEAU, 1972). Les résultats ont été exprimés sous forme de facteurs de concentration dans les organes : nous entendons par là le rapport concentration en Hg dans l'organe (en ppm) / concentration en Hg dans l'eau (en ppm), le dénominateur étant égal à 0.1 ppm dans nos conditions expérimentales. Le plus souvent, le facteur de concentration est considéré lorsque l'animal se trouve en "steady state", c'est à dire lorsque la vitesse d'élimination égale la vitesse d'accumulation. Dans nos conditions expérimentales, ce steady state n'est pas atteint; sauf peut-être au niveau du muscle, de la rate et des branchies dans le cas d'intoxication par HgCl_2 . Nos facteurs de concentration varient donc avec le temps et, pour une durée d'intoxication donnée, ils se classent comme suit en ordre croissant :

<u>Intoxication par</u> <u>HgCl_2</u>	<u>Intoxication par</u> <u>CH_3HgCl</u>
Vessie natatoire et muscles	Vessie natatoire et muscles
Bile et T.D.	Bile
	T.D.
Peau	
Cerveau	Cerveau
	Peau
Foie	Foie et Rein
Rein	
Rate	Rate
Branchies	Branchies

Notons en ce qui concerne les branchies que la vitesse d'accumulation est nettement plus rapide que dans les autres organes pendant les premiers jours. Après une douzaine de jours cependant, la rate et le rein atteignent des concentrations en Hg plus élevées que dans les branchies dans le cas des intoxications par le mercure inorganique.

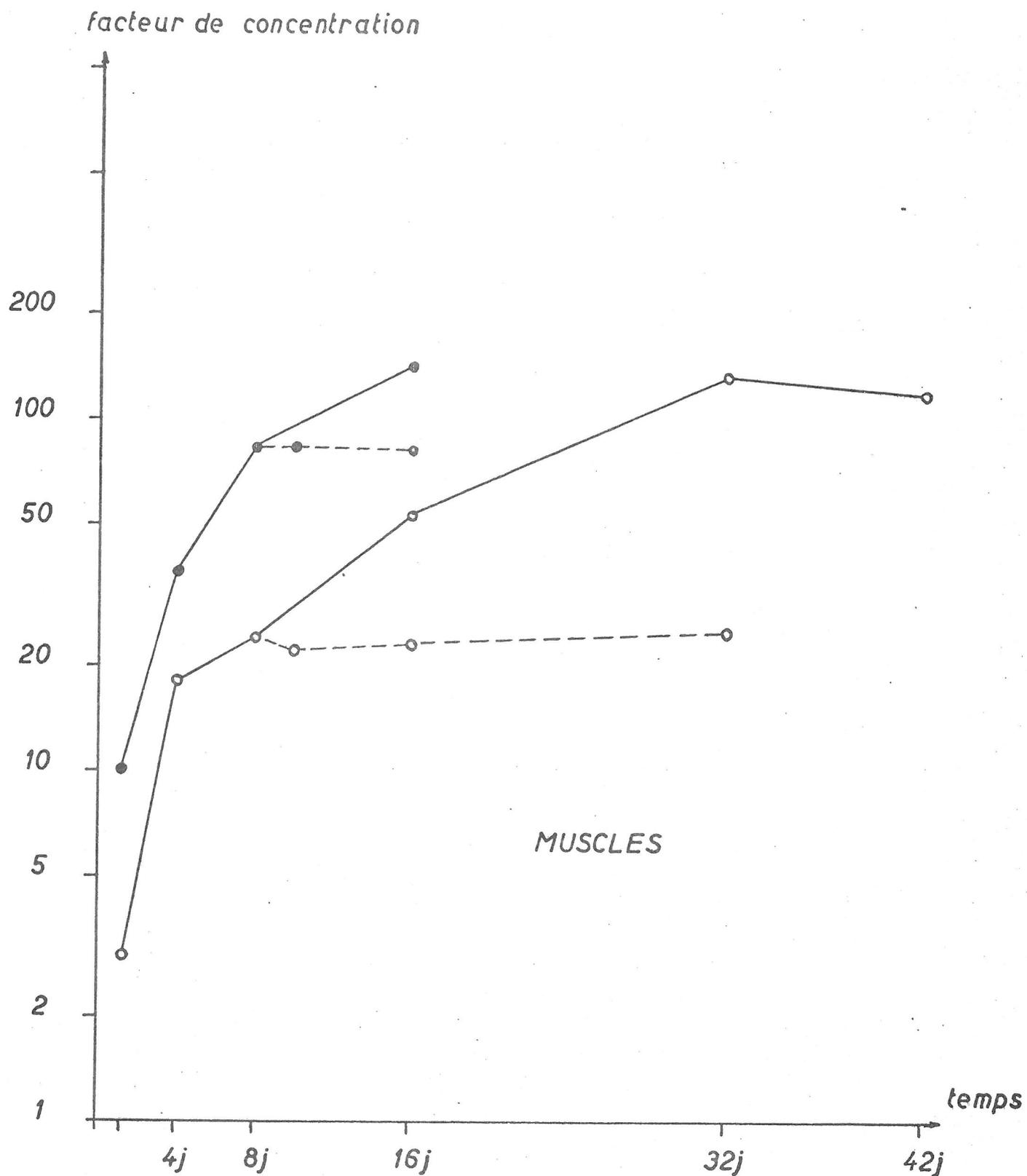


FIGURE 2 : Facteurs de concentration dans les muscles d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de mercure:

● sous forme de CH₃HgCl ; ○ sous forme de HgCl₂.

— = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

facteur de concentration

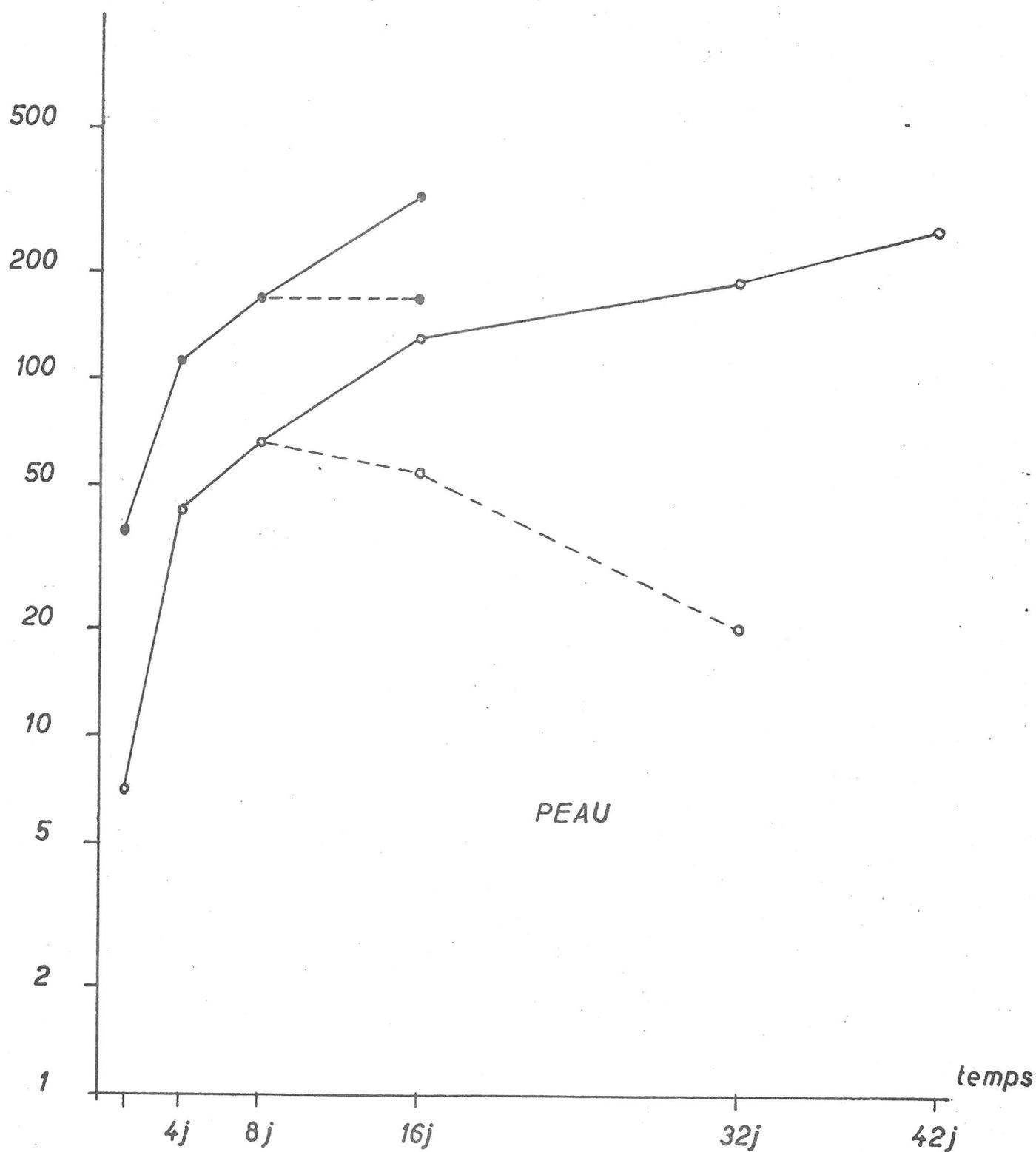


FIGURE 3 : Facteurs de concentration dans la peau d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

- sous forme de CH₃HgCl ; ○ sous forme de HgCl₂.
- = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

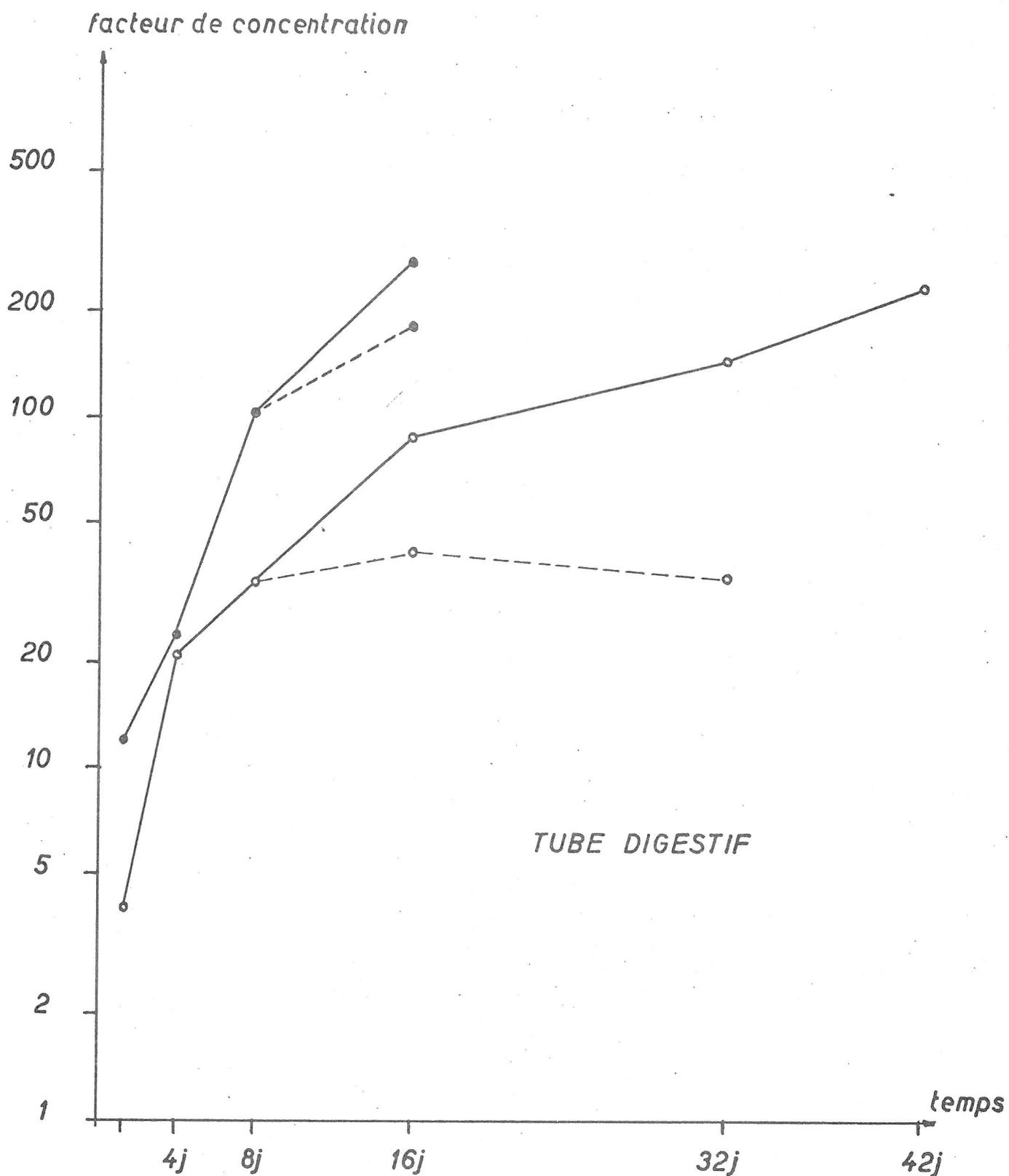


FIGURE 4 : Facteurs de concentration dans le tube digestif d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

● sous forme de CH₃HgCl ; ○ sous forme de HgCl₂.

— = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

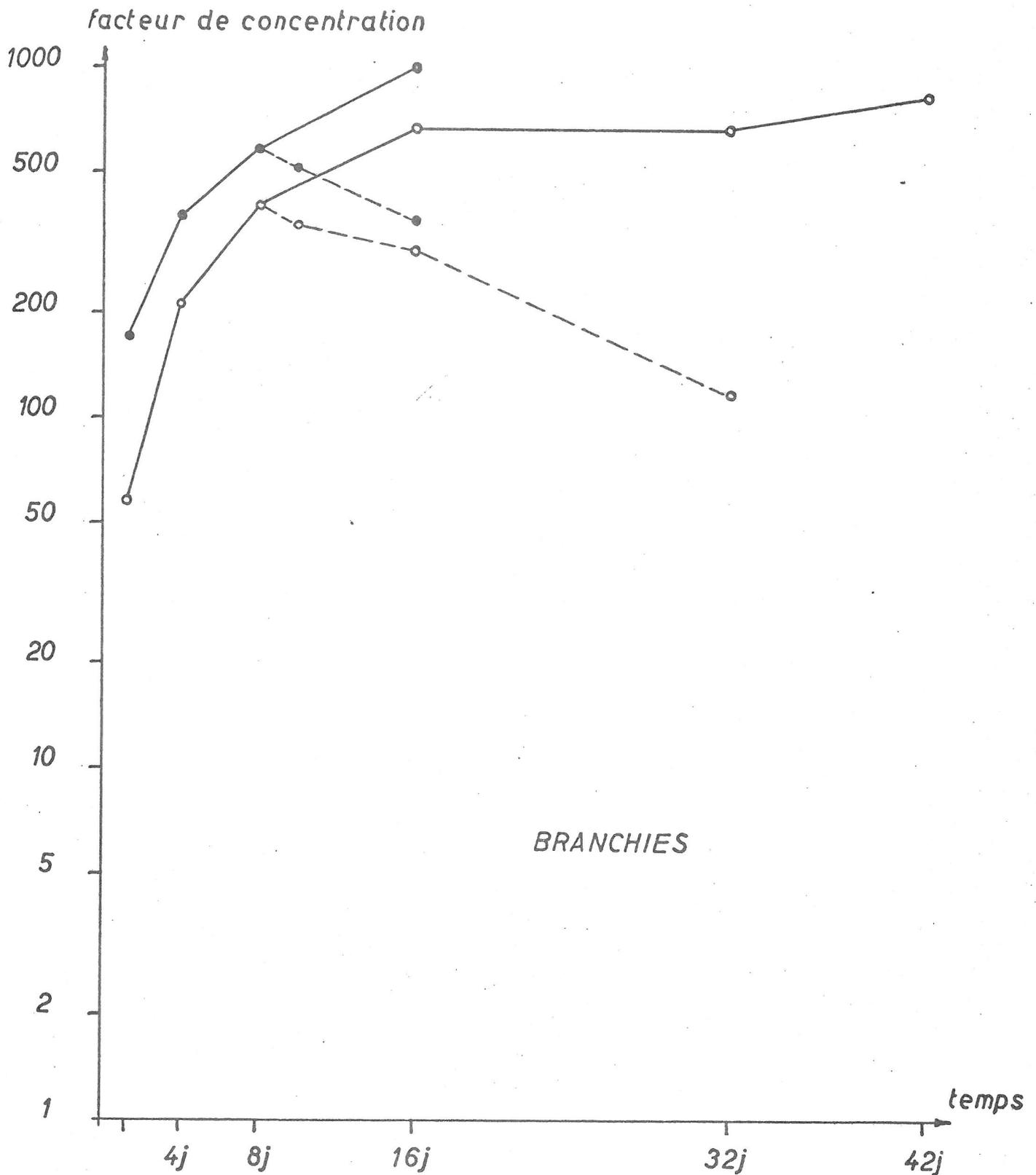


FIGURE 5 : Facteurs de concentration dans les branchies d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

- : sous forme de CH₃HgCl ; ○ : sous forme de HgCl₂.
- = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

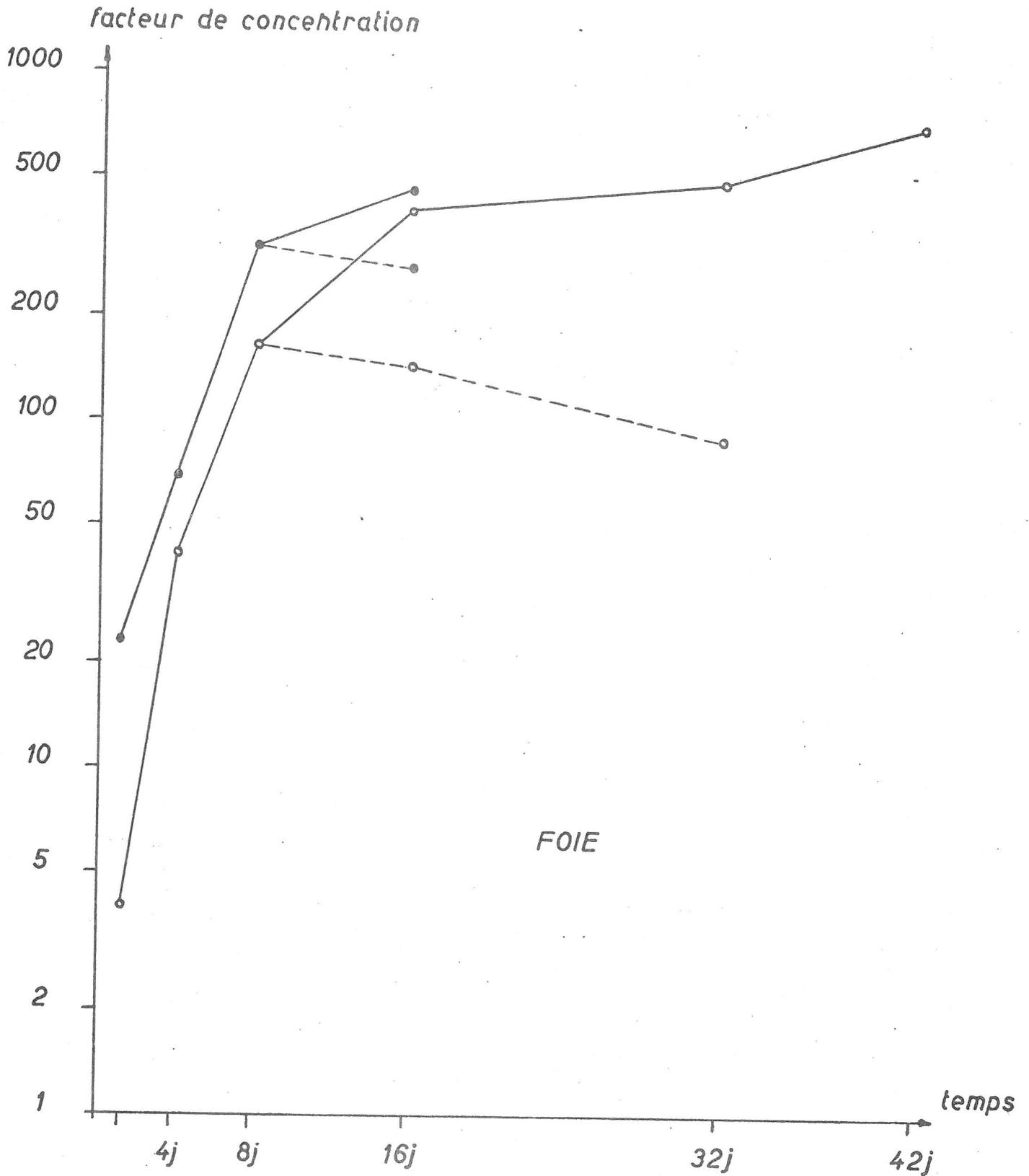


FIGURE 6 : Facteurs de concentration dans le foie d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

- sous forme de CH_3HgCl ; ○ sous forme de HgCl_2 .
- = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

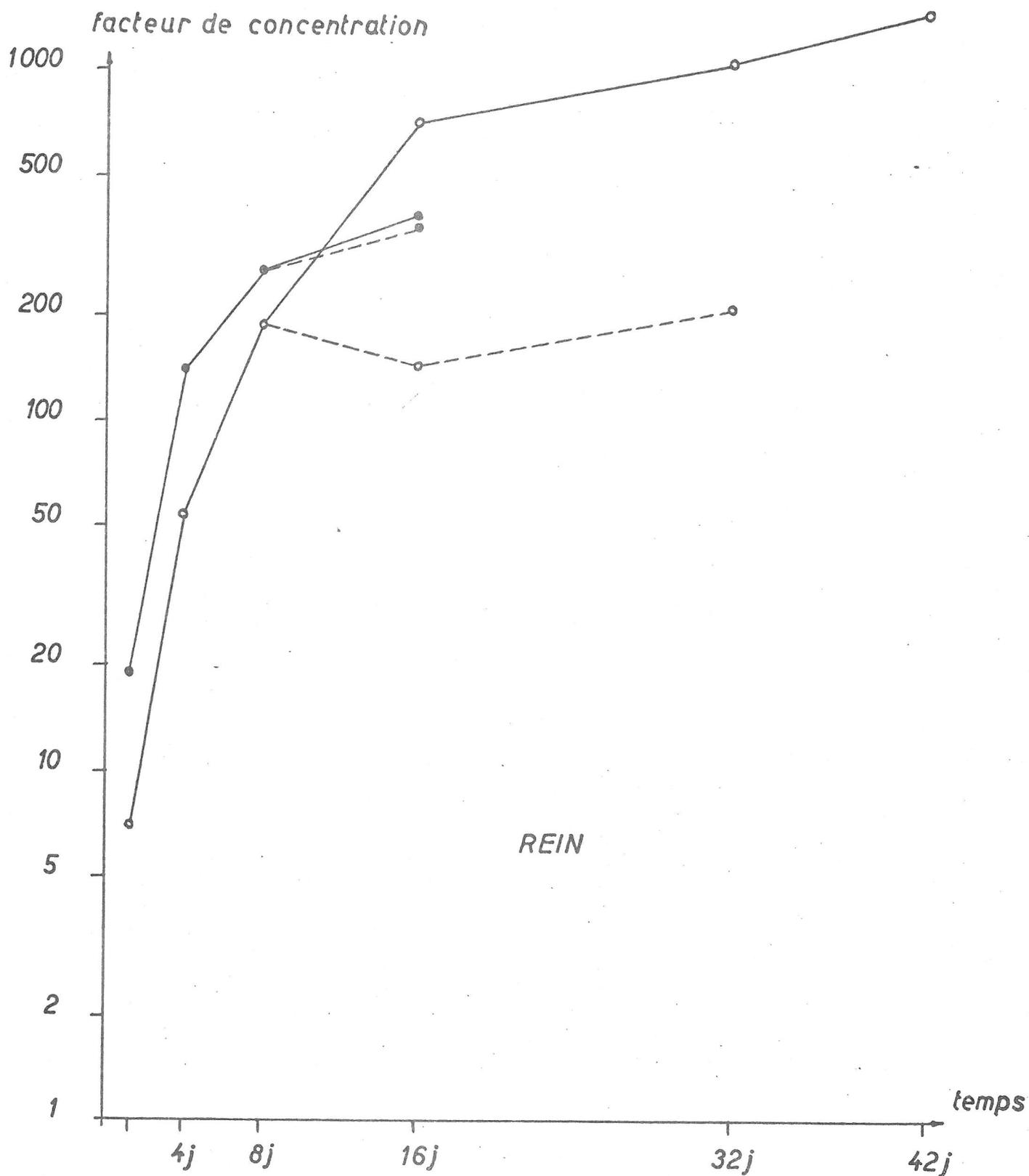


FIGURE 7 : Facteurs de concentration dans le rein d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

● sous forme de CH₃HgCl ; ○ sous forme de HgCl₂.

— = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

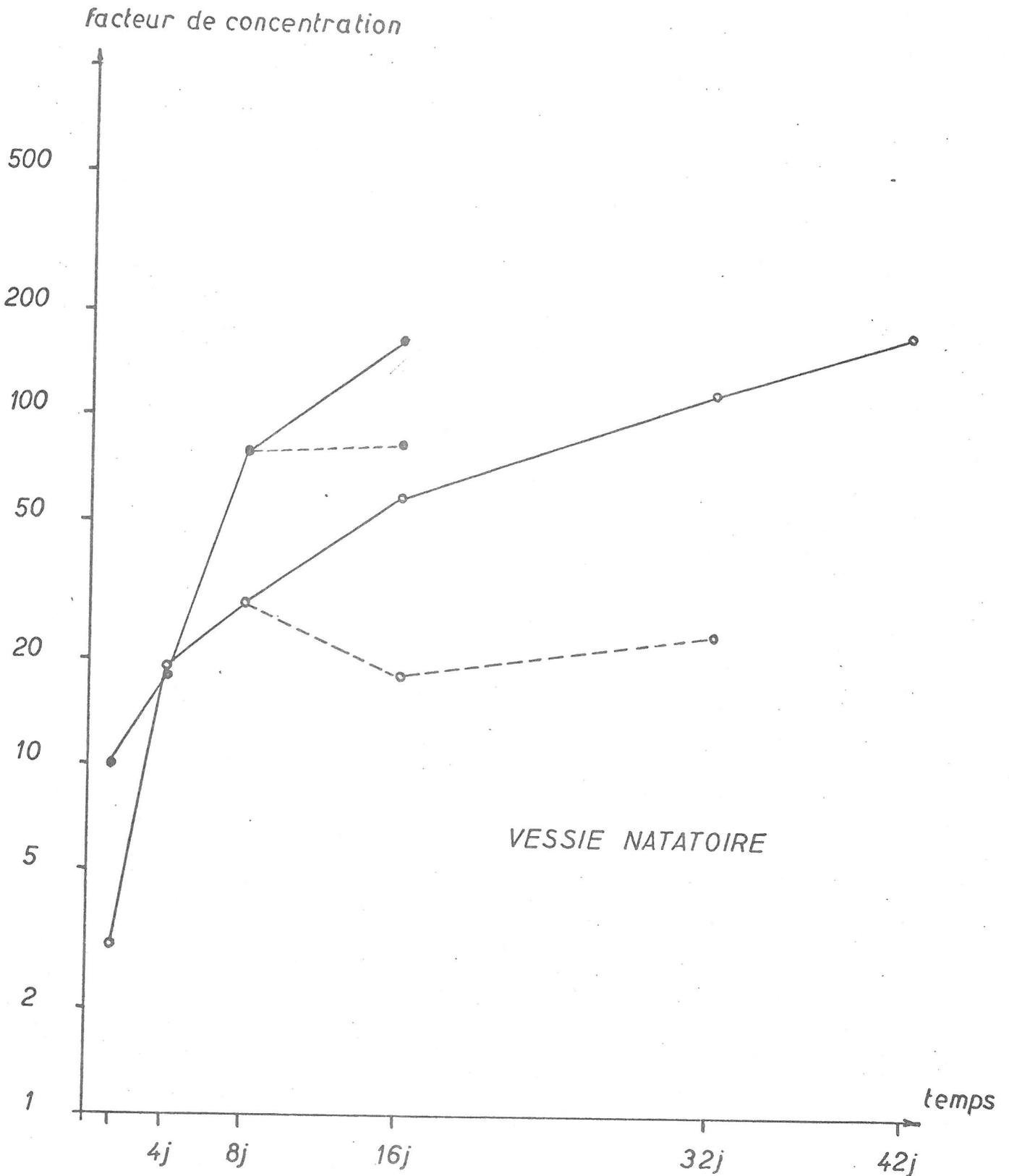


FIGURE 8 : Facteurs de concentration dans la vessie natatoire d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

● sous forme de CH₃HgCl ; ○ sous forme de HgCl₂.

— = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

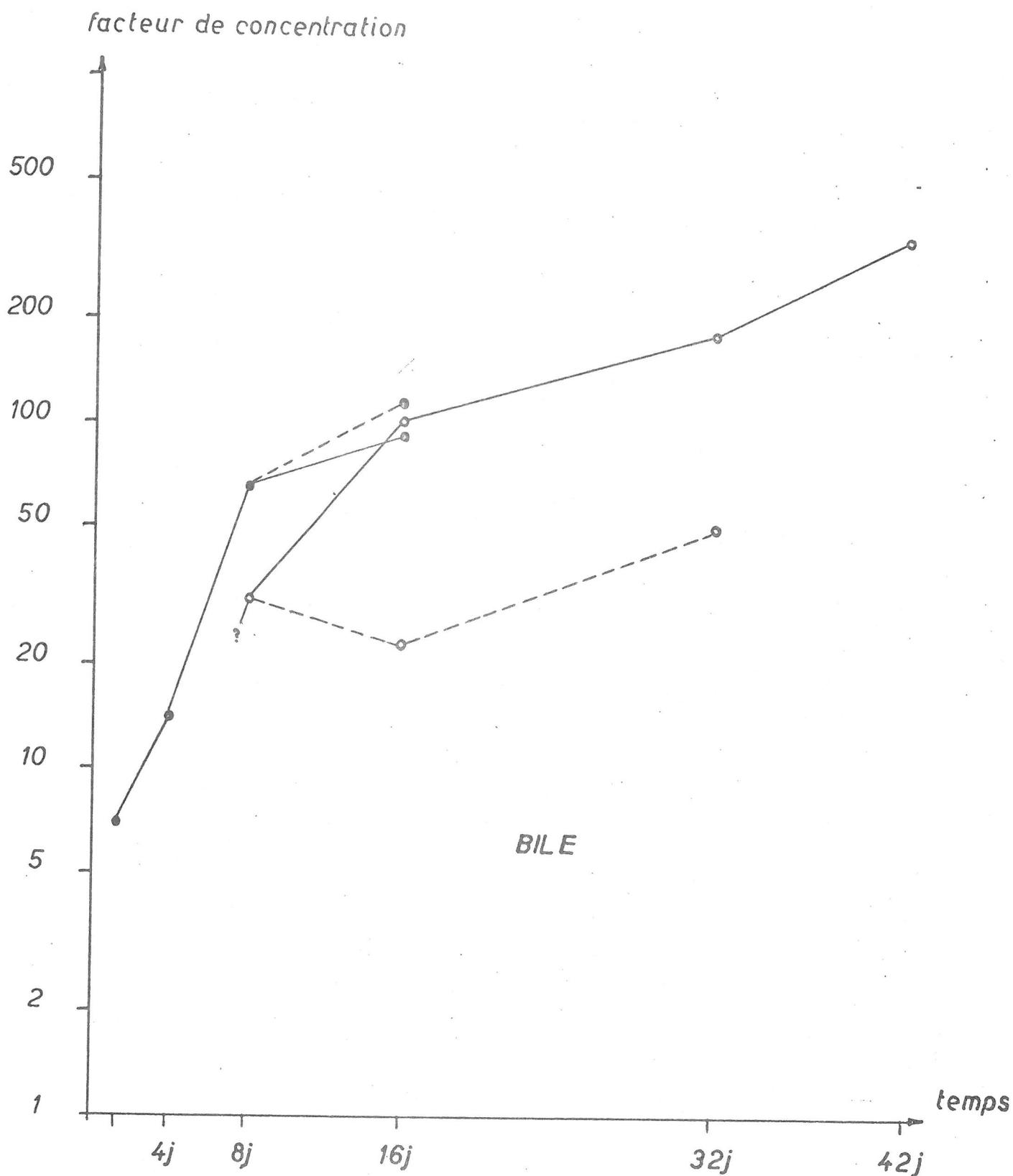


FIGURE 9 : Facteurs de concentration dans la bile d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

● sous forme de CH_3HgCl ; ○ sous forme de HgCl_2 .

— = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

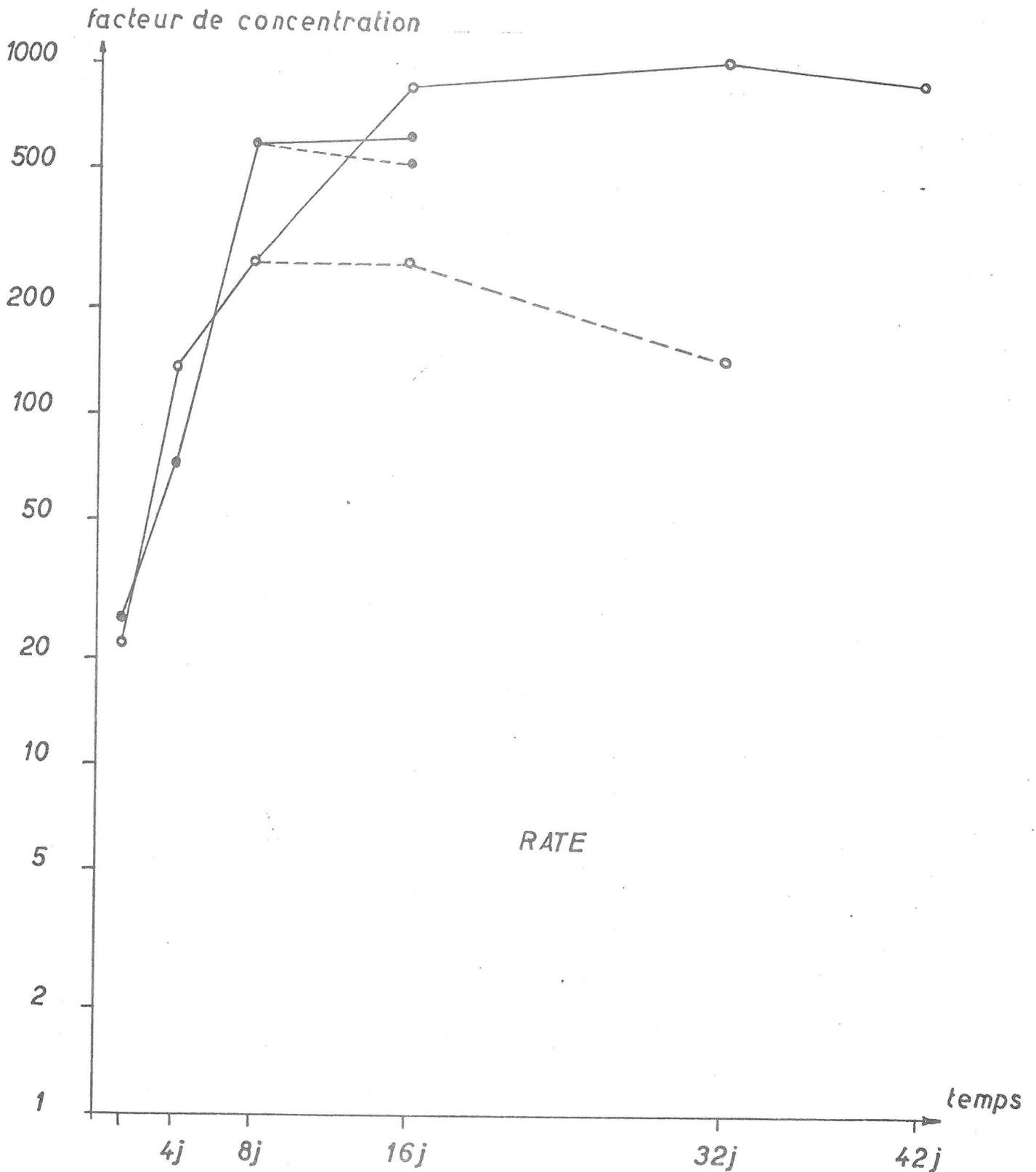


FIGURE 10 : Facteurs de concentration dans la rate d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

- sous forme de CH_3HgCl ; ○ sous forme de HgCl_2 .
- = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

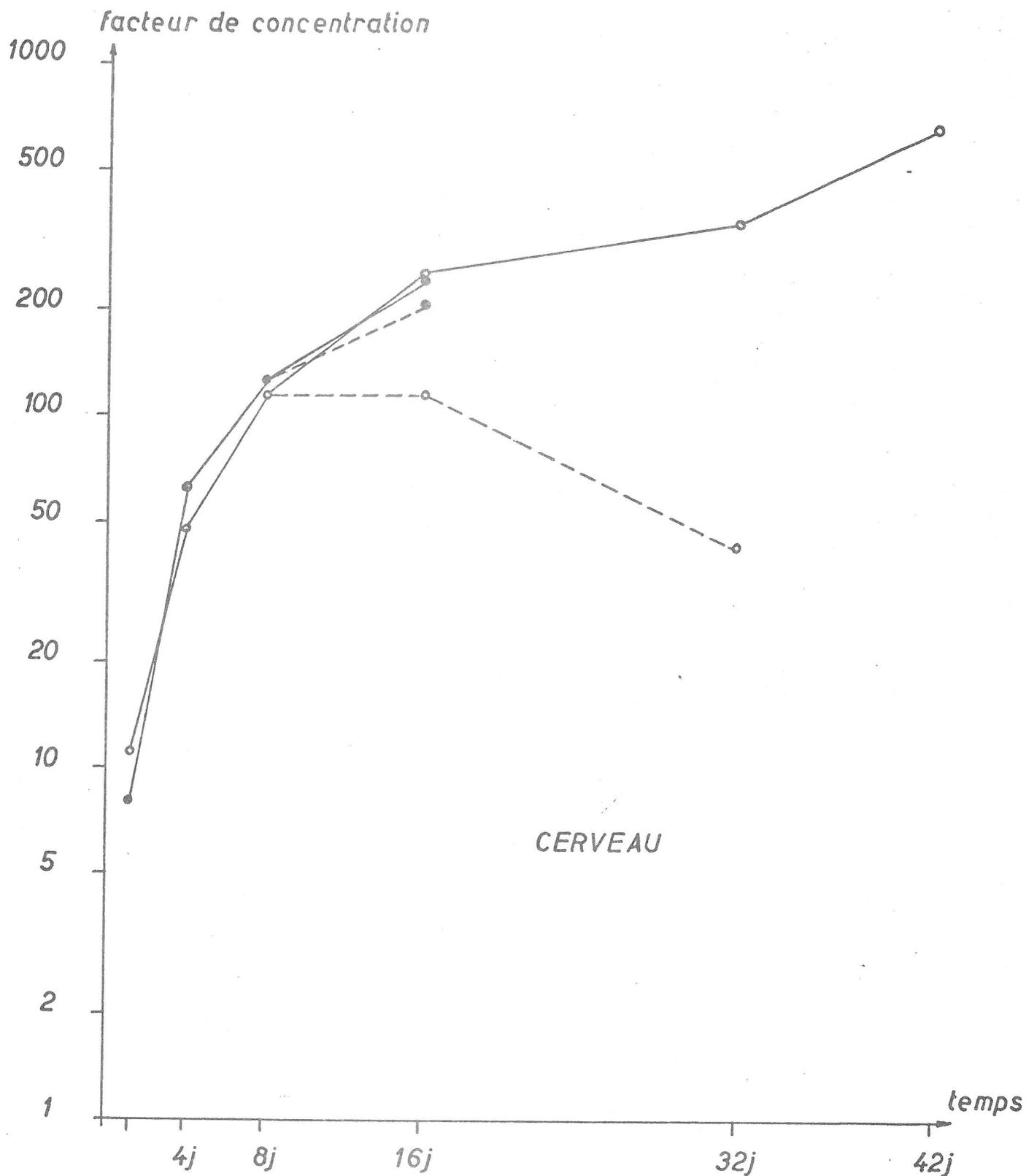


FIGURE 11 : Facteurs de concentration dans le cerveau d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

● sous forme de CH_3HgCl ; ○ sous forme de HgCl_2 .

— = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

Outre ces différences mentionnées au niveau des valeurs relatives des facteurs de concentrations, les figures 2 à 11 montrent d'une manière générale que le mercure s'accumule avec une vitesse environ deux fois plus grande lors des intoxications par le mercure organique. Les rares exceptions sont le cerveau et la rate dans lesquels les vitesses d'accumulation sont semblables et le rein, dont nous venons de parler et dont le facteur de concentration devient extraordinairement élevé lors des intoxications chroniques par HgCl_2 .

B2. Accumulation du mercure dans le sang .

Le sang joue un rôle très particulier dans l'organisme: c'est lui qui établit la liaison entre les divers organes et, en conséquence, c'est par lui que sont transportés les polluants aux organes internes de l'animal. En vue d'éclaircir quelque peu son rôle dans l'accumulation du mercure, nous avons tout d'abord mesuré la répartition de celui-ci dans le sang d'individus^{intoxiqués} par une dose de 0.1 ppm pendant huit jours (Tableau 1).

	CH_3HgCl		HgCl_2	
	Conc.en Hg	$\mu\text{g Hg/g}$ de sang	Conc.en Hg	$\mu\text{g Hg/g}$ de sang
Sang	31.2 ppm	31.2	2.7 ppm	2.7
Plasma	2.7 ppm	1.8	2.1 ppm	1.2
Globules	90.3 ppm	29.4	3.5 ppm	1.5

TABLEAU 1 : Concentration et répartition du mercure dans le sang d'anguilles intoxiquées pendant huit jours dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de mercure (sous forme de HgCl_2 ou de CH_3HgCl).

Nos résultats montrent que le mercure est un peu plus concentré dans le plasma des poissons intoxiqués par CH_3HgCl , mais que l'énorme différence observée au niveau du sang provient en fait de l'accumulation très importante de méthylmercure par les globules.

Ces observations, ajoutées aux différences mises en évidence aux niveau des autres organes suggèrent que Hg^{++} et CH_3Hg^+ gardent, tout au moins dans une grande proportion, leur intégrité chimique dans les tissus. Ils ne sont en tous cas pas métabolisés dans la branchie comme nous en avons émis l'hypothèse pour tenter d'expliquer l'adaptation des anguilles aux effets du mercure sur l'osmorégulation (BOUQUEGNEAU, 1972).

En vue d'éclaircir davantage encore les mécanismes de transport de ce métal dans le sang, nous avons effectué l'expérience suivante : du sang prélevé à des poissons témoins est centrifugé et privé de son culot de globules. A un ml du surnageant (le plasma) est alors ajouté 2, 5, ou 10 μg de Hg sous les deux formes étudiées dans ce travail. Après un quart d'heure d'agitation, les protéines sont précipitées par de l'acide trichloracétique, centrifugées et séparées du surnageant en vue de doser la répartition du mercure dans les deux phases. Les résultats obtenus sont exprimés dans le tableau 2 et la fig.12.

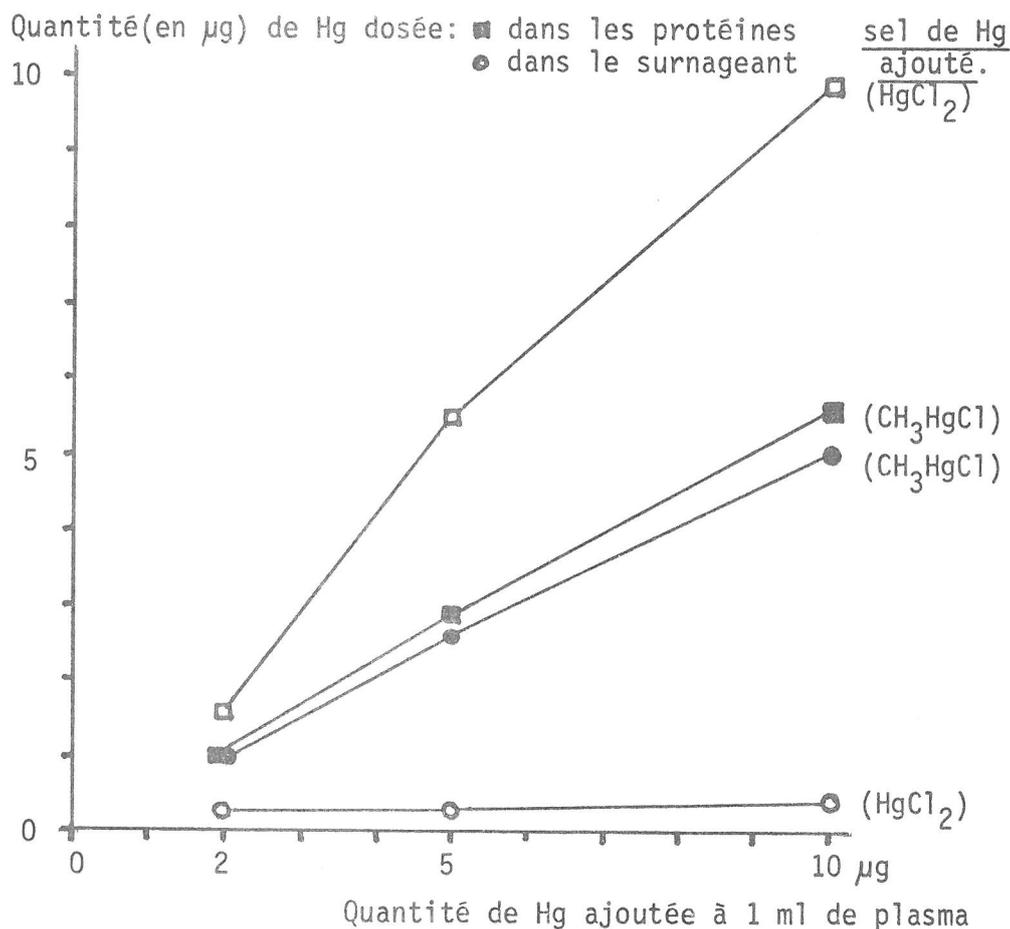


FIGURE 12 : répartition dans le plasma du mercure ajouté in vitro sous forme inorganique (HgCl_2) ou organique (CH_3HgCl).

Quantité de Hg ajoutée à 1 ml de plasma	Sel de Hg utilisé	Concentration en Hg dosée dans le plasma	Concentration en Hg dans le culot de protéines	Concentration en Hg dans le surnageant trichloracétique
2 µg	HgCl ₂	1.86 ppm	31.2 ppm	0.3 ppm
2 µg	CH ₃ HgCl	2.04 ppm	2.0 ppm	1.1 ppm
5 µg	HgCl ₂	5.81 ppm	110.4 ppm	0.3 ppm
5 µg	CH ₃ HgCl	5.50 ppm	57.6 ppm	2.8 ppm
10 µg	HgCl ₂	10.28 ppm	197.8 ppm	0.4 ppm
10 µg	CH ₃ HgCl	10.60 ppm	112.6 ppm	5.2 ppm

TABLEAU 2 : Répartition du mercure ajouté in vitro à 1 ml de plasma d'anguille (voir explications dans le texte).

Ils montrent clairement la différence de comportement des deux composés:

- le Hg^{++} se fixe presque exclusivement sur les protéines
- le CH_3Hg^+ reste dans une proportion importante libre dans le plasma, ou alors il s'y trouve sous forme de complexes de faible poids moléculaires.

B3. Charge en mercure de l'anguille .

Etant donné notre connaissance de la répartition du mercure dans un grand nombre d'organes de l'anguille, il nous a semblé intéressant d'essayer à l'aide de nos résultats d'obtenir une image de la charge totale de l'animal. Cette détermination ne sera évidemment qu'approximative puisque, comme le montrent les tableaux 3 et 4, elle ne tient pas compte du sang ni des os. En ce qui concerne ces derniers, leur poids est inclus dans celui des muscles avec lesquels ils ont été pesés. Cette approximation est à notre avis acceptable compte tenu du faible poids des os en comparaison de celui des muscles et étant donné les similitudes de facteurs de concentration déjà observés au niveau de ces deux organes (HANNERZ , 1968). Il n'est en outre pas tenu compte des organes représentant moins de 0.1% du poids total.

De l'examen des tableaux 3 et 4, il ressort que les muscles (+os!), la peau et les branchies rendent toujours compte d'au moins 87 % du mercure total.

Etant donné la quantité importante de muscles dans l'organisme, le facteur de concentration au niveau de la charge du corps est moins élevé qu'il ne l'est dans la plupart des autres organes pris individuellement (voir résultats de la figure 13).

Durée de l'intoxication		30 h	4 j.	8 j.	16 j.	32 j.	8 j. + 8 j. de lavage	8j.+ 24j. de lavage
Poids des organes (en grammes)		Poids de mercure dans chaque organe (en µg).						
Muscles	84.8	25.4	152.6	203.5	457.9	1136.3	195.0	212.0
Peau	8.7	6.1	37.4	58.3	113.1	163.6	47.9	17.4
T.D.	2.5	1.0	5.3	8.5	22.3	36.3	10.8	8.8
Branchies	1.9	11.0	40.1	76.8	128.8	126.7	57.2	22.4
Foie	0.9	0.4	3.7	14.7	35.6	43.7	12.9	7.9
Rein	0.8	0.6	4.3	15.1	56.1	92.6	11.4	16.8
Ves.Nat.	0.2	0.1	0.4	0.6	1.2	2.4	0.4	0.5
Bile	0.1	0.0	0.1	0.3	1.0	1.8	0.2	0.5
Rate	0.1	0.2	1.4	2.7	8.8	11.0	2.8	1.5
Poids du corps	100 g							
Poids de Hg dans le corps (en µg)		44.8	245.3	380.5	824.8	1614.4	338.6	287.8
Conc. en Hg dans le corps(en ppm)		0.4	2.5	3.8	8.2	16.2	3.4	2.9
Facteur de concentration.		4	25	38	82	162	34	29

TABLEAU 3 : Détermination approximative (voir texte) des facteurs de concentration chez l'anguille intoxiquée par de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg (sous forme de $HgCl_2$).

Durée de l'intoxication		30 h.	4 j.	8 j.	16 j.	8 j. + 8 j. de lavage
Poids des organes (en grammes)		Poids de mercure dans chaque organe (en µg).				
Muscles	84.8	84.8	313.8	712.3	1204.2	695.4
Peau	8.7	33.1	97.4	147.0	281.9	147.0
T.D.	2.5	3.0	6.0	26.0	69.3	45.3
Branchies	1.9	32.3	71.8	113.4	190.0	69.5
Foie	0.9	2.1	6.2	28.2	41.0	24.8
Rein	0.8	1.5	11.3	21.7	30.5	29.0
Vessie nat.	0.2	0.2	0.4	1.6	3.0	1.7
Bile	0.1	0.1	0.1	0.7	0.9	1.2
Rate	0.1	0.3	0.7	6.0	6.2	5.3
Poids du corps	100 g					
Poids de Hg dans le corps (en µg)		157.4	507.7	1056.9	1827.0	1019.2
Conc. en Hg dans le corps (en ppm)		1.6	5.1	10.6	18.3	10.2
Facteur de concentration		16	51	106	183	102

TABLEAU 4 : Détermination approximative (voir texte) des facteurs de concentration chez l'anguille intoxiquée par de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg (sous forme de CH_3HgCl).

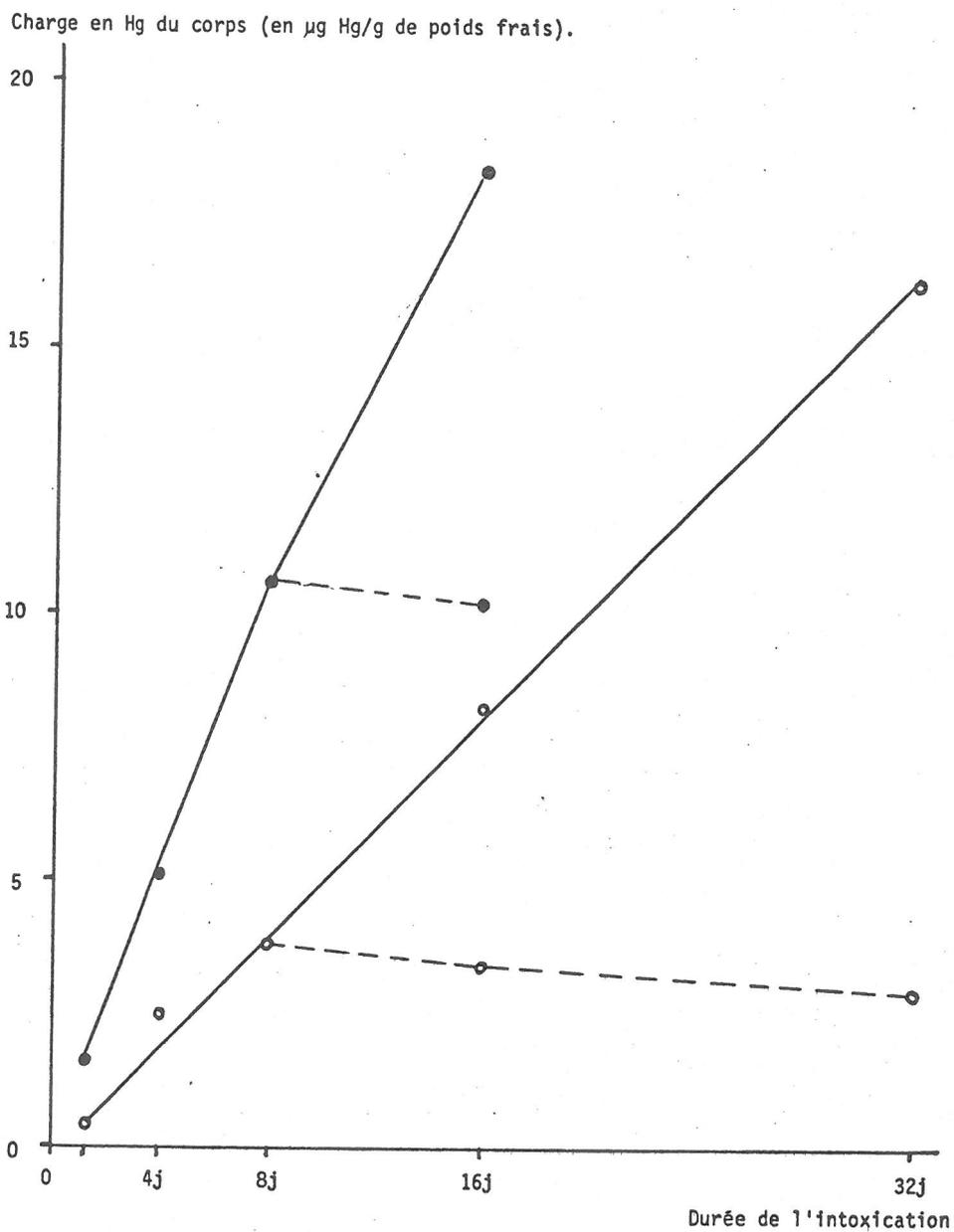


FIGURE 13 : charge en mercure du corps d'anguilles séjournant dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg :

- sous forme de CH_3HgCl ; ○ sous forme de HgCl_2 .
- = accumulation ; - - - = retour dans une eau de mer non polluée après huit jours d'intoxication.

C. ELIMINATION DU MERCURE CHEZ L'ANGUILLE INTOXIQUEE.

L'étude de l'élimination du Hg a été abordée chez des anguilles préalablement intoxiquées par 0.1 ppm de Hg (HgCl_2 ou CH_3HgCl) dans de l'eau de mer pendant huit jours. Les poissons sont alors placés dans de l'eau de mer naturelle non polluée qui est entièrement renouvelée chaque jour.

C1. Elimination au niveau de chaque organe.

Les résultats sont consignés dans les figures 2 à 11 (lignes en pointillé). On peut constater trois cas bien distincts :

- 1° Certains organes éliminent le mercure avec une demi-vie relativement rapide. Ce sont les branchies, la peau (cas de HgCl_2), le foie, la vessie natatoire (cas de HgCl_2), la rate et le cerveau (dans le cas de HgCl_2).
- 2° Certains organes gardent pratiquement constante leur concentration en mercure. En fait, ils l'éliminent avec une demi-vie extrêmement longue (voir discussion dans la partie C2). C'est principalement le cas des muscles, de la peau (CH_3HgCl) et de la vessie natatoire (CH_3HgCl).
- 3° Enfin, certains organes continuent à accumuler le mercure en dépit du lavage imposé à l'anguille. Ce sont le tube digestif, le rein, la vésicule biliaire et le cerveau (CH_3HgCl), les trois premiers organes intervenant en fait dans l'excrétion du mercure.

Une telle augmentation dans certains organes témoigne donc d'une redistribution du mercure à l'intérieur du poisson en vue de son élimination.

Remarque à propos des branchies : HANNERZ (1968) a montré que des concentrations relativement élevées de mercure sont trouvées dans les branchies de poissons, que ce métal soit fourni dans la nourriture ou directement dans l'eau. Cela indique, écrit-il, que les branchies sont importantes pour les échanges de mercure entre le poisson et l'eau.

De plus, outre le rôle bien connu d'excrétion des chlorures par la branchie, MASONI et GARCIA-ROMEU (1972) ont mis en évidence la capacité de cet organe d'excréter certaines substances organiques. Il nous semble donc raisonnable, compte tenu de cette remarque et de la vitesse d'élimination extrêmement rapide du mercure hors de la branchie de reconnaître le rôle important joué par elle dans l'élimination de ce métal.

C2. Elimination au niveau de l'animal entier.

Si nous considérons l'évolution de la charge totale en mercure de l'anguille (voir figure 13, lignes en pointillé), nous constatons une élimination lente de ce métal. Etant donné la durée de vie très importante du mercure dans le muscle, son élimination n'est pas mesurable dans le délai de nos expériences. Nous ne pouvons donc pas apporter ici de conclusions au seul vu de nos résultats. Nous nous reporterons donc aux travaux de JÄRVENPAA, TILLANDER et MIETTINEN (1970) qui ont injecté par voie buccale dans des anguilles du mercure marqué sous forme de $\text{CH}_3^{203}\text{Hg}^+$ et qui ont observé la décroissance de la radioactivité totale de l'animal en fonction du temps. Ils observent une cinétique de lavage à deux compartiments, le premier ayant une demi-vie rapide (± 10 jours) et le second, qui rend compte de 70% de la radioactivité totale, ayant une demi-vie extrêmement longue (de l'ordre de 1000 jours).

Selon notre interprétation, la phase rapide, outre la perte de mercure due au vomissement et mentionnée par les auteurs, représenterait principalement l'excrétion due à des organes à demi-vie rapide. (branchies, foie). Par contre, la phase lente rendrait compte de la rétention extrêmement importante du mercure dans le tissu musculaire.

D. DISCUSSION ET CONCLUSIONS.

Les résultats obtenus à propos de l'accumulation et de l'élimination du mercure fourni au poisson sous forme de HgCl_2 et de CH_3HgCl montrent que ces deux polluants gardent leur individualité au sein de l'animal. Il s'avère donc important de connaître le composé de mercure qui se trouve dans une eau de mer polluée pour pouvoir prévoir ses effets. A partir de nos observations et en nous appuyant sur des données de la littérature (Pour des revues de la littérature, voir CLARKSON, 1972 ainsi que FRIBERG et VOSTAL, 1972), nous en sommes arrivés aux concepts décrits dans les schémas de la figure 14. Il y apparait ce qui suit :

- 1° l'absorption du CH_3HgCl est deux fois plus rapide que celle du HgCl_2 .
- 2° la fourniture du mercure aux organes via le plasma se fait principalement par les branchies, puis par la peau, et enfin, dans une moindre mesure, par le tube digestif.

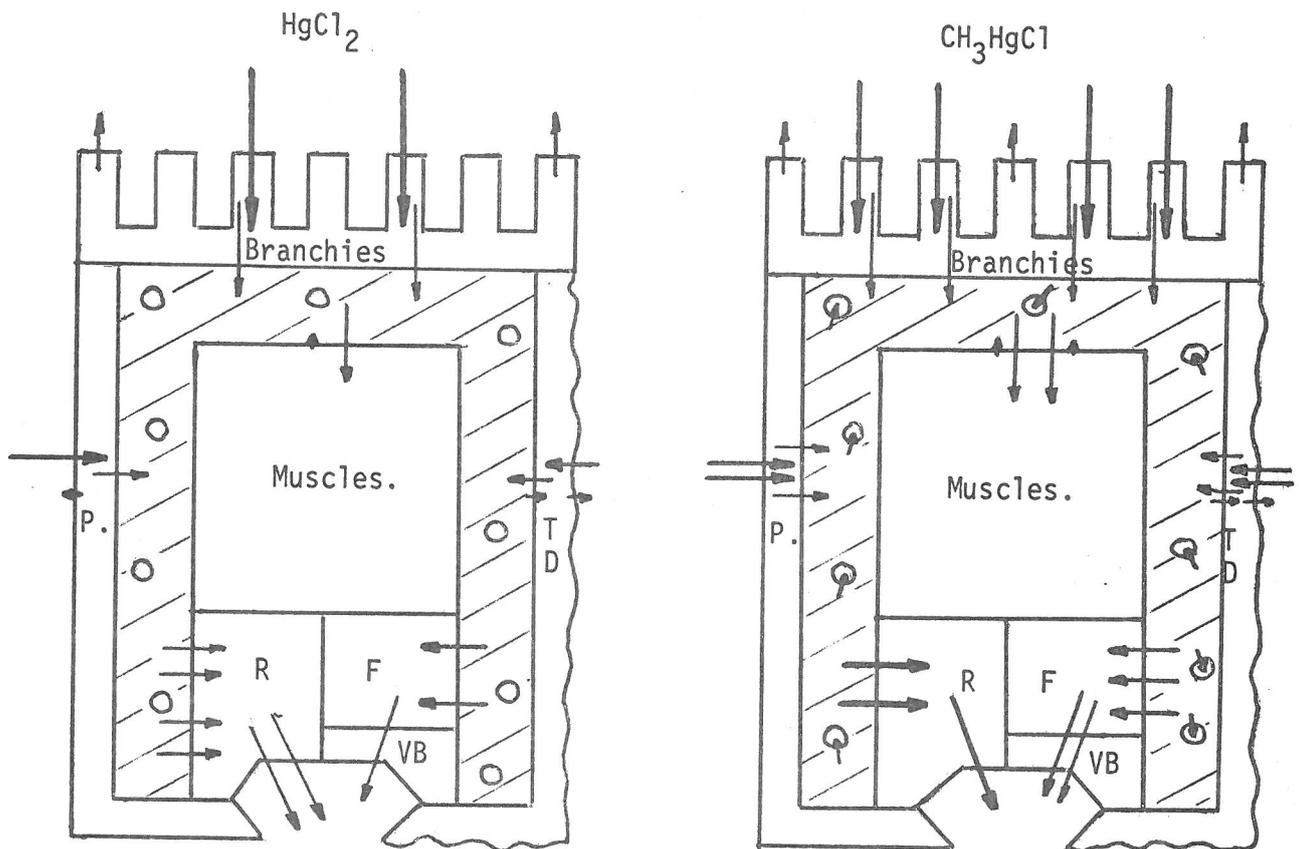


Figure 14 : Schémas représentant l'accumulation et l'excrétion du mercure dans le corps de l'anguille (voir explications dans le texte).

P = peau R = rein F = foie VB = vésicule biliaire
 TD = tube digestif // = plasma ○ = érythrocytes.

- 3° les érythrocytes accumulent le CH_3Hg^+ d'une manière très importante.
- 4° l'élimination du mercure des muscles vers le plasma est très lente.
- 5° les deux principaux organes qui excrètent le mercure sont le rein et le foie (par l'intermédiaire de la bile). Le rein intervient pour la plus grande part dans l'élimination du mercure inorganique tandis que le foie intervient surtout dans l'élimination du mercure organique.
- 6° les organes périphériques, ou tout au moins les branchies, interviennent également pour une certaine part dans l'élimination du mercure de l'organisme.

Si, comme l'a montré HANNERTZ (1968), le mercure est capté par le brochet d'une manière plus importante directement à partir de l'eau qu'à partir de la nourriture, il est indispensable de tenir compte de la phase d'accumulation directe dans l'élaboration d'un modèle cinétique de concentration du mercure chez les poissons. Nous comptons dès à présent orienter nos recherches dans ce domaine, mais auparavant, il convient de voir si le comportement du mercure chez l'anguille peut être comparable à ce qui se passe chez d'autres poissons. Ce fait fait l'objet de la deuxième partie de ce travail.

Comme nous l'avons déjà mentionné auparavant (BOUQUEGNEAU, 1973), l'existence de vitesses d'accumulation et d'élimination très variables d'un organe à l'autre dans un même poisson, de même que la variabilité relative des concentrations en Hg selon le composé utilisé peuvent présenter un intérêt considérable. Les deux exemples qui suivent vont préciser notre pensée :

1°. La vitesse d'accumulation du foie est beaucoup plus grande que celle du muscle et il en est de même en ce qui concerne la vitesse d'élimination. D'autre part, un poisson qui vit dans une eau de mer non polluée a des concentrations en mercure plus importantes dans le muscle que dans le foie (CUMONT et al., 1972). Si ce poisson séjourne dans une eau polluée par le mercure, le rapport $\frac{\text{Conc. en Hg dans les muscles}}{\text{Conc. en Hg dans le foie}}$ qui était inférieur à un va lui devenir supérieur. C'est ce qu'a observé CUMONT et ses collaborateurs en comparant des poissons vivant au large de l'Atlantique (eau non polluée) à des poissons vivant en Méditerranée (polluée). D'autre part, si l'eau se dépollue, il est fort vraisemblable que le quotient diminuera pour éventuellement redevenir inférieur à un. Ce quotient pourrait donc être considéré comme un test biologique indicateur de l'histoire et de l'état de la pollution dans une région déterminée.

2°. Comme nous l'avons montré au début de ce travail (Tableau 1), le rapport entre la concentration en Hg dans les érythrocytes et dans le plasma peut être un indicateur de la nature de la pollution.

Ainsi, et ce sera notre dernière conclusion, une connaissance approfondie des modalités d'accumulation des divers composés du mercure devrait pouvoir nous amener, au simple vu des concentrations en Hg dans les divers organes, à dresser une véritable "carte d'identité" de l'état de la pollution de la région dans laquelle le poisson a vécu.

2ème PARTIE : ACCUMULATION ET EFFET DU MERCURE DANS L'EAU DE MER CHEZ
TROIS TELEOSTEENS MARINS.

C'est grâce à l'extrême amabilité des Docteurs HOVART et DECLERCQ de la Station des Recherches pour la Pêche Maritime à Ostende qui nous ont fourni un lot de poissons pêchés en Mer du Nord, que nous avons pu recueillir les quelques résultats décrits dans cette partie.

Ce lot de poissons, composé d'environ 15 limandes, 10 plies et 30 cottus (*Cottus scorpius*), a été transporté par nos soins dans les aquariums de l'Université de Liège où il a été mis pendant plusieurs jours en observation. Il s'est tout d'abord produit une mortalité importante consécutive au transport et à l'adaptation des animaux à nos conditions de laboratoire. Cette mortalité s'étant stabilisée, nous avons disposé pour nos expériences d'intoxication de 9 limandes, de 4 plies et de 12 cottus. 2 poissons de chaque espèce ont été prélevés comme témoins. Deux cottus ont été intoxiqués par 10 ppm de Hg dans l'eau. Les autres ont été placés dans des sacs de polyéthylène remplis d'eau de mer abondamment aérée contenant 0.1 ppm de Hg sous forme de $HgCl_2$. Deux limandes et deux cottus ont été prélevés après 30 heures d'intoxication, une limande et un cottus après 4 jours, une plie et deux limandes après 8 jours, 2 cottus après 16 jours et enfin 2 cottus après 24 jours. Les autres poissons sont morts au cours des expériences.

Les faits que nous rapportons ci-dessus indiquent clairement que nous considérons les résultats obtenus comme fragmentaires et sujets à caution. Les animaux prélevés ont été examinés sous deux angles bien précis :

- 1° d'une part, nous avons dosé la concentration en mercure de quelques organes (branchies, rein, rate, peau, foie et T.D.) et nous l'avons comparée à celle que nous avons observée chez l'anguille (cf. 1ère partie de ce rapport).
- 2° d'autre part, nous avons dosé les concentrations en Na, en K et en eau dans les branchies.

Les résultats ont été rassemblés dans les tableaux 5, 6, 7, 8, 9 et 10.

A. ACCUMULATION DU MERCURE DANS LES ORGANES (Tableaux 6, 7, 8 et 9).

D'une manière générale, on constate que ce sont les branchies, le rein et la rate qui accumulent le plus. Ensuite vient le foie puis la peau et le tube digestif, et enfin les muscles.

La différence essentielle qui existe entre l'anguille d'une part et la limande et le cottus d'autre part (nous n'avons pas assez d'éléments en ce qui concerne la plie) semble plutôt résider dans les vitesses d'accumulation au niveau de chaque organe. En effet, tout se passe comme si le turn-over du mercure dans les limandes et les cottus était beaucoup plus rapide que chez l'anguille. Par exemple, après 30 heures d'intoxication, il n'y a que 5.8 ppm de Hg dans les branchies et 0.4 ppm de Hg dans les muscles de l'anguille alors qu'il y a déjà 17.5 et 2.0 ppm de Hg dans les mêmes organes du cottus (tableau 6). Par contre, après 16 jours d'intoxication, les valeurs sont inversées et on trouve alors plus de mercure dans ces deux organes chez l'anguille que chez le cottus (Tableau 9). On peut faire des observations similaires chez la limande après 8 jours d'intoxication par exemple. En conséquence, et avec les réserves que nous avons formulées en début de ce chapitre, il semble bien que les vitesses d'échange du mercure soient plus rapides chez ces deux derniers poissons que chez l'anguille. Si c'est le cas, leur demi-vie d'élimination du mercure devrait être beaucoup plus courte que celle de l'anguille. Nous espérons pouvoir réaliser des expériences en vue de tester cette hypothèse au cours de l'année 1974.

B. EFFET DU MERCURE SUR L'OSMOREGULATION CHEZ LA PLIE, LA LIMANDE ET LE COTTUS (Tableaux 5 à 10).

La dose de 0.1 ppm de Hg dans l'eau ne semble pas perturber de manière importante les équilibres ioniques des branchies des trois poissons. Par contre, 10 ppm de Hg provoque chez le cottus une augmentation très importante de la concentration en sodium de la branchie, comme le montrent les résultats du tableau 10.

Il semble donc bien que les observations réalisées en 1972 chez l'anguille - à savoir une rupture de la balance ionique pour des concentrations en Hg dans l'eau excédant 1 ppm, mais une adaptation du poisson à cet effet pour des concentrations inférieures (BOUQUEGNEAU, 1972)- se vérifient chez les trois téléostéens étudiés.

C. CONCLUSIONS.

Les résultats de ce travail, bien que très fragmentaires,

montrent une fois de plus la variabilité importante des effets du mercure selon les espèces envisagées et par là même l'intérêt de poursuivre les expériences réalisées. Ils suggèrent également l'intérêt d'une étude approfondie des mécanismes de rejet du mercure chez les trois espèces de poissons envisagées.

Poissons témoins				
	Anguille	Plie	Limande	Cottus
Branchies	0.5	0.9	0.5	0.7
Rein	0.5	0.2	0.2	0.8
Rate	0.2	0.3	0.6	0.5
Peau	0.2	0.2	0.2	0.5
Muscles	0.3	0.2	0.4	0.9
Foie	0.4	0.4	0.2	0.5
T.D.	0.2	0.1	0.1	0.4
<u>Caractères ioniques des branchies :</u>				
Teneur en eau :		81.1 %	81.8 %	82.8 %
μEq Na/g PF :		115.9	113.7	110.5
μEq K /g PF :		77.6	86.8	73.0
μEq Na/g PS :		607.6	626.9	639.1
μEq K /g PS :		412.4	475.1	422.9

TABLEAU 5 : Concentration en mercure (exprimée en ppm) dans quelques organes de quatre téléostéens marins et concentrations en Na, en K et en eau dans leurs branchies.

	POISSONS INTOXIQUES PAR 0.1 PPM DE Hg (HgCl ₂) DANS L'EAU PENDANT 30 HEURES			
	ANGUILLE	PLIE	LIMANDE	COTTUS
Branchies	5.8	-	15.1	17.5
Rein	0.7	-	12.2	4.1
Rate	2.2	-	15.8	4.3
Peau	0.7	-	-	3.6
Muscles	0.3	-	1.2	2.0
Foie	0.4	-	5.6	6.1
T.D.	0.4	-	2.1	0.9
<u>Caractères ioniques de la branchie :</u>				
Teneur en eau :	-	-	81.1 %	83.0 %
μEq Na/g PF :	-	-	103.3	106.1
μEq K /g PF :	-	-	81.7	79.7
μEq Na/g PS :	-	-	549.9	625.8
μEq K /g PS :	-	-	434.1	468.0

TABLEAU 6 : Concentration en mercure (exprimée en ppm) dans quelques organes de trois téléostéens marins intoxiqués par du mercure et concentrations en Na, en K et en eau dans leurs branchies.

	POISSONS INTOXIQUES PAR 0.1 PPM DE Hg (HgCl ₂) DANS L'EAU PENDANT 4 JOURS.			
	ANGUILLE	PLIE	LIMANDE	COTTUS
Branchies	21.1	-	21.4	25.7
Rein	5.4	-	38.6	13.3
Rate	13.9	-	38.6	12.0
Peau	4.3	-	-	3.4
Muscles	1.8	-	2.1	2.5
Foie	4.1	-	11.6	7.9
T.D.	2.1	-	4.7	2.1
<u>Caractères ioniques de la branchie :</u>				
Teneur en eau :	-	-	-	82.1
μEq Na/g PF :	-	-	-	123.0
μEq K /g PF :	-	-	-	73.9
μEq Na/g PS :	-	-	-	686.9
μEq K /g PS :	-	-	-	414.3

TABLEAU 7 : Concentration en mercure (exprimée en ppm) dans quelques organes de trois téléostéens marins intoxiqués par du mercure et concentrations en Na, en K et en eau dans leurs branchies.

	POISSONS INTOXIQUES PAR 0.1 PPM DE Hg (HgCl ₂) DANS L'EAU PENDANT 8 JOURS			
	ANGUILLE	PLIE	LIMANDE	COTTUS
Branchie	40.4	35.0	40.1	-
Rein	18.9	39.5	63.9	-
Rate	27.1	22.2	47.7	-
Peau	6.7	3.2	-	-
Muscles	2.4	1.1	2.1	-
Foie	16.3	16.6	16.3	-
T.D.	3.4	4.8	11.1	-
<u>Caractères ioniques de la branchie :</u>				
Teneur en eau :		81.8 %	83.2 %	-
μEq Na/g PF :		102.8	113.0	-
μEq K /g PF :		84.1	86.4	-
μEq Na/g PS :		563.8	637.6	-
μEq K /g PS :		461.5	487.8	-

TABLEAU 8 : Concentration en mercure (exprimée en ppm) dans quelques organes de trois téléostéens marins intoxiqués par du mercure et concentrations en Na, en K et en eau dans leurs branchies.

	POISSONS INTOXIQUES PAR 0.1 PPM DE Hg (HgCl ₂) DANS L'EAU		
	ANGUILLE	COTTUS	COTTUS
			PENDANT 24 JOURS
Branchies	67.8	42.6	52.0
Rein	70.1	38.8	54.1
Rate	87.5	20.3	23.8
Peau	13.0	8.6	15.1
Muscles	5.4	5.1	6.6
Foie	39.6	20.7	46.3
T.D.	8.9	2.3	5.3
<u>Caractères ioniques des branchies :</u>			
Teneur en eau :		82.3 %	83.2 %
μEq Na/g PF :		119.4	119.9
μEq K /g PF :		73.4	77.4
μEq Na/g PS :		675.5	722.3
μEq K /g PS :		413.8	465.0

TABLEAU 9 : Concentration en Hg (exprimée en ppm) dans quelques organes de deux téléostéens marins intoxiqués par du mercure et concentrations en Na, en K et en eau dans leurs branchies.

COTTUS TEMOINS (cf. TABLEAU 5)	COTTUS INTOXIQUES PAR 10 PPM Hg DANS L'EAU	
	PENDANT 2 HEURES	PENDANT 5 HEURES
82.8 % d'eau	83.9 % d'eau	82.5 % d'eau
110.5 μ Eq Na/g PF	159.7 μ Eq Na/g PF	193.2 μ Eq Na/g PF
73.0 μ Eq K /g PF	68.2 μ Eq K /g PF	71.7 μ Eq K /g PF
639.1 μ Eq Na/g PS	996.1 μ Eq Na/g PS	1106.6 μ Eq Na/g PS
422.9 μ Eq K /g PS	424.9 μ Eq K /g PS	409.5 μ Eq K/g PS

TABLEAU 10 : Variation des concentrations en Na, en K et en eau des branchies de Cottus placés dans de l'eau de mer contenant 10 ppm de mercure (sous forme de HgCl_2).

3ème PARTIE : ESSAI D'INTERPRETATION DES EFFETS LETHAUX ET SUBLETHAUX DE HgCl₂ et CH₃HgCl CHEZ L'ANGUILLE.

Nous avons montré (BOUQUEGNEAU, 1971, 1972) que le mercure, lorsqu'il se trouve dans l'eau en concentration létale, provoque une rupture de la balance ionique de l'anguille. Nous avons postulé au cours de ces travaux que c'est ce déséquilibre osmotique qui est à l'origine de la mort des poissons. Or, on sait que la concentration en Na dans l'organisme des téléostéens marins est contrôlée par des systèmes enzymatiques appelés Na⁺K⁺ATPases situés dans les branchies et directement impliqués dans le transport actif de cet ion. L'énergie nécessaire au système serait ainsi fournie par l'hydrolyse de l'ATP. Nous avons mis en évidence d'une manière indiscutable l'effet inhibiteur de HgCl₂ et de CH₃HgCl sur cet enzyme "in vitro" (BOUQUEGNEAU, 1971). Si les résultats obtenus "in vivo" vont dans le même sens, il ne nous est cependant pas permis de rejeter à priori l'hypothèse selon laquelle l'effet observé sur le transport de sodium ne serait en réalité qu'un effet secondaire dû à une inhibition de la respiration (donc de la source principale de fourniture d'ATP) chez l'anguille et nous avons tenté d'aborder cet aspect du problème au cours de notre travail.

D'autre part, nous avons entrepris une observation plus détaillée de l'effet létal du mercure (sous forme de HgCl₂). Cette étude a été réalisée par trois approches différentes :

- 1° Une étude des variations ioniques de la branchie lorsque c'est l'animal entier qui est intoxiqué ;
- 2° une étude des variations ioniques dans des branchies isolées d'anguilles témoins et directement incubées dans de l'eau de mer contenant 10 ppm de mercure;
- 3° une étude des variations ioniques dans des branchies isolées d'anguilles témoins, chargées de mercure au moyen d'une préincubation dans une solution physiologique et ensuite incubées dans de l'eau de mer.

Quelques-uns des résultats ont également été comparés à ceux obtenus lorsque le CH₃HgCl est utilisé comme polluant dans de l'eau de mer.

Enfin, nous avons, au cours de cette troisième partie de notre travail, discuté les possibilités de mécanismes d'adaptation de l'anguille aux doses subléthales de mercure.

A. ETUDE DE L'EFFET LETHAL.

A₁. Effet du mercure sur la respiration des branchies isolées d'anguilles.

Des branchies isolées d'anguilles témoins ont été placées pendant une demi-heure dans des bouteilles de Winkler d'environ 100 ml et remplies d'eau de mer saturée à 85 % en O₂. La diminution de la concentration en oxygène a été mesurée dans les bouteilles après une demi-heure d'incubation :

- 1° dans de l'eau de mer naturelle ;
- 2° dans de l'eau de mer contenant 10 ppm de Hg sous forme de HgCl₂ ;
- 3° dans de l'eau de mer contenant 10 ppm de Hg sous forme de CH₃HgCl.

La concentration en O₂ est dosée par la méthode de Winkler. Ce type d'expérience ne nous donne pas à proprement parler une mesure de la "consommation d'oxygène", mais plus exactement une mesure de la demande biologique en oxygène de l'organe.

Les résultats obtenus sont repris dans le tableau 11.

On constate que la demande biologique en O₂ des branchies, augmente légèrement sous l'action du mercure. La différence obtenue n'est cependant pas significative. Cet effet étant assez paradoxal et les paramètres contrôlant l'expérience étant assez nombreux, nous avons examiné nos résultats plus en détail.

	g d'O ₂ /g. de P.frais/30' ± ES	n	σ	Valeurs de P (test de Student)
EM naturelle	102.6 ± 9.5	7	25.3	$\left[\begin{array}{l} \overline{0.3-0.2} \\ \overline{0.9-0.8} \end{array} \right] 0.3-0.2$
EM + HgCl ₂ (10 ppm Hg)	119.7 ± 8.6	4	17.2	
EM + CH ₃ HgCl (10 ppm ³ Hg)	123.2 ± 14.5	4	29.0	

TABLEAU 11 : Consommation d'O₂ par des corbeilles branchiales isolées d'anguilles dans de l'eau de mer polluée (Détails des conditions expérimentales : voir texte).

Tous les flacons à BOD n'avaient pas la même capacité (celle-ci variait de 100 à 108 ml). Cependant, cette variation dont il est d'ailleurs tenu compte lors du calcul de la demande en oxygène des branchies est très faible en regard de la variation du poids des corbeilles branchiales utilisées. C'est la raison pour laquelle nous avons examiné la variation de la consommation d'oxygène en fonction du traitement et du poids de l'organe utilisé (voir figure 15).

De cette figure, il ressort que la dispersion des points correspondant aux individus témoins est relativement importante. En particulier, les deux points de coordonnées (1;65) et (1.3;100) sont particulièrement bas et s'ils constituaient des valeurs anormales, la droite remonterait sensiblement et on ne pourrait vraisemblablement plus voir de différence entre les témoins et les intoxiqués.

Quoiqu'il en soit, le nombre restreint d'échantillonnage ne nous permet pas de conclure que HgCl_2 et CH_3HgCl (10 ppm) induisent une augmentation de la consommation d' O_2 . On peut cependant affirmer que ces deux polluants ne diminuent pas la demande en O_2 des corbeilles branchiales isolées et placées pendant 1/2 heure dans de l'eau de mer naturelle.

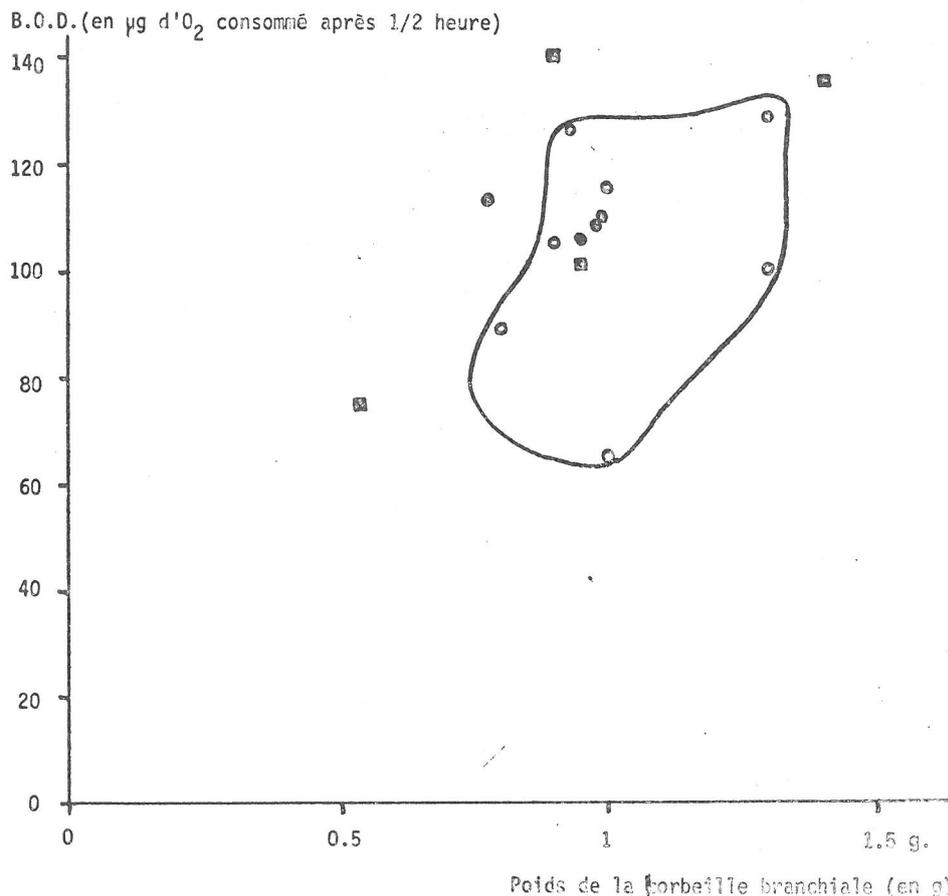


FIGURE 15 : Relation entre le poids des corbeilles branchiales et leur demande biologique en oxygène.

A₂. Variations ioniques et variation de la teneur en eau dans les branchies d'anguilles intoxiquées par des doses léthales de mercure.

Les résultats obtenus sont consignés dans la figure 16. Il ressort de ces données que les effets de HgCl_2 et de CH_3HgCl sont sensiblement différents. En effet, on constate ce qui suit :

1° Dans le cas de HgCl_2 , il se produit :

- une diminution faible et continue de la teneur en eau ;
- pas de variation significative de la concentration en K. (En fait, une très faible diminution de la teneur totale en K qui paraît liée à la perte d'eau, puisqu'il n'y a pas de variation lorsqu'on exprime les résultats en $\mu\text{EqK/g.PF}$;
- une augmentation continue de la concentration en Na.

2° Dans le cas de CH_3HgCl , par contre, les variations semblent se dérouler en 2 phases bien distinctes :

a. Pendant la première heure d'intoxication :

- une faible diminution de la teneur en eau ;
- une diminution de la teneur en K ;
- une faible augmentation de la teneur en Na.

b. Pendant la deuxième heure d'intoxication :

- une diminution très importante de la teneur en eau ;
- une diminution brusque de la teneur en K liée à la perte d'eau (la diminution reste lente lorsque la concentration en K est exprimée en $\mu\text{EqK/g.PF}$) ;
- une augmentation très importante de la teneur en Na.

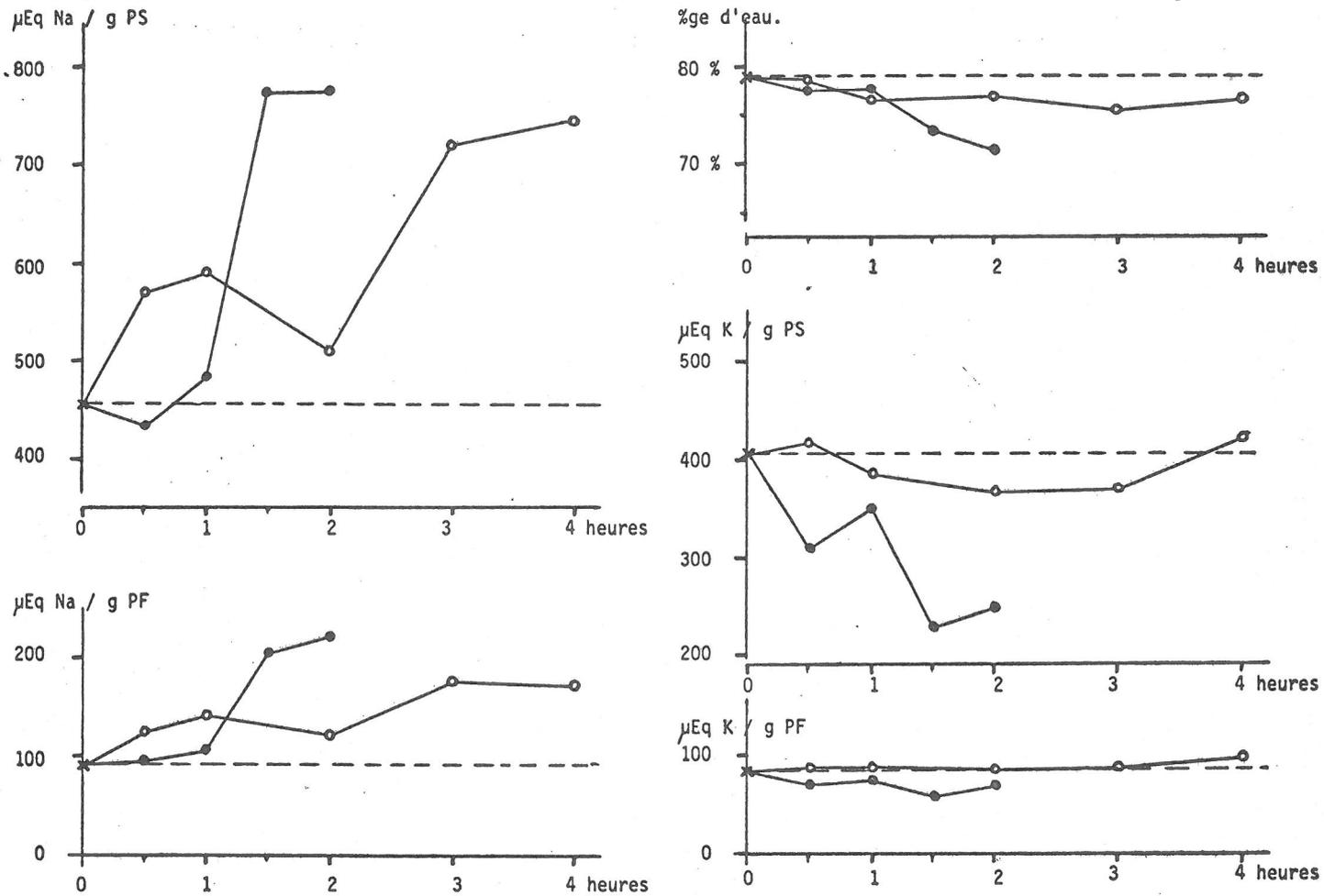


FIGURE 16 : Variation des concentrations en Na, en K et en eau dans les branchies d'anguilles intoxiquées dans de l'eau de mer contenant 10 ppm de mercure (o : sous forme de HgCl_2 : ● : sous forme de CH_3HgCl)
En abscisse : durée de l'intoxication (en heures).

A₃. Variations ioniques et variations des teneurs en eau dans des branchies isolées d'anguilles témoins incubées dans de l'eau de mer contenant du mercure.

Lorsqu'on intoxique des branchies isolées au lieu de l'animal entier, on doit s'attendre à des effets plus rapides et plus marqués. En effet, l'accumulation du mercure doit être plus rapide étant donné que, dans l'organe isolé, le compartiment occupé par le sang est beaucoup plus petit que dans l'anguille entière où ce compartiment représente en fait la totalité du sang de l'organisme. Chez l'animal in toto, le passage du mercure du tissu branchial dans le compartiment sang sera donc bien plus important.

Enfin, il faut aussi noter le fait que les branchies non intoxiquées et isolées sont le siège de variations osmotiques importantes du simple fait de leur séparation du reste de l'organisme (il n'y a plus d'apport d'eau provenant de l'intestin, etc...) alors qu'in vivo, la pression osmotique est constante.

Les résultats de la figure 17 concordent avec ceux du paragraphe A₂ et avec les considérations que nous venons d'énoncer : les effets de HgCl₂ et de CH₃HgCl sont plus rapides et plus importants que chez l'animal entier (On notera la différence d'échelle de temps entre les figures 16 et 17).

Dans le cas d'intoxication par 10 ppm de HgCl₂, on observe une diminution faible de la teneur en eau, pas de différence au niveau du potassium et une augmentation de la teneur en sodium.

Dans le cas d'intoxication par 10 ppm de CH₃HgCl, les effets sur le flux d'eau et de Na sont identiques mais de plus grande amplitude. Au niveau du potassium, on observe une nette diminution de la teneur totale de l'organe, mais cette diminution est uniquement liée à la perte d'eau, puisqu'il n'y a en fait pas de variation en K si on exprime les résultats en $\mu\text{EqK/g.PF}$.

Les expériences de la figure 17 avaient également pour objet la validation des résultats obtenus lors des mesures de demande biologique en oxygène. En effet, si nous avons montré qu'il n'y avait pas d'inhibition de la BOD des branchies isolées intoxiquées après 1/2 heure d'intoxication, il restait à montrer que dans le même délai et dans les mêmes conditions, il y avait déjà un effet marqué du mercure, ce qui est effectivement le cas,

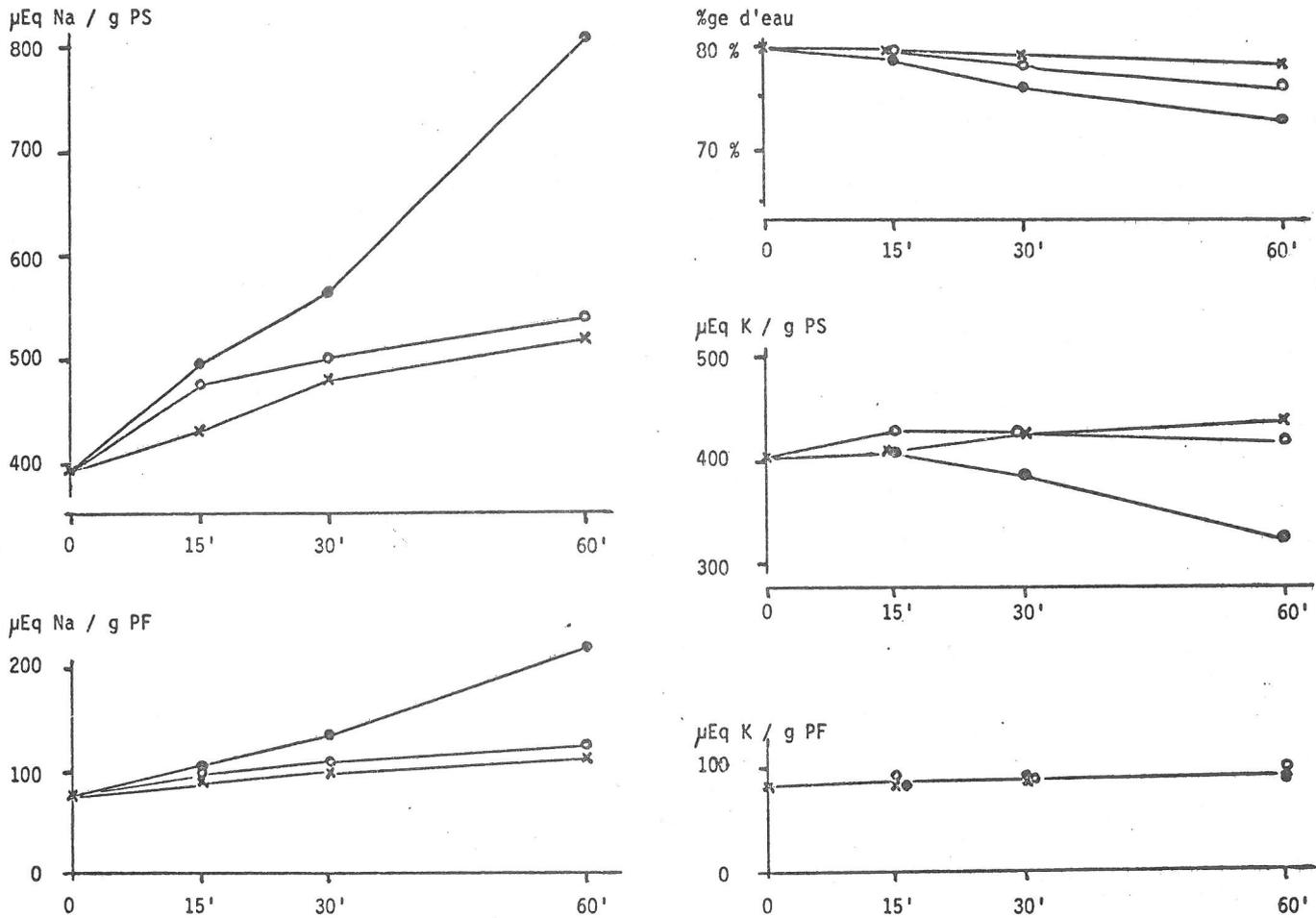


FIGURE 17 : Variation des concentrations en Na, en K et en eau dans des branchies isolées d'anguilles témoins lors d'une incubation : x dans de l'eau de mer naturelle, o : dans de l'eau de mer naturelle contenant 10 ppm de Hg (HgCl₂), ● : dans de l'eau de mer naturelle contenant 10 ppm de Hg (CH₃HgCl).
En abscisse : durée de l'incubation en minutes.

comme le montrent les résultats de la figure 17.

Finalement, en vue de clarifier quelque peu les mécanismes d'échanges ioniques et l'effet de HgCl_2 , nous avons effectué une autre série d'expériences sur des branchies isolées d'anguilles témoins.

Dans l'espoir de mettre mieux en évidence l'effet de 10 ppm de mercure sous forme de HgCl_2 dans l'eau de mer, nous avons préalablement chargé les branchies dans une solution physiologique contenant 10 ppm de Hg (HgCl_2). La composition du liquide physiologique est la suivante :

NaCl	170 mM	
KCl	5 mM	
CaCl ₂	2.6 mM	
MgSO ₄	4.1 mM	
Tris-HCl	10 mM	pH de la solution : 7.6

Cette solution a l'avantage d'être en équilibre osmotique avec la branchie. Il ne s'ensuit donc pas de variations sensibles après une heure d'incubation, et ce, que la solution physiologique soit chargée ou non en Hg (figure 19). Par contre, l'accumulation de mercure se fait de manière importante comme le montrent les résultats de la figure 18.

Si on examine la figure 19, on constate que l'entrée de Na dans la branchie est très sensible à l'oxygénation et est d'autant plus grande que l'eau de mer est moins oxygénée. D'autre part, l'entrée du sodium est encore plus importante lorsque l'eau de mer contient 10 ppm de Hg que lorsque l'incubation est réalisée en anoxie (dans de l'eau de mer ayant subi un barbotage d' N_2 pendant quelques heures précédant l'expérience).

Les très légères variations de K peuvent être directement corrélées aux variations de teneur en eau sauf lorsque l'incubation a lieu en présence d'oxygène pur où on constate une légère augmentation de la teneur en K.

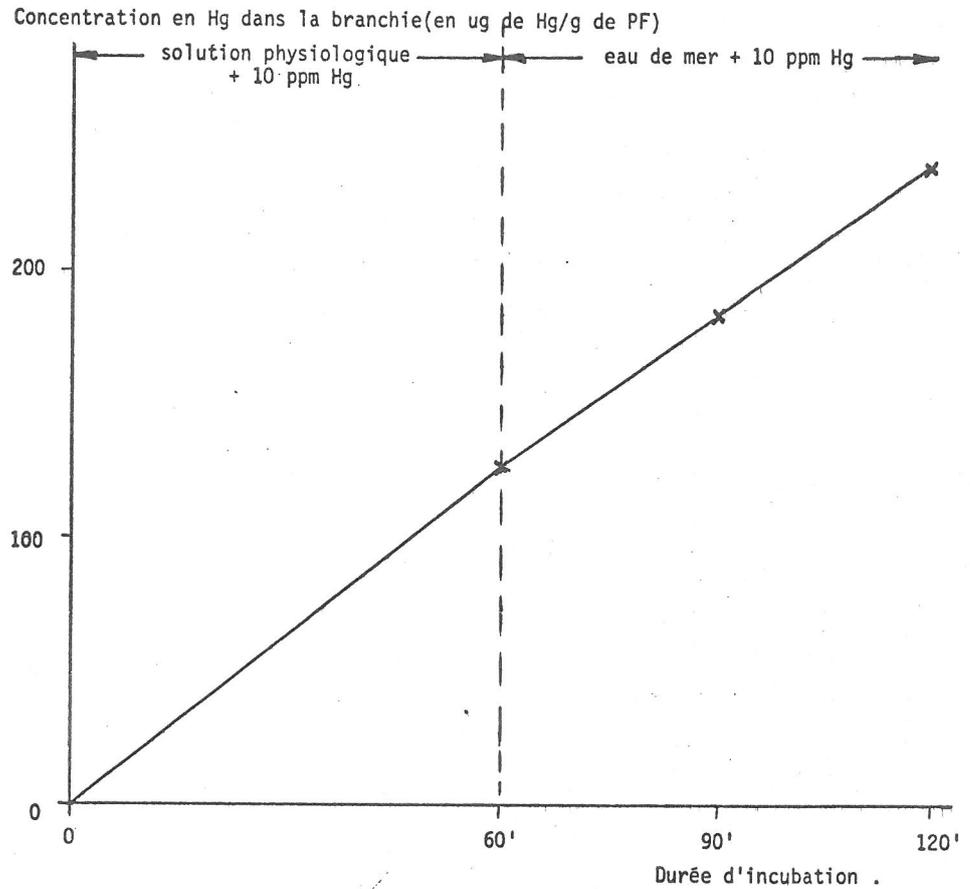


FIGURE 18 : Accumulation du mercure chez des branchies isolées d'anguilles témoins incubées pendant 1 heure dans une solution physiologique puis pendant 1 heure dans de l'eau de mer naturelle, les deux liquides d'incubation contenant chacun 10 ppm de Hg sous forme de $HgCl_2$

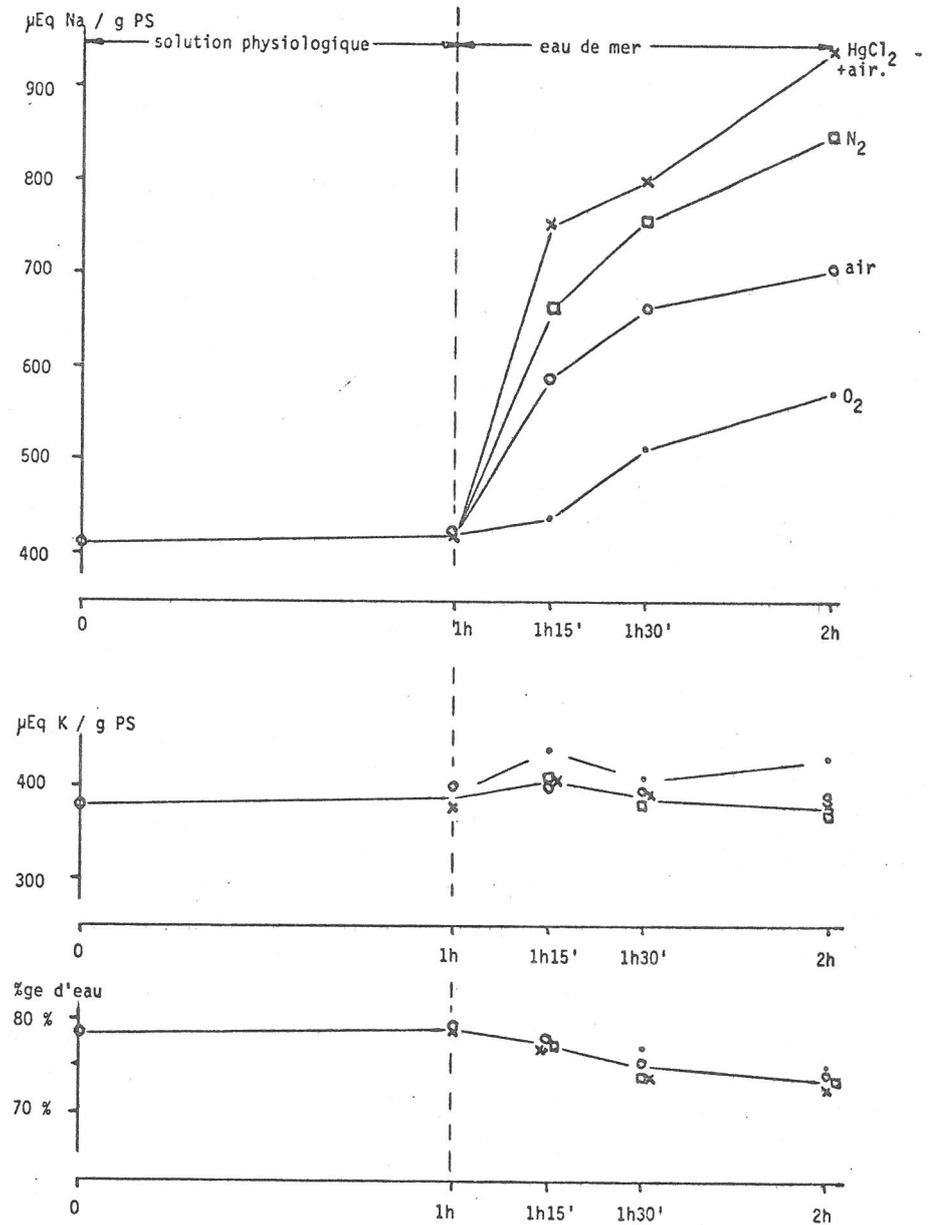


FIGURE 19 : Variation des teneurs en Na, en K et en H_2O dans des branchies isolées d'anguilles témoins incubées pendant 1 heure dans une solution physiologique puis pendant 1 heure dans de l'eau de mer.

o : avec barbotage d'air ■ : avec barbotage d' N_2
 • : avec barbotage d' O_2 x : avec barbotage d'air et addition de 10 ppm de Hg

Un tel effet du méthylmercure peut donc être envisagé au niveau des branchies d'anguille et, lors de l'éventuelle nécrose tissulaire, on devrait observer les effets que nous venons de décrire au niveau des teneurs en Na, en K et en eau. Dans le cas d'intoxications par HgCl_2 , nous avons observé qu'il n'y avait pas de destruction du tissu branchial après une heure d'intoxication (10 ppm de Hg dans l'eau). Nous n'avons cependant pas encore d'observations à ce sujet en ce qui concerne les intoxications par 10 ppm de mercure sous forme de CH_3HgCl .

B. CONSIDERATIONS SUR L'ADAPTATION DE L'ANGUILLE AUX EFFETS SUBLETHAUX *

L'adaptation des anguilles à des doses subléthales de mercure dans l'eau de mer est un phénomène qui mérite de retenir notre attention. Au cours de nos travaux antérieurs (BOUQUEGNEAU, 1972), nous avons déjà suggéré une série d'hypothèses susceptibles d'expliquer nos observations. Qu'advient-il de ces propositions à la lumière de résultats plus récents et de nouvelles données bibliographiques ?

Rappelons brièvement quelles étaient nos hypothèses de travail pour tenter d'expliquer cette adaptation :

- la fonction physiologique perturbée pourrait être prise en charge par un autre organe (le rein ?) ;
- les cellules à chlorures de la branchie, éventuellement détruites, pourraient se régénérer ;
- une redistribution du mercure dans l'organe telle qu'elle n'influence plus le transport de Na dans la branchie ("Shift" du mercure dans l'organe) ;
- une métabolisation du mercure sous une forme moins nocive pour les cellules.

Il faudrait également ajouter à ces hypothèses l'effet antagoniste possible de certaines substances à l'effet du mercure. La discussion de cette hypothèse constituera la première partie de ce chapitre.

* N.B. : seule l'adaptation de l'anguille aux effets de HgCl_2 sera envisagée ici.

1° Effet antagoniste de diverses substances.

A ce propos, notre attention a été tout particulièrement attirée par les travaux de GANTHER et al (1972) qui rapportent les observations suivantes : des espadons nourris avec du méthylmercure au moyen de thon pollué survivent beaucoup mieux que s'ils sont nourris avec la même concentration en méthylmercure contenue dans des graines de soya. Cela provient du fait que le thon contient également des quantités importantes de Sélénium et a tendance à accumuler d'autant plus de Sélénium qu'il y a de mercure dans le milieu pollué. Une concentration en Sélénium dans la nourriture comparable à celle qu'on trouve dans le thon diminue par ailleurs la toxicité du méthylmercure chez le rat. On constate ainsi un effet antagoniste du Sélénium à celui du mercure lorsque les deux métaux peuvent être accumulés en même temps.

Dans nos conditions expérimentales, une telle absorption de Sélénium (de l'ordre de plusieurs ppm) est peu vraisemblable. Par contre, le calcium qui se trouve en concentration importante dans l'eau de mer (environ 15 mM) est bien connu pour ses effets antagonistes de ceux du mercure (voir, par exemple MARCQ, 1973)(Technical Report-1973/PHYSIOL.-SYNTHESE 01). Nous avons donc essayé de voir si les concentrations en Ca dans l'animal n'étaient pas modifiées chez les anguilles adaptées à l'eau de mer polluée. Le dosage de Ca a été effectué par absorption atomique dans le plasma d'anguilles témoins et dans celui d'anguilles intoxiquées pendant 4 jours dans de l'eau de mer contenant 0.1 ppm de Hg. Nous avons trouvé chez les deux lots d'individus des concentrations en Ca identiques et de l'ordre de 2.6 mM/litre de plasma. L'anguille ne semble donc pas modifier la teneur en Ca de son sang en même temps qu'elle accumule le mercure.

2° Prise en charge de la régulation de Na par le rein.

- A des doses léthales (10 ppm de Hg dans l'eau pendant 5 heures - BOUQUEGNEAU, 1972), on constate une accumulation très importante de mercure dans la branchie alors qu'il n'y en a que 2.5 ppm dans le rein. Dans ces conditions, il y a rupture de la balance ionique de l'animal (le Na entre ; le rein, bien que peu pollué n'effectue pas de régulation) ;

- a des doses subléthales (0.1 ppm de Hg dans l'eau pendant 16 jours, par exemple ; voir Figures 4 et 5), l'accumulation de Hg dans le rein est de l'ordre

de 70 ppm et est environ égale à l'accumulation observée au niveau des branchies. Or, à ce moment, l'anguille est parfaitement adaptée (BOUQUEGNEAU; 1972) et la balance ionique est rétablie.

Ainsi, le rein aurait repris à sa charge exclusive le rôle d'éliminateur du sodium alors qu'il est extrêmement pollué par le mercure tandis qu'il ne l'a pas fait lors d'intoxications léthales alors qu'il en contenait moins.

3° Régénération des cellules à chlorures.

Nous n'avons pas de données nouvelles en ce qui concerne cette hypothèse. Rappelons simplement que nous n'avons pas constaté d'altérations sensibles de l'épithélium branchial d'anguilles intoxiquées à des doses léthales par du HgCl_2 , sur des préparations histologiques.

Nous n'avons toutefois pas encore pu effectuer de comptages de cellules à chlorures.

4° Métabolisation du mercure dans la branchie.

Les résultats que nous avons obtenus en comparant l'accumulation au niveau des organes et principalement au niveau du sang chez des anguilles intoxiquées par un sel inorganique et par un sel organique de mercure suggèrent, comme nous en avons discuté dans la première partie de ce rapport, que les composés gardent, tout au moins dans une large proportion, leur individualité lorsqu'ils ont pénétré les organes périphériques, et notamment la branchie. Ces observations rendent peu probable l'éventuelle métabolisation du Hg^{++} d'autant plus que, dans la plupart des cas où cet ion est transformé, il est méthylé, donc transformé en un composé plus toxique encore pour la branchie.

5° Redistribution du mercure dans l'organe.

Cette cinquième hypothèse est à notre avis de loin la plus vraisemblable. En effet, le mercure est bien connu pour son affinité pour les groupements sulfhydriles. C'est d'ailleurs en se basant sur cette propriété que l'on explique généralement l'effet inhibiteur du mercure sur l'activité de certaines enzymes. Si les groupements $-\text{SH}$ d'une enzyme considérée font partie de ses sites actifs ou allostériques, on doit donc s'attendre à une inhibition de son activité en présence de mercure. C'est ce que

nous avons observé (BOUQUEGNEAU, 1971) au niveau de l'activité Na^+K^+ ATPasique des branchies d'anguilles, ce système enzymatique ayant d'ailleurs des groupes -SH dans ses sites actifs, comme l'a montré SKOU (1963).

D'autre part, si on ajoute à l'homogénat contenant les systèmes ATPasiques une substance qui possède des groupes -SH, on constate une diminution très nette de l'inhibition de l'activité enzymatique. C'est ce que nous avons observé en utilisant de la cystéine 10^{-3} M dans une expérience d'inhibition de l'activité Na^+K^+ ATPasique par du HgCl_2 10^{-5} M. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau 11. Ils montrent clairement la levée de l'inhibition dans le cas où la cystéine est ajoutée au milieu d'incubation.

Il nous semble donc raisonnable d'imaginer que, si les Na^+K^+ ATPases sont effectivement impliquées dans la régulation du Na, l'adaptation de l'anguille pourrait s'expliquer par un "shift" de mercure des sites actifs du système enzymatique sur d'autres sites non fonctionnels de la branchie. Comme les Na^+K^+ ATPases sont situées au niveau des membranes cellulaires, on pourrait alors avoir le schéma de la figure 20.

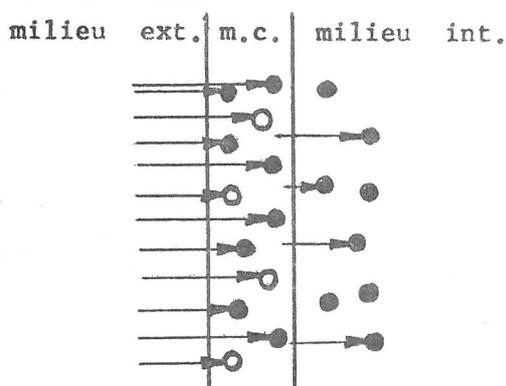
Conditions expérimentales (cf. BOUQUEGNEAU, 1971)	Pourcentage de l'activité Na^+K^+ ATPasique de la branchie par rapport à l'activité ATPasique totale.
Conditions optimales	31 %
Conditions optimales + HgCl_2 10^{-5} M	10 %
Conditions optimales + HgCl_2 10^{-5} M + cystéine 10^{-3} M	29 %
Conditions optimales + cystéine 10^{-3} M	32 %

TABEAU 11 : Réversibilité de l'effet de HgCl_2 sur l'activité Na^+K^+ ATPasique des branchies d'anguilles par l'addition de cystéine à l'homogénat.
Dosage de l'activité ATPasique : voir BOUQUEGNEAU, 1971.

Dans le cas de l'effet létal, l'entrée massive de mercure provoquerait sa fixation sur tous les groupements -SH de la membrane. L'inhibition des Na^+K^+ ATPases serait alors irréversible et létale.

Dans le cas de l'effet subléthal, l'accumulation étant nettement moins rapide, seule une partie des groupes -SH serait occupée par du mercure. On observerait donc une inhibition partielle de l'activité Na^+K^+ ATPase et par conséquent une faible augmentation de la teneur en Na des branchies. C'est ce que l'on observe effectivement. Dans un deuxième temps, une augmentation de la concentration membranaire de substances à sites -SH non fonctionnels prendrait en charge le mercure et le transporterait dans le milieu intracellulaire.

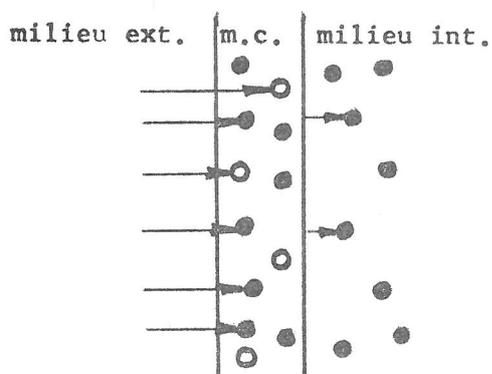
EFFET LETHAL



Légende:

- m.c. = membrane cellulaire
- = grpts -SH des Na^+K^+ -ATPases
- = autres grpts -SH (acides aminés libres, peptides, etc...)
- = passage du Hg et fixation à l'endroit indiqué par la flèche.

EFFET SUBLETHAL



ADAPTATION

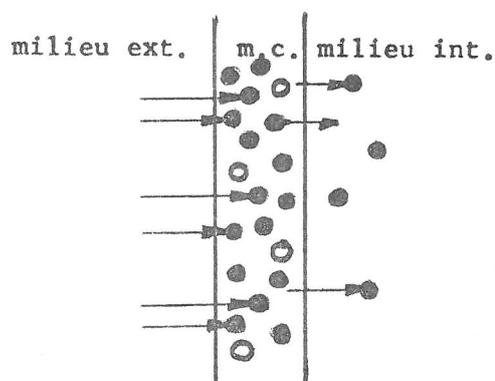


FIGURE 20 : Schéma hypothétique d'interprétation des effets létaux et sublétaux du mercure au niveau de sa fixation sur les groupes -SH (voir explications dans le texte).

Les Na^+K^+ ATPases, réactivées, rétabliraient alors la balance ionique de l'animal.

Le schéma que nous proposons est évidemment de nature tout à fait hypothétique. Il a en tous cas l'intérêt de rendre compte d'une manière satisfaisante des variations en Na constatées dans les branchies et dans le plasma lors d'intoxications à des doses léthales et subléthales des anguilles. Il est également susceptible d'expliquer les résultats rapportés dans la figure 1 et figurés par les points ■. On peut y constater que des anguilles préalablement adaptées à des doses subléthales de mercure résistent mieux à des doses léthales que des anguilles témoins dans les mêmes conditions. Selon notre schéma, les membranes cellulaires des branchies des individus adaptés seraient mieux pourvues en sites -SH (acides aminés libres, peptides, etc.) par conséquent les groupements thiols des Na^+K^+ ATPases sont beaucoup plus dilués relativement à l'ensemble des groupements sulfhydriles et par conséquent, l'effet léthal est moins rapide.

Dans le schéma de la figure 20, seul est considéré le passage du mercure sous forme de mercure fixé à des groupes -SH. D'autre part, nous basant sur des analyses de cystéine et de méthionine, nous postulons qu'il n'y a pas de variation de la concentration tissulaire totale en groupements thiols, ce qui nous a amené à en dessiner moins dans le milieu intracellulaire puisque nous en avons plus au niveau de la membrane cellulaire.

On peut également envisager, outre ce "shift" intracellulaire, un transport du mercure dans des régions privilégiées de la branchie. Une étude autohistoradiographique des branchies devrait pouvoir amener des arguments pour ou contre ces deux hypothèses de même qu'une analyse plus détaillée de la répartition des groupes -SH. Enfin, il n'est pas exclu que la formation de dérivés mercuriques des Na^+K^+ ATPases n'active le turn-over lié à la synthèse de ces protéines.

Remerciements : Nous remercions tout particulièrement Monsieur le Professeur A. DISTECHE sans lequel ce travail n'aurait pu être réalisé. Nous remercions également Monsieur le Docteur E. SCHOFFENIELS, Professeur ordinaire, le Docteur C. DAEMERS, Chef de Travaux et Monsieur A. PEQUEUX, Chercheur FNRS pour l'intérêt qu'ils accordent à mes recherches. Nous considérons les discussions que nous avons avec ces quatre personnes comme une réelle source d'enrichissement.

BIBLIOGRAPHIE.

- BILLEN, G et WOLLAST, R. (1972), dans Modèle mathématique. Rapport de synthèse I, pp.195-232. Journées d'Etude des 27+28 novembre 1972.Prog. Nat. sur l'Environnement. Pollution des Eaux, Projet Sambre.
- BOUQUEGNEAU, J.M. (1971). Technical Report - Biol.-Labo.01
- BOUQUEGNEAU, J.M. (1972). Technical Report - Physiol.Synthèse 01.
- BOUQUEGNEAU, J.M. (1973). Bull.Soc.Roy.Sci.Liège - Sous presse.
- CLARKSON, T.W. (1972). CRC Critical Reviews in Toxicology, 203-234.
- CUMONT, G., VIALLEX, G., LELIEVRE, H. et BOBENRIETH, P. (1972). Rev.Intern. Oceanogr.Méd., 28, 95-127.
- FRIBERG, L. et VOSTAL, J (Editors) : Mercury in the Environment, CRC Press (1972)
- GANTHER, H.E., GOUDIE, C., SUNDE, M.L., KOPECKY, M.J., WAGNER, P., SANG-HWAN OH et HOEKSTRA, W.G. (1972). Science, 175, 1122-1124.
- HANNERZ, L. (1968). Rep.Inst.Freshwater Res., Sweden,48, 120-175.
- JÄRVENPÄÄ, T., TILLANDER, M. et MIETTINEN, J.K. (1970). Working paper of the FAO Technical Conference on Marine Pollution. Rome, Italy, 9-18 december 1970 - FIR : MP/70/E-66.
- JENSEN, S. et JERNELOV, A. (1969). Nature, 223, 753-754.
- LINDAHL, P.E. et HELL, C.E.B. (1970) . Oikos, 21, 267-275.
- MARCQ, O. (1973). Technical Report - Physiol.Synth.01
- MASONI, A. et GARCIA-ROMEU, F. (1972). Z. Zellforsch, 133, 389-398.
- SKOU, J.C. (1963). Biochem.Biophys.Res.Comm., 10, 79.
- SPRAGUE, J.B. (1969). Water Research, 3, 793-821.
- TONOMURA, K. et KANZAKI, F. (1969). Biochim.Biophys.Acta, 184, 227-229.
- UI, J. (1971). Rev.Intern.Oceanogr.Med., 22-23, 79-128.