

Christine
Année N°3

VII a

11330

UNIVERSITE DE LIEGE

LABORATOIRE D'OCEANOGRAPHIE (UNITE D'ECOTOXICOLOGIE)

ACTIONS DE RECHERCHES CONCERTÉES EN OCEANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITE

1977

Directeur : Prof. A. DISTECHE

Collaborateurs scientifiques : Dr J.M. BOUQUEGNEAU

Dr F. FRANKENNE

Mme F. NOEL-LAMBOT

Collaborateurs techniques : Mr R. BIONDO

Mme G. JAMSIN

I. INTRODUCTION.

Le laboratoire d'écotoxicologie marine (service d'océanographie du Prof. A. DISTECHE - Université de Liège) s'intéresse essentiellement à l'étude des métaux lourds dans les écosystèmes marins, à savoir :

- 1° - l'étude des mécanismes d'accumulation et d'élimination de ces polluants dans les organismes marins suite à une intoxication, que celle-ci soit due à la présence de métal dans l'eau (intoxication directe), dans la nourriture (intoxication indirecte) ou les deux à la fois.
- 2° - l'étude d'une protéine particulière, la Métallothionéine, connue pour sa capacité de fixer les métaux lourds :
 - Quelle est sa structure et quelles sont ses propriétés ?
 - Quel est son rôle dans l'organisme ?
 - Quel est son comportement à la suite d'une intoxication de l'organisme par les métaux lourds ?
- 3° - l'étude des effets toxiques des métaux lourds chez les organismes marins.

II. ETUDE DES PROCESSUS D'ACCUMULATION DIRECTE ET PAR VOIE ALIMENTAIRE DES METAUX LOURDS CHEZ LES ORGANISMES AQUATIQUES.

II. 1. Comparaison de l'accumulation directe du Hg et du Cd chez l'anguille adaptée à l'eau de mer.

L'étude de l'intoxication directe par le Hg et par le Cd chez l'anguille dans les mêmes conditions expérimentales nous a permis de comparer leur toxicité, leur accumulation et leur répartition dans les divers organes (voir annexe n° 1).

Il ressort de cette comparaison que le mercure est beaucoup plus toxique que le cadmium, qu'il est accumulé beaucoup plus rapidement et ce, au niveau de tous les organes considérés.

II. 2. L'importance relative de l'accumulation directe et indirecte des métaux lourds chez les organismes marins.

Des études réalisées en laboratoire et l'observation des chaînes alimentaires aquatiques "in situ" tendent à montrer l'importance prépondérante de l'accumulation directe du mercure et la faible importance de son assimilation à partir de nourriture contaminée (voir annexe n° 2).

Deux chaînes alimentaires à deux maillons ont été étudiées dans notre laboratoire §§ (voir annexe n° 3) : *Dunaliella bioculata* - *Artemia salina* et *Tubifex tubifex* - *Lebistes reticulatus*.

Les techniques d'intoxication originales permettent à la fois de faire la part entre les deux types d'intoxication et de déterminer le taux d'assimilation des polluants étudiés. Ces taux d'assimilation sont extrêmement faibles en ce qui concerne le Cu, le Zn, le Cd et le Hg lorsque ce dernier est utilisé sous une forme inorganique. Par contre, environ 30 à 50 % du méthylmercure ingéré par voie alimentaire se fixe dans l'organisme intoxiqué. Ce type d'étude se poursuit très activement dans notre laboratoire afin de quantifier l'accumulation directe et indirecte, de déterminer l'influence de la matière en suspension sur l'accumulation directe, etc... L'étude de l'assimilation du mercure par un poisson marin (*Serranus cabrilla*) est également en cours.

II. 3. L'élimination des métaux lourds par les organismes aquatiques.

Un certain nombre d'expériences ont été réalisées en vue de déterminer les vitesses d'élimination du Hg ou du Cd chez des animaux préalablement intoxiqués en laboratoire ou in situ :

- 1° - chez des patelles soit capturées dans l'estuaire de la Severn (Angleterre) soit capturées dans la Baie de Calvi et contaminées par du cadmium en laboratoire.
- 2° - chez des guppies intoxiquées par du Hg⁺⁺ ou du CH₃ Hg⁺ en laboratoire.

Les résultats de ces expériences sont en cours d'analyse.

§§ Cette recherche est également subsidiée par la C.E.E. (contrat n° 178-77-I ENVB)

III. ETUDE DES METALLOTHIONEINES CHEZ LES ANIMAUX MARINS.

III. 1. Isolement et caractérisation des métallothionéines.

Les métallothionéines de foies d'anguilles (voir annexe n° 4) et de moules (voir annexe n° 5) ont été isolées et caractérisées. Un travail similaire est en cours au niveau de la patelle. Ces recherches vont nous permettre d'étudier l'affinité de cette protéine pour les différents métaux, de déterminer la teneur en métallothionéines d'animaux intoxiqués en laboratoire ou in situ et enfin d'étudier le devenir des métallothionéines après la mort de l'organisme.

L'apparition des métallothionéines et la fixation des métaux a été étudiée de manière très détaillée au niveau de divers organes d'anguilles intoxiquées en laboratoire (voir annexe n° 6).

Des travaux sont actuellement en cours pour étudier le rôle des métallothionéines lors de l'élimination du polluant, lorsque l'organisme est replacé dans un milieu non contaminé.

III. 2. Le rôle des métallothionéines dans l'organisme.

a. Etudes réalisées au niveau du foie d'anguilles non intoxiquées (voir annexe n° 7)

Les concentrations en Cu et en Zn du foie d'anguille étant très variables, nous avons étudié leur répartition dans la fraction hépatique soluble.

Les quantités de Cu et de Zn associées aux métallothionéines sont étroitement dépendantes des concentrations en Cu et en Zn de l'organe "in toto", alors que la teneur en métal des autres fractions protéiniques est peu affectée par ces variations. Il apparaît donc que les métallothionéines ont un rôle important dans le stockage du Zn et du Cu en excès dans l'organe.

Une étude similaire est en cours au niveau de la fixation du Cd sur les métallothionéines de patelles provenant de l'estuaire de la Severn.

b. L'importance des métallothionéines chez des invertébrés marins vivant dans une région polluée par des métaux lourds (Cd et Zn). Comparaison avec des animaux sains ou intoxiqués en laboratoire.

Nous avons comparé (voir annexe n° 8) la distribution du Cd, du Zn et du Cu chez trois espèces de mollusques (*Patella vulgata*, *Littorina littorea* et *Purpura lapillus*) vivant dans des régions non polluées ou très polluées du Sud-Ouest de l'Angleterre, ainsi que chez les mêmes espèces après une contamination par le cadmium en laboratoire.

Les résultats obtenus montrent que les métallothionéines, bien que généralement considérées comme agents protecteurs de l'organisme, peuvent être en fait responsables de fortes charges en métaux que l'on trouve chez certains organismes vivant en eau de mer polluée. D'autre part, les réponses différentes que l'on peut obtenir chez une même espèce selon les conditions d'intoxication montrent combien il est dangereux de choisir une seule espèce comme indicateur de pollution.

IV. ETUDE DES EFFETS TOXIQUES DU MERCURE CHEZ LES ANIMAUX MARINS.

L'étude de l'effet létal du mercure sur l'osmorégulation de l'anguille, entreprise au cours des recherches subsidiées par la C.I.P.S., a été terminée et a fait l'objet d'un rapport (voir annexe n° 9).

Une recherche similaire a été entreprise au niveau de l'effet du mercure chez un crabe (*Eriocheir sinensis*), mais en mettant cette fois l'accent sur l'influence de la salinité sur l'accumulation et sur la toxicité de ce polluant. Les premiers résultats obtenus montrent une influence extrêmement importante de la salinité, une diminution de celle-ci induisant une augmentation de l'absorption et de la toxicité du mercure.

ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n° 1

COMPARATIVE STUDY OF TOXICITY, UPTAKE AND
DISTRIBUTION OF CADMIUM AND MERCURY IN THE
SEA WATER ADAPTED EEL (*Anguilla anguilla*).

Comparative Study of Toxicity, Uptake and Distribution of Cadmium and Mercury in the Sea Water Adapted Eel *Anguilla anguilla*

F. Noël-Lambot and J. M. Bouquegneau
Laboratory of Oceanology—University of Liège,
22, quai Van Benenden—4020 Liège, Belgium

There is no evidence whether Cd and Hg are biologically essential but their toxicity for organisms is well known (FRIBERG et al. 1974 ; FRIBERG and VOSTAL. 1972). One of their main properties regarding biological effects is their ability to bind to organic substances, principally to sulfhydryl groups.

Data about Cd and Hg toxicity for fish are rather extensive (DOUDOROFF and KATZ. 1953 ; BOETIUS. 1960 ; BALL. 1967 ; EISLER. 1971 ; PICKERING and GAST. 1972). Some informations describing the distribution of these metals in tissues of experimentally intoxicated fishes are also available (BACKSTRÖM. 1967 ; MIETTINEN et al. 1972 ; BOUQUEGNEAU. 1973 ; EISLER. 1974 ; ROWE and MASSARO. 1974).

However no comparative study of the effects generated by Cd and Hg on the same species of fish has to our knowledge been reported. This is the aim of the present paper.

In our experiments, Cd and Hg are directly added to sea water. Indeed data seem to indicate that for both metals, uptake from water would be much more important than from food (HANNERZ. 1968 ; JERNELOV and LANDNER. 1969 ; BOUQUEGNEAU et al. 1976).

MATERIALS AND METHODS

Fresh water eels were adapted during at least eight days to unpolluted North Atlantic sea water. Fishes were then placed in polyethylene bags containing aerated sea water (5 l per animal) to which various doses of Cd or Hg were added as CdCl₂ and HgCl₂. Water was changed every day. Its temperature stayed always close to 18°C. Fishes were not fed during the experiments.

Tissue samples were analyzed for Cd by atomic absorption spectrophotometry (Perkin-Elmer 103) after mineralization in HNO₃ 65% (2.5 ml per g fresh tissue) and dilution. Hg was determined by flameless atomic absorption spectrometry (Coleman Mercury Analyser System MAS 50) after mineralization in H₂SO₄ 95% and H₂O₂ 30% (10 ml H₂SO₄ and 2 ml H₂O₂ per g fresh tissue).

RESULTS

1. Evaluation of the toxicity of Cd and Hg

Fig.1 presents mortality curves realized according to the classical method described more particularly by SPRAGUE (1969). Each curve was performed with about 10 fishes. It is clear that HgCl_2 is much more toxic than CdCl_2 . It appears that 1 ppm Hg and 50 ppm Cd are lethal concentrations for the eel. The concentrations of 0.1 ppm Hg and perhaps 30 ppm Cd can be considered sub-lethal. We could keep eels more than six months in sea water containing 13 ppm Cd. This latter concentration is thus certainly sublethal for the eel.

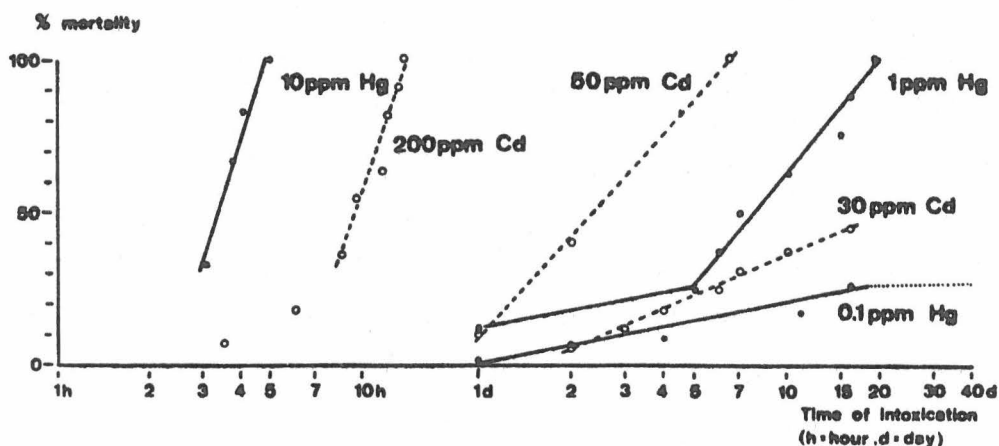


Fig.1 Mortality curves for sea water adapted eels exposed to different constant concentrations of CdCl_2 or HgCl_2 in natural sea water.

2. Uptake and tissue distribution of Cd and Hg at sublethal exposures

The distribution of Cd and Hg in the organs of eels after 60 days of exposure to 0.13 ppm Cd or after 32 days of exposure to 0.10 ppm Hg are compared in table 1. It presents mean concentrations expressed as $\mu\text{g/g}$ wet weight and obtained from at least 3 animals. From these metal concentrations in the different organs and from the weight fractions of these organs, the metal load (expressed in μg) of each organ can be calculated for a fish whose weight is reduced to 100 grams. The total body load is determined by summation of the load of each organ.

TABLE 1
Comparison between Cd and Hg distribution in intoxicated eels

Organs	0.13 ppm Cd 60 days		0.10 ppm Hg 32 days		Weight of organs, g	0.13 ppm Cd, 60 days		0.10 ppm Hg, 32 days	
	Cd conc. (ppm wet wt).	Hg conc. (ppm wet wt).	Cd load (µg)	% of total body load		Hg load(µg)	% of total body load		
Muscles	0.2	13.4	15.1	27.1	75.5	1011.7	66.1		
Skin	0.4	18.8	4.2	7.5	10.6	199.3	13.0		
Digestive tract	6.7	14.5	14.1	25.3	2.1	30.4	2.0		
Liver	4.8	48.5	5.8	10.4	1.2	58.2	3.8		
Kidneys	16.0	115.7	11.2	20.1	0.7	81.0	5.3		
Gill filaments	2.0	66.9	1.0	1.8	0.5	33.4	2.1		
Spleen	1.4	110.0	0.3	0.5	0.2	22.0	1.4		
Bile	0.4	18.0	< 0.1	0.1	0.1	1.8	0.1		
Other organs			4.0	7.2	9.1	95.0	6.2		
Total body	0.56	15.3	55.7	100.0	100.0	1532.8	100.0		
Concentration factor	4.3	153.3							

We use the concentration factor defined by the ratio :

$$\frac{\text{Concentration of metal in animal (ppm wet weight)}}{\text{Concentration of metal in water (ppm)}}$$

It appears immediately that both pollutants behave quite differently.

a) The accumulation of Hg is much more important than that of Cd. This is true for all the organs and consequently for the whole animal.

b) The two metals are distributed quite differently in the organs. Results expressed as Cd and Hg concentrations in the organs indicate that in both cases, the maximum concentrations are attained in the kidneys¹. Next come the digestive tract and the liver in the case of Cd, the spleen, the gills and the liver in the case of Hg.

Examination of results presented as metal load of the organs shows that Cd is principally contained in the viscera whereas Hg is principally contained in the muscles. Indeed, in the first case, the digestive tract, the kidneys and the liver, in spite of their very little weight fraction (4% of the total body weight) contain together 56% of the Cd body load. In the Hg intoxicated eels, these organs account for only 11% of the Hg body load, the muscles 66%.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Our results show that eels are much more susceptible to HgCl₂ exposure than to CdCl₂ exposure. This is also true for many other species (WALDICHUK. 1974). This fact could be simply explained by the great difference of the respective concentration factors and be related to a much lower permeability to Cd than to Hg at the level of their uptake pathways. Indeed gills, the principal absorption site for Hg (OLSON and al. 1973 ; BOUQUEGNEAU. 1975) seem to be much less permeable to Cd than to Hg.

The dissimilarity between the distribution of both metals in the eel organs is in agreement with the results of workers using either Hg or Cd on different fish species. The great difference observed by us between the accumulation of Cd and Hg by the eel muscles is also corroborated by the data on Cd and Hg concentrations found in fishes caught in various parts of the world. In contrast to the case of Hg, alarming Cd concentrations have never been reported in fish flesh even in very polluted areas. Concerning the low capacity of Cd accumulation by muscles, it must be

¹ Note that in the case of Cd intoxications carried out at higher concentrations (but below the lethal threshold), maximum Cd concentration is attained in the liver and not in the kidneys (NOËL-LAMBOT, unpublished results).

pointed out that an intoxication of 120 days in sea water containing as much as 13 ppm Cd raises the Cd concentration of the eel muscles only to 0.6 ppm (against 277 ppm in the liver and 113 ppm in the kidneys, NOËL-LAMBOT, to be published).

Owing to this very low Cd accumulation capacity of fish muscles, it is very improbable that sea pollution by Cd could ever lead to Cd levels in fish dangerous for man, in so far as the ingestion by fish of contaminated food does not induce a more important accumulation of Cd than the direct uptake described here, which seems to be the case from the data available (see introduction). Therefore a control of the Cd concentration in fish caught for human consumption does not seem to be required. However, the control of the Cd content of the viscera, as well as that of Hg, would be useful in the case of small species eaten whole and in the case of fish used to make flour.

We have shown (BOUQUEGNEAU et al. 1975 ; NOËL-LAMBOT, to be published) that in a number of eel organs, Cd and Hg occur principally bound to a cystein-rich protein, metallothionein. This protein seems to have a role in detoxification of both metals (PULIDO et al. 1966 ; SUDA et al. 1974 ; RUGSTAD and NORSETH. 1975). Its synthesis is induced in response to administration of these metals (WEBB. 1972 ; CHEN et al. 1975) and it has been shown (PIOTROWSKI et al. 1974) that the increase of the Cd or Hg load of rat liver or kidney is linked to the increase of their metallothionein content.

Thus in order to explain the very dissimilar accumulation and distribution of Cd and Hg within the eel body one must take into account not only the possibility of different membrane permeabilities to both metals but also the problem of their binding within the cells. In order to conclude, we think that the knowledge of the affinity of metallothionein for Cd and Hg and of the ability of both metals for inducing the synthesis of the protein in the different organs will probably contribute to explain our observations.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was carried out in participation in the Belgian National Research and Development Program on the Environment - Water - Sea Project, Office of the Prime Minister, Interministerial Commission for Science Policy and Programmation.

We are grateful to Prof. A. DISTECHE for their advice throughout this work. We thank Mrs C. MARCHAND and Mr R. BIONDO for their excellent assistance.

REFERENCES

- BÄCKSTRÖM, J.: *Oikos* suppl. 9, 30 (1967).
- BALL, I.R.: *Water Research* 1, 805 (1967).
- BOETIUS, J.: *Dan. Fisk. Havrunders* 3, 93 (1960).
- BOUQUEGNEAU, J.M.: *Bull. Soc. Roy. Sc. Lg*, 9-10, 440 (1973).
- BOUQUEGNEAU, J.M.: Doctorat thesis, University of Liège (1975).
- BOUQUEGNEAU, J.M., Ch. GERDAY and A. DISTECHE : *FEBS Letters* 55, 173 (1975).
- BOUQUEGNEAU, J.M., F. NOEL-LAMBOT and A. DISTECHE : Le problème de l'intoxication directe et indirecte par les métaux lourds. In: Programme National de Recherche et de Développement - Environnement eau - Projet Mer - Rapport final, volume 9 : Contamination des produits de la mer, 266-292, édité par Jacques C.J. NIHOUL et A. DISTECHE. Services du Premier Ministre - Programmation de la Politique Scientifique, Bruxelles (1976).
- CHEN, R.W., P.D. WHANGER and P.H. WESWIG : *Biochem. Med.* 12, 95 (1975).
- DOUDOROFF, P. and M. KATZ : *Sew. and Ind. Wastes* 25, 821 (1953).
- EISLER, R.: *J. Fish. Res. Bd Can.* 28, 1225 (1971).
- EISLER, R.: *J. Fish. Biol.* 6, 601 (1974).
- FRIBERG, L. and J. VOSTAL : "Mercury in the environment" CRC Press, Cleveland (1972).
- FRIBERG, L., M. PISCATOR, G.F. NORDBERG and T. KJELLSTROM : "Cadmium in the environment", 2nd Edition, CRC Press, Cleveland (1974).
- HANNERZ, L.: *Rep. Inst. Freshwater Res., Sweden*, 48, 120 (1968).
- JERNELOV, A. and L. LANDNER : In "Metals and Ecology". Symposium, Stockholm 24 March 1969, Ecological Research Committee 5, Swedish Nat. Sc. Res. Council, Stockholm, Sweden (1969).
- MIETTINEN, V., E. BLANKENSTEIN, K. RISSANEN, M. TILLANDER, J.K. MIETTINEN and M. VALTONEN : In "Marine Pollution and Sea Life"- Publ. by Fishing News (Books) Ltd, Surrey (1972).
- OLSON, K.R., H.L. BERGMAN and P.O. FROMM: *J. Fish. Res. Bd Can.* 30, 1293 (1973).
- PICKERING, Q.H. and M.H. GAST : *J. Fish. Res. Bd Can.* 29, 1099 (1972).
- PIOTROWSKI, J.K., B. TROJANOWSKA and A. SAPOTA : *Arch. Toxicol.* 32, 351 (1974).
- PULIDO, P., J.W.R. KÄGI and B.L. VALLEE : *Biochem.* 5, 1768 (1966).
- ROWE, D.W. and E.J. MASSARO : *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11, 244 (1974).
- RUGSTAD, H.E. and T. NORSETH : *Nature* 257, 136 (1975).

- SPRAGUE, J.B. : Water Research 3, 793 (1969).
- SUDA, T., N. HORIUCHI, E. OGATA, I. EZAWA, N. OTAKI and M. KIMURA:
FEBS Letters 42, 23 (1974).
- WALDICHUK, M.: In "Pollution and Physiology of Marine Organisms".
F.J. Vernberg and W.B. Vernberg Ed. Academic Press, Inc (1974).
- WEBB, M.: Biochem. Pharmac. 21, 2767 (1972).

ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n° 2

L'ACCUMULATION DU MERCURE A PARTIR DE L'EAU
ET DE LA NOURRITURE CHEZ LES POISSONS MARINS.

L'ACCUMULATION DU MERCURE A PARTIR DE L'EAU ET DE LA NOURRITURE CHEZ LES POISSONS MARINS

par J. M. BOUQUEGNEAU et F. NOEL-LAMBOT*

INTRODUCTION :

Il est bien connu que les métaux lourds se trouvent en concentration beaucoup plus grande dans les organismes marins que dans l'eau de mer et qu'ils sont généralement encore plus abondants si les organismes proviennent de milieux pollués.

L'accumulation de ces métaux dans les tissus peut résulter d'une absorption directe (à partir de l'eau), d'une absorption indirecte (à partir des aliments) ou des deux à la fois.

Si les expériences démontrent clairement que et la teneur en métaux de l'eau et celle de la nourriture peuvent influencer leur concentration dans les organismes aquatiques, les parts respectives de ces deux voies d'intoxication sont cependant très mal établies. En fait, il semble bien qu'elles varient énormément selon le métal et l'organisme considérés. Pourtant, cette connaissance devrait être essentielle à la compréhension des mécanismes et des vitesses de transfert de ces polluants dans les divers compartiments de l'écosystème marin.

L'étude de chaînes alimentaires aquatiques "in situ" montre que les concentrations en métaux lourds les plus élevés sont presque toujours atteintes par les animaux occupant les échelons trophiques inférieurs. De plus, une augmentation de la teneur en métaux lourds d'un milieu aquatique naturel modifie bien plus leur concentration dans les plantes et les invertébrés que dans les poissons et les mammifères aquatiques.

Citons, parmi beaucoup d'autres, les travaux de Mathis et Cummings (1973) réalisés sur la faune d'une rivière polluée, l'Illinois, et qui montrent que les teneurs en Cu, Zn, Cd, Ni, Cr et Co sont bien plus élevées chez les annélides et les mollusques que chez les poissons, les travaux de Peden (1973) effectués sur des organismes vivant dans le canal de Bristol et qui mettent en évidence d'une part un remarquable parallélisme entre la teneur en Cd de l'eau et celle des algues et des mollusques et, d'autre part, des teneurs en Cd plus de 100 fois supérieures chez ces organismes que chez les poissons, etc...

Le cas du mercure est cependant quelque peu plus complexe, car il est vrai que les concentrations en polluant sont souvent fort importantes chez certains poissons tels que les thons, les brochets ou les perches, mais il ne semble pas que ce soit le cas chez toutes les espèces qui occupent les échelons supérieurs des chaînes

* Université de Liège, Institut de Chimie, Laboratoire d'Océanologie, B 4000
SART TILMAN par LIEGE 1, Belgique.

alimentaires. Si l'étude effectuée par Jernelöv et Lann (1971) de chaînes benthiques de lacs et de rivières suédois révèle des teneurs en mercure d'autant plus importantes que les individus sont à un échelon élevé de ces chaînes alimentaires (l'échelon le plus élevé est cependant chaque fois le brochet), il n'en est pas de même au niveau de nombreuses chaînes pélagiques étudiées "in situ". En effet, plusieurs auteurs n'ont pas trouvé de concentrations en mercure en fonction du niveau occupé dans la chaîne alimentaire aquatique, et ce aussi bien au niveau de chaînes pélagiques marines (Knauer et Martin, 1972 ; Williams et Weiss, 1973 ; Leatherland et al., 1973) qu'au niveau de chaînes dulçaquicoles (Wobeser et al., 1970 ; Huckabee et al., 1974).

Des éléments autres que la position d'un animal dans la chaîne alimentaire (sans toutefois négliger celle-ci) doivent vraisemblablement intervenir pour expliquer d'une manière satisfaisante les concentrations en mercure observées chez certains poissons. Nous pensons que deux de ces éléments pourraient être la vitesse de croissance de l'espèce considérée et son espérance de vie.

En effet, Scott (1974) a montré que ce sont non seulement les poissons les plus vieux, mais également ceux qui ont une croissance rapide, qui sont généralement les plus contaminés.

Enfin, s'il est évident qu'il y a une augmentation de la teneur en mercure dans les muscles au fur et à mesure que l'animal vieillit, il est d'autant plus évident que pour interpréter les observations effectuées dans les chaînes alimentaires, il sera important de tenir compte non seulement de la durée de vie des prédateurs et des proies, mais aussi des classes d'âges de ces dernières.

En conclusion, l'idée largement répandue selon laquelle les polluants se concentrent le long des chaînes alimentaires n'est pas applicable aux métaux lourds. Ce concept s'appuie comme nous venons de le voir sur des analyses d'organismes prélevés dans des milieux naturels, mais aussi sur des études visant à reconstituer des chaînes trophiques en laboratoire.

Si les données quantitatives relatives aux transferts directs de métaux lourds de l'eau aux organismes sont relativement nombreuses, celles obtenues par des chaînes biologiques où les organismes sont simultanément contaminés directement par l'eau et indirectement par leur nourriture, sont beaucoup plus rares (Aubert et al., 1974).

Aubert et ses collaborateurs ont le mérite d'avoir étudié ce type de transfert en laboratoire notamment au niveau de trois chaînes trophodynamiques marines : une chaîne de type pélagique (Phytoplancton : *Asterionella japonica* et *Diogenes* sp. - Zooplancton : *Artemia salina* - Poissons : *Carassius auratus* - Consommateur final mammifère : *Mus musculus* ; Aubert et al., 1972), une de type néritique à mollusque (*Diogenes* sp. - *Mytilus edulis* - *Mus musculus* ; Aubert et al., 1974) et une de type benthique (Bactéries marines : *Nereis diversicolor* - Poissons : *Scorpaena porcus* - *Mus musculus* ; Aubert et al., 1975).

Aubert a étudié le transfert de cinq polluants métalliques (le cuivre, le zinc, le chrome, le plomb et le mercure), soit à l'état ionique simple, soit à l'état complexé par diverses substances naturelles (par exemple des eaux d'égouts) ou artificielles (EDTA, détergents). Ceci est très intéressant du fait que l'on sait que la présence notamment dans les effluents de telles substances peut modifier l'état physico-chimique des métaux lourds (De Groot, 1973) et par suite leur accumulation par les organismes (Perpeet et Vloebergh, 1975).

De l'ensemble de ces résultats, il ressort tout d'abord que c'est toujours le premier échelon trophique qui est le plus contaminé, et ce, quel que soit le polluant utilisé. Ceci est en accord avec les observations "in situ" que nous avons mentionnées plus haut.

En ce qui concerne les échelons trophiques plus élevés, il s'avère que les mollusques et les annélides accumulent les métaux lourds plus rapidement que les poissons.

Bien que de manière moins importante que le plancton, les annélides, les moules et les poissons accumulent les cinq polluants, mais il ressort que les poissons accumulent principalement le mercure.

Cette aptitude particulière des poissons à accumuler le mercure peut rendre compte des observations de Cross et al. (1973) qui ont mis en évidence une relation entre l'âge de deux poissons (*Pomatomus saltatrix* et *Antimora rostrata*) et leur teneur en mercure, alors que la concentration en Mn, Fe, Cu et Zn restait constante ou diminuait chez les animaux les plus âgés. De nombreux autres auteurs ont également mis en évidence une relation entre l'âge ou la longueur de l'animal et sa charge en mercure. Citons par exemple les travaux de Bache et al. (1971) chez *Salvelinus namaycush*, ceux de Nuertova et Hasanen (1971) chez *Myoxocephalus quadricornis*, ceux de Johnels et al. (1967) chez *Esox lucius* et ceux de Scott et Armstrong (1972) chez plusieurs espèces vivant en eau douce. Chez les poissons marins, une telle corrélation a également été mise en évidence, notamment chez trois espèces de thons (*Thunnus thynnus*, *T. albacora* et *T. alalunga*) par Cumont et al. (1972), chez *Merlangus merlangus* et *Gadus morrhua* par De Clerck et al. (1974) et chez *Myoxocephalus scorpius* par Bouquegneau (1975).

On dispose, en fait, dans la littérature de très peu de données quantitatives à propos de l'importance relative de l'accumulation directe et indirecte du Hg. Il ressort cependant des expériences de Hannerz (1968) que chez les poissons, ce métal est accumulé de manière plus importante à partir de l'eau qu'à partir de la nourriture qu'ils ingèrent. De même, sur la base de calculs effectués à partir d'observations "in situ", Jernelöv et Lann (1971) estiment que la part de la concentration en Hg due à une absorption à partir de l'eau est de l'ordre de 50 % de la concentration totale du brochet, et de plus de 90 % chez les poissons consommés par celui-ci.

Enfin, les expériences que l'un d'entre nous (Bouquegneau, 1975) a réalisées au niveau d'*Anguilla* et de *Myoxocephalus scorpius* montrent que ces poissons, non nourris, accumulent des quantités importantes de mercure, qu'il soit sous forme de $HgCl_2$ ou de CH_3HgCl , et ce, pour des concentrations aussi faibles que 1 ppb de Hg dans l'eau de mer. D'autres expériences (Bouquegneau, 1973 et 1975), réalisées à des concentrations en mercure et à des temps d'intoxication semblables à ceux utilisés par Aubert et ses collaborateurs, au niveau de la chaîne de type benthique (Aubert et al., 1975) montrent que, suite à une simple intoxication directe, *Anguilla anguilla* et *Myoxocephalus scorpius* présentent des concentrations en Hg du même ordre de grandeur que celles des *Scorpaena porcus* qui, lors des expériences d'Aubert, ont subi en même temps les deux types d'intoxication. Ceci montre une fois de plus la faible part prise par l'alimentation dans l'accumulation du mercure par les poissons.

Nous avons tenté, au cours de ce travail, d'estimer les flux entrants et sortants de Hg dans deux poissons vivant en Mer du Nord : le merlan (*Merlangus merlangus*) et le cabillaud (*Gadus morrhua*). Nous avons pu en déduire le flux dû à une absorption directe à partir de l'eau et nous l'avons comparé à celui obtenu au cours d'expériences en laboratoire effectuées sur l'anguille (*Anguilla anguilla*) adaptée à l'eau de mer. Les processus d'intoxication des anguilles et de dosages du mercure ont déjà été décrits (Bouquegneau, 1973 et 1975).

ESTIMATION DES FLUX ENTRANTS ET SORTANTS DE METAUX LOURDS DANS LES COMPARTIMENTS POISSONS DE LA MER DU NORD :

1 - ACCUMULATION DU MERCURE CHEZ LE MERLAN :

Cette tentative a été réalisée au niveau de merlans (*Merlangus merlangus* L.) mâles ou immatures d'une longueur de 16 à 20 cm provenant de la zone côtière belge de la Mer du Nord et s'appuie sur les données de De Clerck et al. (1974), De Clerck (1975),

Jernelöv et Lann (1971), Bouquiaux et Herman (1973), Herman et Bouquiaux (1974), Bouquegneau (1975) ainsi que sur des données non publiées de F. Redant.

Les résultats de De Clerck et al. (1974) montrent que la charge en mercure des merlans mâles pêchés le long de la côte belge augmente en fonction de la longueur du poisson selon la relation :

$$y = 8.8.10^{-3} \cdot x - 23.10^{-3}$$

où y représente la charge en Hg du poisson exprimée en ppm (poids frais) et x représente la longueur du poisson exprimée en cm.

On peut, d'après cette relation, constater que la croissance des merlans de 16 cm à 20 cm s'accompagne en moyenne d'une augmentation de leur teneur en mercure de 0.0352 ppm (0.1178 ppm pour les merlans de 16 cm et 0.1530 ppm pour les merlans de 20 cm).

D'après De Clerck (1975), on peut estimer qu'il faut une période de l'ordre de 146 jours pour observer un tel accroissement de taille chez ces poissons.

Comme les merlans pèsent en moyenne 33 g à 16 cm et 64 g à 20 cm (Redant, communication personnelle), on peut estimer que, en 146 jours, des merlans pesant 64 g et mesurant 20 cm ont fixé une quantité nette de mercure égale à :

$$(0.1530 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \times 64 \text{ g}) - (0.1178 \frac{\mu\text{g}}{\text{g}} \times 33 \text{ g}) = 5.9046 \mu\text{g de Hg, soit}$$

$$\frac{5.9046}{64 \times 146} = 0.00063 \mu\text{g de Hg accumulé/g de poisson et par jour.}$$

Etant donné que chez les poissons, la demi-vie d'élimination du Hg et principalement du CH_3Hg^+ est extrêmement longue et de l'ordre de 700 jours (Järvenpää et al., 1970), nous avons estimé à 0.00014 μg la quantité moyenne de Hg excrétée par g de merlan et par jour.

En conséquence, on peut calculer le flux entrant total (d'origine directe + d'origine indirecte) comme étant égal à :

$$0.00063 + 0.00014 = 0.00077 \mu\text{g de Hg/jour et par g de poisson.}$$

Quelle est dès lors la part due à l'accumulation à partir de la nourriture et celle due à l'absorption directe à partir de l'eau ?

Tout d'abord, voyons quelle est la teneur en Hg des aliments ingérés par les merlans. Ceux-ci ont un régime alimentaire constitué notamment de crevettes (principalement *Crangon crangon*). Celles-ci représentent 31 % du poids total de la nourriture ingérée et le reste (69 %) est essentiellement constitué de *Portunus holsatus* et de *Gobius minutus* (Redant, communication personnelle). Nous avons postulé que ces deux espèces étaient consommées en quantité égale, ce qui ne peut provoquer d'erreur importante étant donné la similitude de leur charge en mercure.

D'après De Clerck et al. (1974), les crevettes *Crangon crangon* pêchées le long de la côte belge contiennent en moyenne 0.10 ppm de Hg, et d'après Vanderstappen (résultats non publiés), *Portunus holsatus* et *Gobius minutus* en contiennent respectivement 0.07 et 0.06 ppm. Il s'ensuit que la nourriture ingérée par les merlans contient en moyenne :

$$\frac{0.1 \times 31}{100} + \frac{0.07 \times 34.5}{100} + \frac{0.06 \times 34.5}{100} = 0.076 \text{ ppm de Hg (poids frais).}$$

Suite à l'analyse du contenu stomacal des merlans, on sait que celui-ci représente 2.2 % du poids total de l'animal, avec un temps de résidence égal à deux jours (Redant, communication personnelle). En conséquence, le merlan ingère par voie alimentaire une quantité égale à :

$$\frac{2.2 \times 0.076}{100 \times 2} = 0.00083 \mu\text{g de mercure/g de poisson et par jour.}$$

A partir d'expériences effectuées en laboratoire, on sait que les poissons prédateurs ont tendance à accumuler entre 10 et 15 % (admettons 12.5) du mercure présent dans leurs proies (Jernelöv et Lann, 1971). Il en résulte que le merlan accumule par voie alimentaire en moyenne :

$$\frac{0.00083 \times 12.5}{100} = 0.00010 \text{ } \mu\text{g de Hg/g de poisson et par jour.}$$

Etant donné que le merlan accumule journallement une quantité effective de 0.00063 μg de Hg/g de poisson, quantité qui résulte d'un flux entrant total de 0.00077 μg et d'un flux sortant de 0.00014 μg , il s'ensuit que le flux entrant de Hg à partir de l'eau est égal à :

$$0.00077 - 0.00010 = 0.00067 \text{ } \mu\text{g de Hg.}$$

En postulant que l'élimination du mercure se fait de la même manière, que celui-ci ait été accumulé par voie directe ou indirecte, l'accumulation effective de mercure par voie directe est égale à :

$$0.00067 - \frac{0.00014 \times 67}{77} = 0.00055 \text{ } \mu\text{g de Hg accumulé par jour par g de}$$

poisson, ce qui est tout-à-fait compatible avec nos résultats expérimentaux obtenus chez *Anguilla anguilla* (voir Fig. 1). L'ensemble de nos calculs est repris schématiquement dans la Fig. 2a.

2 - ACCUMULATION DU MERCURE CHEZ LE CABILLAUD :

Nous avons effectué des calculs semblables au niveau du cabillaud *Gadus morrhua* à partir des données suivantes :

- teneur en mercure des poissons : 0.115 ppm (I.R.C., 1975) ;
- teneur en mercure du contenu stomacal : 0.083 ppm (I.R.C., 1975) ;
- d'après De Clerck et al. (1974), cette teneur en mercure des cabillauds correspond à des poissons d'une grandeur de l'ordre de 45 cm. Nous avons fait nos calculs sur la base de la croissance de cette espèce de 40 à 50 cm ;
- pour passer de 40 à 50 cm, il faut environ 180 jours (De Clerck, 1975) et le poids moyen des cabillauds est respectivement égal à 666 et à 1300 g, la ration journalière étant en moyenne de l'ordre de 1.15 % du poids de l'animal (Daan, 1973) ;
- l'accumulation correspondante de mercure est obtenue par l'équation :

$$y = 2.4 \cdot 10^{-3} x + 33 \cdot 10^{-3} \text{ (De Clerck et al., 1974).}$$

Les résultats obtenus, consignés dans la Fig. 2b, sont les suivants :

Flux entrant total journalier	:	$73 \cdot 10^{-5}$	$\mu\text{g Hg/g/jour}$
Accumulation journalière nette	:	$59 \cdot 10^{-5}$	$\mu\text{g Hg/g/jour}$
Accumulation indirecte	:	$12 \cdot 10^{-5}$	$\mu\text{g Hg/g/jour}$
Accumulation directe	:	$61 \cdot 10^{-5}$	$\mu\text{g Hg/g/jour}$
Vitesse d'accumulation directe	:	$49 \cdot 10^{-5}$	$\mu\text{g Hg/g/jour}$

ce qui est également compatible avec nos résultats expérimentaux chez l'anguille (Fig.1)

DISCUSSION :

Les schémas d'accumulation journalière de mercure chez *Merlangus merlangus* et chez *Gadus morrhua* vivant dans la zone côtière belge doivent être considérés comme hypothétiques et basés sur un nombre important de données de la littérature ne s'appliquant pas directement à notre problème. Néanmoins, ces schémas constituent une première approche quantitative de la connaissance des flux de transfert de mercure

chez les poissons et, comme nous l'avons déjà signalé, ils sont à la fois en accord avec les observations réalisées "in situ" (De Clerck et al., 1974 ; I.R.C., 1975) et avec les données expérimentales de la littérature;

De l'examen des schémas de la Fig. 2, il ressort que les flux de mercure sont du même ordre de grandeur chez les deux espèces étudiées. Il y apparaît qu'environ 85 % de la charge en mercure du poisson résulte d'une absorption directe de polluant à partir de l'eau. Cette absorption a lieu principalement au niveau des branchies (Bouqueneau, 1975 ; Olson et al., 1973).

Le rôle de la teneur en mercure de la nourriture dans les phénomènes de transfert de polluants dans l'écosystème marin est cependant loin d'être négligeable étant donné que, outre le fait que 15 % de la charge en mercure du poisson résulte de la nourriture ingérée, une quantité importante de polluant transite dans le tube digestif et en ressort sous forme de déjections dont la teneur en mercure est fortement concentrée par rapport à celle des proies. Ces déjections seront vraisemblablement appelées à enrichir fortement la charge en mercure des sédiments et, sans doute dans une mesure beaucoup moindre, celle de l'eau.

Enfin, la Fig. 2 nous fournit une explication évidente du fait qu'on n'observe pas nécessairement d'enrichissement en métal d'un échelon à l'autre d'une chaîne alimentaire : le flux entrant de mercure à partir de la nourriture est inférieur au flux sortant résultant des mécanismes excréteurs de ce polluant.

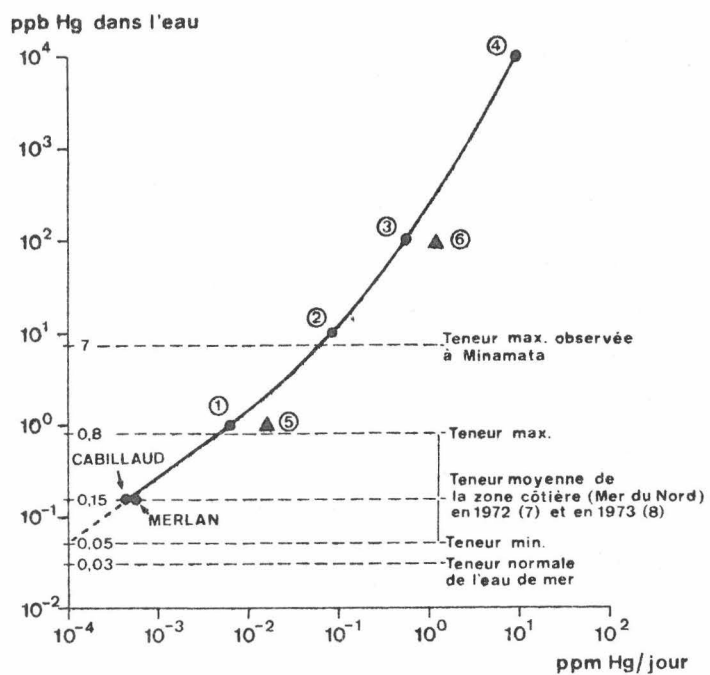


Fig. 1 : Vitesse d'accumulation directe du mercure par l'anguille (résultat expérimental : points 1, 2, 3, 4, 5 et 6), par le merlan et le cabillaud (valeurs calculées) en fonction de la concentration en mercure de l'eau de mer (● : sous forme de $HgCl_2$; ▲ : sous forme de CH_3HgCl). 7 : d'après Bouquiaux et Herman (1973) ; 8 : d'après Herman et Bouquiaux (1974).

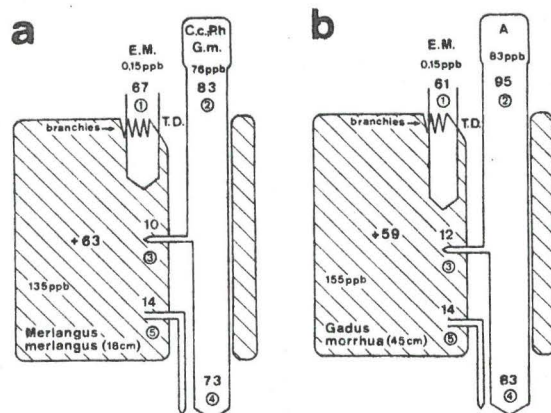


Fig. 2 : Accumulation journalière de mercure chez *Merlangus merlangus* (a) et chez *Gadus morrhua* (b) vivant dans la zone côtière belge. Les concentrations sont exprimées en ppb (poids frais). Les flux sont exprimés en 10^{-5} $\mu\text{g Hg/g}$ de poids frais et par jour.

- 1 Quantité de mercure entrée à partir de l'eau.
- 2 Quantité de mercure contenue dans l'alimentation.
- 3 Quantité de mercure assimilée à partir de l'alimentation.
- 4 Quantité de mercure non assimilée à partir de l'alimentation.
- 5 Quantité de mercure excrétée par le poisson.

EM = eau de mer ; C.c. = *Crangon crangon* ; P.h. = *Portunus holsatus* ; G.m. = *Gobius minutus*.

La Fig. 1 représente une cinétique d'accumulation directe du mercure chez les poissons en fonction de la teneur en Hg de l'eau. Les points expérimentaux de la cinétique (points d'ordonnée 10^0 , 10^1 , 10^2 et 10^4) ont été obtenus à partir d'intoxication par du chlorure mercurique. Or, on ignore sous quelle forme se trouve le mercure dans l'eau de la zone côtière belge de la Mer du Nord. Il est cependant raisonnable d'imaginer que le mercure est partiellement sous cette forme, partiellement sous forme de méthylmercure qui est accumulé de l'ordre de deux fois plus rapidement que le Hg^{++} (cf. triangles noirs de la Fig. 1), mais aussi partiellement sous forme complexée à des particules organiques, forme sous laquelle le mercure serait accumulé environ deux fois moins rapidement que le Hg^{++} (voir expériences d'Aubert citées plus haut). Dans l'ignorance des proportions de ces trois formes de polluant dans l'eau, il nous paraît donc raisonnable de considérer que la courbe obtenue à partir du polluant accumulé à une vitesse moyenne est la plus fiable et dès lors d'utiliser la courbe de la Fig. 1 comme susceptible de prédire, en première approximation, l'effet d'une augmentation de la teneur en mercure dans l'eau de mer sur le compartiment poisson.

REMERCIEMENTS :

Cette recherche a été conduite en participation au programme R & D sur l'environnement physique et biologique, subventionné par les Services du Premier Ministre - Services de Programmation de la Politique Scientifique, Bruxelles.

ABSTRACT

The uptake of mercury from water and food by marine fishes. Among heavy metals considered as marine pollutants, fishes accumulate particularly mercury. The uptake of mercury from water and (or) food is still a much debated question. From measurements of mercury contamination "in situ" and from experimental data, we propose a diagram of mercury accumulation in *Merlangus merlangus* and in *Gadus morrhua*. It is concluded that the direct uptake of mercury by gills is the most significant.

BIBLIOGRAPHIE

- AUBERT M., BITTEL R., LAUMOND F., ROMEO M., DONNIER B. et BARELLI M., 1972 - Utilisation d'une chaîne trophodynamique de type pélagique pour l'étude des transferts des polluants métalliques. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, 28, 27-52.
- AUBERT M., BITTEL R., LAUMOND F., ROMEO M., DONNIER B. et BARELLI M., 1974 - Utilisation d'une chaîne trophodynamique de type néritique à mollusque pour l'étude des transferts des polluants métalliques. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, 33, 7-29.
- AUBERT M., BITTEL R., LAUMOND F., BARELLI M., GAUTHIER M., DONNIER B. et ROMEO M., 1975 - Utilisation d'une chaîne trophodynamique de type benthique pour l'étude des transferts des polluants métalliques. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, 39-40, 117-151.
- BACHE C.A., GUTENMAN W.H. et LISK D.J., 1971 - Residues of total mercury and methylmercuric salts in lake trout as a function of age. *Science*, 172, 951-952.
- BOUQUEGNEAU J.M., 1973 - Etude de l'intoxication par le mercure d'un poisson téléostéen *Anguilla anguilla*. I. Accumulation du mercure dans les organes. *Bull. Soc. Roy. Sc. Lge.*, 9-10, 440-446.
- BOUQUEGNEAU J.M., 1975 - L'accumulation du mercure et ses effets physiologiques chez *Anguilla anguilla* et *Myoxocephalus scorpius*. Thèse de Doctorat, Université de Liège, Belgique.
- BOUQUIAUX J. et HERMAN P., 1973 in *Math Modelsea, Fisheries Improvement and Hydrography*, International Council for Exploration of the Sea, E19.
- CROSS F.A., HARDY L.H., JONES N.Y. et BARBER R.T., 1973 - Relation between total body weight and concentrations of manganese, iron, copper, zinc and mercury in white muscle of blue-fish (*Pomatomus saltatrix*) and a bathyl-demersal fish *Antimora rostrata*. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 30, 1287-1291.
- CUMONT G., VIALLEX G., LELIEVRE H. et BOBENRIETH P., 1972 - Contamination des poissons de mer par le mercure. *Rev. Int. Océanogr. Méd.*, 28, 95-127.
- DAAN N., 1973 - A quantitative analyse of the food intake of North Sea cods *Gadus morrhua*. *Neth. J. of Sea Res.*, 6, 479-517.
- DE CLERCK R., VANDERSTAPPEN R. et VYNCKE W., 1974 - Mercury content of fish and shrimps caught off the belgian coast. *Ocean Manag.*, 2, 117-126.
- DE CLERCK R., 1975 - Studie van de vis- en garnaalpopulaties in de visgronden van het "Westdiep" gedurende de periode mei 1971-mei 1972. Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent). Publikatie nr 99.

- DE GROOT A.J., 1973 - Occurrence and behaviour of heavy metals in river deltas, with special reference to the Rhine and Ems rivers. In : *North Sea Science*, Nato North Sea Science Conference Aviemore, Scotland 15-20 November 1971, Ed. Edward D. Goldberg, MIT Press.
- HANNERZ L., 1968 - Experimental investigations on the accumulation of mercury in water organisms. *Rep. Inst. Freshwater Res.*, Sweden, 48, 120-175.
- HERMAN P. et BOUQUIAUX J., 1974 - In *Math Modelsea*, 1974, Fisheries Improvement and Hydrography, International Council for Exploration of the Sea, C:1.
- HUCKABEE J.W., FELDMAN C. et TALMI Y., 1974 - Mercury concentrations in fish from the great smoky mountains national park. *Anal. Chim. Acta*, 70, 41-47.
- I.R.C., 1975 - Contamination des poissons, crustacés de mer et autres organismes marins. Ministère de l'Agriculture - Institut de Recherches Chimiques - Tervuren, M15, Décembre 1975. Tech. Rep. CIPS 1975/3.
- JÄRVENPÄÄ T., TILLANDER M. et MIETTINEN J.K., 1970 - Methylmercury : half-time of elimination in flounder pike and eel. FAO Technical Conference on marine pollution and its effects on living resources and fishing, Rome, Italy, 9-18 December.
- JERNELOV A. et LANN H., 1971 - Mercury accumulation in food chains. *Oikos*, 22, 403-406.
- JOHNELS A.G., WESTERMARK T., BERG W., PERSSON P.I. et SJÖSTRAND B., 1967 - Pike (*Esox lucius L.*) and some other aquatic organisms in Sweden as indicators of mercury contamination in the environment. *Oikos*, 18, 323-333.
- KNAUER G.A. et MARTIN J.H., 1972 - Mercury in a marine pelagic food chain. *Limnol. Oceanogr.*, 17, 868-876.
- LEATHERLAND T.M., BURTON J.D., CULKIN F., McCARTNEY M.J. et MORRIS R.J., 1973 - Concentrations of some trace metals in pelagic organisms and of mercury in Northeast Atlantic Ocean Water. *Deep-Sea Res.*, 20, 679-685.
- MATHIS B.J. et CUMMINGS T.F., 1973 - Selected metals in sediments, water, and biota in the Illinois river. *J. Wat. Poll. Control.*, 45, 1573-1583.
- NUORTEVA P. et HASANEN E., 1971 - Observations on the mercury content of *Myoxocephalus quadricornis* (L.) (Teleostei, Cottidae) in Finland. *Ann. Zool. Fennici*, 8, 331-335.
- OLSON K.R., BERGMAN H.L. et FROMM P.O., 1973 - Uptake of methylmercury chloride and mercuric chloride by trout : a study of uptake pathways into the whole animal and uptake by erythrocytes "in vitro". *J. Fish. Res. Bd Can.*, 30, 1293-1299.
- PEDEN J.D., CROTHERS J.H., WATERFALL C.E. et BEASLEY J., 1973 - Heavy metals in Somerset Marine organisms. *Mar. Poll. Bull.*, 4, (1), 7-10.
- PERPEET Ch. et VLOEBERGH M., 1975 - Etude de l'adsorption du mercure sur des particules organiques et inorganiques. *Belgian Nat. R.D. Progr. Environment - Water - Sea Project - Technical Report Biol. Labo 01.*
- SCOTT D.P., 1974 - Mercury concentration of white muscle in relation to age, growth and condition in four species of fishes from Clay Lake, Ontario. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 31, 1723-1729.
- SCOTT D.P. et ARMSTRONG F.A.J., 1972 - Mercury concentration in relation to size in several species of freshwater fishes from Manitoba and Northwestern Ontario. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 29, 1685-1690.

- WILLIAMS P.M. et WEISS H.V., 1973 - Mercury in the marine environment ; concentration in sea water and in a pelagic food chain. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 30, 293-295.
 - WOBESER G., NIELSEN N.O., DUNLOP R.H. et ATTON F.M., 1970 - Mercury concentrations in tissues of fish from the Saskatchewan river. *J. Fish. Res. Bd Can.*, 27, 830-835.
-

ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n°.3

ÉTUDE QUANTITATIVE DES TRANSPORTS DE MÉTAUX
LOURDS DANS DIVERS COMPARTIMENTS DE L'ÉCOSYSTÈME
MARIN.

ETUDE QUANTITATIVE DES TRANSPORTS DE METAUX LOURDS
DANS DIVERS COMPARTIMENTS DE L'ECOSYSTEME MARIN

A. DISTECHE et J.M. BOUQUEGNEAU

(D'après un travail expérimental de C. HOUBA,
C. MERCENIER et J.M. BOUQUEGNEAU).

Rapport périodique : du 1.1.77 au 31.12.77

INTRODUCTION

Ce contrat de recherche a pour objectif principal d'étudier les mécanismes d'entrée et de sortie des métaux lourds considérés comme polluants dans les organismes aquatiques. Cette première année de recherche a été essentiellement consacrée à l'étude des mécanismes d'entrée des polluants. En effet, l'entrée en métaux lourds dans les organismes marins peut avoir deux origines bien distinctes :

elle peut résulter soit d'une contamination de l'organisme par le polluant contenu dans l'eau dans laquelle il vit (intoxication directe), soit d'une contamination par la nourriture qu'il ingère (intoxication indirecte).

En fait, on ignore généralement quelle est la part respective de ces deux sources dans les phénomènes de concentration de métaux par les organismes aquatiques. C'est le but de ce travail d'étudier ces deux voies d'entrée et notamment de déterminer le pourcentage de polluant contenu dans la nourriture qui traverse la barrière intestinale au niveau de divers échelons de chaînes alimentaires aquatiques, et principalement marines. C'est à cette étude que nous avons principalement consacré nos efforts au cours de ce premier exercice.

CHOIX DES CHAINES ALIMENTAIRES ETUDIEES

Le premier problème à résoudre était de reconstituer en laboratoire des chaînes alimentaires susceptibles de fournir la possibilité de mesurer le flux d'entrée de polluant via l'alimentation.

De nombreux essais préliminaires ont été réalisés au niveau de chaînes trophiques de type benthique à trois maillons dont le premier est un microorganisme représenté soit par des bactéries, soit par des protozoaires, soit par des algues. Le consommateur primaire est un microphage représenté par des moules (*Mytilus edulis*) ou par des huîtres (*Ostrea edulis*) et le consommateur secondaire est l'étoile de mer (*Asterias rubens*).

Malheureusement, nous n'avons pu réunir dans notre laboratoire les conditions nécessaires à la bonne survie des consommateurs primaires et secondaires. De plus, les moules, de même que les huîtres, en mauvaises conditions physiologiques, n'ont jamais absorbé les microorganismes d'une manière quantifiable.

Par contre, nous n'avons pas rencontré ce type de difficulté en nourrissant des artémias (*Artemia salina* - consommateur primaire) au moyen d'une algue unicellulaire, *Dunaliella bioculata* (producteur). De même, nous avons pu étudier dans de bonnes conditions expérimentales le transfert de métaux dans une chaîne alimentaire d'eau douce : *Tubifex tubifex* (ver oligochète microphage) et *Lebistes reticulatus* (poisson téléostéen - consommateur primaire).

TECHNIQUES D'INTOXICATION

Bien qu'il était prévu dans ce programme de recherche l'utilisation de radioisotopes pour les mesures de flux de polluant à partir de l'eau et de la nourriture, nous avons pu mettre au point une méthode expérimentale qui rendait leur emploi inutile compte tenu de la précision des techniques de dosage utilisées.

Cette méthode est basée sur le principe suivant : un lot de consommateurs primaires est pendant toute la durée de l'expérience dans la même eau (tous les individus subissent ainsi la même intoxication directe). Ce lot est divisé en deux parties A et B. La partie A est nourrie avec de la nourriture saine, la partie B avec de la nourriture contaminée. En fin d'expérience, la concentration en polluant du lot B moins la concentration en polluant du lot A représente donc la contamination par voie alimentaire des individus du lot B, compte tenu de l'élimination du polluant pendant la durée de l'expérience.

1° Chaîne alimentaire planctonique marine.

(*Dunaliella bioculata* - *Artemia salina*)

Les algues ont été cultivées en continu en étant intoxiquées par du cuivre (1 ppm), du zinc (1 ppm), du cadmium (0.1 ppm), du mercure (Hg^{++} , 0.1 ppm) ou du méthylmercure (CH_3Hg^+ , 0.01 ppm), les cinq polluants étant ajoutés au milieu de culture sous forme de chlorure.

Dans le cas de chaque métal, 400 artémias ont été réparties à raison de 100 individus par tube dans quatre tubes en plexiglas de 6 cm de diamètre et 25 cm de long obturés à une extrémité par du tulle à maille de 1 mm de côté environ. Cette maille retient les artémias mais permet un libre passage des algues.

Les 200 artémias réparties dans deux tubes ont été nourries une heure par jour, pendant huit jours consécutifs, au moyen de *Dunaliella bioculata* intoxiquées par le métal considéré. Pour ce faire, les tubes étaient plongés dans un berlin en plastic contenant 240 ml d'eau de mer additionnée d'une suspension d'algues intoxiquées. Les artémias, nourries de cette façon, étaient donc intoxiquées à la fois directement et indirectement.

Après l'alimentation, l'eau des berlins était filtrée sur millipore à pore de 8 μ de manière à éliminer les algues non ingérées.

Les 200 artémias contenues dans les deux autres tubes ont été plongées une heure par jour pendant huit jours dans cette eau filtrée. Elles étaient ensuite nourries pendant une heure au moyen de *Dunaliella bioculata* non intoxiquées. Ces 200 artémias étaient donc intoxiquées directement seulement. Le reste de la journée, les quatre tubes contenant les 400 artémias intoxiquées soit directement seulement, soit à la fois directement et indirectement, étaient réunis dans un bassin en plastic contenant 10 l d'eau de mer. L'eau de ce bassin était agitée magnétiquement et aérée par bullage d'air comprimé.

Cette réunion dans une même eau homogénéisée complétait l'intoxication directe par les fèces rejetées dans l'eau. En déterminant le nombre d'algues ingérées par jour et par 100 artémias, le poids moyen d'une algue et en dosant la quantité du métal lourd considéré présent dans les algues utilisées, il est possible de déterminer la quantité d'algues et de métal quotidiennement ingérée par chaque lot de 100 artémias.

Cette détermination a été faite chaque jour et pour chaque métal avant le nourrissage afin d'en augmenter la précision au maximum. Les algues ingérées quotidiennement ont été dénombrées de la manière suivante : avant l'introduction du tube contenant les 100 artémias dans le berlin et après nourrissage, 1 ml était prélevé dans le berlin de manière à mesurer la concentration en algues avant et après alimentation. Les comptages ont été effectués au moyen d'un compteur électronique d'impulsion "coulter-counter".

Les artémias ont été récoltées et pesées après les huit jours d'expérience et la quantité de métaux lourds qu'elles contenaient a été déterminée par spectrophotométrie d'absorption atomique. La teneur en métaux des algues a été déterminée par la même technique.

2° Chaîne alimentaire dulçaquicole.

(*Tubifex tubifex* - *Lebistes reticulatus*)

Les tubifex ont été intoxiqués pendant deux jours dans un berlin de 250 cc dans lequel coulait goutte à goutte de l'eau douce contenant le polluant considéré.

Pour chaque expérience, environ 40 guppies femelles ont été réparties en deux lots dans un aquarium contenant 100 litres d'eau et cloisonné en deux compartiments de 50 litres séparés par un grillage d'une maille de 2 mm. Ceci empêche les guppies de passer d'un compartiment à l'autre de l'aquarium. Pendant toute la durée de l'expérience, une pompe d'un débit de 250 litres à l'heure et pourvue ou non d'un filtre de charbon de bois et de laine de verre prend l'eau dans un compartiment et la renvoie dans le deuxième.

Les poissons d'un seul compartiment sont nourris avec des tubifex contaminés. Les autres reçoivent une quantité égale de tubifex non contaminés.

Comme dans le cas des artémias, la différence de concentration en polluant entre les deux lots permet d'estimer la contamination d'origine alimentaire.

RESULTATS OBTENUS ET DISCUSSION

1° Chaîne alimentaire *Dunaliella bioculata* - *Artemia salina*.

a. Variation de la teneur en polluant de *Dunaliella bioculata* suite à une intoxication directe par divers polluants métalliques.

Le tableau 1 reprend les conditions expérimentales d'intoxication des algues en culture. Le temps de génération de ces algues est environ de quatre jours. Les concentrations en polluant utilisées nous ont permis d'obtenir dans ce laps de temps une augmentation importante de la teneur en polluant des algues. D'après la littérature, cette augmentation résulte en grande partie d'un phénomène d'adsorption du métal sur les membranes. Ceci se passe d'ailleurs aussi bien au cours d'intoxi-

	Teneur en métal des algues avant intoxication	Teneur en métal du milieu de culture	Teneur en métal des algues intoxiquées	Facteur de concentration
Cu	9 ppm	1 ppm (CuCl ₂)	72 ppm	63
Zn	22 ppm	1 ppm (ZnCl ₂)	254 ppm	232
Cd	4 ppm	0.1 ppm (CdCl ₂)	27 ppm	230
Hg	0.1 ppm	0.1 ppm (HgCl ₂)	4.1 ppm	40
Hg	0.1 ppm	0.01 ppm (CH ₃ HgCl)	1.4 ppm	140

Tableau 1 : Teneur en métaux des algues (*Dunaliella bioculata*) avant et après intoxication par l'ajout de sels métalliques dans le milieu de culture.

cation en laboratoire qu'au cours de pollutions dans la nature. Les algues accumulent particulièrement bien le Zn et le Cd, puis le méthylmercure, puis le cuivre et le mercure inorganique.

b. Effet de la prédation des algues contaminées sur la teneur en polluant des *Artemia salina*.

Les résultats sont consignés dans le tableau 2.

En ce qui concerne le cuivre et le zinc, bien que des quantités très importantes aient été ingérées par les artémias, nous n'avons pas pu constater d'augmentation sensible de leur concentration dans ces organismes. Il s'ensuit un taux d'assimilation apparent (défini comme le rapport de la quantité de métal effectivement retenue dans l'organisme sur la quantité totale ingérée via la nourriture) nul.

Ceci ne veut évidemment pas dire que ni le cuivre ni le zinc ne pénétrèrent dans l'organisme via l'épithélium intestinal, ce qui correspondrait à un taux d'assimilation réel (rapport de la quantité de métal absorbée par le tube digestif sur la quantité totale de métal ingérée via la nourriture) nul. En effet, une partie du Cu et du Zn passe probablement la barrière intestinale mais cet excédent est facilement éliminé de l'organisme au fur et à mesure de son apparition en excès, ces deux métaux étant des oligoéléments naturellement métabolisés.

Dans cette hypothèse (où le Cu et le Zn absorbés seraient rapidement éliminés), l'accumulation directe de Cu et de Zn observée au cours de l'expérience (3ème colonne du tableau 2) serait principalement due à une adsorption des métaux sur la cuticule des artémias (comme dans le cas des algues).

En ce qui concerne le Cd et le Hg par contre, ces deux métaux ne sont pas des métaux essentiels, et il est bien connu que leur élimination par les organismes est très lente. Elle peut être considérée comme nulle dans le cadre de cette expérience qui a une durée de huit jours et, dans ce cas, le taux d'assimilation apparent peut être considéré comme égal au taux d'assimilation réel. Ce taux est relativement faible

Sel métallique utilisé pour l'intoxication des algues	Concentration en métal des artémias avant intoxication (ppm)	Concentration en métal des artémias témoins (a) (ppm)	Concentration en métal des artémias intoxiqués par voie alimentaire (b) (ppm)	Quantité de métal assimilée par g d'artémia (a-b)	Quantité de métal ingérée en excès par g d'artémia (y)	$\frac{a-b}{y}$
CuCl ₂	8.6	11.8 ± 0.5 [⊛]	11.9 ± 0.2 [⊛]	0	63.4 µg	0
ZnCl ₂	30.0	55.7 ± 1.2 [⊛]	54.8 ± 8.8 [⊛]	0	382.5 µg	0
CdCl ₂	0.8	1.9 ± 0.1 [⊛]	2.4 ± 0.3 [⊛]	0.5 µg	14.1 µg	3.5 %
HgCl ₂	0.40	0.41 ± 0.01 [⊛]	0.64 ± 0.05 [⊛]	0.23 µg	4.05 µg	5.7 %
CH ₃ HgCl	0.40	0.40 ± 0.01 [⊛]	0.63 ± 0.01 [⊛]	0.23 µg	0.80 µg	28.8 %

Tableau 2 : Détermination du taux d'assimilation de divers polluants par des *Artemia salina* nourris au moyen de *Dunaliella bioculata* contaminées (voir tableau 1).

⊛ Ecart à la moyenne.

dans le cas du Cd^{++} et du Hg^{++} : respectivement 3.5% et 5.7%. Il est nettement plus important dans le cas du méthylmercure : 28.8%.

Cette différence importante entre l'absorption du mercure inorganique et celle du méthylmercure est probablement due à leur comportement fondamentalement différent dans les tissus : le mercure inorganique est essentiellement fixé aux groupes -SH des protéines et des acides aminés, tandis que le CH_3Hg^+ est essentiellement dissous dans les lipides.

2° Chaîne alimentaire *Tubifex tubifex* - *Lebistes reticulatus*.

Le tableau 3 résume les conditions expérimentales et les résultats obtenus. Quatre polluants ont été utilisés : le zinc, le cadmium et le mercure sous forme inorganique (HgCl_2) et organique (CH_3HgCl). Les concentrations en métaux utilisées pour contaminer les tubifex ont produit une accumulation remarquable au niveau de ces organismes sauf dans le cas du zinc (métal essentiel) dont la concentration paraît relativement bien contrôlée.

Un taux d'assimilation positif a pu être déterminé dans tous les cas. Il est particulièrement faible dans le cas du cadmium (0.1%), ce qui peut expliquer les très faibles concentrations en cadmium que l'on décrit généralement chez les poissons et ce, quelle que soit leur position dans la chaîne trophique.

L'assimilation du mercure inorganique est également extrêmement faible (1%) en regard de ce qu'on observe dans le cas du méthylmercure (taux d'assimilation de l'ordre de 45%).

La filtration de l'eau sur charbon de bois et sur laine de verre, qui permet une excellente survie des poissons intoxiqués, masque cependant une réintoxication directe possible des poissons par les métaux contenus dans leurs déjections, comme c'est le cas lors de l'intoxication des guppies par des tubifex contaminés par du HgCl_2 . Dans ce cas, lorsque l'eau n'est pas filtrée, on peut observer une contamination

Sel métallique utilisé pour l'intoxication des Tubifex	Traitement de l'eau	Concentration moyenne en métal des Tubifex avant intoxication	Concentration moyenne en métal des Tubifex après intoxication	Durée de l'expérience	Concentration en métal des poissons avant intoxication	Concentration en métal des poissons témoins (a)	Concentration en métal des poissons intoxicés par voie alimentaire (b)	Quantité de métal assimilée par g de poisson x = b-a	Quantité de métal ingérée par g de poisson (y)	Taux d'assimilation x/y
ZnCl ₂ (5 ppm)	filtrée	100.0 ppm	139.0 ppm	8 jours	41.8 ppm	42.2 ppm	45.1 ppm	2.9 µg	27.3 µg	10.6 %
CdCl ₂ (0.5 ppm)	filtrée	2.7 ppm	83.9 ppm	16 jours	1.0 ppm	1.1 ppm	1.2 ppm	0.1 µg	125 µg	0.1 %
HgCl ₂ 100ppb	filtrée	0.080 ppm	11.055 ppm	12 jours	0.084 ppm	0.091 ppm	0.293 ppm	0.202 µg	18.151 µg	1.1 %
200ppb	filtrée	0.055 ppm	19.791 ppm	9 jours	0.083 ppm	0.086 ppm	0.255 ppm	0.169 µg	12.109 µg	1.4 %
200ppb	non filtrée	0.055 ppm	19.791 ppm	9 jours	0.083 ppm	0.400 ppm	0.411 ppm	0.011 µg	11.297 µg	0.1 %
CH ₃ HgCl 5ppb	filtrée	0.080 ppm	2.332 ppm	12 jours	0.084 ppm	0.093 ppm	1.096 ppm	1.003 µg	2.700 µg	37.1 %
10ppb	filtrée	0.055 ppm	2.864 ppm	9 jours	0.083 ppm	0.103 ppm	1.097 ppm	0.994 µg	1.869 µg	53.2 %
10ppb	non filtrée	0.055 ppm	2.864 ppm	9 jours	0.083 ppm	0.070 ppm	0.638 ppm	0.568 µg	1.316 µg	43.2 %

Tableau 3 : Détermination du taux d'assimilation de divers polluants par des guppies (*Lepistes reticulatus*) nourris au moyen de tubifex (Tubifex tubificus) contaminés.

directe du poisson par ses déjections qui est bien plus importante que sa contamination par voie alimentaire.

CONCLUSIONS - ORIENTATION DES RECHERCHES EN 1978.

En conclusion, les expériences que nous avons réalisées, bien qu'encore incomplètes, nous ont déjà permis de constater la faible part que semble avoir l'absorption alimentaire dans les phénomènes de concentrations de métaux dans les divers échelons des chaînes trophiques aquatiques. Ceci explique d'ailleurs que ce sont les échelons les plus bas (phytoplankton, par exemple) qui sont généralement les plus contaminés parce qu'ils ont un rapport surface/volume extrêmement élevé, ce qui favorise les phénomènes de contamination directe et notamment les phénomènes d'adsorption.

Exception doit cependant être faite pour le méthylmercure qui semble relativement bien assimilé par la voie alimentaire. Les études que nous avons entreprises en 1977 seront continuées et affinées en 1978, principalement dans le cadre de la chaîne trophique tubifex-guppy afin

- 1° de comparer plus quantitativement l'influence relative de l'intoxication directe et indirecte,
- 2° d'étudier l'influence de la matière en suspension dans l'eau sur les phénomènes d'intoxication directe ainsi que l'influence de la concentration en polluant de la nourriture sur le taux d'assimilation.

Il conviendra également de vérifier les hypothèses que nous avons formulées sur les vitesses d'élimination des polluants considérés.

Enfin, nous comparerons les résultats obtenus sur cette chaîne alimentaire d'eau douce avec une chaîne alimentaire d'eau de mer comprenant également un poisson. Nous choisirons un téléostéen carnivore, le Serran petite chèvre (*Serranus cabrilla*), qui, maintenu dans nos aquariums, s'est révélé suffisamment vorace pour être utilisé dans ce genre d'expérience. De plus, la taille relativement importante de

ce poisson nous permettra d'étudier la répartition des polluants dans ses organes, suite à des intoxications directes ou indirectes.

ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n° 4

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES DEUX
METALLOTHIONEINES DE FOIES D'ANGUILLES
(*Anguilla anguilla*) INTOXIQUÉES PAR LE
CADMIUM.

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES DEUX METALLOTHIONEINES
DE FOIES D'ANGUILLES (*Anguilla anguilla*)
INTOXIQUEES PAR LE CADMIUM

F. FRANKENNE

INTRODUCTION

Les métallothionéines, protéines de petite taille (6 à 12.000 Daltons) possèdent une forte affinité pour le Cu^{++} , Zn^{++} , Hg^{++} et Cd^{++} , ceci en liaison avec leur contenu remarquablement élevé en cystéine ($\pm 30\%$ du total des résidus)(1,2). Leur distribution dans le monde animal est assez universelle, puisqu'on les trouve chez les mammifères (2-6) et les poissons (7,8)(au niveau du foie et du cortex rénal) aussi bien que chez les mollusques (9).

Il est probable qu'elles jouent un rôle protecteur envers les quatre métaux précités car une intoxication par ceux-ci induit un accroissement spectaculaire de la quantité de métallothionéine (10,13). Par ailleurs, leur rôle physiologique exact n'est pas encore connu à ce jour (14).

Depuis quelques années, notre laboratoire étudie ces protéines et a, notamment, participé à leur mise en évidence chez les poissons et mollusques (8,9). Ces travaux vont se poursuivre par l'étude de leur synthèse sous l'action des métaux polluants et par une approche du problème de leur rôle physiologique.

Un tel programme peut difficilement se concevoir sans une connaissance relativement précise de la protéine en cause. C'est dans cette optique que nous avons réalisé le travail décrit ici : l'isolement des métallothionéines de foie d'anguilles intoxiquées au cadmium, leur caractérisation et la mise au point d'une méthode permettant de les purifier en quantité suffisante pour entamer une étude plus poussée, au niveau notamment de la liaison métal-protéine. Différentes méthodes de purification des métallothionéines ont déjà été décrites (2,15). Après les avoir testées, nous avons rejeté plusieurs de ces techniques en raison des dénaturations qu'elles provoquent ou faibles quantités qu'elles permettent de traiter. La méthode décrite ici s'apparente à celle de BÜHLER et KAGI (6), mais avec un nombre réduit d'étapes, ce qui accroît la rapidité de préparation et diminue les pertes de matériel.

MATERIEL ET METHODES

Intoxication

Les anguilles, achetées vivantes dans le commerce, sont adaptées à l'eau de mer pendant une semaine environ. Elles sont ensuite placées dans des aquariums d'eau de mer contenant 20 ppm de CdCl_2 . L'intoxication se poursuit pendant quatre semaines.

Extraction

Les anguilles intoxiquées sont tuées puis disséquées afin d'en prélever les foies. L'extraction de ceux-ci est réalisée à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-turrax (IKA) dans deux volumes de saccharose 0.5M ($\frac{\text{volume}}{\text{poids}}$). La suspension est centrifugée à 40.000g pendant une heure, puis le culot est lavé avec un nouveau volume de saccharose 0.5M. Le culot final est éliminé et les surnageants rassemblés. Toutes ces opérations se déroulent à une température inférieure à 4°C.

Fractionnement au sulfate ammonique

Le surnageant de l'extrait est tout d'abord amené à 40% de saturation en sulfate ammonique, en maintenant le pH à une valeur de 7.8. Après une nuit dans la chambre froide, le précipité est éliminé, puis le surnageant amené à 90% de saturation pendant cinq heures. Une centrifugation de 45 minutes à 40.000g sépare le surnageant du précipité (40-90%). Le premier est éliminé, tandis que le dernier est dialysé une nuit contre du NH_4HCO_3 0.05M.

Fractionnement à l'acétone

L'acétone, portée précédemment à -30°C, est ajoutée au surnageant de l'extrait jusqu'à une concentration de 45%. Le précipité est éliminé, puis toutes les protéines du surnageant sont à leur tour précipitées par un nouvel ajout d'acétone jusqu'à une concentration de 80%. Ce dernier précipité est dissous par le minimum de NH_4HCO_3 0.05M. Toutes les opérations se déroulent à une température de 0°C.

Filtration sur tamis moléculaire

Toutes les résines ont été équilibrées dans le NH_4HCO_3 0.05M, utilisé également comme éluant dans toutes les filtrations. Les extraits, fractionnés ou non, étaient chromatographiés sur AcA54 (LKB) en chambre froide. Pour les volumes d'échantillon inférieurs à 10 ml, nous utilisons une colonne de 2.5 x 100 cm (Pharmacia), à une vitesse de \pm 30 ml/heure, en recueillant des fractions de 5 ml. Pour les volumes d'échantillon supérieurs à 10 ml, nous avons employé une colonne de 5 x 50 cm (Pharmacia), en élution ascendante, avec une vitesse de \pm 60 ml/heure et en recueillant des fractions de 10 ml.

Les dessalements étaient réalisés par filtration sur une colonne (2 x 30 cm) de Sephadex G25, à température ordinaire.

Chromatographie sur DEAE-cellulose

Avant son utilisation, la résine (Whatman DE52) est rincée plusieurs fois avec le tampon de chromatographie enrichi de NaCl à 20%, et stockée au frigo dans le même milieu. Avant la chromatographie, la résine est rincée, d'abord sur büchner, ensuite sur la colonne (2 x 25 cm) avec le tampon de départ (Tris-HCl 0.025M pH 8.5) jusqu'à obtenir l'équilibre de pH et de conductivité entre l'éluant et l'éluat. L'échantillon est filtré sur une colonne (2 x 30 cm) de Sephadex G25 équilibrée dans le tampon de chromatographie.

La figure 1 schématise le montage utilisé pour la chromatographie. L'échantillon est introduit dans la colonne au moyen de la pompe péristaltique (LKB varioperpex) délivrant 20 ml/heure. La colonne est alors éluee d'abord par 130 ml de tampon, puis par un gradient de concentration en NaCl obtenu au moyen d'un Varigrad (Büchler) dont les deux premiers compartiments contiennent 200 ml de tampon et les deux suivants, 200 ml de la même solution mais 0.6M en NaCl. On recueille des fractions de 3 ml.

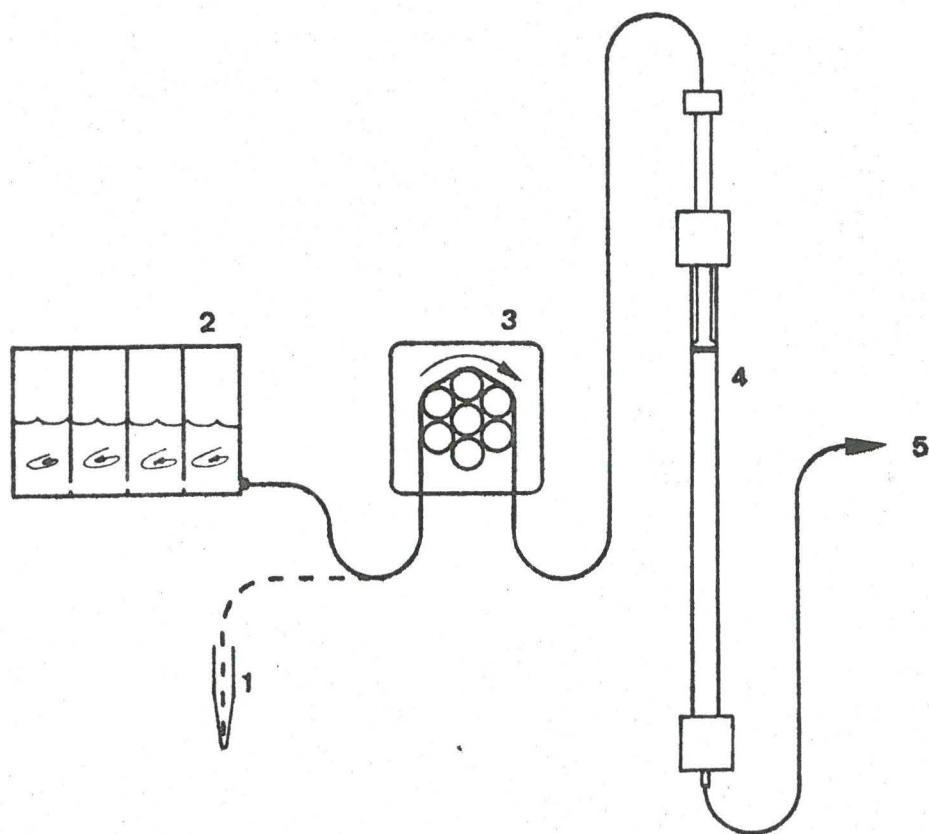


Fig.1. : Schéma du montage utilisé pour les chromatographies sur DEAE-cellulose.

1. Echantillon
2. Varigrad
3. Pompe
4. Colonne
5. Vers le collecteur.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les électrophorèses sont conduites selon PERRIE et PERRY (16) dans un appareil réalisé au laboratoire (fig.2) en utilisant les conditions suivantes :

Gel : à 50 ml d'une solution de 5g d'acrylamide (Serva) et 0.13g de N,N'-méthylènebisacrylamide (Serva) dans du Tris 0.019M, glycine 0.119M, urée 8M, pH 8.6, on ajoute 0.25 ml de persulfate ammonique à 10% dans l'eau (poids: volume) et 0.075 ml de TMED (N,N,N',N'-tetraméthyléthylène-diamine). Cette solution est immédiatement coulée dans l'appareil et on laisse le gel polymériser durant 30 minutes.

Tampon : le Tris 0.019M, glycine 0.119M, pH 8.6 est utilisé pour le compartiment anodique et cathodique.

Echantillons : avant leur application, le pH des échantillons est amené à 8.5 et on leur adjoint de l'urée et du bleu de bromophénol.

Electrophorèse : elle est conduite sous un courant constant de 13 mA (200V)(pour un gel de 1.5 x 7.5 x 140 mm) durant deux fois et demi le temps de migration du colorant. Avant l'application des échantillons, un courant constant de 13 mA est appliqué au gel jusqu'à la stabilisation de la tension.

Coloration : les protéines sont colorées par trempage de 20 minutes dans la solution suivante : 1.25g de bleu de coomassie, 227 ml de méthanol et 46 ml d'acide acétique, amenée à 500 ml par de l'eau.

La décoloration du gel est obtenue par trempage dans la solution suivante : un volume d'acide acétique, deux volumes de méthanol et sept volumes d'eau.

Dosage des métaux

Un spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme (Perkin-Elmer 370A) nous a servi à déterminer la concen-

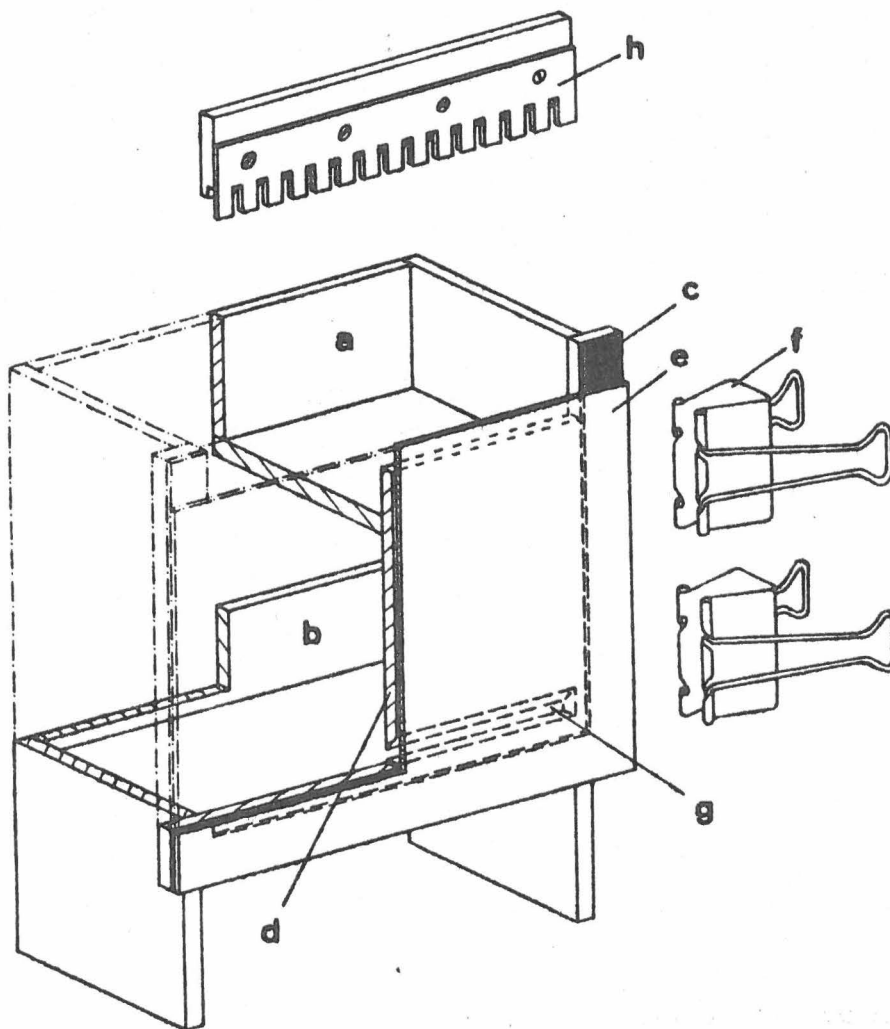


Fig.2. : Appareil utilisé pour l'électrophorèse sur plaque de polyacrylamide :

- a. compartiment cathodique
- b. compartiment anodique
- c. joint en U (caoutchouc)
- d. paroi frontale fixe
- e. paroi frontale amovible (verre)
- f. pince de serrage
- g. fente permettant la communication du gel avec le compartiment anodique
- h. peigne, en Teflon, servant à former dans la partie supérieure du gel, des cavités pour le dépôt des échantillons.

Le corps de l'appareil est réalisé en Plexiglas. Le gel est coulé entre la paroi frontale fixe (d) et la paroi frontale amovible (e).

tration en Cd^{++} , Cu^{++} et Zn^{++} dans les solutions.

Pour déterminer le contenu en métal dans des portions de gel de polyacrylamide, ceux-ci sont préalablement solubilisés par incubation de 48 heures à 50°C dans H_2O_2 à 50%. Le prélèvement des fragments à analyser se fait avant la coloration du gel.

Analyses d'acides aminés

Oxydation performique (17) : l'échantillon est dissous dans 0.5 ml d'acide formique et 0.1 ml de méthanol, et reste 30 minutes à -5°C . On lui ajoute 1 ml de la solution suivante : 4.75 ml d'acide formique et 0.25 ml d' H_2O_2 à 30% incubée 2 heures à 30°C puis 30 minutes à -5°C . Après deux heures, l'échantillon est dilué par 16 ml d'eau froide, puis lyophilisé .

Hydrolyse et analyse : les échantillons lyophilisés sont hydrolysés dans des tubes scellés sous vide, par 1 ml d'acide chlorhydrique 5.6N, à 110°C pendant 24, 48 ou 72 heures. Le réactif est ensuite éliminé sous pression réduite, dans un exsiccateur.

L'hydrolysate redissous dans un tampon citrate de pH 2.2 est injecté dans un analyseur automatique d'acides aminés (Beckman, type 120B), fonctionnant selon la méthode de BENSON et PATTERSON (18).

Spectre ultra-violet

Les spectres des protéines dissoutes dans NH_4HCO_3 0.05M ont été enregistrés au moyen d'un appareil Optica (Milan).

RESULTATS

Le surnageant d'un extrait de 2g de foie est filtré sur une colonne (2.5 x 100 cm) d'AcA54 0.5M. Au volume d'élution des poids moléculaires de ± 10.000 Daltons, apparaît un pic d'absorbance à 250 nm (fig. 3), longueur d'onde à laquelle les métallothionéines sont réputées présenter une forte absorption, au contraire des autres protéines.

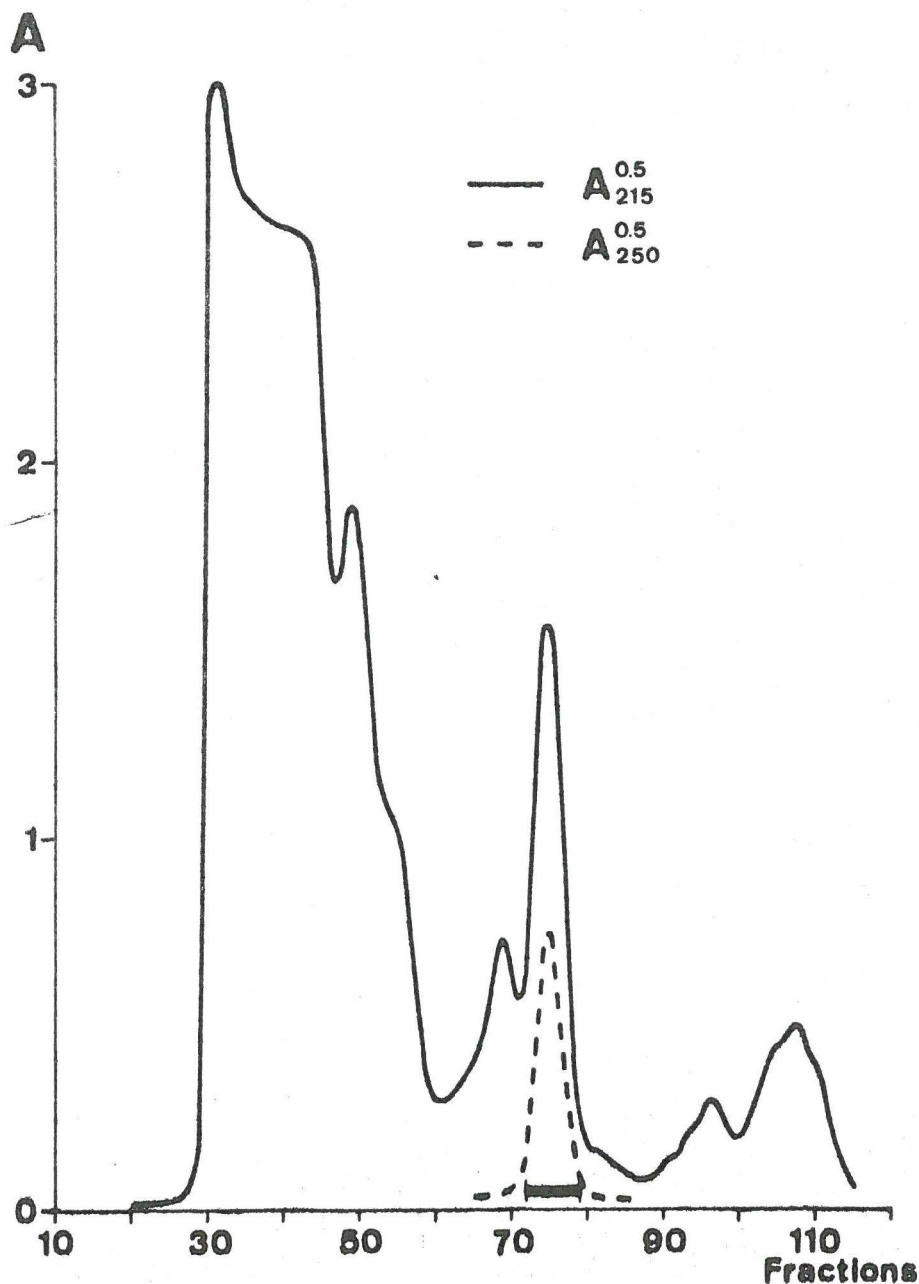


Fig.3. : Filtration sur AcA54 (2.5 x 100 cm) d'un extrait de 2g de foie d'anguille intoxiquée. Eluant ; NH_4HCO_3 0.05M ; vitesse d'élution : 30 ml/h ; fractions : 5 ml.

Les fractions correspondant à ce pic sont rassemblées puis concentrées par ultrafiltration sur une membrane Amicon UM2, avant d'être analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (fig. 4). Le pic se révèle ainsi constitué de trois composants principaux. D'autre part, le dosage du Cd par spectrométrie d'absorption atomique, sur des portions de gel solubilisées (fig. 5) indique que les deux composants les plus véloces à l'électrophorèse contiennent des quantités appréciables de ce métal et correspondent donc probablement aux métallothionéines.

Pour passer à un autre stade de purification, il était nécessaire de partir d'une plus grande quantité de matériel. Mais pour obtenir la résolution optimum en gel-filtration, il aurait alors fallu utiliser des colonnes gigantesques de tamis moléculaire pour éviter une contamination par les plus grosses protéines.

Nous avons plutôt cherché à éliminer une partie de celles-ci par précipitation. Nous avons tout d'abord testé le fractionnement au sulfate ammonique car celui-ci provoque en général le moins de dénaturation. Plusieurs essais nous ont démontré que ce n'est pas le cas avec les métallothionéines car l'absorbance à 250 nm, ainsi que la quantité de Cd fixé aux protéines, diminuent dramatiquement au bout de quelques jours dans les extraits ainsi traités.

Par contre, le fractionnement à l'acétone ne provoque pas ce phénomène.

Le précipité 45-80% obtenu à partir de 8g d'organe est dissous dans le minimum de NH_4HCO_3 froid puis filtré sur une colonne (5 x 50 cm) d'AcA54. Le pic d'absorbance à 250 nm est identique à celui obtenu précédemment comme le prouve l'analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (fig. 6).

Pour isoler les métallothionéines de cette fraction obtenue par gel-filtration, nous avons choisi d'utiliser la chromatographie sur une résine échangeuse d'ion : la DEAE-cellulose.

Les fractions, rassemblées et concentrées, sont

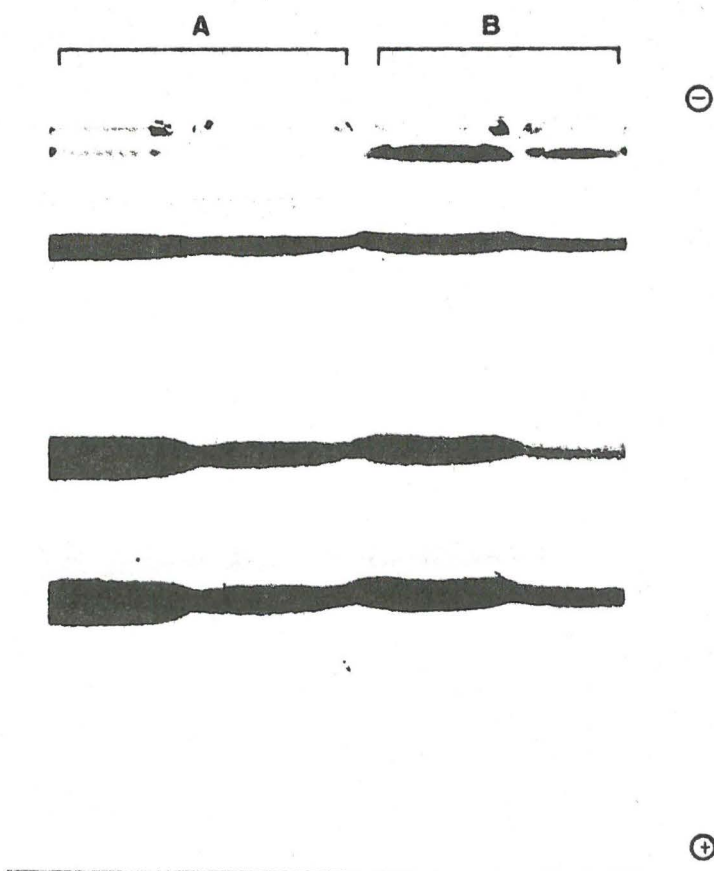


Fig.4. : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des pics d'absorbance à 250 m μ obtenus lors de la filtration sur AcA54 :

A. de l'extrait total de foies d'anguilles intoxiquées
 B. du précipité 45-80% d'un même extrait fractionné à l'acétone.

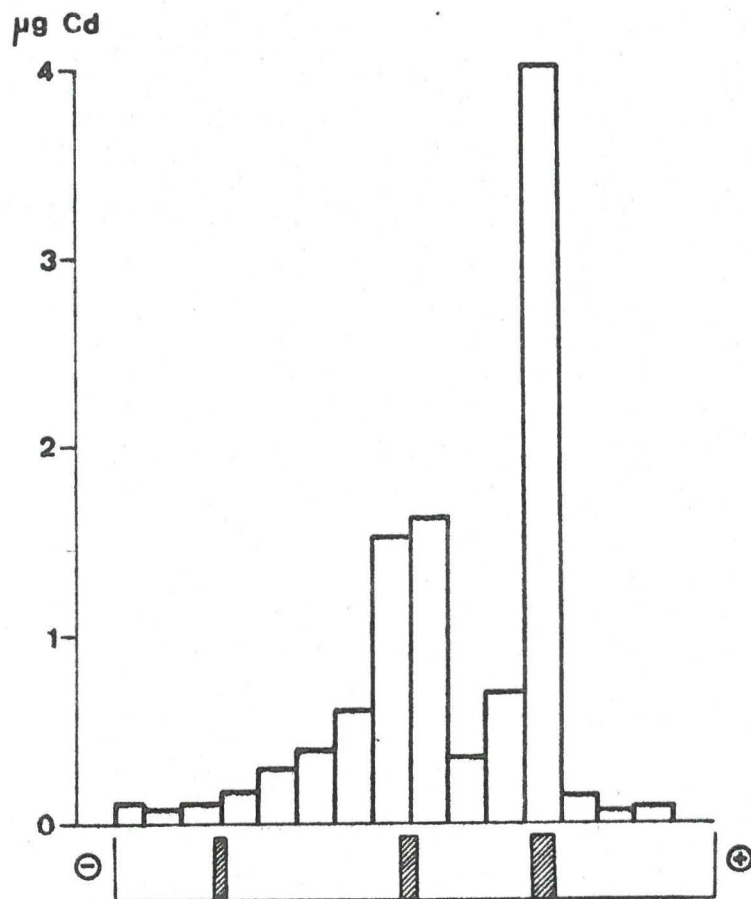


Fig.5. : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de la fraction absorbant à 250 m μ obtenue par filtration sur AcA54 d'un extrait de foies d'anguilles intoxiquées (cf. fig.3 et 4A) : variation de la teneur en Cd en fonction de la vitesse de migration. La largeur des colonnes correspond à celle des portions de gel, la hauteur à leur contenu en cadmium.

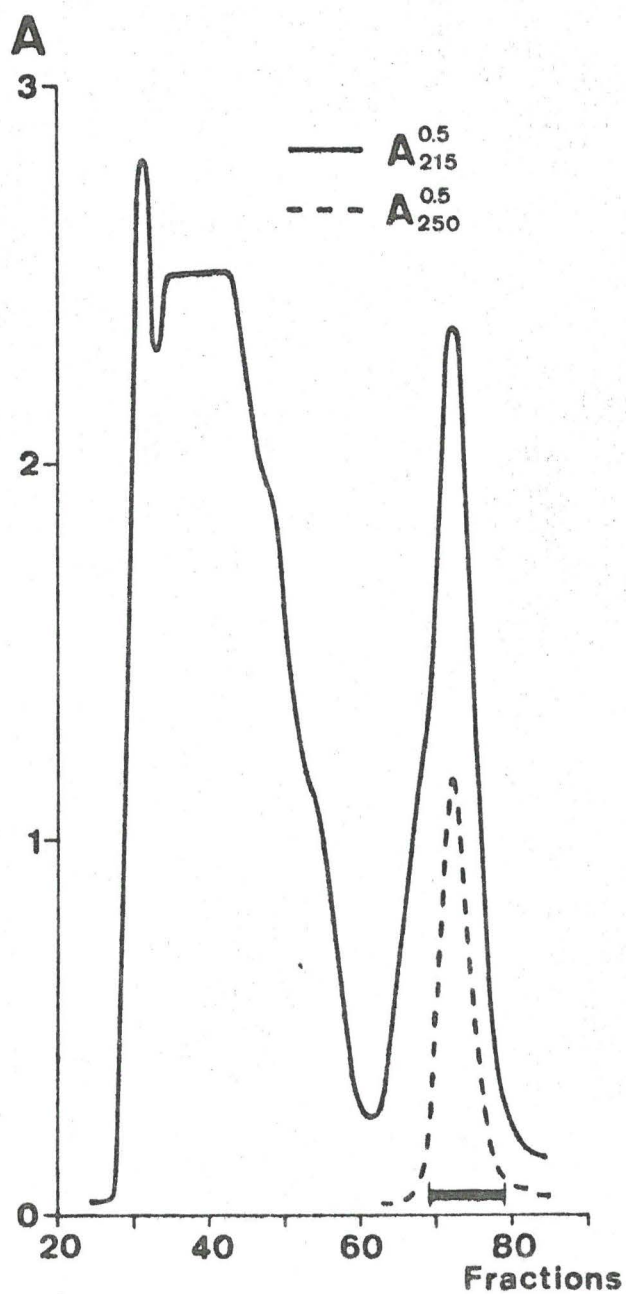


Fig.6. : Filtration sur AcA54 (5x50cm) de la fraction acétonique 45-80% d'un extrait de 8g de foies d'anguilles intoxiquées. Eluant : NH_4HCO_3 0.05M ; vitesse d'élution : 60 ml/h ; fractions : 10 ml.

équilibrées dans le nouveau tampon par filtration sur Sephadex G25. Après une nouvelle concentration, le mélange est déposé sur la colonne (1.5 x 20 cm). Après avoir testé plusieurs domaines de pH et de force ionique, une résolution satisfaisante a été obtenue dans les conditions suivantes : la résine est équilibrée dans le tampon Tris-HCl 0.025M, pH 8.5 et l'élution est réalisée d'abord avec ce tampon seul, puis avec un gradient de NaCl allant jusque 0.6M.

De la sorte, trois pics sont obtenus (fig.7). Les deux plus retardés présentent une absorbance nette à 250 nm et correspondent chacun à une seule bande sur gel de polyacrylamide (fig.8). Il s'agit des deux composants riches en cadmium apparaissant sur l'électrophorèse du pic d'absorbance à 250 nm obtenu sur AcA54.

La caractérisation de ces deux protéines prouve qu'elles appartiennent à la famille des métallothionéines.

Le spectre ultra-violet (fig.9) est très caractéristique : épaulement à 250 nm et absence d'absorbance à 280 nm, ce dernier point indiquant l'absence de tyrosine et de tryptophane.

Très typique également, la composition en acides aminés : très grosse proportion de cystéine (30%), grande quantité de lysine (11 à 12.5%), de thréonine (13 à 14.5%) et de sérine (12 à 13.5%). En plus de la tyrosine et du tryptophane, absence de phénylalanine, de leucine, d'isoleucine, d'arginine et d'histidine (tableau I).

Enfin, ces protéines fixent de grandes quantités de métaux (Cd, Zn, Cu)(tableau II) : 15.5 et 16.5 ions-grammes par 30 résidus de cystéine, soit un rapport de deux cystéines pour un métal.

REFERENCES

1. KOJUMA, Y., BERGER, C., VALLEE, B.L. et KÄGI, J.H.R. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1976), 73, 3413-3417.
2. NORDBERG, M., NORDBERG, G.F. et PISCATOR, M. Environ. Physiol. Biochem. (1975), 5, 396-403.

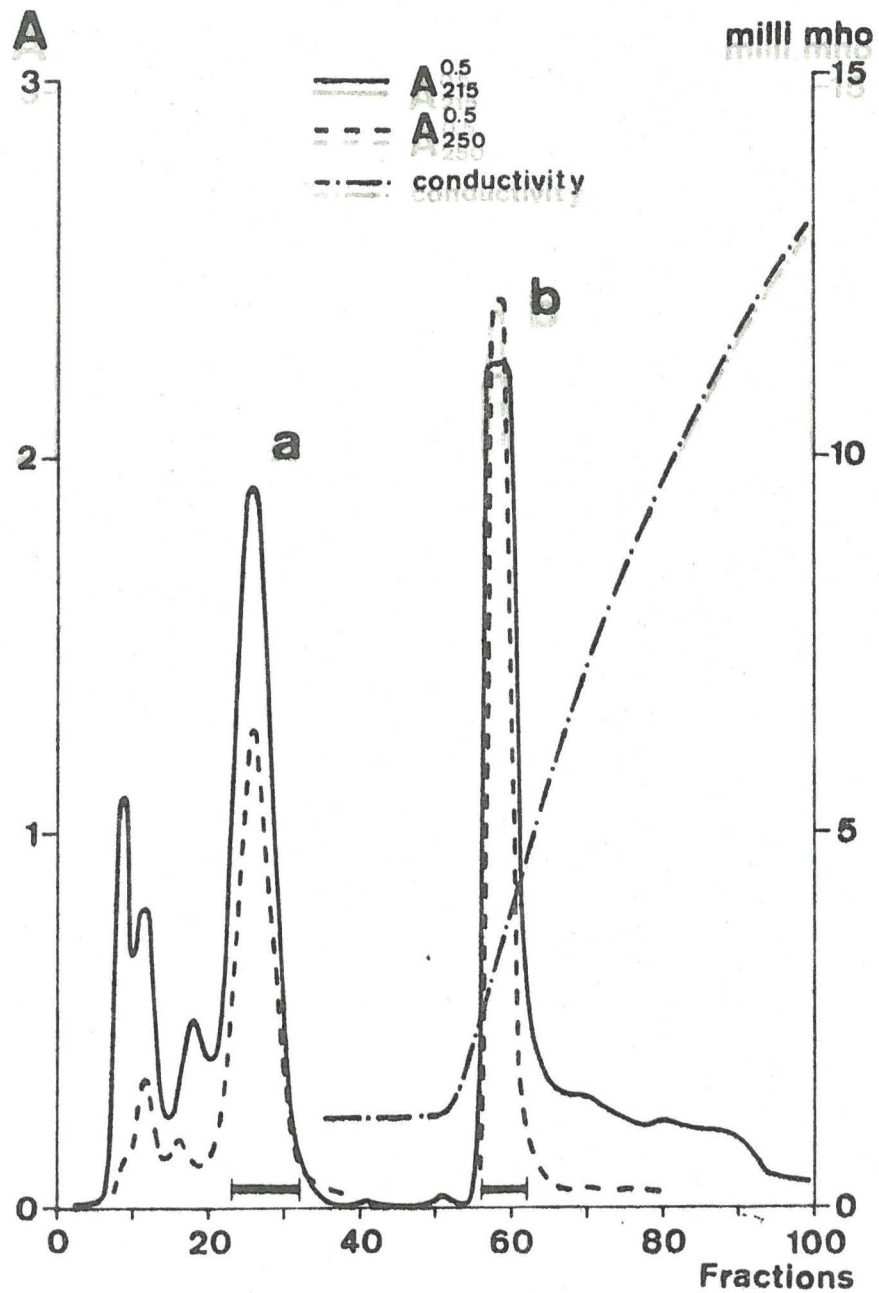


Fig.7. : Chromatographie sur DEAE-cellulose de la fraction contenant les métallothionéines après filtration sur AcA54 (cf. fig.6). Les conditions de chromatographie sont reprises dans le texte.

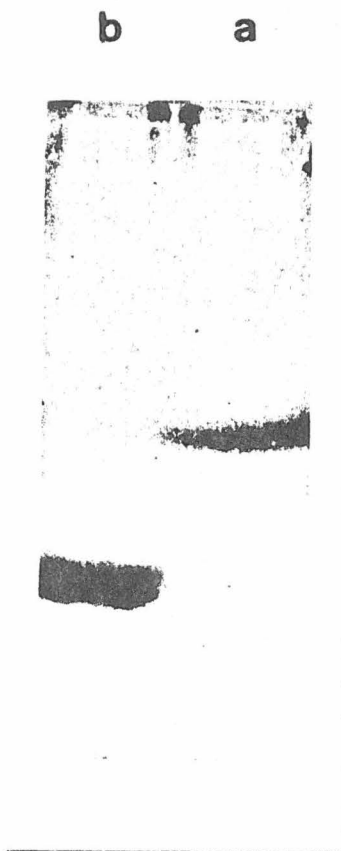


Fig.8. : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide des fractions a et b de la chromatographie sur DEAE-cellulose (cf.fig.7).

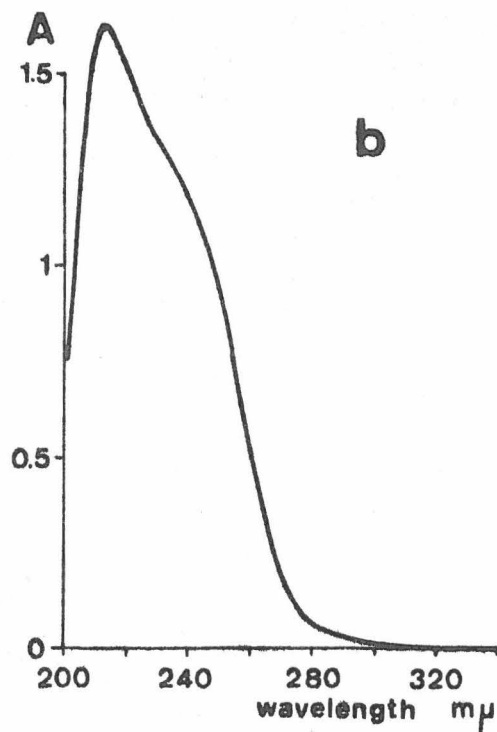
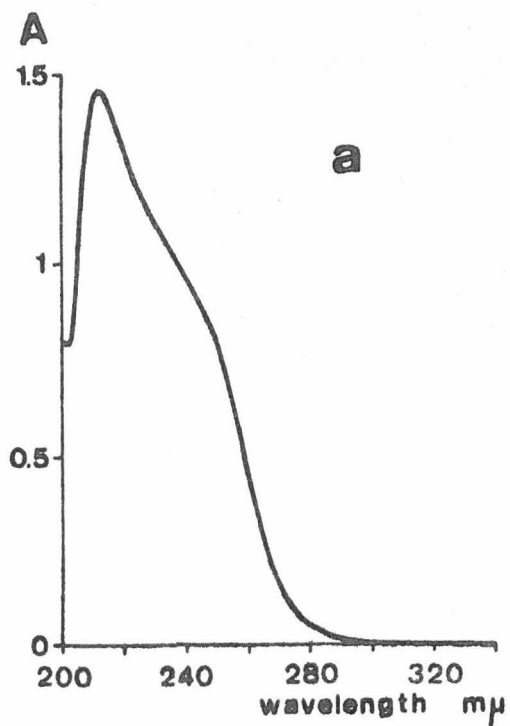


Fig.9. : Spectres ultra-violet des métallothionéines a et b.

TABLEAU I : Composition en acides aminés des métallothionéines A et B (MTA et MTB) du foie d'anguille intoxiquée au cadmium.

Acides Aminés	Nombre de résidus				
		MTA		MTB	
	pour 100	pour 96		pour 100	pour 92
Lys □	12.46	12	(12)	11.00	10.1 (10)
His □	0	0		0	0
Arg □	0	0		0	0
Asp] □	7.23	7	(7)	8.78	8.1 (8)
Asn]					
Thr *	12.98	12.5	(12-13)	14.60	13.4 (13-14)
Ser *	13.5	13	(13)	11.82	10.9 (11)
Glu] □	1.99	1.9	(2)	2.09	1.9 (2)
Gln]					
Pro □	3.19	3.1	(3)	3.38	3.1 (3)
Gly □	8.49	8.2	(8)	8.85	8.1 (8)
Ala □	5.11	4.9	(5)	5.29	4.9 (5)
¹ / ₂ Cys △	31.15	29.7	(30)	30.40	27.9 (28)
Val +	2.18	2.1	(2)	2.18	2 (2)
Met ‡	1.66	1.6	(1-2)	1.63	1.5 (1-2)
Ile □	0	0		0	0
Leu □	0	0		0	0
Tyr □	0	0		0	0
Phe □	0	0		0	0
Trp ○	0	0		0	0

□ : moyenne des valeurs obtenues après 24, 48 et 72h d'hydrolyse.
 * : valeur déterminée par extrapolation à un temps d'hydrolyse égal à zéro

△ : dosée comme acide cystéique

+ : valeur obtenue après 72h d'hydrolyse

‡ : dosée comme méthionine sulfone

○ : l'absence de tryptophane est déduite de l'absorbance des protéines à 280 nm.

TABLEAU II : Contenu en métaux des métallothionéines A et B exprimé en atome-grammes de métal pour 30 résidus de cystéine.

	Cd	Zn	Cu	Total
MTA	11.5	1.8	2.1	15.4
MTB	12.4	2.7	1.4	16.5

3. SYVERSEN, T.L.M. Arch. Environ. Health (1975), 30, 158-161.
4. KÄGI, J.H.R. et VALLEE, B.L. J. Biol. Chem. (1961), 236, 2435-2442.
5. LEE, S.S., MATE, B.R., VON DER TRENCK, K.T., RIMERMAN, R.A. et BÜHLER, D.R. Comp. Biochem. Physiol. (1977), 576, 45-53.
6. BÜHLER, R.H.O. et KÄGI, J.H.R. FEBS Letters (1974), 39, 229-234.
7. MARAFANTE, E. Experientia (1976), 32, 149-150.
8. BOUQUEGNEAU, J.M., GERDAY, Ch. et DISTECHE, A. FEBS Letters (1975), 55, 173-177.
9. NOËL-LAMBOT, F. Experientia (1976), 32, 324-325.
10. BREMNER, I. et DAVIES, N.T. Biochem. J. (1975), 149, 733-738.
11. CEMPEL, M. et WEBB, M. Biochem. Pharmacol. (1976), 25, 2067-2071.
12. RICHARDS, M.P. et COUSINS, R.J. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1975), 64, 1215-1233.
13. RIORDAN, J.R. et GOWER, I. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1975), 66, 678-685.
14. CHEN, R.W., WHANGER, P.D. et WESWIG, P.H. Biochem. Médecine (1975), 12, 95-105.
15. CHERIAN, M.G. Biochem. Biophys. Res. Comm. (1974), 61, 920-926.
16. PERRIE, W.T. et PERRY, S.V. Biochem. J. (1970), 119, 31-38.
17. HIRS, C.H.W. Methods Enzymol. (1967), 11, 197.
18. BENSON, I.V. et PATTERSON, J.A. Analyt. Chem. (1965), 37, 1108-1110.

ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n° 5

ISOLEMENT ET CARACTÉRISATION DES
METALLOTHIONEINES CHEZ LA MOULE
Mytilus edulis.

ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES METALLOTHIONEINES
CHEZ LA MOULE *Mytilus edulis*

F. FRANKENNE

INTRODUCTION

Les métallothionéines, protéines de petite taille (environ 10.000 Daltons), remarquables par leur affinité pour les métaux lourds et leur teneur élevée en cystéine (environ 30% des résidus) ont été tout d'abord mises en évidence chez les mammifères^{1,5}. Plus récemment, leur présence a été détectée chez des poissons^{6,7} et dans un travail récent, nous avons isolé et caractérisé deux composants à partir de foies d'anguilles intoxiquées au cadmium (résultats non publiés).

Il nous a paru intéressant de chercher à savoir si les invertébrés synthétisaient également des métallothionéines. Une première approche du problème a donné des indications dans ce sens en révélant la présence, dans la fraction des protéines d'environ 10.000 Daltons, de composants riches en cadmium chez des moules intoxiquées par ce métal⁸.

Dans ce travail, nous avons voulu isoler les composants riches en cadmium et les caractériser de manière à établir ou non leur appartenance à la famille des métallothionéines.

MATERIEL ET METHODES

Intoxication

Les moules, achetées vivantes dans le commerce, sont placées dans des aquariums d'eau de mer contenant 0,2 ppm de CdCl₂. L'intoxication se poursuit pendant deux semaines.

Extraction

L'extraction des moules débarrassées de leur coquille est réalisée à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-turrax

(IKA) dans deux volumes de saccharose 0.5M ($\frac{\text{volume}}{\text{po\ddot{e}ds}}$). La suspension est centrifugée à 40.000g pendant une heure, puis le culot est lavé avec un nouveau volume de saccharose 0.5M. Le culot final est éliminé et les surnageants rassemblés. Toutes ces opérations se déroulent à une température inférieure à 4°C.

Fractionnement à l'acétone

L'acétone, à -30°C, est ajoutée au surnageant de l'extrait jusqu'à une concentration de 45%. Le précipité est éliminé, puis toutes les protéines du surnageant sont à leur tour précipitées par un nouvel ajout d'acétone jusqu'à une concentration de 80%. Ce dernier précipité est dissous par le minimum de NH_4HCO_3 0.05M. Toutes les opérations se déroulent à une température de 0°C.

Filtration sur tamis moléculaire

Toutes les résines ont été équilibrées dans le NH_4HCO_3 0.05M, utilisé également comme éluant dans toutes les filtrations. La fraction acétonique contenant les métallothionéines a été chromatographiée à 4°C sur une colonne (5 x 50 cm) de résine AcA54 (LKB) en élution ascendante, à une vitesse d'environ 60 ml/heure et en recueillant des fractions de 10 ml.

Les dessalements étaient réalisés par filtration sur une colonne (2 x 30 cm) de Sephadex G25, à température ordinaire.

Chromatographie sur DEAE-cellulose

Avant son utilisation, la résine (Whatman DE52) est rincée plusieurs fois avec le tampon de chromatographie enrichi de NaCl à 20%, et stockée au frigo dans le même milieu. Avant la chromatographie, la résine est rincée, d'abord sur büchner, ensuite sur la colonne (2 x 25 cm) avec le tampon de départ (Tris-HCl 0.025M pH 8.5) jusqu'à obtenir l'équilibre de pH et de conductivité entre l'éluant et l'éluat. L'échantillon est filtré sur une colonne (2 x 30 cm) de Sephadex G25 équilibri-

brée dans le tampon de chromatographie.

L'échantillon est introduit dans la colonne au moyen de la pompe péristaltique (LKB varioperpex) délivrant 20 ml/heure. La colonne est alors éluée d'abord par 70 ml de tampon, puis par un gradient de concentration en NaCl obtenu au moyen d'un Varigrad (Büchler) dont les deux premiers compartiments contiennent 150 ml de tampon et les deux suivants, 150 ml de la même solution mais 0.6M en NaCl. On recueille des fractions de 3 ml.

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les électrophorèses sont conduites selon PERRIE et PERRY⁹ dans un appareil réalisé au laboratoire en utilisant les conditions suivantes :

Gel : à 50 ml d'une solution de 5g d'acrylamide (Serva) et 0.13g de N,N'-méthylènebisacrylamide (Serva) dans du Tris 0.019M, glycine 0.119M, urée 8M, pH 8.6, on ajoute 0.25 ml de persulfate ammonique à 10% dans l'eau (poids : volume) et 0.075 ml de TMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylène-diamine). Cette solution est immédiatement coulée dans l'appareil et on laisse le gel polymériser durant 30 minutes.

Tampon : le Tris 0.019M, glycine 0.119M, pH 8.6 est utilisé pour le compartiment anodique et cathodique.

Echantillons : avant leur application, le pH des échantillons est amené à 8.5 et on leur adjoint de l'urée et du bleu de bromophénol.

Electrophorèse : elle est conduite sous un courant constant de 13 mA (200V) (pour un gel de 1.5 x 7.5 x 140 mm) durant deux fois et demi le temps de migration du colorant. Avant l'application des échantillons, un courant constant de 13 mA est appliqué au gel jusqu'à la stabilisation de la tension.

Coloration : les protéines sont colorées par trempage de 20 minutes dans la solution suivante : 1.25g de bleu de coomassie, 227 ml de méthanol et 46 ml d'acide acétique, amenée à 500 ml par de l'eau.

La décoloration du gel est obtenue par trempage dans la solution suivante : un volume d'acide acétique, deux volumes de méthanol et sept volumes d'eau.

Dosage des métaux

Un spectrophotomètre d'absorption atomique à flamme (Perkin-Elmer 370A) nous a servi à déterminer la concentration en Cd^{++} , Cu^{++} et Zn^{++} dans les solutions.

Pour déterminer le contenu en métal dans des portions de gel de polyacrylamide, ceux-ci sont préalablement solubilisés par incubation de 48 heures à 50°C dans H_2O_2 à 50%. Le prélèvement des fragments à analyser se fait avant la coloration du gel.

Analyses d'acides aminés

Oxydation performique¹⁰ : l'échantillon est dissous dans 0.5 ml d'acide formique et 0.1 ml de méthanol, et reste 30 minutes à -5°C . On lui ajoute 1 ml de la solution suivante : 4.75 ml d'acide formique et 0.25 ml d' H_2O_2 à 30% incubée 2 heures à 30°C puis 30 minutes à -5°C . Après deux heures, l'échantillon est dilué par 16 ml d'eau froide, puis lyophilisé.

Hydrolyse et analyse : les échantillons lyophilisés sont hydrolysés dans des tubes scellés sous vide, par 1 ml d'acide chlorhydrique 5.6N, à 110°C pendant 24, 48 ou 72 heures. Le réactif est ensuite éliminé sous pression réduite, dans un exsiccateur.

L'hydrolysate redissous dans un tampon citrate de pH 2.2 est injecté dans un analyseur automatique d'acides aminés (Beckman, type 120B), fonctionnant selon la méthode de BENSON et PATTERSON¹¹.

Spectre ultra-violet

Les spectres des protéines dissoutes dans NH_4HCO_3 0.05M ont été enregistrés au moyen d'un appareil Hitachi Perkin-Elmer 124.

RESULTATS

Un extrait de 34g de moules intoxiquées est soumis au fractionnement acétonique. Le précipité 45-80%, redissous par un minimum de NH_4HCO_3 0.05M est immédiatement filtré sur AcA54 (5 x 50 cm). Le diagramme d'élution (fig.1) indique un pic d'absorbance à 250 m μ au volume d'élution des protéines d'environ 10.000 Daltons. Or, parmi les protéines de ce poids moléculaire, seules les métallothionéines sont susceptibles de présenter une absorption marquée à cette longueur d'onde.

Les fractions correspondant à ce pic sont donc rassemblées, puis concentrées sur membrane Amicon UM2 jusque 5 ml. Des aliquots de 50 μ l, soumis à l'électrophorèse sur polyacrylamide, révèlent que le pic contient huit composants principaux, dont six de mobilité très élevée et qui contiennent du cadmium (fig.2). Ces derniers correspondent donc très probablement à des métallothionéines.

Nous avons tenté, dans un stade ultérieur de purification, d'éliminer de ce mélange les composants ne fixant pas le cadmium. Pour cela, nous avons chromatographié la fraction sur DEAE-cellulose (1.5 x 20 cm) avec le tampon Tris-HCl 0.015M pH 8.5 et un gradient croissant en NaCl. Comme le montre la fig.3, un seul pic très étalé apparaît à 215 m μ , mais le pic correspondant à 250 m μ est bien plus étroit.

Les fractions correspondant au pic d'absorption à 250 m μ sont rassemblées, concentrées puis dessalées par filtration sur Sephadex G25 (2 x 20 cm) équilibrée dans NH_4HCO_3 0.05M.

L'électrophorèse sur polyacrylamide d'aliquotes de cette fraction (fig.4) montre qu'elle est uniquement composée des protéines fixant le cadmium.

Le spectre ultra-violet de cette fraction (fig.5) est très caractéristique des métallothionéines : épaulement marqué à 250 m μ et absence d'absorbance à 280 m μ , témoin de l'absence de tyrosine et de tryptophane.

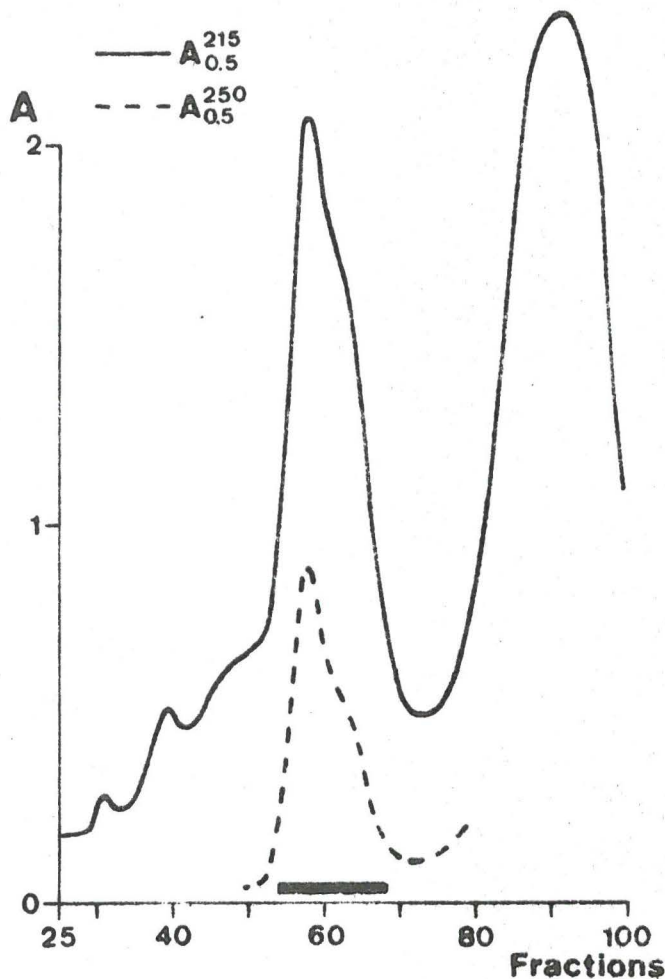


Fig.1. : Filtration sur AcA 54 (5 x 50 cm) de la fraction acétonique 45-80% d'un extrait de 34 grs de moules intoxiquées. Eluant : NH_4HCO_3 0.05M ; vitesse d'élution : 60 ml/h ; fractions : 10 r

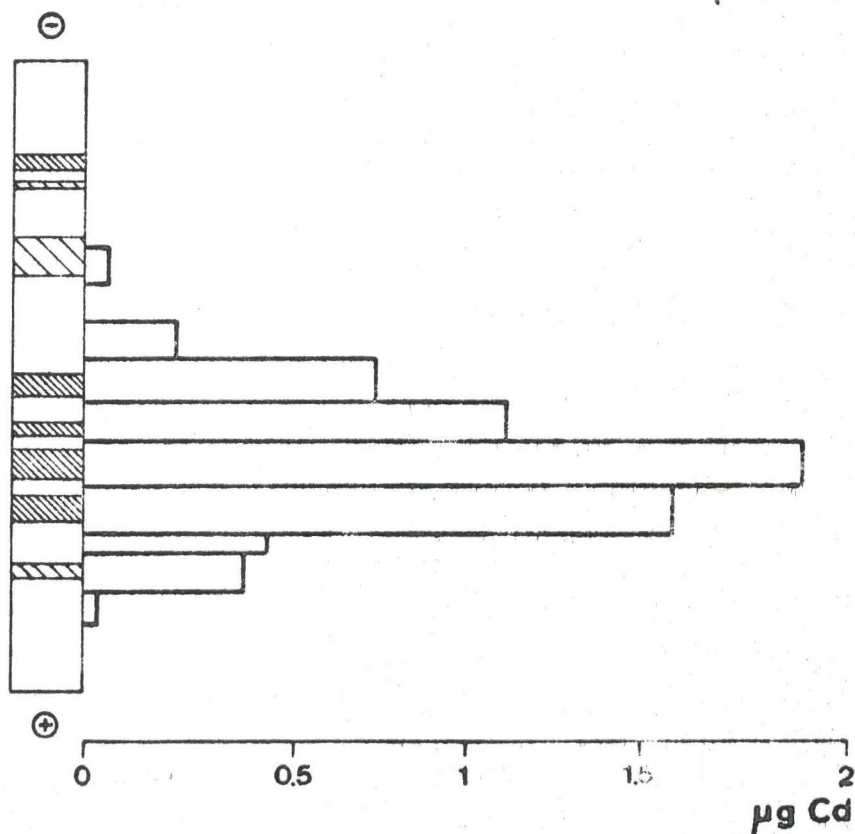


Fig.2. : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide de la fraction absorbant à 250 nm lors de la filtration sur AcA 54 (voir fig.1). Variation de la teneur en Cd en fonction de la vitesse de migration

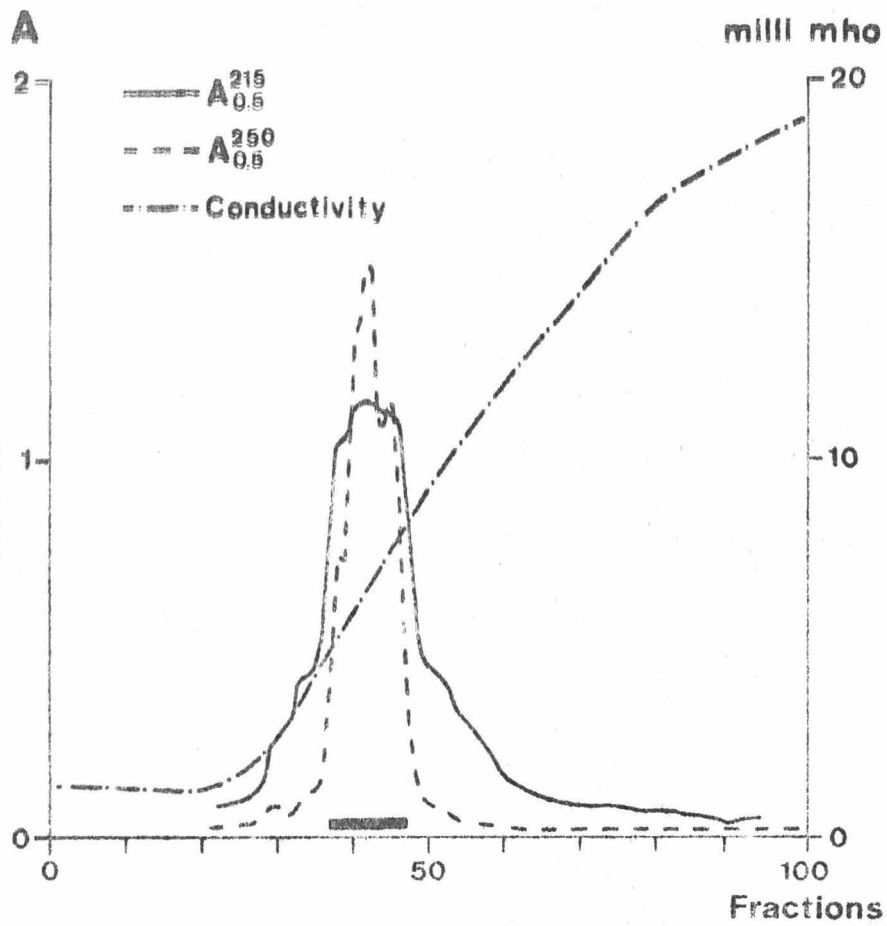


Fig.3. : Chromatographie sur DEAE-cellulose de la fraction contenant les métallothionéines, après filtration sur AcA 54 (voir fig.1). Les conditions de chromatographie sont reprises dans le texte.

⊖



Fig.4. : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide du pic d'absorbance à 250 nm obtenu par chromatographie sur DEAE-cellulose (voir fig.3).

⊕

TABLEAU 1 : Composition en acides aminés de la fraction métallothionéine isolée à partir de moules intoxiquées au cadmium. Valeurs obtenues après 24 heures d'hydrolyse. La cystéine est dosée après oxydation en acide cystéique. L'absence de tryptophane est déduite de la non-absorbance de la fraction à 280 nm (voir fig.5).

<u>Acides aminés</u>	<u>%</u>
Lys	7.7
His	-
Arg	1.8
Asx	8.1
Thr	6.4
Ser	7.9
Glu	4.5
Pro	6.8
Gly	15.8
Ala	5.2
1/2 Cys	25.5
Val	3.8
Met	-
Ile	4
Leu	1.3
Tyr	-
Phe	1.3

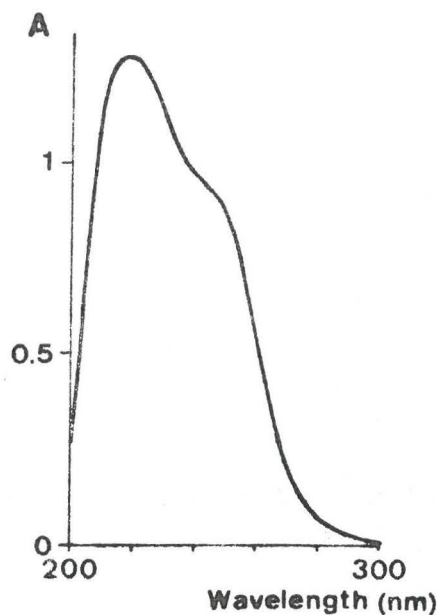


Fig.5. : Spectre UV des métallothionéines de moule.

La composition en acides aminés est également très révélatrice par la très grosse proportion de cystéine (supérieure à 25%) et l'absence ou la présence en très faibles quantités de tyrosine, tryptophane, phénylalanine, leucine, arginine et histidine (tableau 1).

D'autre part, les protéines de cette fraction fixent 9.5 atome-grammes de cadmium, 0.25 atome-gramme de zinc et 0.25 atome-gramme de cuivre par 30 résidus cystéinyles, soit trois cystéines par atome-gramme de métal lourd.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Ces caractéristiques sont tout-à-fait comparables à celles que présentent les métallothionéines extraites jusqu'à présent des poissons et des mammifères. Cette similitude prouve l'appartenance des composants que nous avons isolés à cette famille de protéines.

En raison de la liaison qui a été mise en évidence entre la quantité de métallothionéines présentes dans l'organisme et le degré d'intoxication par les métaux lourds, d'aucuns ont émis l'hypothèse que ces protéines seraient impliquées dans un mécanisme de protection contre de telles intoxications^{12,13}. Dans ce cas, la découverte de métallothionéines chez un invertébré indique que ce mécanisme devrait être considéré comme très universel.

BIBLIOGRAPHIE

1. NORDBERG, M., NORDBERG, G.F. et PISCATOR, M. Environ. Physiol. Biochem. (1975), 5, 396-403.
2. SYVERSEN, T.L.M. Arch. Environ. Health (1975), 30, 158-161.
3. KAGI, J.H.R. et VALLEE, B.L. J. Biol. Chem. (1961), 236, 2435-2442.
4. BÜHLER, R.H.O. et KAGI, J.H.R. FEBS Letters (1974), 39, 229-234.
5. LEE, S.S., MATE, B.R., VON DER TRENCK, K.T., RIMERMAN, R.A. et BÜHLER, D.R. Comp. Biochem. Physiol. (1977), 57C, 45-53.
6. OLAFSON, R.W. et THOMPSON, J.A.J. Mar. Biol. (1974), 28, 83-86.

ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n° 6

DISTRIBUTION OF Cd, Zn and Cu IN LIVER AND
GILLS OF THE EEL *Anguilla anguilla* WITH SPECIAL
REFERENCE TO METALLOTHIONEINS.

(soumis à Comp. Biochem. Phys. pour publication)

DISTRIBUTION OF Cd, Zn AND Cu IN LIVER AND GILLS OF THE EEL
Anguilla anguilla WITH SPECIAL REFERENCE TO METALLOTHIONEINS.

F. NOEL-LAMBOT, Ch. GERDAY* and A. DISTECHE

Laboratory of Oceanology and Laboratory of Muscle Biochemistry* -
University of Liège - Institute of Chemistry, B 4000 Liège -
Sart Tilman, BELGIUM.

ABSTRACT

1. The distribution of Cd, Zn and Cu in the soluble fraction of liver and gills of eels adapted to sea water and submitted to chronic or acute Cd exposure has been studied.
2. During a chronical intoxication, most of the Cd accumulated in both organs is bound to metallothioneins.
3. In the case of acute intoxication, only the liver accumulates Cd as Cd-thioneins.
4. Metallothioneins are present in the liver of non Cd-exposed eels but in lower amount than in chronically intoxicated animals. They are principally under the form of Zn and Cu derivatives. In the gills, the metallothioneins do not exist in detectable amount.
5. The overall characteristics of metallothioneins isolated from eel liver are very similar to those of metallothioneins obtained from mammalian tissues.

INTRODUCTION

Metallothioneins, low molecular weight proteins unique in their high cysteine and metal content were originally isolated and characterized from equine kidney by MARGOSHES & VALLEE (1957) and KÄGI & VALLEE (1960, 1961). Similar proteins were also identified in liver and kidneys of other mammal species (PULIDO et al, 1966 ; BREMNER & MARSHALL, 1974 ; BUHLER & KÄGI, 1974 ; KÄGI et al, 1974). In most cases, kidney metallothioneins contain Cd and Zn in about equal proportions whereas in liver metallothioneins, Zn is the predominant metallic species and is accompanied by only small amounts of Cd and Cu.

Although metallothioneins are present in low concentra-

The organs were homogenized in three volumes of 0.5M sucrose by means of a Polytron Homogenizer. The supernatants obtained by centrifugation at 100,000g for 1 hr at 4°C were then stored in a deep freezer or used immediately. The resolution of the supernatant into different metal containing fractions was made by chromatography at 4°C on a Sephadex G-75 column (76x3cm) equilibrated in 0.05M NH_4HCO_3 . Absorbance measurements of the eluted fractions were made using an U.V. spectrophotometer Zeiss PMQ II. The fractions were directly analysed for Cd, Zn and Cu by atomic absorption spectrophotometry (Perkin Elmer, Model 103). The overall concentrations of metals in the tissues and in the resulting supernatants and pellets of the homogenates were determined as above after mineralization in 65% HNO_3 and suitable dilution. The experiments were repeated three times. Individual samples were used for the liver, whereas for gills two of four organs were pooled.

The ultraviolet absorption spectra of the pooled chromatographic fractions corresponding to metallothioneins were taken with a double-beam spectrophotometer Hitachi Perkin-Elmer Model 124.

In vitro intoxications of excised organs were carried out as follows : homogenization was made in ammonium formate 0.01M pH 7.4 and the supernatant obtained by centrifugation of the homogenate was then divided into two equal parts. One part was directly applied on a chromatography column, whereas the second part was contaminated with Cd (solution of 500 ppm Cd as CdCl_2 in ammonium formate 0.01M pH 7.4) and stirred for 2 hours at 4°C. It was then chromatographed.

The purification of liver metallothioneins was performed on a sample from 5 eels intoxicated during 50 days in 15 ppm Cd, according to the method described by CHERIAN (1974). This procedure, based on the heat-stability of the metallothioneins, involves the following steps : homogenization, heating of the supernatant at 70°C for one minute followed by ammonium sulfate fractionation. Two precipitates corresponding to 0-40% and 40-50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturation were successively discarded by centrifugation. The latter supernatant was dialyzed against 0.01M NH_4COOH pH 7.4, concentrated to 5 ml by ultrafiltration on a UM-2 membrane (Amicon Corporation) and chromatographed on a Sephadex G-75 column (76x3cm) or on a LKB Ultrogel AcA54 column (100x2,5cm) eluted with 0.01M ammonium formate. Metallothioneins

fractions were pooled and lyophilized.

The performic acid oxydized proteins (HIRS, 1956) were hydrolysed under vacuum at 107°C during 24 hr in constant boiling HCl. Amino acid analyses were made using the procedure of BENSON & PATTERSON (1965) and a Beckman amino acid analyser Model 120B. Polyacrylamide and starch gel electrophoresis were performed according to the techniques respectively described by PERRIE and PERRY (1970) and SCOPES (1964).

RESULTS

A. Analyses of the metals distribution in the tissues.

Figures 1, 3 and 4 show the chromatographic profiles of the soluble fraction of liver and gills from eels exposed to various Cd concentrations. On all these profiles, the fraction eluted between 310 and 460 ml has been called MT fraction (metallothioneins fraction). This elution volume is identical with that observed for Hg-thionein in different eel tissues (BOUQUEGNEAU et al, 1975) and is characteristic of substances having molecular weight close to 10.000.

The amounts of Cd, Zn and Cu associated with the liver metallothioneins were obtained by summation of the metal content of the chromatographic fractions corresponding to the MT peak. The table 1 summarizes these results. The sum of the amounts of these three metals associated with the MT fraction and expressed in μ g-atom of metal/g of liver enables to estimate the relative amount of liver metallothioneins. This point will be discuss in the last section of this article.

Absence of intoxication

The small amount of Cd present in the liver of non-Cd-intoxicated animals is principally recovered, after gel fractionation of the supernatant, in the high molecular weight protein fraction (fig.1). In many individuals a little Cd can nevertheless be detected in the MT fraction (fig.1, table 1). The amount of Cd bound to metallothioneins seems to be proportional to the Cd amount in the liver (fig.2).

Liver MT fraction contains a large part of the Zn and most of the Cu present in the soluble fraction (fig.1, table 1). The Cd:Zn:Cu

molar ratio for the MT fraction indicates that Zn is a little more abundant in this fraction than Cu and that Cd constitutes a negligible part of the metals bound to liver metallothioneins.

The very weak absorbance value observed at 250 nm or at 280 nm in the MT region (fig.1) is indicative of the very low content in protein.

In the elution fractions of gill samples, Cd concentrations fall below the detection limit. Zn and Cu are almost exclusively located in the fractions of high molecular weight.

Acute intoxication (few hours in 200 ppm Cd).

Such an intoxication causes the death of eels after 5-10 hours exposure (NOEL-LAMBOT & BOUQUEGNEAU, 1977). After 5 hours exposure, most of the Cd in liver supernatant is bound to the MT fraction (table 1, fig.3). Similar Cd distribution is already obtained after 1 hour exposure. The same relation as in the previous case is observed between the percentage of Cd associated with metallothioneins and the Cd load of the liver (fig.2).

The overall metal concentration in the MT fraction is $0,25 \mu\text{g-at/g}$ liver and this is similar to the corresponding value found in control animals (table 1). Though, the molar ratio of the three metals is changed: roughly, equal amounts of Cd, Zn and Cu are bound to metallothioneins.

Note that the 250 nm absorbance of the low molecular weight Cd peak is rather weak.

In gills extracts Cd as Zn and Cu are almost exclusively bound to high molecular weight proteins.

Chronical intoxication (several weeks in 13 ppm Cd).

Cd accumulates to the greatest extent in the soluble fraction of the liver (table 1) and of the gills (fig.4). After gel fractionation of the supernatant of both organs, most of Cd is found in the MT region (fig.4).

It is worth noting that in the liver, the 250 nm absorbance follows the Cd peak, whereas there is no absorption at 280 nm.

In liver chromatogram, the Cd peak superimposes to a peak of Zn and a small peak of Cu (fig.4). The proportion of both metals to Cd in the MT fraction is however extremely low as shown by the molar ratio : Cd;Zn;Cu = 2200;300;60.

In the MT region of gills chromatogram (fig,4), Zn and Cu

concentrations fall below the detection limit. This region has no significant U.V. absorption.

From the overall metal moiety of the MT peak (table 1), one can estimate (see discussion) that the amount of metallothioneins in the liver of chronically intoxicated eels is ten times higher than in unexposed animals.

Compared with untreated animals, the total Zn load of the liver of Cd-intoxicated eels is about twice higher (table 1). This observation is confirmed by the results presented in table 2 which have been obtained from eels intoxicated during 33 days in sea water containing 15 ppm Cd compared to animals kept during the same period of time in natural sea water.

In vitro intoxication

In order to confirm the existence of metallothioneins in liver of untreated eels and to obtain information concerning the binding of Cd to liver metallothioneins, *in vitro* experiments were made. Cd added to the supernatant of liver homogenate from a non-intoxicated eel binds in about equal proportion to the high molecular weight proteins (HMW) and to metallothioneins. At the same time, Zn disappears almost completely from the MT fraction (fig.5). The amount of Cd bound to the MT fraction is equal to the amount of Zn displaced from this fraction (fig.5). No clear shift of the Cu distribution in the soluble fraction occurs. Therefore the total amount of metal bound to metallothioneins is unaffected.

Contrary to the results obtained by SUZUKI & YOSHIKAWA on rat liver (1974), Zn displaced by addition of Cd is not shifted to the high molecular weight protein fraction as shown in fig.5. Because of the affinity of Ultrogel Aca54 for heavy metals, Zn displaced from metallothioneins is rarely recovered in the salt fraction.

B. Isolation and characterization of the metal binding protein of low molecular weight found in the liver of chronically Cd-intoxicated eels.

A liver sample from chronically Cd-intoxicated eels was fractionated using the method of CHERIAN (see section material and methods). The partially purified sample was then divided into two equal parts which were chromatographed each respectively on a Sephadex G-75 column 76x3cm and on an Ultrogel Aca54 column 100x2,5cm (fig.6).

The MT fraction obtained from Sephadex G-75 column chromatography was lyophilized and analyzed by starch gel and polyacrylamide gel electrophoresis (fig.7). Both electrophoretic patterns presented two major bands corresponding to proteins having the properties of metallothioneins (FRANKENNE et al, unpublished), a third band, less prominent, corresponds to proteinic contaminant.

The single Cd peak visible by filtration on the Sephadex G-75 column (fig.6,a) is partially resolved by filtration through the Ultrogel AcA54 column (fig.6,b). In both cases the profile of the 215 nm absorbance follows the profiles of 250 nm absorbance as well as the Cd distribution. It is worth noting that this double MT peak is not observed in liver samples untreated by the Cheria method and directly applied on the Ultrogel column 100x2,5cm.

Table 3 presents the results of the amino acid analyses made on the fractions MT₁ and MT₂ (fig.6,b). The amino acid compositions of these fractions are very similar to one another and are typical of metallothioneins (WINGE & RAJAGOPALAN, 1972 ; WESER et al, 1973,b ; KIMURA et al, 1974) with a high content in cysteine and a very low content in aromatic amino acids, histidine, arginine.

The elution fractions corresponding to the MT peak visible on fig.4 were pooled, lyophilized and redissolved in distilled water after adjonction of NH₄OH 4M. The UV-absorption spectrum of the solution is shown in fig.8. This spectrum is quite identical with that published for hepatic Cd-thionein from various mammals (WESER et al, 1973,a,b ; NORDBERG et al, 1974). It is characterized by a pronounced shoulder at 250 nm due to the Cd-mercaptide and an unusually low absorbance at 280 nm caused by the absence of tyrosine and tryptophan residues.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

Cd accumulated in the eel liver after Cd exposure is bound predominantly to soluble proteins characterized by an inducible nature on administration of Cd, by a molecular weight close to 10.000, by an unusual U.V. spectrum showing a maximum at 250 nm, by a high content in cysteine residues, by the absence of tyrosine and by a low content in histidine, phenylalanine and arginine residues. All these properties identify these proteins to metallothioneins.

Preliminary results obtained by electrophoresis indicate the presence in eel liver of two metallothionein components. The occurrence of more than one form of metallothionein in eel liver is in agreement with findings on hepatic metallothioneins of mammals (PULIDO et al, 1966 ; SHAIKH & LUCIS, 1971,a, 1972 ; WINGE & RAJAGOPALAN, 1972; NORDBERG et al, 1974 ; WEBB & STODDART, 1974).

Although the Cd-binding protein present in the gills of chronically intoxicated eels has not been fully characterized, it is very probable owing to its molecular weight and its Cd binding capacity, that this component also belongs to the group of metallothioneins. Contrary to liver metallothionein, gills metallothionein only binds very small amounts of Zn and Cu. Metallothionein does not seem to be a normal constituent of the gills ; its synthesis is probably induced in this organ on Cd exposure. Additional evidence is provided by the fact that in gills of non-Cd-exposed eels, the binding of Cd to the low molecular weight fraction is not effective for short Cd exposure. In the gills, a time dependent change in the protein binding capacity for Cd occurs : in the first hours of exposure, Cd is associated with proteins of high molecular weight and later the metal is found in the protein fraction of lower molecular weight. BOUQUEGNEAU et al (1975) found similar phenomenon in the case of Hg intoxicated eels. This time dependent Cd distribution has also been described for the liver and kidneys of rat and mouse (NORDBERG et al, 1971 ; TANAKA et al, 1974 ; SUZUKI & YOSHIKAWA, 1974). SHAIKH & LUCIS (1971,b) and CHEN et al (1975) have studied the synthesis of metallothioneins in rat liver in response to Cd administration using ¹⁴C-labeled cysteine ; they demonstrated that the appearance of metallothioneins was preceded by a delay period of about 5 hours.

In eel liver, however, Cd is found associated with metallothioneins after one hour of exposure to the metal. This can be explained by the fact that unlike to the liver of the above mentioned mammals (NORDBERG et al, 1971 ; SUZUKI, 1972 ; WINGE & RAJAGOPALAN, 1972 ; RIORDAN & GOWER, 1975), eel liver contains in the absence of any experimental intoxication, appreciable amounts of metallothioneins. The existence in non-intoxicated eel liver of significant amounts of Zn, Cu and sometimes Cd fixed to the fraction corresponding to metallothioneins (fig.1) as well as the *in vitro* fixation of Cd to the above mentioned fraction also gives evidence of the presence of metal-

lothioneins in liver of untreated eels. This difference in metallothioneins level between eel and terrestrial laboratory animals could reflect either a species-specific phenomenon or more probably differences in the conditions of environmental exposure to heavy metals. Indeed, eel as man (BUHLER & KAGI, 1974), horse (KAGI et al, 1974), seal (OLAFSON & THOMPSON, 1974), sheep and calf (BREMNER & MARSHALL, 1974), i.e. species in which detectable amounts of metallothioneins in the liver have been found in natural conditions, i.e. in absence of any experimental exposure, have a much higher chance to be exposed to heavy metals than laboratory animals fed with standard diets having usually low levels of heavy metals.

We have estimated the relative concentration of metallothioneins in the liver from the sum of the amounts of Zn, Cu and Cd detected in the elution fractions corresponding to these proteins. Indeed, it is known that the metal ions of metallothioneins are bound to sulfhydryl groups (KAGI & VALLEE, 1960, 1961 ; PULIDO et al, 1966 ; WESER et al, 1973), that these proteins do not contain any free -SH groups (KAGI & VALLEE, 1961 ; WEBB, 1972 ; WINGE & RAJAGOPALAN, 1972 ; BREMNER & DAVIES, 1975) or disulfide bonds (KAGI et al, 1974) and that Cd, Zn, Cu and Hg are the only metals bound in appreciable amount to them (KAGI & VALLEE, 1960 ; PULIDO et al, 1966 ; SABBIONI & MARAFANTE, 1975). Moreover, in absence of Hg intoxication, eel liver contains only trace amounts of Hg (BOUQUEGNEAU et al, 1975) so this metal can be omitted in the calculation. The exact stoichiometry of metal atoms per mole of protein is still an open question. However the tendency is to assign about 8g-atoms of metals per mole of metallothionein (PULIDO et al, 1966 ; WESER et al, 1974). From these data and from the results presented in table 1, the absolute concentration of metallothioneins in the liver of untreated eels can be evaluated by the following calculation :

$$\frac{10.000 \mu\text{g} \times 0,28}{8} = 350 \mu\text{g metallothioneins/g liver.}$$

This value is about twice or three times higher than those reported for liver of other species in absence of intoxication (KAGI et al, 1974 ; OLAFSON & THOMPSON, 1974).

Unlike hepatic metallothioneins from many mammals which contain, in absence of Cd administration, Zn as principal metallic constituent (KAGI et al, 1974 ; BUHLER & KAGI, 1974), eel liver

metallothioneins contain both Zn and Cu in about equal proportion. More than 60% of the Cu and about 35% of the Zn present in the liver supernatant are bound to metallothioneins.

The extraordinary high amounts of Zn and Cu bound naturally to metallothioneins strongly suggest that in the liver, metallothioneins are involved in the metabolism of these essential metals. Recent results indicate that the amounts of Zn and Cu bound to metallothioneins in eel liver are closely related to the concentrations of both metals in this organ (NOEL-LAMBOT et al, in preparation). The role of metallothioneins in Zn storage has already been proposed (WEBB, 1972 ; BREMNER & MARSHALL, 1974 ; BREMNER & DAVIES, 1975 ; RICHARDS & COUSINS, 1975).

The metallothioneins content of eel liver, evaluated from the amounts of metals associated with them, is the same after 5 hours exposure in 200 ppm Cd as in unexposed animals (table 1). The constancy of the sum of Cd, Zn and Cu bound to metallothioneins, in this case of short exposure, as in the case of *in vitro* intoxication, supports the assumption that there is no free -SH groups in metallothioneins. Thus Cd binds to them by displacing other metals. It is known that Cd, Zn and Cu compete for -SH binding sites on metallothioneins and that Cd is more firmly bound to them than Zn (KÄGI & VALLEE, 1960, 1961 ; PULIDO et al, 1966 ; PIOTROWSKI et al, 1973 ; SUZUKI & YOSHIKAWA, 1974). However results obtained for 5 hours exposure do not allow to ascertain metal shifts at the level of metallothioneins because of the large individual variations in the metal content of the liver soluble fractions, along with the small number of animals investigated. On the other hand, it is clear that Cd added *in vitro* to soluble fraction of untreated eel liver displaces stoichiometrically almost all the Zn bound to metallothioneins whereas Cu is unaffected (fig.5).

Liver of eels intoxicated during 180 days in 13 ppm Cd seems to contain 10 times more metallothioneins than the normal amount as shown by the metal content of MT fraction (table 1). Increase in 250 nm absorption also indicates an increase in metallothioneins content (KÄGI & VALLEE, 1961 ; PULIDO et al, 1966). Although this measure is not really accurate due to the fact that the absorbance at this wavelength varies according to the metal species bound (KÄGI et al, 1974).

It is evident that the time dependent accumulation of

Cd in liver is linked to an increase in metallothioneins concentration. This can explain why Cd load of the eel body still increases after more than 100 days of Cd exposure (F. NOEL-LAMBOT, unpublished results). In the gills, metallothionein appearance is initiated by Cd exposure and as in the liver, the amount of Cd present in MT fraction increases with the duration of intoxication.

Metallothioneins thus appear to be the compounds responsible for the important Cd content of organs of chronically Cd-intoxicated eels.

In the case of untreated eels, most of the Cd present in the liver is bound to high molecular weight proteins. Results presented in fig.2 indicate that there may be a threshold level of the hepatic Cd load at which Cd gets bound to metallothioneins and above which the percentage of Cd bound to metallothioneins becomes proportional to the total Cd load of the liver. The same phenomenon was observed for various marine invertebrates (F. NOEL-LAMBOT, 1976 ; F. NOEL-LAMBOT et al, 1977).

Another interesting point concerns the increase in the total hepatic Zn content of chronically Cd-intoxicated eels (tables 1 and 2). This increase occurs in all the Zn-containing fractions of the liver (table 1). Such an increase of the hepatic Zn content concomitant with Cd accumulation but mainly located at the level of metallothionein fraction has frequently been reported in mammals (NORDBERG et al, 1971 ; SUZUKI, 1972 ; WEBB, 1972 ; SCHROEDER & NASON, 1974).

Cd produces thus alterations in Zn metabolism. Experiments are in progress in our laboratory to determine whether this enhanced Zn accumulation in liver results from a Zn redistribution within the body or from an increase in the absorption process of environmental Zn.

It can be concluded that in eel, metallothioneins are a normal and abundant constituent of the liver but not of the gills. In all the properties examined in this study, liver metallothioneins of eel are very similar to those of mammals.

Acknowledgements

We thank Dr. J.M. BOUQUEGNEAU for his assistance in this work and for critical reading and discussion of the manuscript ; Dr. F. FRANKENNE for carrying out the electrophoresis ; Mr. R. BIONDO for technical assistance and Mrs C. MARCHAND for typing the manuscript.

This research was carried out as a contribution to the Belgian National Research and Development Program on the Environment - Water - Sea Project, Office of the Prime Minister, Interministerial Commission for Science Policy and Programmation and to the Concerted Oceanological Actions of the Belgian Universities.

REFERENCES

- BENSON J.V. & PATTERSON J.A. (1965). Accelerated automatic chromatographic analysis of amino acids on a spherical resin. *Analyt. Chem.* 37, 1108-1110.
- BOUQUEGNEAU J.M., GERDAY Ch. & DISTECHE A. (1975). Fish Hg-binding thionein related to adaptation mechanisms. *FEBS Letters* 55, 173-177.
- BREMNER I., DAVIES N.T. & MILLS C.F. (1973). The effect of Zn deficiency and food restriction on hepatic Zn proteins in the rat. *Biochem. Soc. Trans.* 1, 982-985.
- BREMNER I. & MARSHALL R.B. (1974). Hepatic Cu- and Zn-binding proteins in ruminants. 2. Relationship between Cu and Zn concentrations and the occurrence of a metallothionein-like fraction. *Br. J. Nutr.* 32, 293-300.
- BREMNER I. & DAVIES N.T. (1975). The induction of metallothionein in rat liver by Zn injection and restriction of food intake. *Biochem. J.* 149, 733-738.
- BUHLER R.H.O. & KAGI J.H.R. (1974). Human hepatic metallothionein. *FEBS Letters* 39, 229-234.
- CHEN R.W., EAKIN D.J. & WHANGER P.D. (1974). Biological function of metallothionein. II. Its role in Zn metabolism in the rat. *Nutr. Rep. Int.* 10, 195-200.
- CHEN R.W., WHANGER P.D. & WESWIG P.H. (1975). Biological function of metallothionein. I. Synthesis and degradation of rat liver metallothionein. *Biochem. Med.* 12, 95-105.
- CHERIAN M.G. (1974). Isolation and purification of Cd binding proteins from rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 61, 920-926.
- FRIBERG L., PISCATOR M., NORDBERG G.F. & KJELLSTROM T. (1974). *Cd in the environment*, 2nd Edition. CRC Press, Cleveland.
- HIRS C.H.W. (1956). The oxidation of ribonuclease with performic acid. *J. biol. Chem.* 219, 611-621.
- JAKUBOWSKI M., PIOTROWSKI J. & TROJANOWSKA B. (1970). Binding of Hg in the rat : studies using ²⁰³HgCl₂ and gel filtration. *Toxic. appl. Pharmac.* 16, 743-753.
- KAGI J.H.R. & VALLEE B.L. (1960). Metallothionein : a Cd- and Zn-containing protein from equine renal cortex. *J. biol. Chem.* 235, 3460-3465.
- KAGI J.H.R. & VALLEE B.L. (1961). Metallothionein : a Cd- and Zn-containing protein from equine renal cortex. II. Physicochemical properties. *J. biol. Chem.* 236, 2435-2442.
- KAGI J.H.R., HIMMELHOCH S., WHANGER P.D., BETHUNE J.I. & VALLEE B.L. (1974). Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino acid composition and metal content. *J. biol. Chem.* 249, 3537-3542.

- KIMURA M., OTAKI N., YOSHIKI S., SUZUKI M., HORIUCHI N. & SUDA T. (1974). The isolation of metallothionein and its protective role in Cd poisoning. *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 340-348.
- MARAFANTE E. (1976). Binding of Hg and Zn to Cd-binding protein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus L.*). *Experientia* 32, 149-150.
- MARGOSHES M. & VALLEE B.L. (1957). A Cd protein from equine kidney cortex. *J. Am. chem. Soc.* 79, 4813-4814.
- MOUNT D.I. & STEPHAN C.E. (1967). A method for detecting Cd poisoning in fish. *J. Wild. Manag.* 31, 168-172.
- NOËL-LAMBOT F. (1976). Distribution of Cd, Zn and Cu in the mussel *Mytilus edulis*. Existence of Cd-binding proteins similar to metallothioneins. *Experientia* 32, 324-325.
- NOËL-LAMBOT F. & BOUQUEGNEAU J.M. (1977). Comparative study of toxicity, uptake and distribution of Cd and Hg in the eel *Anguilla anguilla*. *Bull. env. Contam. Toxicol.* In press.
- NOËL-LAMBOT, F., BOUQUEGNEAU, J.M., FRANKENNE, F. & DISTECHE, A. (1977). Le rôle des métallothionéines dans le stockage des métaux lourds chez les animaux marins. *Rev. Intern. Océanogr. Med.* In press.
- NORDBERG G.F., PISCATOR M. & LIND B. (1971). Distribution of Cd among protein fractions of mouse liver. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 29, 456-470.
- NORDBERG M., TROJANOWSKA B. & NORDBERG G. (1974). Studies on metal-binding proteins of low molecular weight from renal tissue of rabbits exposed to Cd or Hg. *Environm. Physiol. Biochem.* 4, 149-158.
- OLAFSON R.W. & THOMPSON J.A.J. (1974). Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. *Mar. Biol.* 28, 83-86.
- PERRIE W.T. & PERRY S.V. (1970). An electrophoretic study of the low-molecular-weight components of myosin. *Biochem. J.* 119, 31-38.
- PIOTROWSKI J.K., BOLANOWSKA W. & SAPOTA A. (1973). Evaluation of metallothionein content in animal tissues. *Acta Biochem. Pol.* 20, 207-215.
- PIOTROWSKI J.K., TROJANOWSKA B., WISNIEWSKA-KNYPL J.M. & BOLANOWSKA W. (1974a). Hg binding in the kidney and liver of rats repeatedly exposed to HgCl₂ : induction of metallothionein by Hg and Cd. *Toxic. appl. Pharmac.* 27, 11-19.
- PIOTROWSKI J.K., TROJANOWSKA B. & SAPOTA A. (1974b). Binding of Cd and Hg by metallothionein in the kidney and liver of rats following repeated administration. *Arch. Toxicol.* 32, 351-360.
- PISCATOR M. (1964). Cd in the kidneys of normal beings and the isolation of metallothionein from liver of rabbits exposed to Cd. *Nord. Hyg. Tidskr.* 45, 76-82.
- PULIDO P., KAGI J.H.R. & VALLEE B.L. (1966). Isolation and some properties of human metallothionein. *Biochemistry* 5, 1768-1777.

- RICHARDS M.P. & COUSINS R.J. (1975). Mammalian Zn homeostasis : requirement for RNA and metallothionein synthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 64, 1215-1223.
- RIORDAN J.R. & GOWER I. (1975). Purification of low molecular weight Cu proteins from Cu loaded liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 66, 678-686.
- RUGSTAD H.E. & NORSETH T. (1975). Cd resistance and content of Cd-binding protein in cultured human cells. *Nature* 257, 136-137.
- SABBIONI E. & MARAFANTE E. (1975). Heavy metals in rat liver Cd binding protein. *Environm. Physiol. Biochem.* 5, 132-141.
- SCHROEDER H.A. & NASON A.P. (1974). Interactions of trace metals in rat tissues : Cd and Ni with Zn, Cr, Cu, Mn. *J. Nutr.* 104, 167-178.
- SCOPES R.K. (1968). Methods for starch-gel electrophoresis of sarcoplasmic proteins. An investigation of the relative mobilities of the glycolytic enzymes from the muscles of a variety of species. *Biochem. J.* 107, 139-150.
- SHAIKH Z.A. & LUCIS O.J. (1970). Induction of Cd-binding protein. *Fed. Proc.* 29, 298.
- SHAIKH Z.A. & LUCIS O.J. (1971a). Isolation of Cd-binding proteins. *Experientia* 27, 1024-1025.
- SHAIKH Z.A. & LUCIS O.J. (1971b). The nature and biosynthesis of Cd-binding proteins. *Fed. Proc.* 30, 238.
- SHAIKH Z.A. & LUCIS O.J. (1972). Cd and Zn binding in mammalian liver and kidneys. *Arch. environm. Health* 24, 419-425.
- SUDA T., HORIUCHI N., OGATA E., EZAWA I., OTAKI N. & KIMURA M. (1974). Prevention by metallothionein of Cd-induced inhibition of vitamin D activation reaction in kidney. *FEBS Letters* 42, 23-26.
- SUZUKI Y. (1972). Effects of Cd-binding protein on metal distribution in supernatant of the liver homogenate of rat. *Ind. Health* 10, 52-55.
- SUZUKI Y. & YOSHIKAWA H. (1974). Role of metallothionein in the liver and protection against Cd toxicity. *Ind. Health* 12, 141-151.
- TANAKA K., SUEDA K. & OKAHARA K. (1974). Fate of heavy metal in animals : quantitative change of metallothionein in the liver, kidney and intestinal mucosa of rat after a single injection of $^{109}\text{CdCl}_2$. *J. hyg. Chem.* 20, 98-101.
- WEBB M. (1972). Binding of Cd ions by rat liver and kidney. *Biochem. Pharmacol.* 21, 2751-2765.
- WEBB M. & STODDART R.W. (1974). Isoelectric focusing of the Cd ion-binding protein of rat liver : interaction of the protein with a glycosaminoglycan. *Biochem. Soc. Trans.* 2, 1246-1248.

WEBB M. & DANIEL M. (1975). Induced synthesis of metallothionein by pig kidney cells *in vitro* in response to Cd. *Chem. Biol. Interactions* 10, 269-276.

WESER U., DONAY F. & RUPP H. (1973a). Cd-induced synthesis of hepatic metallothionein in chicken and rats. *FEBS Letters* 32, 171-174.

WESER U., RUPP H., DONAY F., LINNEMANN F., VOELTER W., VOETSCH W. & JUNG G (1973b). Characterization of Cd, Zn-thionein (metallothionein) isolated from rat and chicken liver. *Eur. J. Biochem.* 39, 127-140.

WINGE D.R. & RAJAGOPALAN K.V. (1972). Purification and some properties of Cd-binding protein from rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 153, 755-762.

Table 1. Cd, Zn and Cu distribution in liver of eels exposed to various Cd concentrations. Values are expressed as mean \pm standard error.

	Metal in fresh liver, $\mu\text{g/g}$ wet wt (1)		Metal in supernatant $\mu\text{g/g}$ liver		Metal contained in MT fraction (2) of the supernatant				
	$\mu\text{g/g}$	\pm	$\mu\text{g/g}$	\pm	$\mu\text{g/g}$ liver	% relative to metal content in the supernatant	$\mu\text{g-at/g}$ liver	Cd:Zn:Cu molar ratio	
<u>No Cd exposure (n=3)</u>									
Cd	0,9	\pm 0,3	0,7	\pm 0,2	0,11	\pm 0,08	15,7	0,001	
Zn	41,3	\pm 8,8	26,7	\pm 5,2	10,6	\pm 4,7	39,7	0,16	1:160:120
Cu	17,7	\pm 1,8	11,0	\pm 2,1	7,5	\pm 2,3	68,2	0,12	
Cd + Zn + Cu									
<u>5 hours in 200 ppm Cd (n=3)</u>									
Cd	11,7	\pm 4,4	8,0	\pm 3,6	6,4	\pm 3,3	80,0	0,06	
Zn	42,7	\pm 3,2	22,7	\pm 2,7	7,3	\pm 1,5	32,2	0,11	60:110:80
Cu	13,3	\pm 3,9	7,3	\pm 2,8	5,1	\pm 2,1	69,9	0,08	
Cd + Zn + Cu									
<u>180 days in 13 ppm Cd (n=2)</u>									
Cd	331,0	\pm 49,0	264,5	\pm 10,5	247,0	\pm 8,5	93,4	2,20	
Zn	82,0	\pm 7,0	53,5	\pm 18,5	19,0	\pm 9,0	35,5	0,30	2200:300:60
Cu	15,0	\pm 9,0	13,5	\pm 9,5	3,5	\pm 1,8	25,9	0,06	
Cd + Zn + Cu									

1) Concentrations in the whole organs are calculated from metal contents in supernatant and from those measured in pellet. Therefore values referring to pellets have not been reported in the table.

2) See figures 1, 3 and 4.

Table 2. Metal content of liver from chronically Cd intoxicated eels compared with control values.

Treatment	Number of fishes analyzed	Metal concentration in liver, ppm wet wt (mean \pm S.E.)		
		Cd	Zn	Cu
Controls	11	1,2 \pm 0,3	43,5 \pm 3,4	14,5 \pm 3,6
33 days in 15 ppm Cd	8	104,6 \pm 20,6	104,0 \pm 9,5*	26,5 \pm 10,6

* Statistically higher than controls (P < 0,001)

Table 3. Preliminary amino acid composition of the Cd binding proteins of eel liver.

Amino acid ^a	Number of residues per 10.000 mol.wt.	
	MT ₁ ^b	MT ₂ ^b
Lys	10,5	9,6
His	0,4	0,8
Arg	0,8	0,7
Asp	8,3	9,4
Thr ^e	8,8	8,4
Ser ^e	8,9	8,1
Glu	6,1	7,7
Pro	3,9	5,3
Gly	9,6	9,3
Ala	6,3	6,3
Cys (half) ^c	24,4	20,0
Val	4,2	4,8
Met ^d	1,6	1,6
Ile ^e	1,3	1,9
Leu	2,2	3,2
Tyr	0	0
Phe	1,1	1,3
Total	98,6	98,5

a Trp was not determined

b See fig. 6, b

c Determined as cysteic acid

d Determined as methionine sulfone

e Uncorrected data

LEGENDS OF FIGURES

- Fig.1. Elution profiles on Sephadex G-75 column (76x3cm) of liver or gills soluble fraction from non-Cd-exposed eels.
Metals concentrations in elution fractions are expressed in μg per fraction and per g of organ.
Fractions volume : 10 ml.
Total Cd concentration in gills : 0,2 ppm. For liver, see table 1.
- Fig.2. Relation between the proportion of Cd associated with liver metallothioneins (as percent of the Cd content of the soluble fraction) and the total Cd concentration in this organ.
Each point represents one individual
● : Non-Cd treated eels.
▲ : Eels intoxicated during 5 hr in 200 ppm Cd.
- Fig.3. Elution profiles on Sephadex G-75 column (76x3cm) of liver and gills soluble fraction obtained from acutely Cd-intoxicated eels (5 hr in 200 ppm Cd).
Metals concentrations in the elution fractions are expressed in μg per fraction and per g of organ.
Fractions volume : 10 ml.
Total Cd concentration in gills : 31,2 ppm. For liver, see table 1.
- Fig.4. Elution profiles on Sephadex G-75 column (76x3cm) of liver or gills soluble fraction obtained from eels intoxicated during 180 days (liver sample) or 14 days (gills sample) in sea water containing 13 ppm Cd.
Metals concentrations in the elution fractions are expressed in μg per fraction and per g of organ.
Fractions volume : 10 ml.
Total Cd concentration in gills : 2,3 ppm. For liver, see table 1.
- Fig.5. Addition of Cd (100 μg Cd/g liver) into the liver soluble fraction from an untreated eel. Ultrogel AcA54 column 37x2,6cm, 0,01 M ammonium formate buffer pH 7.4.
Metals concentrations in the elution fractions are expressed in μg per fraction and per g of organ.
Fractions volume : 5 ml.

Fig.6. Gel fractionation of liver soluble proteins from eels intoxicated during 50 days in 15 ppm Cd.

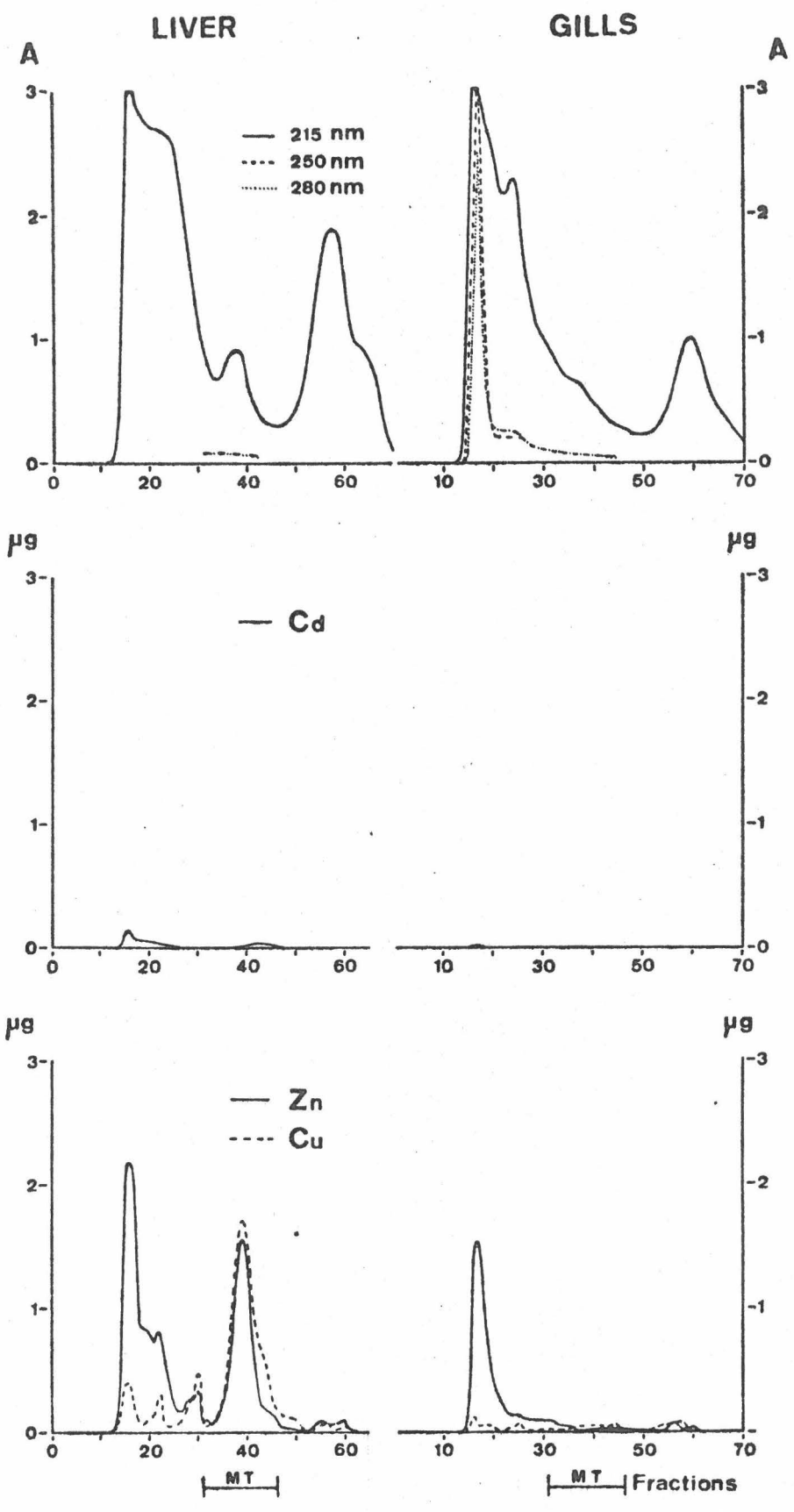
a) Chromatography on a Sephadex G-75 column (76x3cm).

b) Chromatography on an Ultrogel AcA54 column (100x2,6cm). Both columns were eluted with 0,01M ammonium formate, pH 7.4.

Fractions volume was 10 ml.

Fig.7. Electrophoresis of the MT chromatographic fraction (see fig.6,a) of eel liver. Electrophoresis was carried out at room temperature in 5% polyacrylamide, 0,26% N.N'-methylene diacrylamide gel, using pH 8,5 Tris - glycine buffer. The current applied was 1 mA/cm. The slowest migrating band corresponds to a proteinic contaminant.

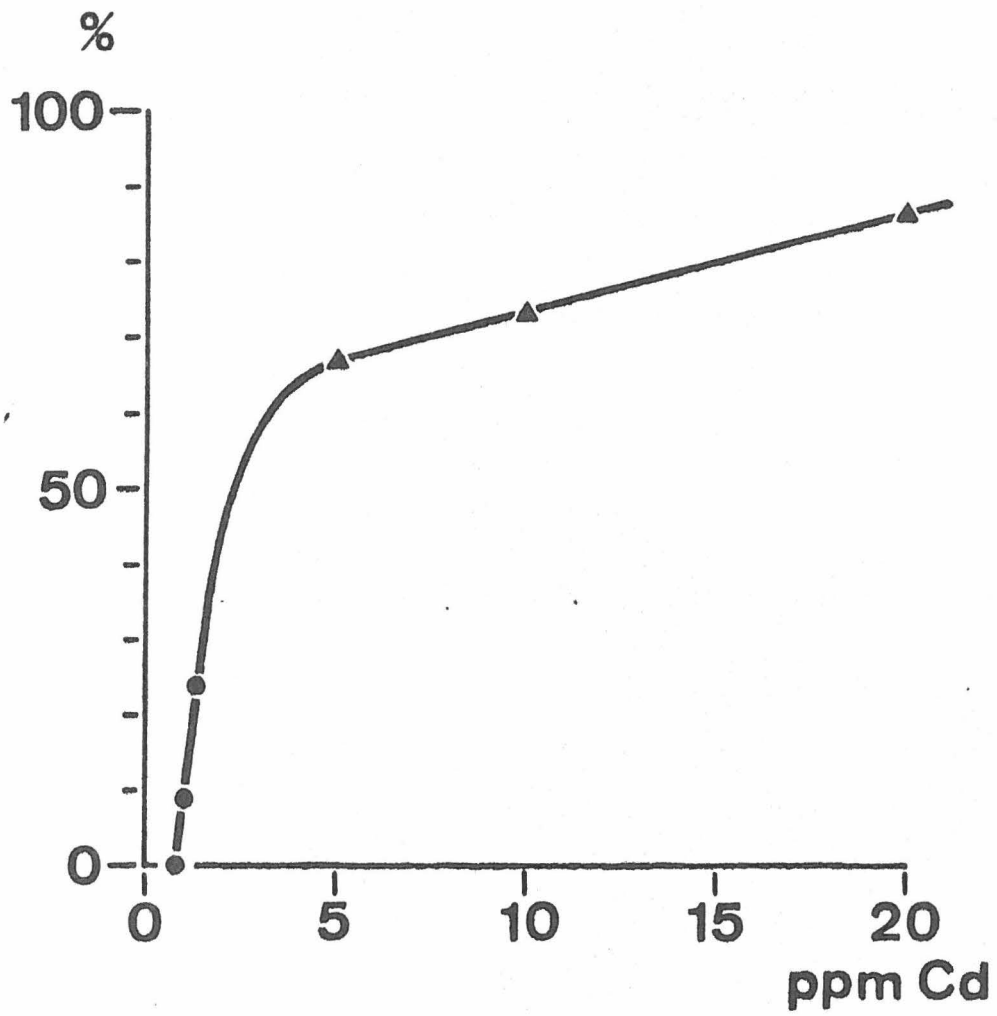
Fig.8. Ultraviolet absorption spectrum of the low molecular weight Cd binding protein from the liver of one eel intoxicated during 180 days in 13 ppm Cd.



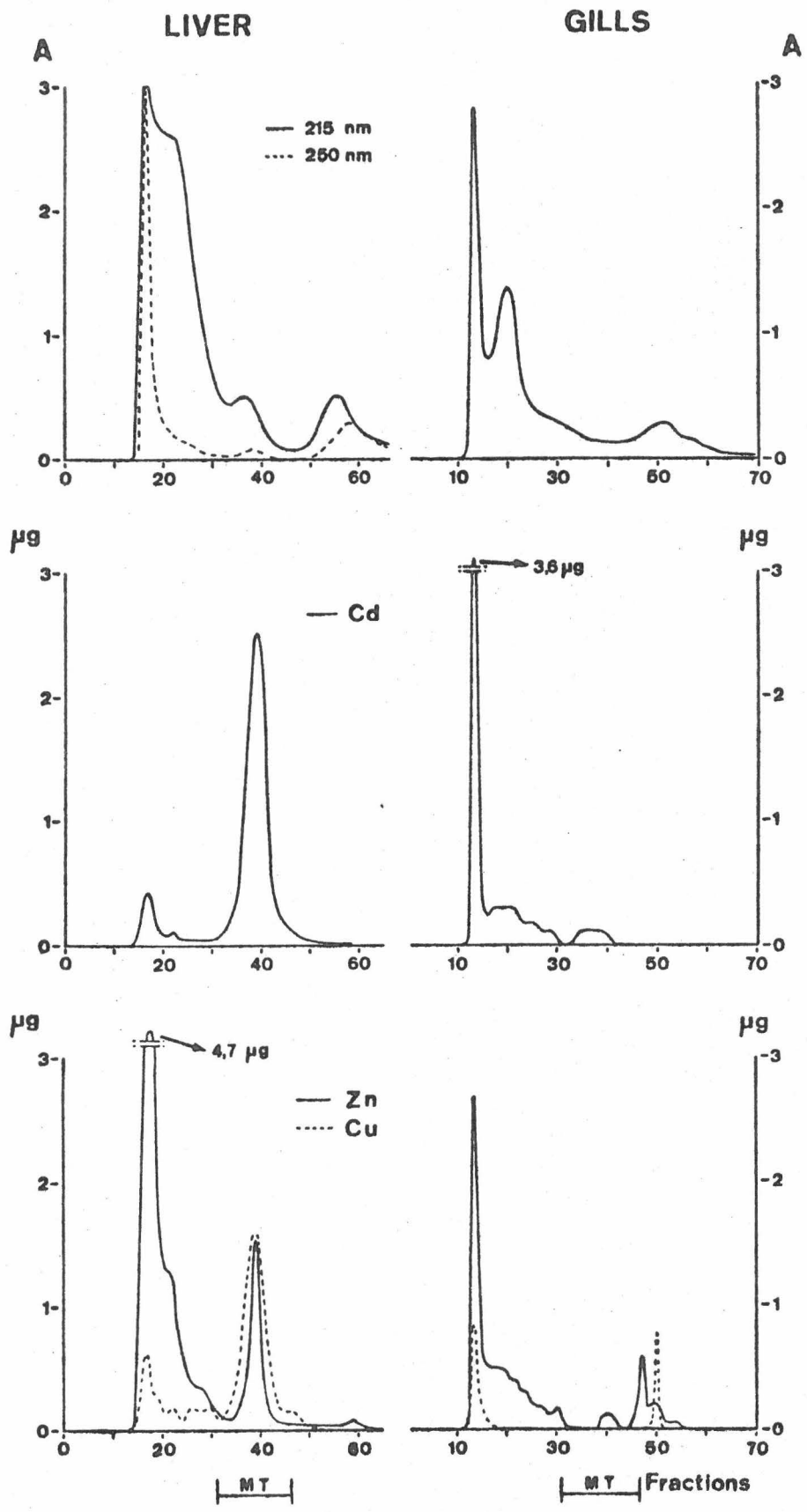
F. NOEL-LAMBOOT et al
 Fig 1

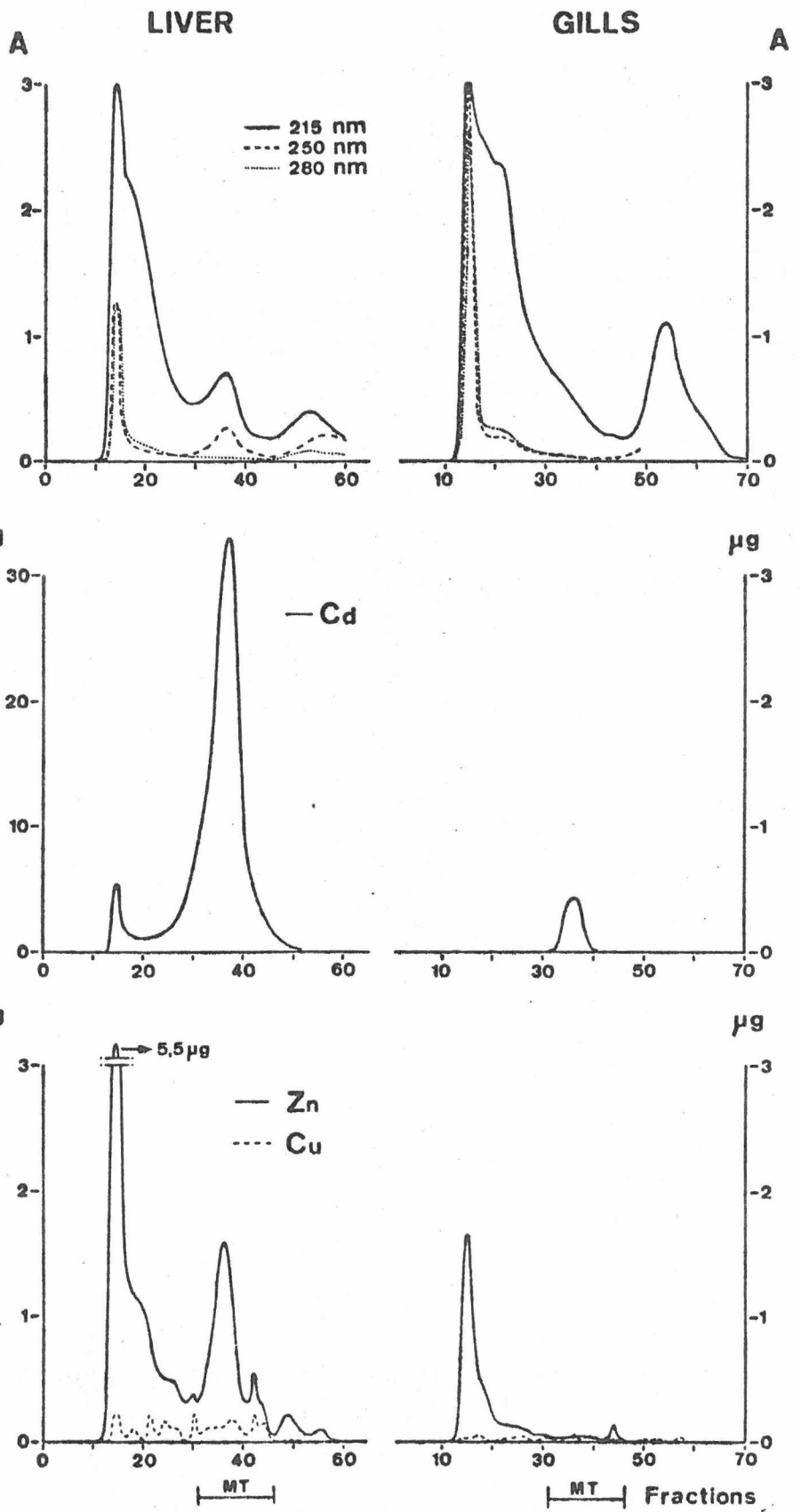
F. NOEL-LAMBOT DE C.

Fig. 2

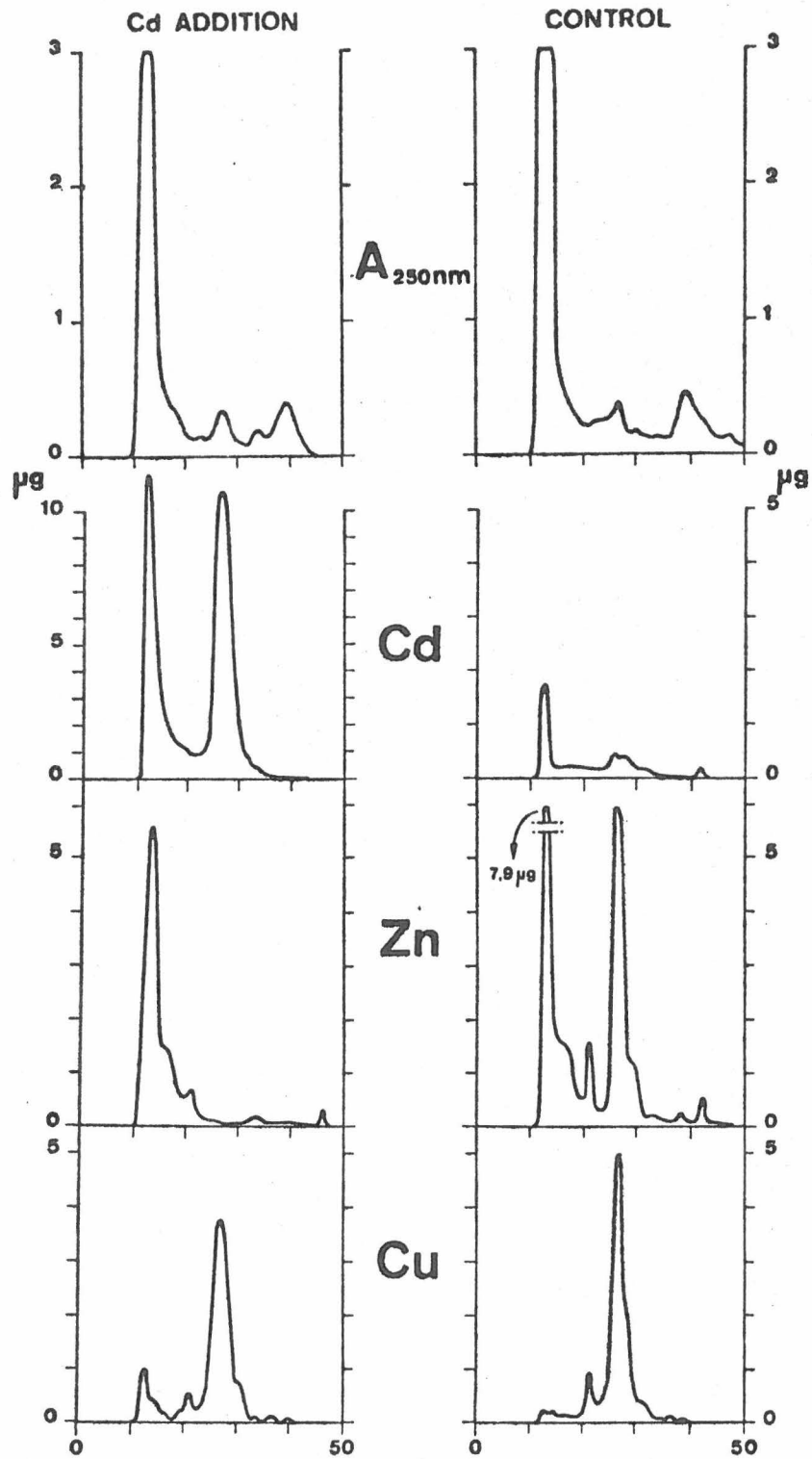


F. NOEL-LAMBERT et al
Fig. 3





F. NOËL-LAMBOT et al
Fig. 4



F. NOËL-LANBROT et al
Fig. 5

HMW	MT	Metal associated with HMW and MT, µg/g. liver	HMW	MT	Fractions
0.35	0.37	Cd	0.05	0.02	
0.34	0.02	Zn	0.38	0.32	
0.07	0.25	Cu	0.05	0.26	
0.76	0.64	Cd + Zn + Cu	0.48	0.60	

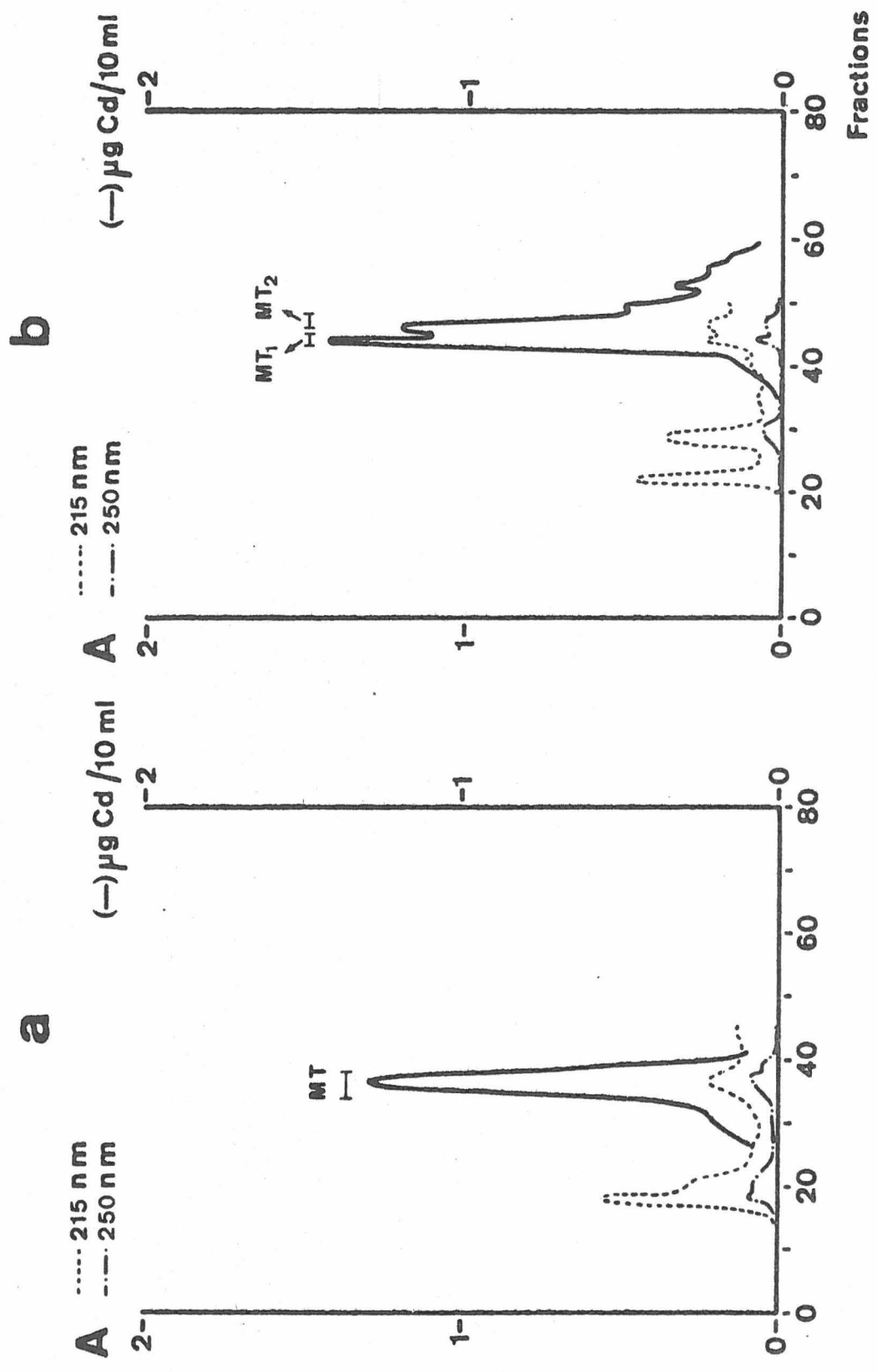
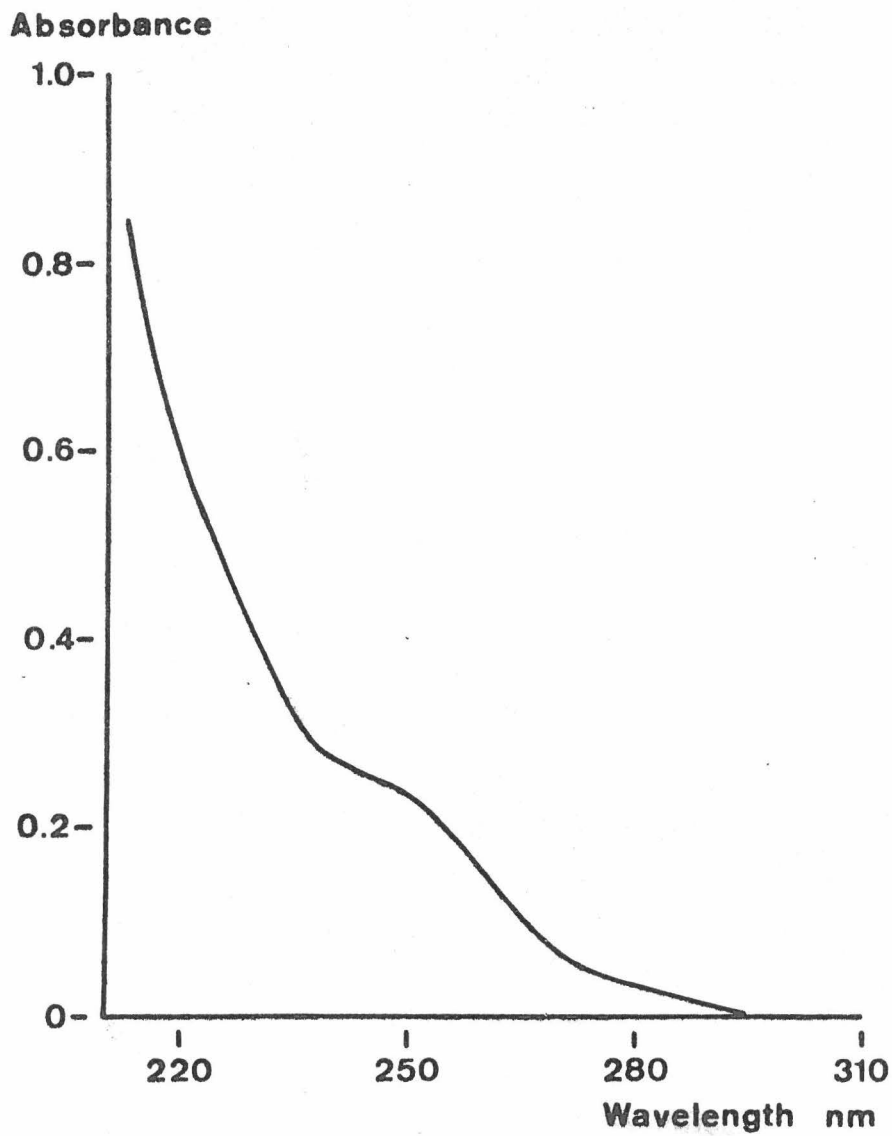




Fig. 7

F. NOEL-LAMBERT et al

Fig. 2



ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n° 7

RELATIONSHIP BETWEEN HEPATIC Zn AND Cu
CONCENTRATIONS IN THE EEL *Anguilla anguilla*
AND OCCURENCE OF METALLOTHIONEINS.

(à soumettre à Comp. Biochem. Phys. pour publication)

RELATIONSHIP BETWEEN HEPATIC Zn AND Cu CONCENTRATIONS IN THE EEL
Anguilla anguilla AND OCCURENCE OF METALLOTHIONEINS

NOEL-LAMBOT, F., BOUQUEGNEAU, J.M. and FRANKENNE, F.

Laboratory of Oceanology, Institute of Chemistry, B 4000 LIEGE -
SART TILMAN - BELGIUM

SUMMARY

Zn and Cu concentrations of the eel liver are variable but closely related to each other. The study of the distribution of these metals among the hepatic soluble fraction has shown that the amounts of Zn and Cu associated with metallothioneins were directly dependent on the Zn and Cu concentrations in the whole liver, while the metal content of the other proteinic fractions was little affected by these variations. These results suggest that metallothioneins have an important role in storage of excess of Zn and Cu.

INTRODUCTION

Metallothioneins are low molecular weight specific Zn-, Cu-, Cd- and Hg- binding proteins which have been suggested to play an important role in the transport, storage and detoxification of these trace elements in mammals (1,2,3,4,5).

Recently, we have described metallothioneins in various organs of mercury or cadmium intoxicated eels (6,7,8). Meanwhile, in absence of such intoxications, these proteins are present in liver, kidney and intestine where they naturally bind zinc, copper and cadmium (8).

In order to test the role of these proteins in fish, we describe in this work the distribution of Zn and Cu among the soluble fraction of the liver of non intoxicated eels.

MATERIAL AND METHODS

22 fresh water eels were kept starved for one week in natural sea water. Each liver was then divided into two parts ; one part was analyzed for its Zn and Cu content by atomic absorption spectrophotometry (Perkin-Elmer Model 103) after mineralization in 65% HNO₃ and suitable dilution. In the case of 11 animals, the other part was prepared for gel filtration.

The livers were homogenized in 3 volumes of 0.5M sucrose by means of a Polytron homogenizer, then centrifuged at 10⁵g for 1 hour. The pellet obtained after a first centrifugation at 100.000g for one hour was resuspended in the same volume of 0.5M

sucrose and centrifuged again at the same speed. The pooled supernatants were then filtered on LKB Ultrogel AcA5⁴ columns (36 x 2.5 cm or 100 x 2.6 cm) equilibrated in ammonium formate 0.01M or ammonium bicarbonate 0.05M.

Zn and Cu concentrations in supernatants, pellets and chromatographic fractions were determined by atomic absorption spectrophotometry. The recovery of Zn and Cu in the elution fractions was generally higher than 90% of the total content of the supernatant.

After concentration by filtration on an UM2 Amicon membrane, the fractions corresponding to the metallothioneins were submitted to electrophoresis on polyacrylamide gel slab (9). Relative concentrations of proteins on the gel were determined by densitometric measurement on a Quick Scangel densitometer (Hellena laboratories).

RESULTS AND DISCUSSION

Mean concentrations of Zn and Cu in eels livers are respectively $0.733 \pm 0.051^*$ and $0.265 \pm 0.046^*$ $\mu\text{g-at/g W.W.}$ This indicates large individual variations but a close relationship binds both concentrations as shown in fig.1. Indeed, the Zn concentration (y) is linearly related to the Cu concentration (x) and this can be expressed by the equation

$$y = 0.98 x + 0.48$$

* Standard error

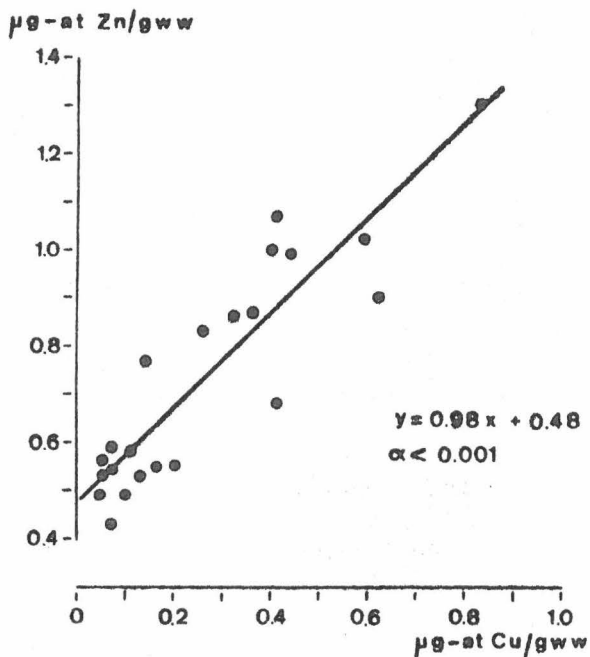


FIG. 1.

Relationship between the total concentrations of Cu and Zn in the eel liver.

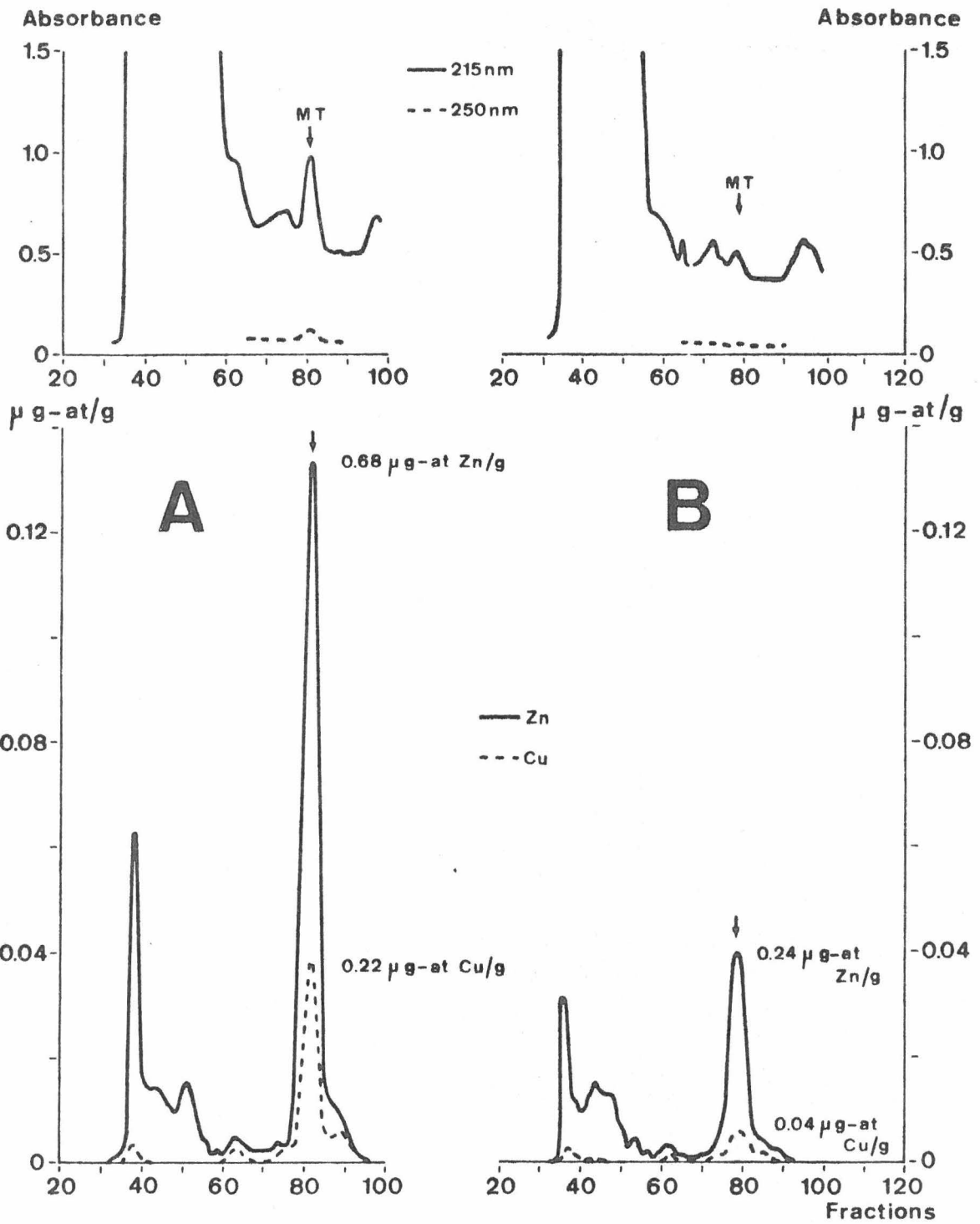


FIG. 2.

Fractionation on Ultrogel AcA 54 column 100x2.6 cm of the soluble proteins extracted from two liver samples of identical weight. Fractions volume: 5 ml. Metal concentrations in the elution fractions are expressed in μ gram-atom per fraction and per g of liver. The amounts of Zn and Cu associated with the metallothioneins and presented on the graphs are obtained by summation of the metal content of the elution fractions corresponding to the MT peak.

A : liver containing 1.77 μ g-at Zn/g and 0.44 μ g-at Cu/g.

B : liver containing 1.04 μ g-at Zn/g and 0.17 μ g-at Cu/g.

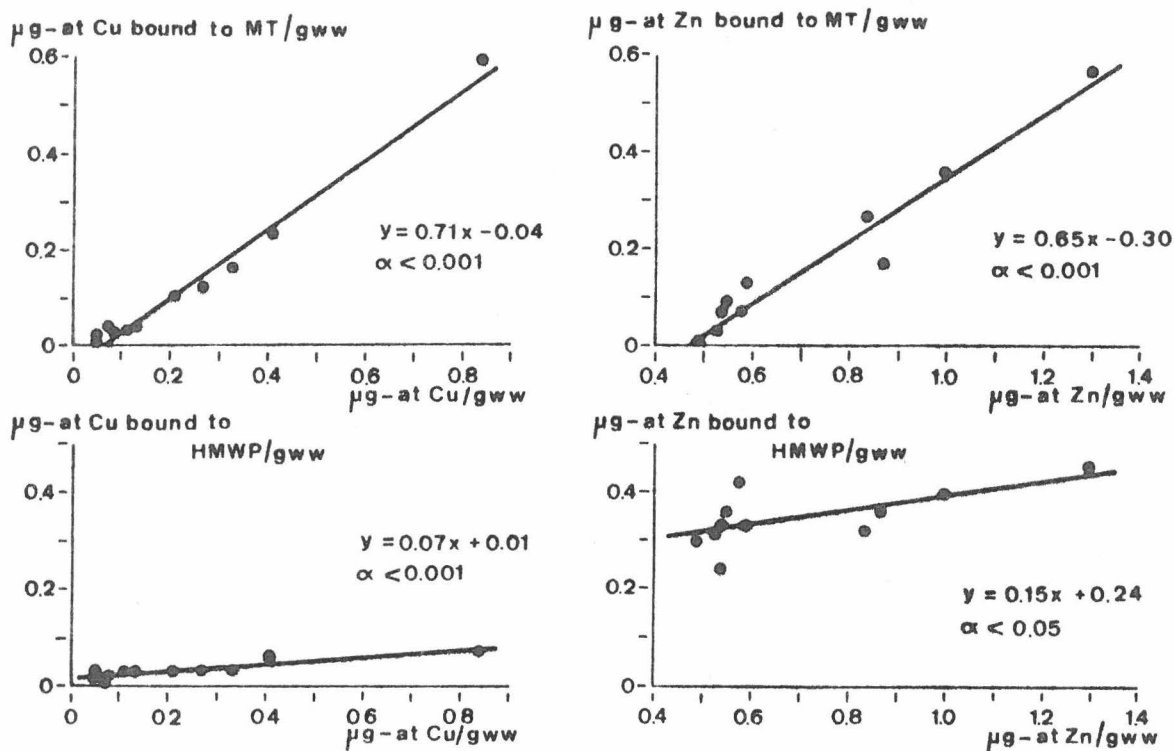


FIG. 3.

Relationship between Cu or Zn concentrations in whole liver and concentrations of both metals associated with metallothioneins (MT) or with high molecular weight proteins (HMWP), as isolated by gel filtration on Ultrogel AcA-54.

This equation is not significantly different of $y = x + 0.48$ ($0.9 < \alpha < 1.0$) so that an increase of one of them is accompanied by an increase of the other in the ratio 1:1.

About 65% (50 to 80) of the total hepatic Zn and Cu is recovered in the soluble fraction obtained by double centrifugation of the homogenate. The metal distribution in this fraction was studied by gel filtration. The Zn and Cu containing proteinic fraction of lowest molecular weight, marked by an arrow on the chromatograms shown in fig.2, was previously identified as metallothioneins (6,8). Such chromatograms were used to estimate the part of metal bound to the metallothionein fraction. It is worth noticing that this fraction contains $26 \pm 5^*$ percent of the Zn and $66 \pm 6^*$ percent of the Cu present in the soluble fraction.

1° Distribution of Zn and Cu in the soluble fraction of livers

The amounts of Zn and Cu bound either to the metallothioneins (MT) or to the high molecular weight proteins (HMWP) are closely related to the total hepatic metals concentrations, but an increase of the total Zn or Cu concentration is accompanied by an increase of the MT bound metal in the ratio 10:7 while it is only

* Standard error.

5
accompanied by an increase of the HMWP bound metal in the ratio 10:1, as shown in fig.3. The major part of the increase in both metals is therefore stored at the level of metallothioneins.

It can moreover be observed (fig.3) that in livers with low concentrations of Zn and Cu (about 0.5 and 0.06 $\mu\text{g-at/g}$ liver), both metals are virtually absent from the metallothionein fraction.

In the second part of this work we tried to know whether this metal storage at the level of metallothioneins was accompanied by an increase of the concentration of these proteins in the liver.

2° Estimation of metallothionein concentration in liver

From the literature, it can be assumed that the sum of the amounts of Zn and Cu (in $\mu\text{g-atoms}$) present in the MT fraction is proportional to the metallothionein content of the sample. Indeed, Zn, Cu, Cd and Hg are the only metals to bind in appreciable amount to metallothioneins (10,11,12), Cd and Hg are present in negligible amounts in eel liver in absence of specific intoxication (6,8), the metals in metallothioneins are bound to sulfhydryl groups (10,13,11) and these proteins do not contain any free SH groups (13,14) or disulfide bonds (15). In order to confirm this assumption, two livers from another lot of eels were studied for their metallothionein content (fig.2). The sums of the amounts of Zn and Cu present in the MT fraction of those livers A and B are respectively 0.90 and 0.28 $\mu\text{g-atom metal/g liver}$. From absorbance measurements at 215 nm and 250 nm (fig.2), it is evident that liver A has a higher content in metallothioneins than liver B. Moreover scanning at 520 nm of the gel electrophoreses performed on both MT chromatographic fractions allows to establish that liver A contains 3 to 4 times more metallothioneins than liver B, which confirms the evaluation made from the Zn and Cu contents of the MT chromatographic fractions.

To conclude, it appears that the concentration of metallothioneins in the liver is regulated by the Zn and Cu content of this organ. This would explain why the large variations observed in the Zn and Cu concentrations of the liver are perceptible almost exclusively at the level of the metallothioneins. These observations strongly suggest that these proteins are involved in control mechanisms of the Zn and Cu metabolism by storing, under a detoxified form, excess of both metals. Metallothioneins would appear in liver for Zn and Cu concentrations in this organ exceeding critical levels. For eel, these critical levels would be approximately 0.5 $\mu\text{g-at/g}$ for Zn and 0.06 $\mu\text{g-at/g}$ for Cu (see fig.3). The occurrence of Zn-thionein in male rat liver only after Zn injection has also been related to an increase in liver Zn concentration above an apparently critical level (3,4). The role of hepatic and intestinal metallothioneins in mammalian Zn homeostasis has previously been proposed (5).

Some of our findings on the distribution of Zn and Cu among the soluble hepatic proteins in function of the metals concentrations in the whole liver are rather similar to the results obtained by several authors on liver of mammals (3,16,4,17,18). Though, it must be pointed out that the widely differing Zn and Cu status of the animals studied by these authors were induced by

diets containing varying amounts of Zn and Cu.

In our case, variations of metals concentrations in liver could be attributed to different states of starvation of the animals, but those differences could also be induced by various environmental exposures or by individual variations in the metabolism of trace elements.

This research was supported by the concerted Oceanological actions of the Belgian Universities and by a grant of the Commission des Communautés Européennes.

We are grateful to Professor A. DISTECHE for his advice throughout this work. We thank Mr. R. BIONDO for technical assistance and Mme C. MARCHAND for dactylography.

REFERENCES

1. G.F. NORDBERG, M. PISCATOR and B. LIND, Acta Pharmacol. Toxicol. 29 456 (1971).
2. M. WEBB, Biochem. Pharmacol. 21 2751 (1972).
3. I. BREMNER, N. T. DAVIES and C. F. MILLS, Biochem. Soc. Trans. 1 982 (1973).
4. R. W. CHEN, D. J. EAKIN and P. D. WHANGER, Nutr. Rep. Intern. 10 195 (1974).
5. M. P. RICHARDS and R. J. COUSINS, Biochem. Biophys. Res. Commun. 64 1215 (1975).
6. J. M. BOUQUEGNEAU, Ch. GERDAY and A. DISTECHE, FEBS Letters 55 173 (1975).
7. F. NOEL-LAMBOT and J. M. BOUQUEGNEAU, Bull. environm. Contam. Toxicol. in press (1977).
8. F. NOEL-LAMBOT, Ch. GERDAY and A. DISTECHE, to be published.
9. W. T. PERRIE and S. V. PERRY, Biochem. J. 119 31 (1970).
10. J. H. R. KÄGI and B. L. VALLEE, J. Biol. Chem. 235 3460 (1960).
11. P. PULIDO, J. H. R. KÄGI and B. L. VALLEE, Biochemistry 5 1768 (1966).
12. E. SABBIONI and E. MARAFANTE, Environ. Physiol. Biochem. 5 132 (1975).
13. J. H. R. KÄGI and B. L. VALLEE, J. Biol. Chem. 236 2435 (1961).
14. D. R. WINGE and K. V. RAJAGOPALAN, Arch. Biochem. Biophys. 153 755 (1972).
15. J. H. R. KÄGI, S. HIMMELHOCH, P. D. WHANGER, J. L. BETHUNE and B. L. VALLEE, J. Biol. Chem. 249 3537 (1974).
16. N. T. DAVIES, I. BREMNER and C. F. MILLS, Biochem. Soc. Trans. 1 985 (1973).
17. I. BREMNER and R. B. MARSHALL, Br. J. Nutr. 32 283 (1974).
18. I. BREMNER and R. B. MARSHALL, Br. J. Nutr. 32 293 (1974).

ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOGRAPHIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n° 8

ROLE DES METALLOTHIONEINES DANS LE STOCKAGE
DES METAUX LOURDS CHEZ LES ANIMAUX MARINS.

LE ROLE DES METALLOTHIONEINES DANS LE STOCKAGE DES METAUX LOURDS CHEZ LES ANIMAUX MARINS

par F. NOEL-LAMBOT,* J. M. BOUQUEGNEAU,* F. FRANKENNE,* et A. DISTECHE.*

INTRODUCTION :

Le nom métallothionéine fut initialement attribué par Margoshes et Vallee en 1957 à une protéine du rein de cheval se caractérisant par un faible poids moléculaire (environ 10 000), de fortes teneurs en cadmium et en zinc, de petites quantités de cuivre et de mercure, une proportion de cystéine tout-à-fait inhabituelle (de l'ordre de 30 % des résidus acides aminés) et une forte absorbance à 250 nm.

Depuis, ces protéines ont été bien étudiées chez les mammifères. On a montré que certains métaux lourds, particulièrement le Cd, induisent la synthèse des métallothionéines dans l'organisme (Shaikh et Lucis, 1970 ; Piotrowski et al., 1973). Cette propriété a conduit à leur attribuer un rôle de protection vis-à-vis des cations toxiques Cd^{2+} et Hg^{2+} (Suda et al., 1974 ; Bouquegneau et al., 1975).

Des travaux récents ont démontré l'existence de métallothionéines chez plusieurs espèces de téléostéens (Olafson et Thompson, 1974 ; Bouquegneau et al., 1975 ; Marafante, 1976), chez quelques mollusques et crustacés (Noël-Lambot, 1976 ; Distèche, 1976 ; Olafson, communication personnelle) et chez une algue bleue (Maclean et al., 1972).

Au cours de ce travail, nous avons tenté de voir quel pourrait être le rôle des métallothionéines dans le stockage du Cd, du Zn et du Cu chez des invertébrés marins. Pour ce faire, nous avons comparé la répartition de ces métaux chez trois espèces de mollusques : *Patella vulgata* (patelle), *Littorina littorea* (bigorneau) et *Purpura lapillus* (pourpre)

- 1 - provenant de milieux réputés non pollués par les métaux lourds : Cap Gris-Nez (Pas-de-Calais, France) ou Polperro (Cornouailles, Angleterre) ;
- 2 - provenant d'un milieu riche en métaux lourds, l'estuaire de la Severn appelé aussi canal de Bristol (Portishead ou Westonsupper-Mare, Somerset, Angleterre), Butterworth et al. (1972) rapportant pour ces eaux des teneurs en Cd de 5.8 ppb et en Zn de 52 ppb alors que les concentrations naturelles de ces métaux dans l'eau de mer sont respectivement de l'ordre de 0.1 ppb et 10 ppb,
- 3 - ayant été intoxiqués par du cadmium en laboratoire.

* Université de Liège, Institut de Chimie, Laboratoire d'Océanologie, B 4000
SART TILMAN par Liège 1, Belgique.

MATERIEL ET METHODES :

Intoxications expérimentales :

Des mollusques récoltés au Cap Gris-Nez ont été intoxiqués en laboratoire pendant 60 jours dans de l'eau de mer contenant 0.5 ppm de Cd sous forme de CdCl₂ selon une technique déjà décrite (Bouquegneau et al., 1975).

Traitement des échantillons :

Les échantillons sont analysés après avoir été conservés un mois à - 30°C. Les constituants moléculaires fixant le Cd, le Zn et le Cu sont étudiés en vue de déceler la présence éventuelle de métallothionéines. Pour ce faire, trois individus d'un même échantillon sont, après enlèvement de la coquille, homogénéisés dans une solution de saccharose 0.5 M. L'homogénat est centrifugé une heure à 40 000 g. Le culot ainsi obtenu est mis en suspension dans du saccharose 0.5 M et recentrifugé dans les mêmes conditions. Les deux surnageants sont réunis et filtrés sur colonne d'Ultrogel AcA54 (LKB) éluée au moyen de formate d'ammonium 0.01 M pH 7.4. Ce type de gel permet de séparer des constituants dont le poids moléculaire est compris entre 6 000 et 70 000.

L'absorbance à 215 et à 250 nm des fractions d'éluion est mesurée au moyen d'un spectrophotomètre Beckman PB-GT et leur teneur en métaux par spectrophotométrie d'absorption atomique (Perkin Elmer 370A). Les animaux entiers, les culots de centrifugation et les aliquots des surnageants sont analysés par la même technique après minéralisation dans HNO₃ 65 % pendant cinq heures à 80°C.

RESULTATS ET DISCUSSION :

Le tableau 1 montre que la teneur en métal de l'eau influence considérablement celle des mollusques y vivant et ce de manière variable selon l'espèce et le métal considérés. Ceci est particulièrement évident dans le cas du Cd pour lequel on trouve une concentration jusqu'à 150 fois plus élevée chez les animaux vivant dans le canal de Bristol que chez les témoins. En ce qui concerne le Zn et le Cu, ce phénomène est moins apparent sauf dans le cas de l'accumulation du Cu par *Purpura lapillus*. Précédemment, plusieurs auteurs ont rapporté l'existence de concentrations fort élevées de Cd, Zn et Cu chez divers organismes marins provenant de la région de Bristol (Peden et al., 1973 ; Stenner et Nickless, 1974).

Comme le montre le tableau 1, les augmentations de concentrations observées chez les animaux intoxiqués "in situ" ou en laboratoire sont, dans la plupart des cas, décelables au niveau de la fraction soluble des homogénats.

L'étude de celle-ci par chromatographie (Fig. 1, 2 et 3) montre que chez les animaux ayant accumulé de grandes quantités de Cd (patelles de Portishead ; pourpres de Weston ; patelles, pourpres et bigorneaux intoxiqués en laboratoire), ce métal se trouve pour la plus grande part associé à une fraction coïncidant avec un pic d'absorbance à 250 nm et dont le volume d'éluion indique un poids moléculaire de l'ordre de 10 000 (fraction MT). Dans la plupart de ces échantillons, cette fraction fixe en outre de faibles quantités de Zn et de Cu.

Une analyse détaillée de la nature de cette fraction chez les patelles récoltées à Portishead indique qu'elle est essentiellement composée de métallothionéines (Frankenne et al., en préparation). Ces mêmes travaux montrent par ailleurs que ces protéines sont beaucoup plus abondantes chez ces individus et chez ceux intoxiqués en laboratoire que chez les patelles provenant de Polperro.

TABLEAU N° 1
Teneur en Cd, Zn et Cu des animaux entiers (en µg/g de tissu frais)
et de la fraction soluble utilisée pour l'étude chromatographique
(en µg/g de tissu frais)

	Cd, µg/g		Zn, µg/g		Cu, µg/g	
	Echantillon total	surageant	Echantillon total	surageant	Echantillon total	surageant
<i>Patella vulgata</i>						
Polperro	0.8	0.4	28.1	12.7	3.6	2.2
Portishead	116.9	75.7	51.7	17.1	4.0	2.8
Intoxication en labo.	33.0	24.0	47.0	5.2	1.2	< 1.0
<i>Purpura lapillus</i>						
Cap Gris-Nez	11.4(1)	7.5	114.8	41.2	8.6	3.2
Weston	84.6	19.6	315.2	68.0	125.0	5.1
Intoxication en labo.	117.0	106.0	203.0	66.0	15.7	4.8
<i>Littorina littorea</i>						
Polperro	0.7	< 0.5	27.3	11.6	23.0	6.7
Weston	10.7	5.9	52.1	26.5	44.7	18.6
Intoxication en labo.	68.0	43.4	87.0	13.0	12.1	3.5

(1) Notons que la concentration élevée en Cd des pourpres provenant du Cap Gris-Nez résulte probablement du fait que ces animaux ont été conservés pendant deux mois à l'aquarium de l'Université de Liège dont l'eau possède des teneurs élevées en métaux lourds (5 ppb de Cd, 17 ppb de Zn, 13 ppb de Cu).

Un autre aspect intéressant de la comparaison de nos résultats est le fait qu'on ne détecte pas non plus de métallothionéines chez les bigorneaux provenant de la région polluée (Fig. 3) alors que les intoxications réalisées en laboratoire montrent que cette espèce est capable d'en synthétiser. On peut en déduire qu'il doit exister un seuil de concentration de Cd (soit dans l'eau, soit dans l'animal) à partir duquel les métallothionéines apparaissent. Dans le cas des patelles et des pourpres du canal de Bristol, ce seuil aurait été atteint, mais non dans le cas des bigorneaux. Il est intéressant de constater aussi que parmi les mollusques que nous avons récoltés dans le canal de Bristol, c'est cette dernière espèce qui contient de loin les plus faibles teneurs en Cd alors qu'en laboratoire dans 0.5 ppm de Cd, les bigorneaux accumulent de Cd plus rapidement que les patelles.

On remarque donc pour les trois espèces considérées dans cette étude que des concentrations élevées de Cd dans les animaux s'accompagnent toujours de l'existence d'une grande partie de métal sous forme de Cd-thionéines alors que chez les animaux à faible teneur en Cd, ce constituant n'existe pas en quantité détectable.

En conclusion, toutes ces observations permettent de considérer que les métallothionéines agissent comme un piège à Cd. Ajoutons que cette idée se trouve confirmée par ce que l'on sait des métallothionéines chez les Vertébrés, par exemple que leur concentration augmente en réponse à l'intoxication par le cadmium et qu'elles ne disparaissent qu'extrêmement lentement lorsque l'exposition à ce métal cesse (Chen et al., 1975).

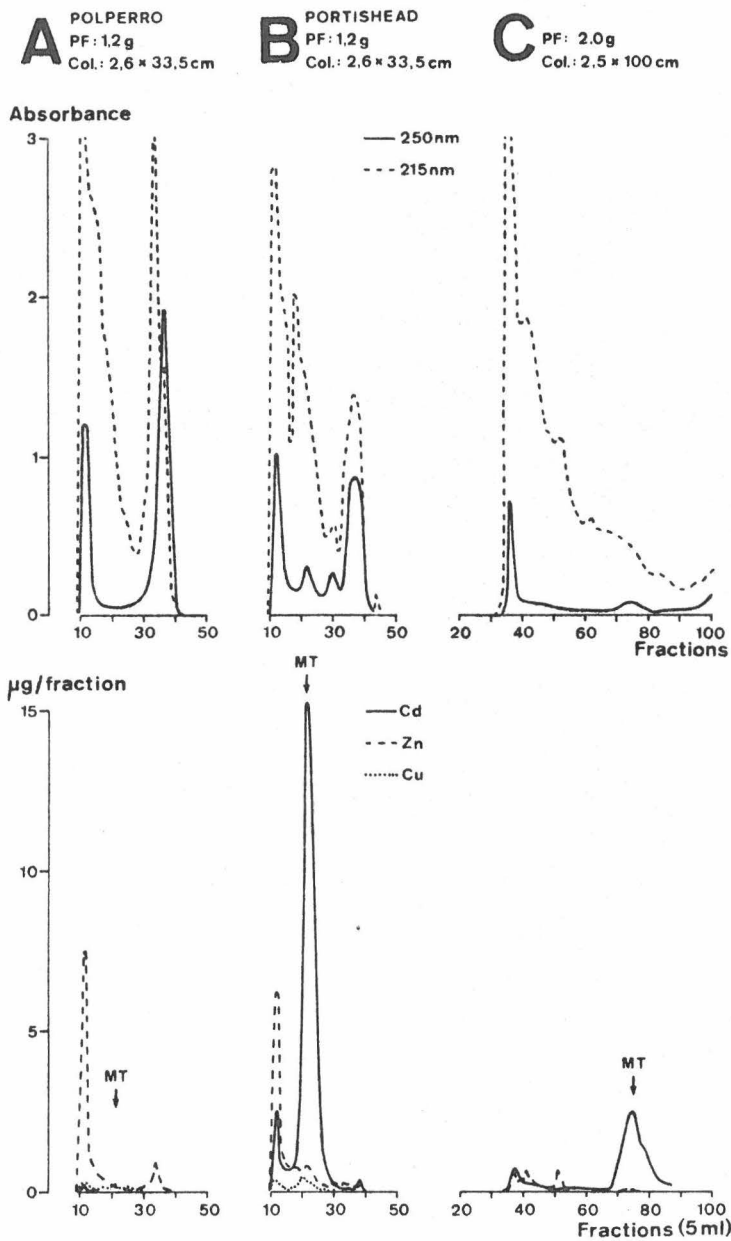


Fig. 1. Profils chromatographiques d'échantillons de *Lactuca vulgaris* provenant d'une zone non polluée (A), polluée (B) ou ayant subi en laboratoire une intoxication au Cd (C).
PF = poids frais de l'échantillon utilisé pour la préparation de l'extrait. Volume des fractions : 5 ml.

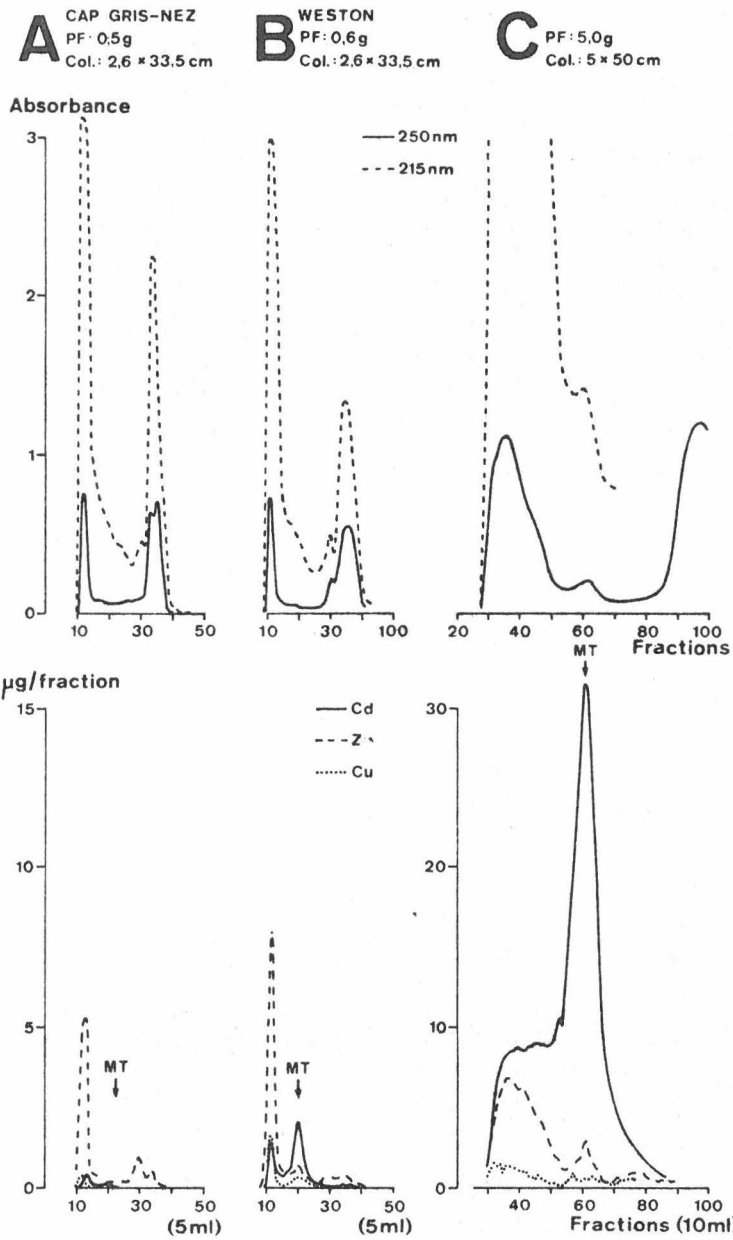


Fig. 2. Profils chromatographiques d'échantillons de *Purpura lapillus* provenant d'une zone non polluée (A), polluée (B) ou ayant subi en laboratoire une intoxication au Cd (C).

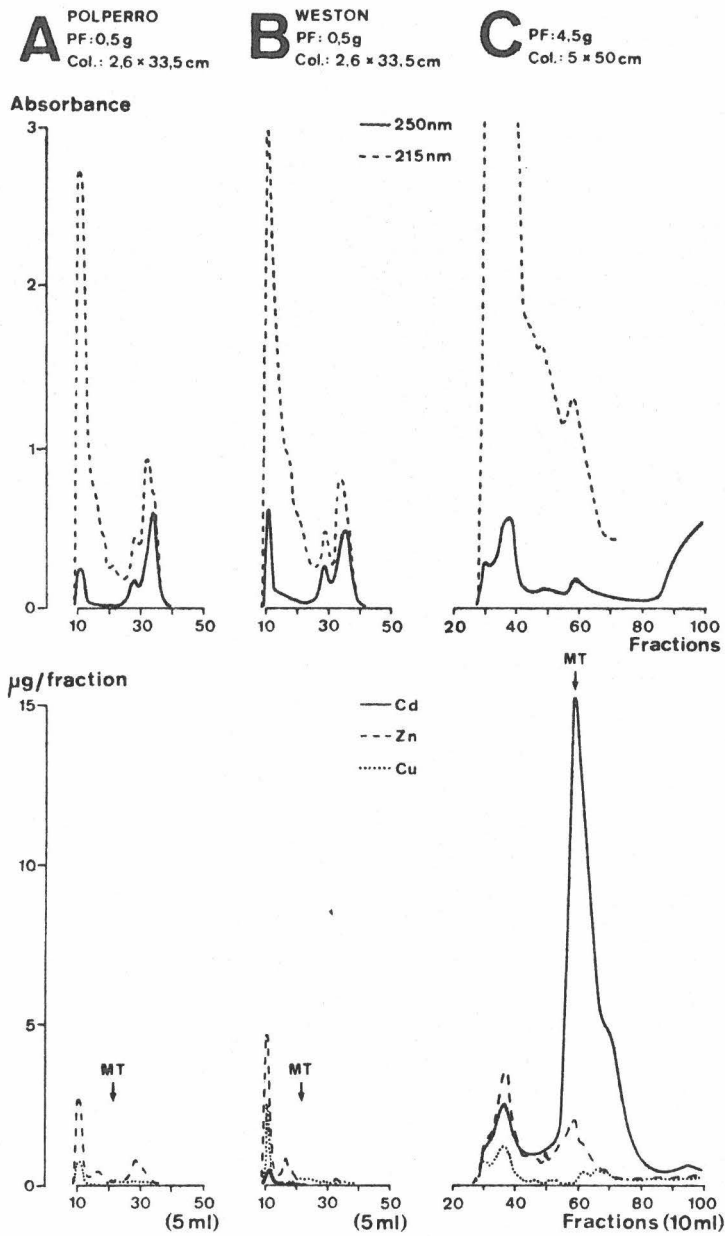


Fig. 3. Profils chromatographiques d'échantillons de *Littorina littorea* provenant d'une zone non polluée (A), polluée (B) ou ayant subi en laboratoire une intoxication au Cd (C).

Donc, bien que les métallothionéines soient généralement considérées comme des agents protecteurs vis-à-vis de la toxicité de métaux tels que le Cd ou le Hg, ce qui, du point de vue strictement toxicologique, leur confère un rôle bénéfique, il semble d'autre part que du point de vue écologique, on doive leur attribuer un rôle néfaste dans le sens où, en favorisant la fixation des métaux lourds dans les organismes, elles augmentent le risque de contamination des animaux occupant les échelons supérieurs des chaînes alimentaires.

REMERCIEMENTS :

Nous tenons à remercier les membres de tous les laboratoires anglais qui nous ont aidés à réaliser ce travail et plus particulièrement ceux du laboratoire du Somerset Country Council à Taunton.

Cette recherche a été réalisée dans le cadre des actions concertées en Océanologie des Universités belges.

ABSTRACT

The part of metallothioneins in the storage of heavy metals in marine organisms. As it has been recently shown in laboratory experiments that heavy metals could bind to metallothioneins, we have compared the distribution of Cd, Zn and Cu in three species of Molluscs (*Patella vulgata*, *Littorina littorea* and *Purpura lapillus*)

- 1 - living in non or very polluted areas of S-W England
- 2 - after experimental contamination by Cd.

Our results show that the rate of accumulation of these metals can be very different according to the studied species and that an important load of Cd-binding thionein can be detected in animals with high levels of that metal. Metallothioneins, although generally considered as a protective mechanism, may be responsible for high metal loads in some organisms living in polluted sea water.

BIBLIOGRAPHIE

- BOUQUEGNEAU J.M., GERDAY Ch. et DISTECHE A., 1975 - *FEBS Letters*, 55, 173-177.
- BUTTERWORTH J., LESTER P. et NICKLESS G., 1972 - *Mar. Poll. Bull.*, 3, 72-74.
- CHEN R.W., WHANGER P.D. et WESWIG P.H., 1975 - *Biochem. Med.*, 12, 95-105.
- DISTECHE A., 1976 - Programme National de Recherche et de Développement - Environnement eau - Projet Mer - Rapport final, volume 9 : Contamination des produits de la mer, pp. 121-264, Edité par J.C.J. Nihoul et A. Distèche, Services du Premier Ministre - Programmation de la Politique Scientifique, Bruxelles.
- MACLEAN F.I., LUCIS O.J., SHAIKH Z.A. et JANSZ E.R., 1972 - *Fedn. Proc. Fedn. Am. Soc. Exp. Biol.*, 31, 699.
- MARAFANTE E., 1975 - *Experientia*, 32, 149-150.

- MARGOSHES M. et VALLEE B.L., 1957 - *J. Am. Chem. Soc.*, 79, 4813-4814.
 - NOEL-LAMBOT F., 1976 - *Experientia*, 32, 324-325.
 - OLAFSON R.W. et THOMPSON J.A.J., 1974 - *Mar. Biol.*, 28, 83-86.
 - PEDEN J.D., CROTHERS J.H., WATERFALL C.E. et BEASLEY J., 1973 - *Mar. Poll. Bull.*, 4, 7-10.
 - PIOTROWSKI J.K., BOLANOWSKA W. et SAPOTA A., 1973 - *Acta Biochem. Pol.*, 20, 207-215.
 - SHAIKH Z.A. et LUCIS O.J., 1970 - *Fed. Proc.*, 29, 298.
 - STENNER R.D. et NICKLESS G., 1974 - *Nature*, 247, 198-199.
 - SUDA T., HORIUCHI N., OGATA E., EZAWA I., OTAKI N. et KIMURA M., 1974 - *FEBS Letters*, 42, 23-26.
-

ACTIONS CONCERTÉES EN OcéANOLOGIE

RAPPORT D'ACTIVITÉ

1977

Annexe n° 9

ATPase ACTIVITY IN MERCURY INTOXICATED EELS.

ATPase activity in mercury intoxicated eels

J. M. Bouquegneau¹

Laboratory of Oceanology, University of Liège, 22, quai Van Beneden, B-4020 Liège (Belgium), 19 November 1976

Summary. Eels intoxicated by lethal doses of HgCl₂ accumulate mercury in their gills. Mercury inhibits the ouabain-sensitive Na⁺K⁺ATPase activity of gills involving the rupture of the fish NaCl balance.

We have previously shown that the lethal effect of mercury (HgCl₂) added to seawater on the seawater-adapted eel *Anguilla anguilla* could be attributed to a disruption of the NaCl balance of the animal². Indeed, when considering fishes, the gill appears to be the most likely site of attack by heavy metals and, in our case, no inhibition of the respiratory processes occurs³. Moreover the effects of mercury are similar whether isolated gills or whole animals are intoxicated³. It appears then that mercury acts in the gills on the osmoregulatory processes, either active or passive ionic movements. Since the work of Skou⁴, there is agreement on the fact that the ouabain-sensitive Na⁺K⁺ATPase has a fundamental role in the active transport^{5,6}. In this paper, we have tried to see whether the disruption of NaCl balance could be attributed to an inhibition of the gill ATPase activity.

Material and methods. Fresh water eels are adapted for at least 10 days to natural seawater. Each control fish is then placed in a polyethylene bag containing 10 l of continuously oxygenated seawater; the fishes to be intoxicated are trapped in an identical bag containing 10 l of oxygenated seawater with 1 ppm of HgCl₂. Both series of eels are kept under these conditions for 30 h. They are then killed and the blood is collected after section of the ventral aorta. The left gills are cut off for the ATPase activity measurement and the right ones for the determination of mercury.

Determination of mercury in the gills. The digestion of the sample is performed following the method described by Sandell⁷ and modified by Mayer⁸, in order to avoid the loss of mercury associated with the use of the concentrated nitric acid. The analysis of the solution is made by the dithizone technique⁷.

Table 1. Reversibility of the effect of HgCl₂ on the Na⁺K⁺ATPase activity of gills by addition of cysteine to the homogenate

Experimental conditions	Percentage of Na ⁺ K ⁺ ATPase activity in the gill related to total ATPase activity
Optimal conditions	31%
Optimal conditions + HgCl ₂ 10 ⁻⁵ M	10%
Optimal conditions + HgCl ₂ 10 ⁻⁵ M + cysteine 10 ⁻³ M	29%
Optimal conditions + cysteine 10 ⁻³ M	32%

Table 2. Effect of HgCl₂ intoxication on Na and Cl concentrations in plasma of seawater adapted eels (mEq/l)

	Na	Cl
Control eels	144.0 ± 6.2	131.8 ± 4.5
Intoxicated eels	208.0 ± 18.0	175.3 ± 17.1

Determination of Na, K and Cl in the plasma. The blood is centrifuged at 1085 × g for 10 min (Sorvall S centrifuge). The ions are determined in the supernatant. The analysis of sodium and potassium is performed using an Eppendorf flame photometer. Chloride is determined with the Marius Chlor-o-Counter.

Determination of ATPase activity. Gill filaments are ground in a 0.5 M sucrose solution containing 5 mM EDTA (pH adjusted to 7.4 with Tris-HCl buffer) in an homogenizer with a Teflon pestle. The solution is centrifuged stepwise at 121 × g for 10 min and at 12,100 × g for 30 min. The precipitate is suspended in a 0.5 M sucrose solution containing 5 mM EDTA (pH 7.4) and is used immediately for testing its ATPase activity.

Assay of ATPase activity. The reaction mixture is adjusted to a final volume of 2 ml and contains 4 mM ATP, 100 mM NaCl, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂ and 0.2 ml of the enzyme solution⁶. After incubation for 30 min, the reaction is stopped by addition of 0.2 ml of 50% trichloroacetic acid. Inorganic phosphate is determined by the method of Fiske and Subbarow, and proteins are analyzed according to the method of Folin. Ouabain-sensitive Na⁺K⁺ATPase activity is obtained by subtracting the ouabain-non sensitive ATPase activity from the whole ATPase activity (the concentration of ouabain used is 0.2 mM).

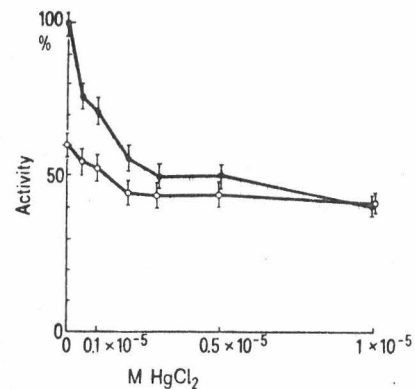


Fig. 1. Effect of HgCl₂ on ATPase activity in eel gills. ●, Total activity; ○, ouabain-non sensitive ATPase activity; I, 2 × SE.

- The author wishes to express his sincere gratitude to Professor A. Disteche and Professor E. Schoffeniels for discussions during the investigation. This research was carried out in participation in the Belgian National Research and Development Program on the Environment-Water-Sea Project-Office of the Prime Minister-Interministerial Commission for Science Policy and Programming.
- J. M. Bouquegneau, Bull. Soc. Roy. Sci. Lg. 9-10, 447 (1973).
- J. M. Bouquegneau, Thèse de Doctorat en Sciences Zoologiques. Université de Liège, Belgium (1975).
- J. C. Skou, Biochim. biophys. Acta 23, 394 (1957).
- J. Maetz, Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B 262, 209 (1971).
- M. Kamiya and S. Utida, Comp. Biochem. Physiol. 26, 675 (1968).
- E. B. Sandell, in: Colorimetric Metal Analysis, 3rd Ed. Intersci. Publ. Inc., New York, London.
- J. Mayer, Bull. env. Contam. Tox. 5, 383 (1970).

Results and discussion. The total MgNaKATPase activity is $0.68 \mu\text{M Pi/mg protein h}$ ($\text{SE}=0.03$; $n=6$). The in vitro effect of HgCl_2 on the enzyme is shown in figure 1. In absence of mercury, the ouabain-sensitive ATPase activity is about 40% of the total activity. For $3 \times 10^{-6} \text{ M HgCl}_2$ concentration, the ouabain-sensitive ATPase activity is completely inhibited. Moreover there appear to be 2 distinct fractions in the ouabain-non sensitive ATPase: one HgCl_2 -sensitive (representing 15% of the total activity) and one HgCl_2 -non sensitive (at concentrations $< 10^{-6} \text{ M}$) representing 45% of the total activity.

The effect of CH_3HgCl is shown in figure 2. The shape of the curves is similar to what is observed during inhibition by HgCl_2 , but CH_3HgCl seems somewhat less toxic: the ouabain-sensitive ATPase is totally inhibited when the CH_3HgCl concentration reaches $8 \times 10^{-6} \text{ M}$. As the inactivation is faster with HgCl_2 , we have used this salt in the intoxication experiments described later in this paper. Regarding the cause of the observed inhibition of the ouabain-sensitive ATPase, it is probably due to the great affinity of Hg^{++} for $-\text{SH}$ compounds. Indeed, cysteine 10^{-3} M added to the preparation suppresses the inhibitory effect of mercury as shown in table 1.

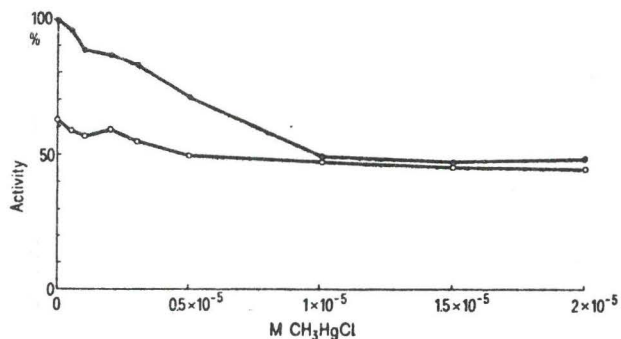


Fig. 2. Effect of CH_3HgCl on ATPase activity in eel gills. ●, Total activity; ○, ouabain-non sensitive ATPase activity.

If mercury is able in vitro to react with the gill ouabain-sensitive ATPase, it remains to be shown that it does so in vivo. We have assayed the percent ouabain-sensitive ATPase activity in gill homogenates of intoxicated eels. Those values are compared with the percent activity in gill homogenates of control eels.

The percentage of ouabain-sensitive ATPase activity is only $10.2 \pm 5.7\%$ in the 6 intoxicated eels, whereas it represents $34.8 \pm 4.0\%$ of the total activity in the 6 control eels. The difference between those averages is significant when applying the t-test ($p < 0.05$).

Owing to the fact that gills contained $13.7 \pm 1.5 \text{ ppm Hg}$ and considering the different dilutions during the ATPase assay, leading to a final concentration of 10^{-6} M in the homogenate, figure 1 shows that we should only expect a 20% inhibition of the $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity instead of the 48% observed. It is concluded that the observed

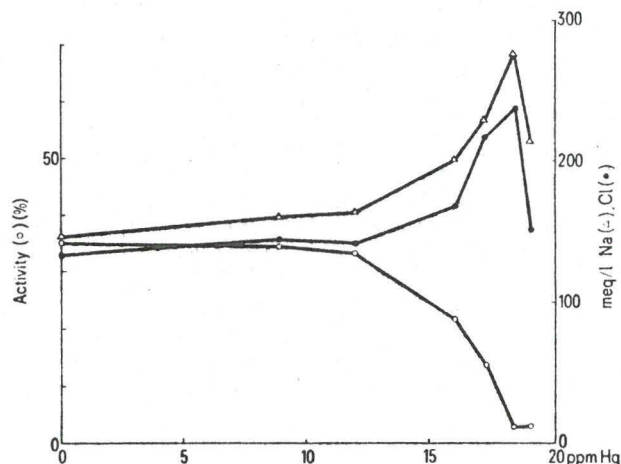


Fig. 3. Relation between Hg concentrations and ATPase activity in the gills and NaCl concentrations in the plasma. Δ , Na concentration; \bullet , Cl concentration; \circ , percentage of ouabain-sensitive $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity.

inhibition occurs in vivo, although a secondary effect caused by homogenization cannot be totally excluded. The effect of intoxication on the NaCl concentrations in the plasma is shown in table 2. Each datum is the average of 6 determinations $\pm \text{SE}$. The increases of Na and Cl concentrations are very significant (Na: $p < 0.01$; Cl: $p < 0.05$).

Considering the data corresponding to intoxicated eels, both ATPase activity assays and ion determinations, the SE appear to be rather high and reflect important individual variations. Individual variations are very important, but the relationship between the different data is clearly seen in figure 3. When the Hg concentration increases, the ATPase activity decreases in the gills and the Na and Cl concentrations increase in the plasma. The rupture of osmotic equilibrium appears only when the mercury concentration in the gill reaches about 10 ppm. To conclude, the lethal effect of mercury previously related to a rupture of the NaCl balance² can be attributed to an inhibition of the $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$ activity of the gills and consequently to an inhibition of the NaCl transport. It is otherwise interesting to note that no decrease of the K content both of plasma or gills occurs in such intoxicated eels^{2,3}, which shows to be debatable, as quoted by other authors^{9,10}, the theory of MAETZ⁵ of a NaK coupled active transport in gills of seawater teleosts.

- 9 W. T. W. Potts and W. R. Fleming, *J. exp. Biol.* 54, 63 (1971).
- 10 R. Gilles, in: *Marine Ecology*, vol. 2, part 1, ch. 5, p. 259. Ed. O. Kinne. John Wiley, New York 1975.