

C.I.P.S.

MATHEMATICAL MODEL
OF THE POLLUTION IN THE NORTH SEA.

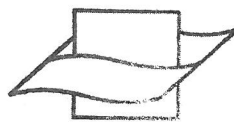
TECHNICAL REPORT
1972/PHYSIOL.:SYNTHESE 06

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

222763

INTOXICATION DES MOULES ET DES ASTERIES (ASTERIAS RUBENS) PAR LES METAUX LOURDS.

cl.Gerets, W.Delhaye, Ch. Perpeet, M. Vloebergh, M. Jangoux.



Vlaams Instituut voor de Zee
Flanders Marine Institute

I. INTOXICATION DES MOULES PAR LES METAUX LOURDS.

M.-Cl. GERETS, W. DELHAYE, Ch. PERPEET.

1. Effet sur la mortalité.

Comme il est impossible de reproduire en laboratoire les conditions du milieu naturel quant à l'évolution d'un polluant, diverses possibilités s'offraient à nous. Nous pouvions, ou bien mettre l'animal en présence d'une certaine concentration de substance toxique, vérifier que celle-ci reste constante ou renouveler régulièrement le milieu, ou bien mettre l'animal en présence de la même concentration et laisser évoluer le système. Dans ce dernier cas, une partie du polluant peut se perdre par suite de la fixation de celui-ci sur d'autres substances ou organismes.

L'intérêt d'une telle étude est pourtant évident à partir du moment où, travaillant toujours dans les mêmes conditions, on entreprend l'étude comparative de l'effet de plusieurs ions.

a) le cuivre

La technique consiste à placer 50 moules (*Mytilus edulis* venant d'un brise lame de Knokke) dans 10 litres d'eau de mer synthétique additionnée de sulfate de cuivre et de relever chaque jour le nombre de moules mortes. Après divers essais en eau de mer naturelle, l'emploi d'eau de mer synthétique s'est révélé être plus approprié car les résultats sont à chaque expérience comparables.

Les concentrations de cuivre utilisées vont de 0,1 à 13 mg de Cu^{++} / l.(ppm). Des moules dans la même eau sans cuivre sont utilisées comme témoins.

Les graphiques obtenus nous permettent de déterminer le LT_m , temps pour lequel, à une concentration donnée, la moitié des individus sont morts. On remarque que dans 0,1 ppm de Cu^{++} , ceux-ci résistent plus d'un mois, tandis qu'à partir de 0,2 ppm, l'effet néfaste de ce métal apparaît. De 0,3 à 1 ppm, le LT_m se situe de 5-6 à 10 jours; de 1,5 à 2 ppm à 6 jours et de 2,5 à 5 ppm à 4-5 jours. (voir graphiques 1 et 2).

Les effets visible de la toxicité du cuivre se marquent sur la filtration (branchie) et la fixation (filaments de byssus) des moules. Si les animaux filtrent l'eau de mer et posent normalement les filaments de byssus à 0,1 ppm, ils le font d'autant moins qu'ils

sont placés dans des concentrations plus élevées de cuivre. Aux fortes concentrations, rares sont encore les animaux qui se fixent, les autres ne le font que par 2 ou 3 filaments de byssus. La sécrétion du byssus dépend de 2 actions principales, d'une part le tannage de protéines, dont le collagène, et d'autre part les mouvements musculaires du pied. Le cuivre peut dès lors agir à plusieurs endroits, par exemple au niveau des polyphénoloxydases intervenant dans le tannage ou encore sur les enzymes oxydatifs procurant l'énergie aux muscles.

b) le mercure

Ce métal lourd a été mis en solution dans l'eau de mer synthétique sous forme de chlorure de mercure. Les graphiques représentant les courbes de mortalité nous donnent également les LT_m pour diverses concentrations de Hg^{++} ; la valeur est de 11 jours pour 0,5 ppm; 6 à 7 pour 0,6 à 0,9 ppm; 3,5 à 5 pour 1 à 2,5 ppm; et 6 à 6,5 pour 3 à 5 ppm. (graphique 2).

Il est à noter que dans le cas du mercure, aux faibles et moyennes concentrations, on remarque un long temps de latence pendant lequel les valves des moules demeurent fermées, l'animal vit en anaérobiose et ne se trouve pas en relation directe avec le milieu extérieur. Ce temps de latence existait également dans le cas du cuivre mais était bien plus bref. Nous avons dès lors fait intervenir ce temps de latence en déterminant le Δ ($\Delta = LT_m - \text{temps de latence}$). (graphique 4).

Dans les intoxications au mercure, on observe une pose plus ou moins normale de byssus à la concentration de 1 ppm de Hg^{++} .

c) le zinc et le plomb

Le zinc a été employé sous forme de sulfate de zinc ($Zn SO_4$) et le plomb sous forme de nitrate de plomb ($Pb(NO_3)_2$). La toxicité de ces deux métaux est beaucoup moins grande que les deux précédents. Même à une concentration de 10 ppm de Pb^{++} les moules sont encore vivantes au 15ème jour, filtrent et sont fixées normalement.

d) mélanges de métaux

D'après la littérature, nous nous attendions à observer une plus forte mortalité dans le cas de mélange de métaux. En ce qui concerne les moules, ce fait ne se confirme pas et une solution de mercure

et de cuivre dont la somme correspond à 1 ppm est moins toxique qu'une solution 1 ppm de cuivre ou qu'une solution 1 ppm de mercure pure.

2. Effet sur la respiration.

Les métaux lourds affectant la respiration des animaux, nous avons étudié celle-ci comme test de toxicité subléthale.

a) Respiration de Mytilus edulis en eau de mer pure

La mesure de la respiration est effectuée grâce à une électrode Beckman Spinco O₂ à 15°. Cet appareil nous permet de suivre la diminution de la pression partielle en Oxygène (exprimée en mm de Hg) au cours du temps dans une seringue de 100 ml contenant l'animal. La respiration étant fonction du poids, nous avons utilisé des animaux de poids voisin (de 3,4 à 3,8 g). Afin d'éviter l'anaérobiose par fermeture des valves de la moule, ces valves ont été meulées, ce qui a pour but de mettre l'animal directement en contact avec le milieu extérieur. Enfin la respiration dépendant aussi de la tension initiale en oxygène, celle-ci a été ajustée à 150 mm Hg pour tous les animaux.

Les résultats relatifs à la respiration de Mytilus edulis sont repris sur le graphique 5. Vu la variation, nous obtenons une zone (zone hachurée) dans laquelle se placent des points relatifs aux moules témoins. Si nous prenons comme critère le temps nécessaire pour utiliser la moitié de l'oxygène disponible, il est compris entre 3 et 8 heures.

Des mesures de la respiration des moules ont été effectuées au cours de toute l'année; ces mesures subissent des variations et atteignent un maximum lors de la période de ponte. La respiration est donc fonction de l'état de maturité sexuelle de l'animal. (graphique 6).

b) Respiration de Mytilus edulis dans des solutions de cuivre - en fonction de la concentration de cuivre

Tous les milieux normaux et pollués par le cuivre possèdent un pH situé entre 6 et 8, zone de pH dans laquelle la consommation d'oxygène n'est pas influencée par ce facteur.

Diverses concentrations de cuivre (sous forme de sulfate) ont été employées : 0,025 ; 0,13 ; 0,25 ; 0,50 ; 0,77 ; 1 ; 2 et 3 ppm. Le graphique 5 nous permet de constater que les courbes de consommation d'oxygène pour les individus placés dans les faibles concentrations de cuivre (0,025 et 0,13 ppm) se placent dans la zone hachurée des témoins. A 0,25 et 0,77 ppm de Cu^{++} les courbes se placent en dehors du secteur normal et la moitié d'oxygène n'est consommée qu'après 15 heures. Pour les fortes concentrations, (1, 2, et 3 ppm), la respiration est extrêmement faible. La réduction de la respiration en fonction de la concentration du cuivre suit une courbe exponentielle.

Jusqu'à une concentration de 0,25 l'effet du cuivre est réversible, c'est-à-dire que si on replace les animaux dans l'eau de mer pure, on retrouve une respiration normale. Au-dessus de cette concentration, l'effet du cuivre est irréversible.

- en fonction du temps dans la solution de cuivre
.....

Après l'étude de la consommation d'oxygène en fonction de la concentration du métal lourd, nous avons fait des mesures de celle-ci en fonction du temps de séjour dans le polluant (24, 48 et 72 heures). Il semble bien que le temps intervienne moins, l'effet du cuivre est précoce et lorsqu'il est atteint, il ne varie plus.

- en fonction du rythme saisonnier
.....

Nous avons mis une variation saisonnière de la respiration en évidence, celle-ci se maintient dans les solutions de cuivre mais à un rythme nettement inférieur. (graphique 6).

c) conclusions

Le métabolisme respiratoire des moules est fort sensible au cuivre dès une concentration de 0,25 ppm, mais ce n'est qu'à partir de 0,5 ppm que les effets du métal sont irréversibles.

L'action du cuivre paraît assez immédiate et pour chaque concentration atteint très rapidement son maximum. Malgré la présence de cuivre, la respiration des Moules reste soumise, quoique de façon atténuée, au rythme saisonnier (graphique 6).

Il apparaît que certains métaux lourds inhibent les processus enzymatiques et particulièrement ceux de la respiration. En ce qui

concentre le cuivre, il s'agirait d'une action au niveau des groupes sulfhydriles.

On sait de plus que chez les Mollusques, le transfert d'oxygène se fait grâce à l'hémocyanine, pigment contenant du cuivre. Certains auteurs ont montrés qu'en présence de fortes concentrations de cuivre, ce pigment disparaît.

De nombreuses études restent donc à faire dans ce domaine.

3. Histochimie des métaux lourds

Après passage dans des solutions de 0 ; 0,5 ; 1 et 2,5 ppm de cuivre, les animaux sont fixés, enrobés, coupés et traités afin de colorer spécifiquement le cuivre. Seul aux hautes concentrations (2,5) on remarque, après examen microscopique, d'infimes granules de cuivre au niveau du mucus entourant le manteau, les branchies et le pied de la moule. Bien que les granules soient également présents dans la lumière du tube digestif, nous n'avons jamais pu en observer dans les cellules.

Outre le cuivre, nous avons également fait des essais de colorations du mercure. Dans ce cas, nous pouvons noter une accumulation de granules à l'intérieur de certaines cellules du bord du manteau (macrophages).

Les études histochimiques ne nous apportent donc que peu de renseignements. L'étude biochimique du contenu des organes de l'animal nous sera par contre, vraisemblablement d'une plus grande aide dans la compréhension du cheminement du polluant.

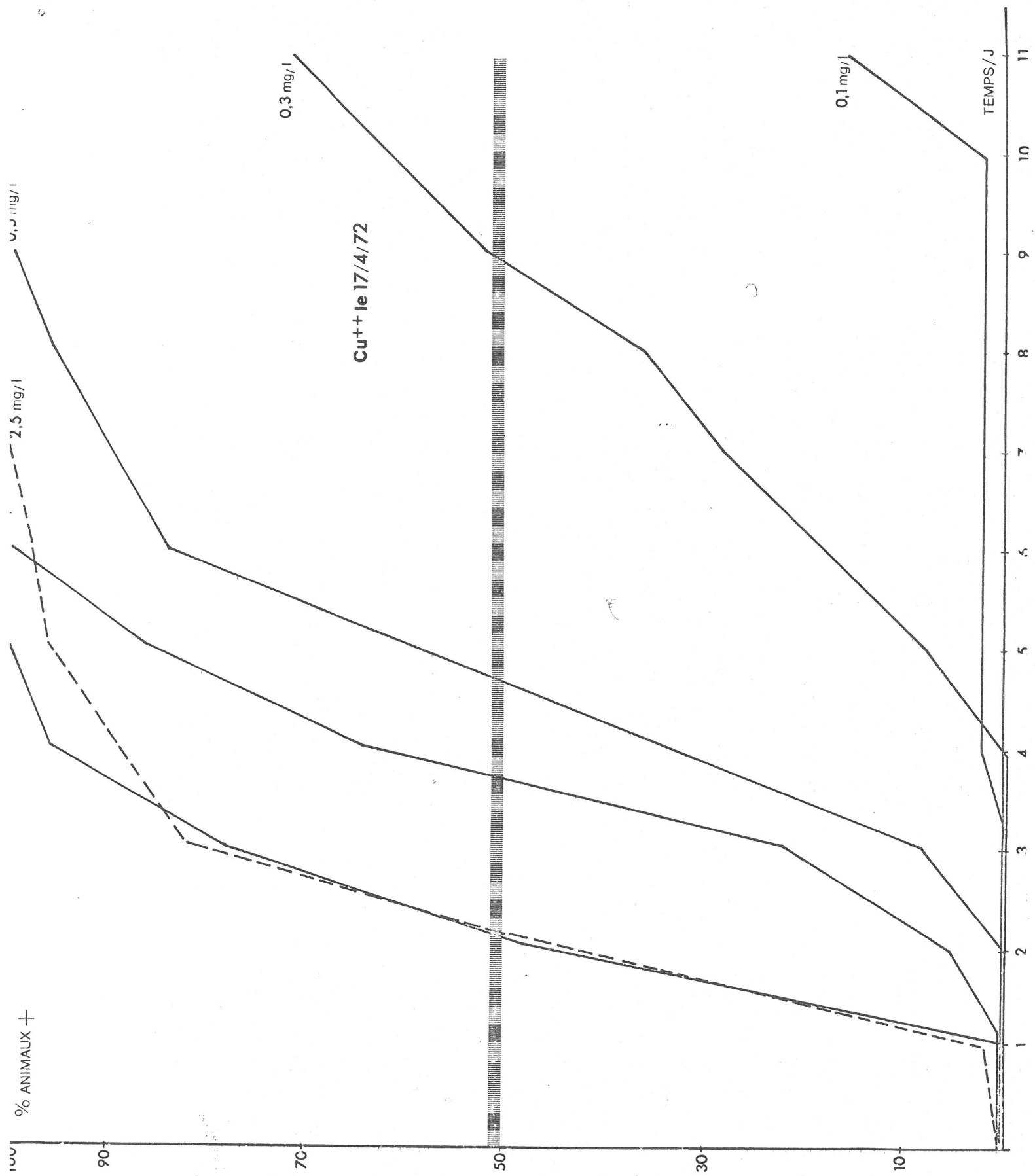


FIG.1.: Effet de la concentration en Cu^{2+} de l'eau et du temps d'intoxication sur la mortalité de Mytilus edulis.

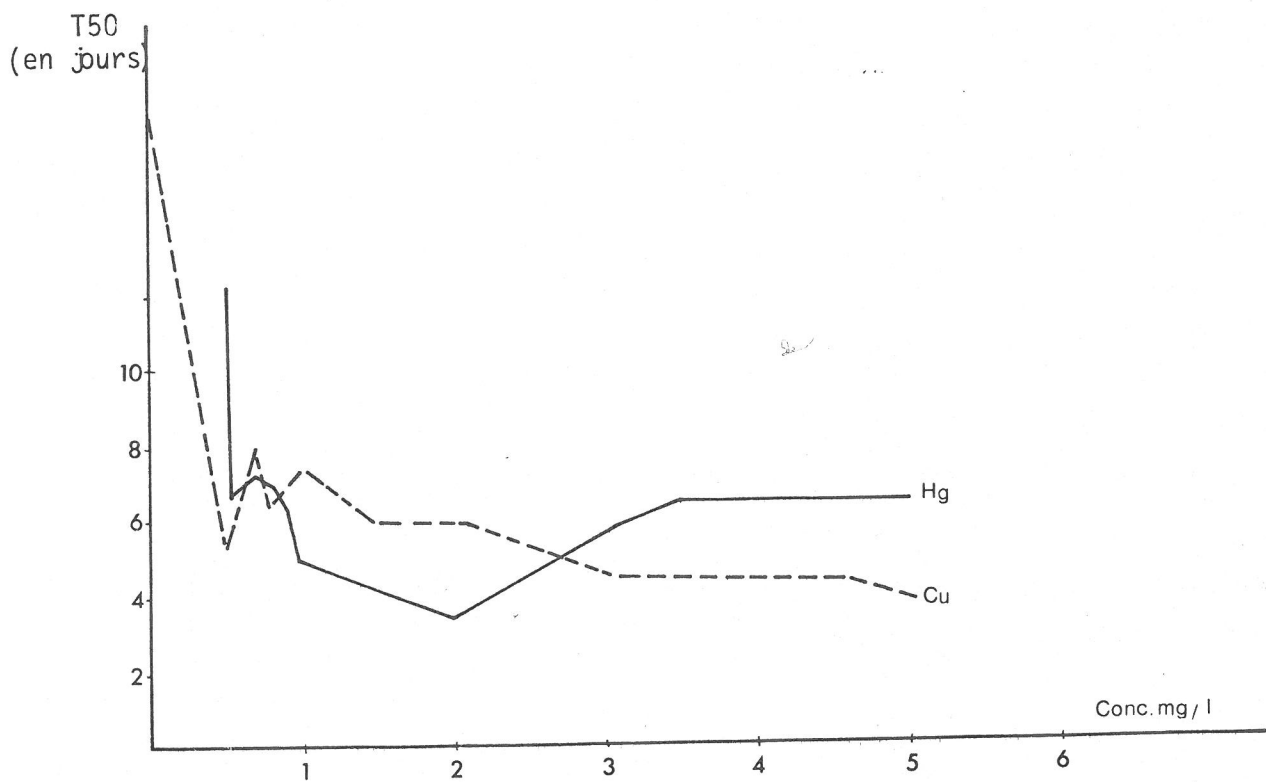


FIG.2. : Variation du T50 chez Mytilus edulis en fonction de la concentration en Cu^{2+} ou en Hg^{2+} dans l'eau.

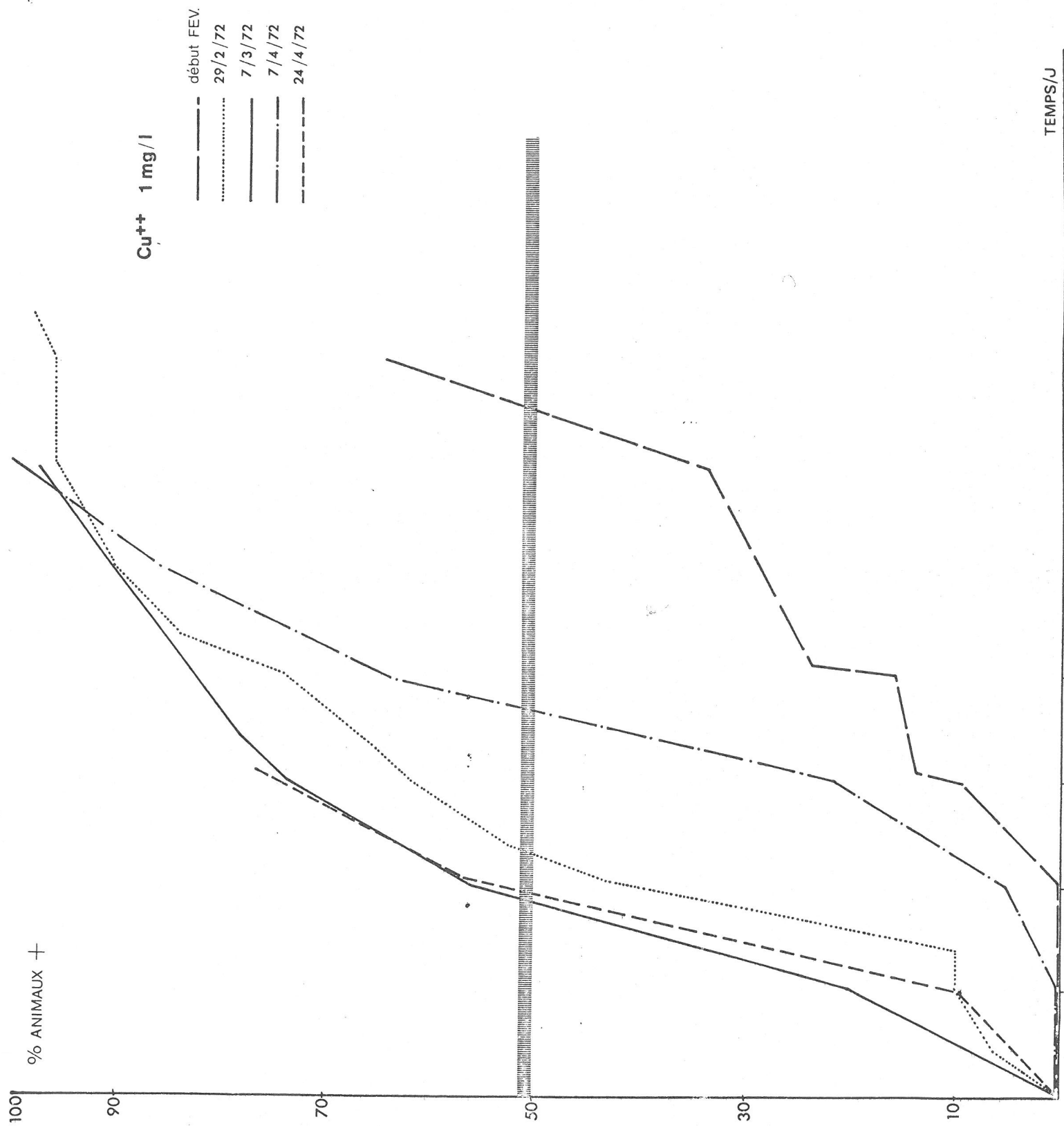
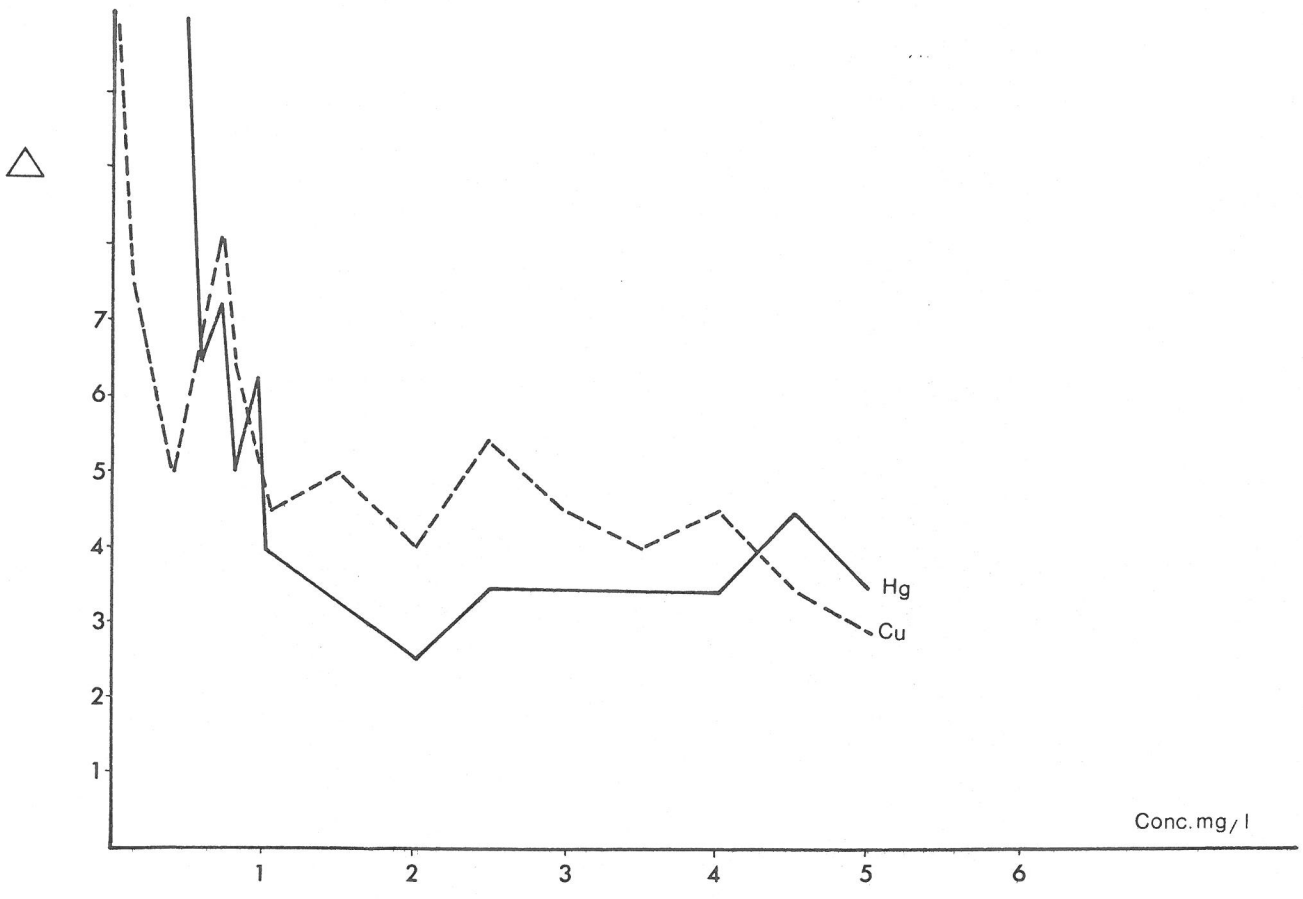


FIG.3.: Effet de la période de reproduction sur la sensibilité au Cuivre chez Mytilus edulis.



GRAPH. 4

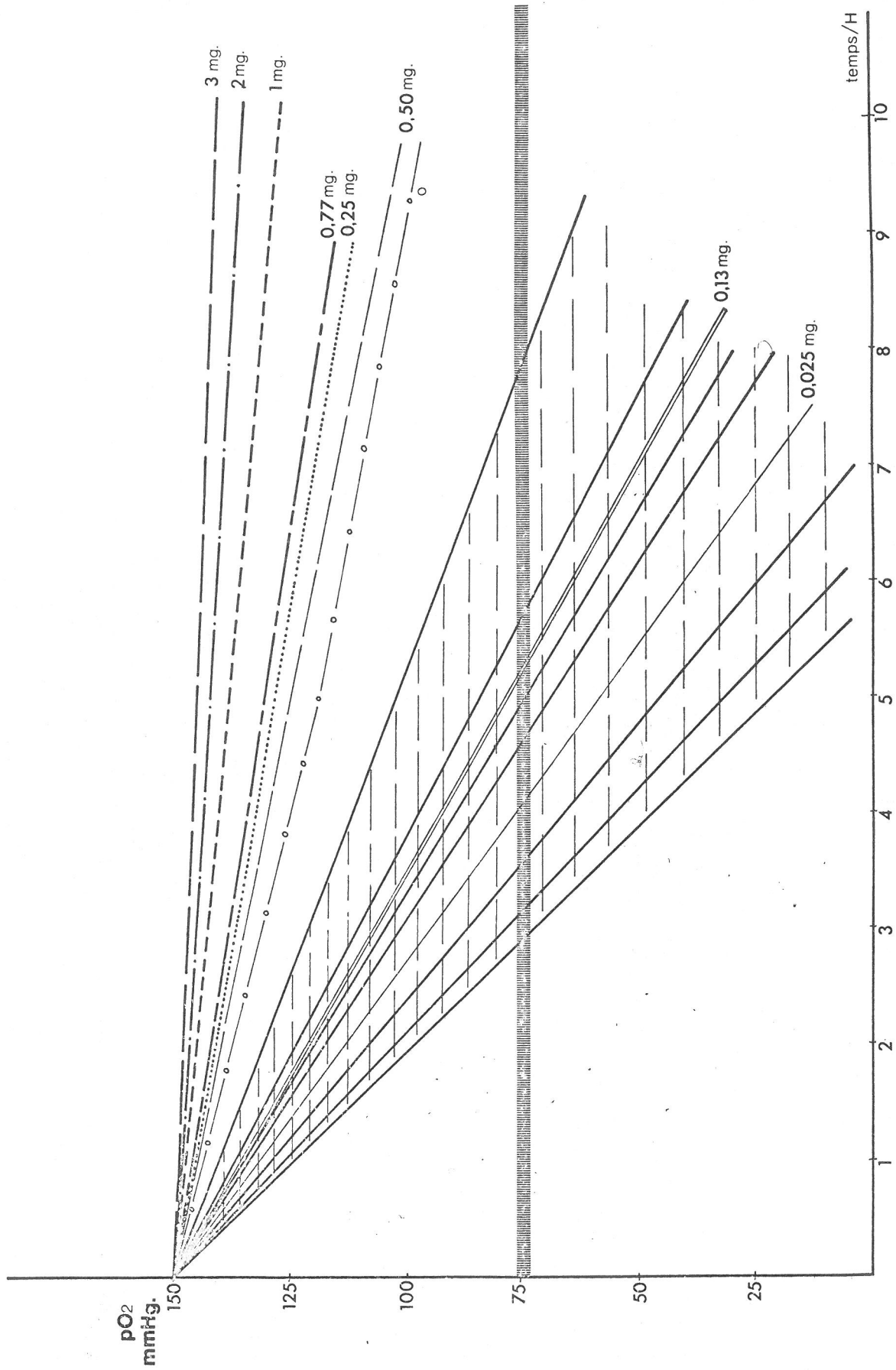


FIG. 5.: Effets relatifs de diverses concentrations en Cu^{2+} sur la respiration chez Mytilus edulis.

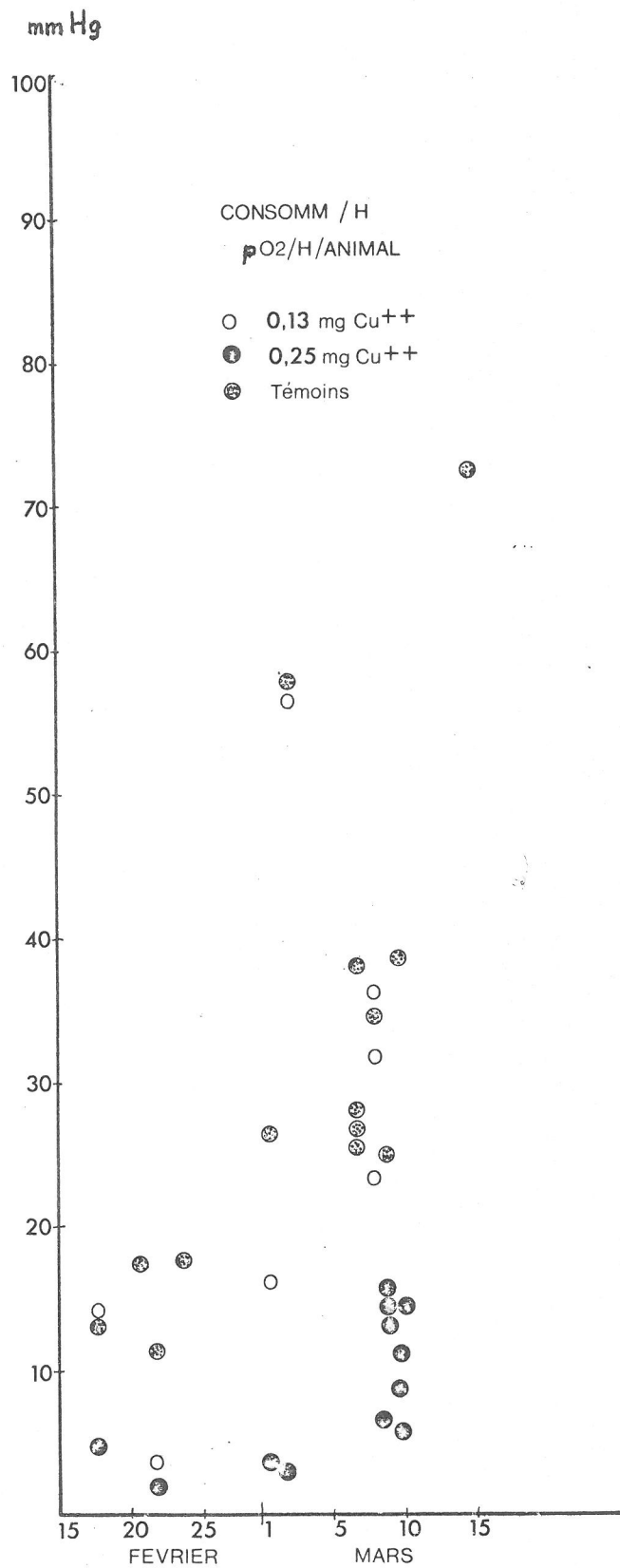


FIG.6.: Effet du rythme saisonnier sur la respiration chez Mytilus edulis en présence d'ions Cu²⁺

II. INTOXICATION DES ASTERIES (Asterias rubens) PAR LES METAUX LOURDS (Cuivre).

Ch. PERPEET, M. VLOEBERGH, H. JANGOUX

Les étoiles de mer étudiées proviennent de la région Nord-Est de la côte belge (Knokke). Dans tous les cas, le milieu expérimental utilisé était constitué d'eau de mer synthétique (32 % de sel marin HW).

Les individus témoins (en milieu non contaminé) n'ont jamais présenté de troubles.

1. Comportement des astéries en milieu pollué.

Nos observations ont principalement porté sur l'effet de l'ion Cu^{++} (apporté au milieu sous forme de citrate ~~de citrate~~ de Cuivre). Nous avons suivi les modifications comportementales présentées par plus de 150 animaux après un séjour dans des eaux différemment polluées (0,025 à 2 p.p.m. Cu^{++}).

De l'ensemble des observations, il apparaît qu'une concentration/faible de l'ion Cuivre (0,04 p.p.m.) entraîne massivement la mort de tous les individus qui lui sont soumis ~~en~~ dans les 5 jours. Ce seuil de 0,04 p.p.m. est particulièrement intéressant à constater surtout lorsque l'on sait que les concentrations de ce métal atteignent 0,01 p.p.m. dans les eaux océaniques et 0,02 à 0,03 p.p.m. dans les eaux estuariennes (embouchure de l'Escaut non loin de Knokke).

Au fur et à mesure de l'intoxication par le Cuivre, les animaux présentent différents symptômes. On remarque tout d'abord une intense sécrétion muqueuse ainsi qu'une dépigmentation partielle de la peau. On assiste ensuite à un gonflement généralisé du disque et des bras de l'astérie, à un amollissement de la peau et à une nette diminution de la quantité de liquide coelomique (ce dernier semblant s'être emmagasiné dans les organes digestifs internes). Parallèlement, un engourdissement progressif se manifeste (diminution de l'activité des pieds ambulacraires). Signalons que nombre

de ces symptômes se produisent également lorsque l'étoile de mer est plongée en milieu desalé (BINYON, 1961 et 1962).

Des observations préliminaires sur le comportement des *Asterias rubens* en milieux pollués par d'autres métaux (Hg et Pb, amenés sous forme de chlorures) montrent que pour un même laps de temps (5 jours), des doses de l'ordre de 0,1 p.p.m., voir plus, ne sont guère léthales. Par contre, à plus fortes concentrations, des manifestations identiques à celles précédemment décrites pour le Cu s'observent.

Des expériences actuellement en cours tentent de dresser la symptomatologie précise de l'intoxication des astéries par le Cuivre. Elles ont pour but d'une part de dresser la chronologie de l'apparition des différents symptômes et ce dans un but essentiellement comparatif (comparaison avec les intoxications produites par d'autres métaux), d'autre part de déterminer le seuil de réversibilité de l'intoxication et d'envisager le problème de l'accoutumance.

2. Effet de l'intoxication par le Cuivre sur la respiration.

a) Respiration en milieu non pollué.

Les Astéroïdes ne possèdent aucun organe propre à la respiration et on s'accorde à penser que les échanges respiratoires se font au niveau des pieds ambulacraires (système aquifère), ainsi qu'au niveau des papules, petites excroissances dermiques (FARMAN FARMAIAN, 1966).

Les données relatives à la croissance d'*Asterias rubens* sont peu nombreuses, on sait cependant que la consommation d'oxygène varie avec plusieurs facteurs dont le poids de l'animal, la tension d'oxygène dans le milieu, le pH et la température.

Nous avons cru bon d'étudier tout d'abord les variations de la consommation d'oxygène en fonction du poids des individus. Nous avons donc effectué des mesures de respiration de 35 individus (individus témoins) dont le poids s'échelonnait entre 3 et 30 gr. Les résultats obtenus sont repris au graphique 1 (points noirs),

ils sont exprimés en consommation O_2 (mm.Hg)/h/g. en fonction du poids frais total. Les mesures s'effectuent à l'aide d'un "Gaz Analyser Beeckmann-Spinco".

b) respiration en milieu pollué par le Cuivre.

Le Cuivre a été utilisé à des concentrations allant de 0,025 à 0,100 p.p.m..

Le tableau suivant représente les résultats obtenus en fonction de la concentration de Cu^{++} et du temps d'immersion dans la solution. La consommation d' O_2 est exprimée en mm.Hg par gramme de poids frais et par heure.

TABLEAU 1 : Consommation O_2 (mm.Hg/g/h).

(Cu^{++})	0,025 ppm	0,050 ppm	0,075 ppm	0,100 ppm	témoins
1 jour	4,3	3,5	6,6	4,0	7,5
	5,2	4,2	2,3	3,2	7,4
	5,1	2,5	2,2	5,5	4,8
		4,9	7,9	3,8	8,5
2 jours		6,5	4,1	5,0	10,6
3 jours		6,1	3,8	5,2	6,6

Si on considère les courbes de diminution de la consommation d' O_2 en fonction du temps (graphique 2), en aucun cas celles relatives aux individus intoxiqués ne se trouvent dans la zone des courbes normales. En outre, l'effet du cuivre sur la respiration se marque dès la concentration de 0,025 ppm et dès le premier jour.

Si on complète le graphique 1 avec ces derniers résultats ($\times, \Delta, \square, \square$), on remarque nettement qu'à même poids, la consommation d'oxygène des individus vivant en milieu pollué est moindre que celle des individus témoins.

On peut en conclure que la présence de cuivre dans le milieu influence la respiration d'*Asterias rubens*. Cependant le nombre d'individus expérimentés est trop faible pour qu'on puisse interpréter statistiquement le phénomène. Des manipulations ultérieures sont prévues dans ce sens.

c) Dosage d'activités enzymatiques et histoenzymologie.

La diminution de l'activité respiratoire est nette après séjour en eau polluée, mais à quoi est-elle due? On pourrait penser à une perte d'efficacité des enzymes concernés. Pour vérifier cette hypothèse, nous nous sommes proposé d'étudier le comportement de la déshydrogénase succinique et de la cytochrome oxydase. Ces manipulations sont toujours en cours et nous ne parlerons ici que des résultats préliminaires.

L'activité de la déshydrogénase succinique fut mise en évidence par la méthode de Gasper et Kawatski (1972).

Principe : On mesure (400 nm) la réduction du ferricyanure en ferrocyanure en suivant la diminution de coloration. Cette réduction est permise par la réaction de transformation du succinate en fumarate et en présence d'un inhibiteur de la chaîne des cytochromes (KCN)

Milieu expérimental : 0,3 ml KCN 0,1M (neutralisé à pH 7,5 par HCl N)

0,3 ml Ferricyanure K 0,01M

0,2 ml Succinate Na 10^{-3} M

2 ml tampon phosphate 0,15 M pH 7,5

0,5 ml extrait enzymatique. (broyat de jodia)

TABLEAU 2 : Mesure de l'activité de la déshydrogénase succinique après séjour d'astéries dans un milieu contenant 1 ppm Cu⁺⁺

	PODIA		ESTOMAC		CAEC.PYL.	
	D.O./mg.Prot. et min.		D.O./mg.Prot. et min.		D.O./mg.Prot. et min.	
Témoins	0,0019 0,0028 0,0017	0,0021	0,0026 0,0025 -	0,0017	0,0024 0,0029 0,0039	0,0030
1 heure	0,0021 0,0020 0,0019	0,0020	0,0014 0,0016 0,0013	0,0014	0,0014 0,0027 0,0037	0,0026
2 heures	0,0021 0,0020 0,0018	0,0018	0,0011 0,0013 0,0014	0,0012	0,0016 0,0024 0,0034	0,0024
3 heures	0,0016 0,0021 0,0017	0,0018	0,0013 0,0017 0,0013	0,0014	0,0020 0,0014 0,0017	0,0017
4 heures	0,0016 0,0017 0,0016	0,0016	0,0010 0,0010 0,0021	0,0013	0,0013 0,0018 0,0015	0,0015
5 heures	0,0008 0,0014 0,0019	0,0013	0,0021 0,0025 0,0018	0,0021	0,0029 0,0018 0,0014	0,0020

Après séjour en milieu pollué (1 ppm Cu⁺⁺), on note une diminution caractéristique de l'activité de l'enzyme (tableau 2 et graphique 3), diminution particulièrement régulière au niveau des pieds ambulacraires.

Par histoenzymologie, nous avons pu mettre en évidence, chez des individus non contaminés, une intense activité de cytochrome oxydase au niveau de la hampe des podia, (zone supérieure des cellules banales de l'épithélium interne).

3. Accumulation du Cuivre dans différents organes.

Nous avons montré qu'à des concentrations relativement faibles (0,04 ppm), le Cuivre entraînait la mort des astéries. Y a-t-il accumulation de cet ion hautement toxique dans les divers organes de l'animal ? Pour répondre à cela, nous avons fait séjourner plusieurs individus dans des milieux contenant diverses concentrations de Cuivre et pendant des temps différents. Les résultats obtenus, après dosage du métal (absorption atomique) dans les podia, les estomacs, les caecums pyloriques et la peau, sont repris dans les graphiques 4 et 5 (les points noirs correspondent aux valeurs des témoins).

De la lecture comparée des graphiques dressés, il ressort qu'à des concentrations relativement élevées (0,2 et 0,4 ppm Cu^{++}), les podia accumulent le métal de façon privilégiée. Notons également la haute teneur en Cuivre dans les Caecums pyloriques des animaux témoins, phénomène qui ne semble cependant pas influencer sur la bonne vie de l'astérie.

Remerciements.

Nous tenons à remercier M. le Professeur PATRIARCHE qui nous a permis de faire plusieurs dosages par absorption atomique.

Bibliographie.

- BINYON, J., 1961. J. mar. biol. Ass. U.K., 41, 161-174.
 BINYON, J., 1962. J. mar. biol. Ass. U.K., 42, 49-64.
 FARMANFARMAIAN, A., 1966. In BOOLOOTIAN, Physiology of Echinodermata, N.Y. : Intersciences, pp 245-265.
 GASPER et KAWATSKI, 1972. Comp. Bioch. Physiol., 41, 655.

Consommation O₂ en fonction du Poids frais

- Témoin
- 0,100 ppm Cu²⁺
- 0,075 »
- △ 0,050 »
- ★ 0,025 »

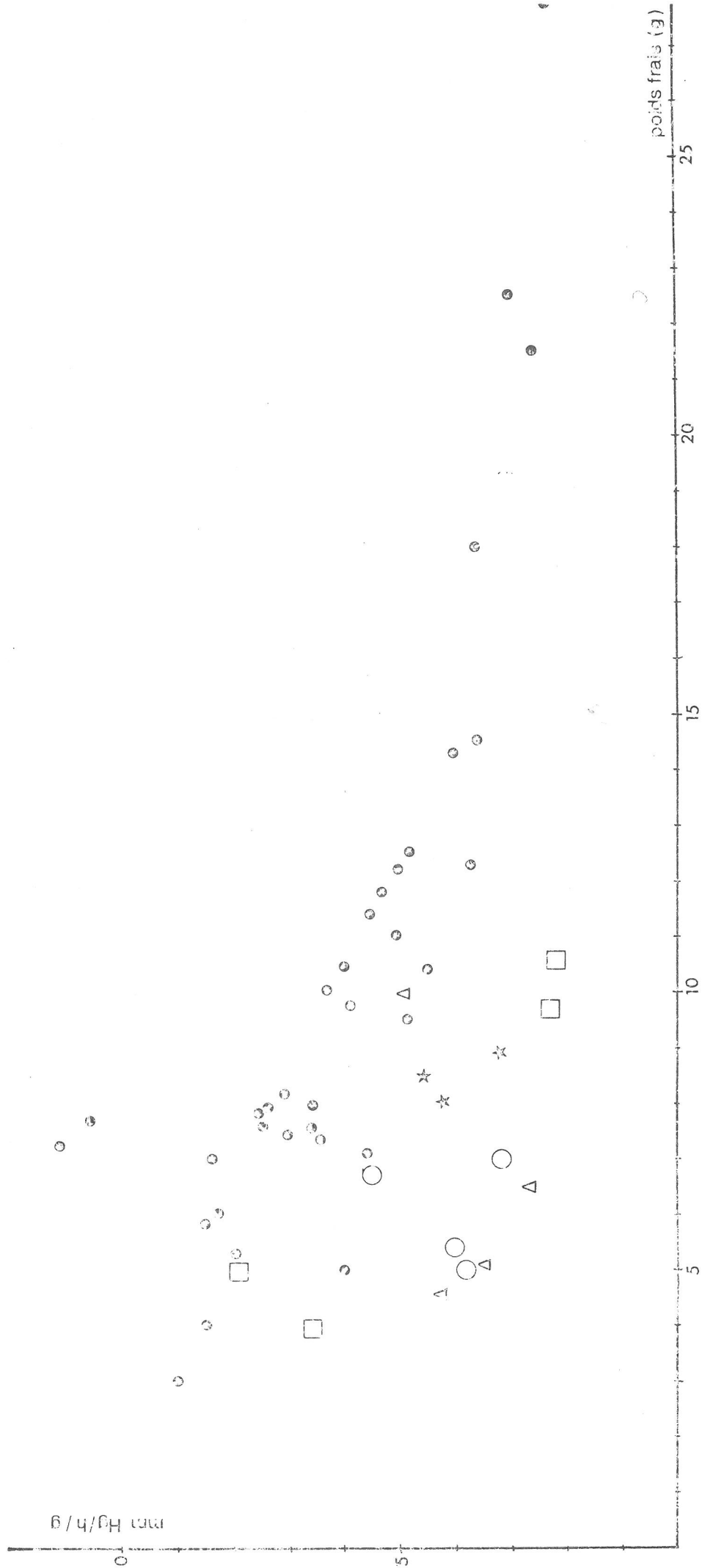
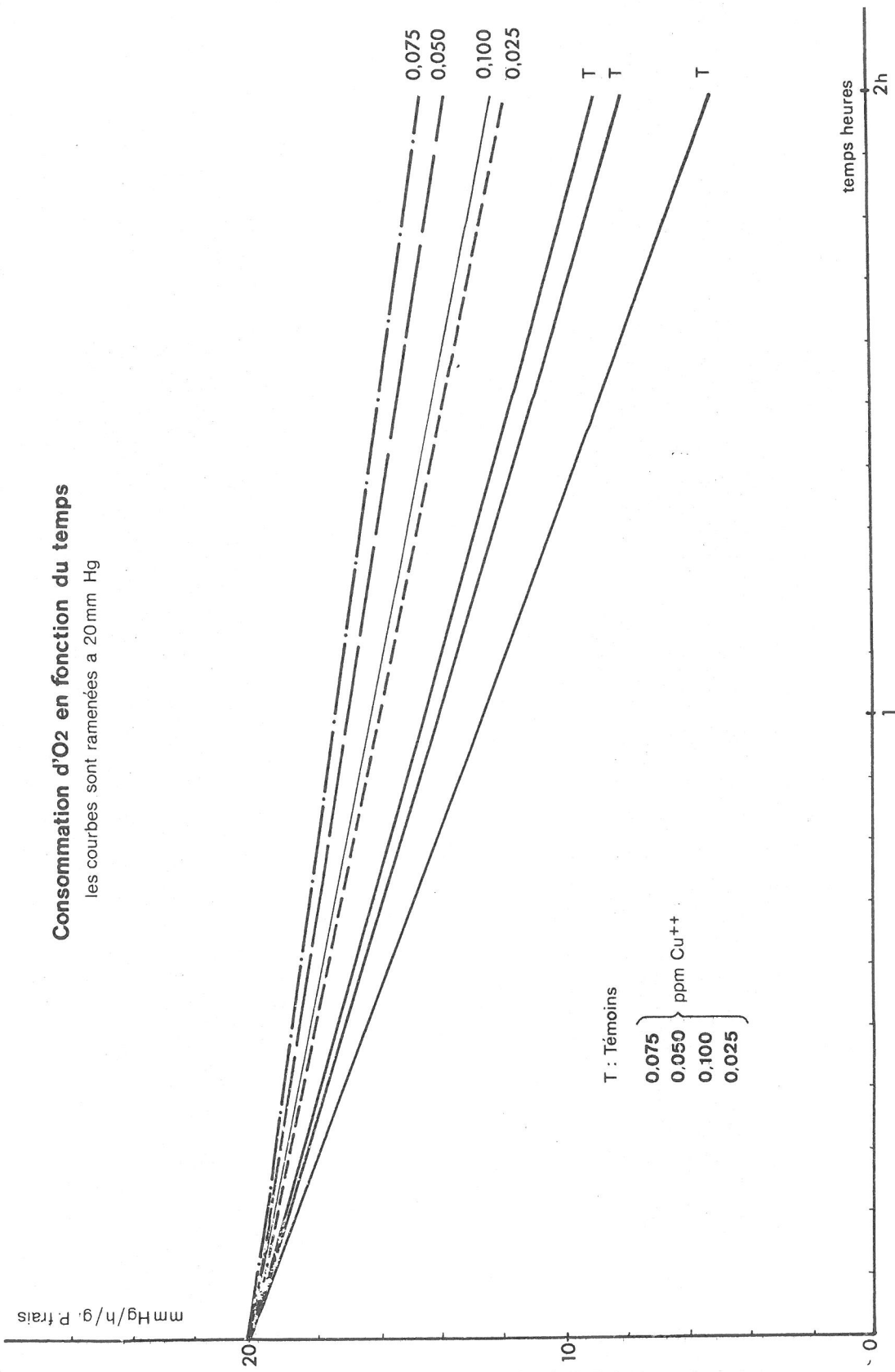


FIG. I.: Consommation d'O₂ chez *Asterias rubens* par gramme et par heure en fonction du poids de l'animal et effet de diverses concentrations en Cu²⁺.

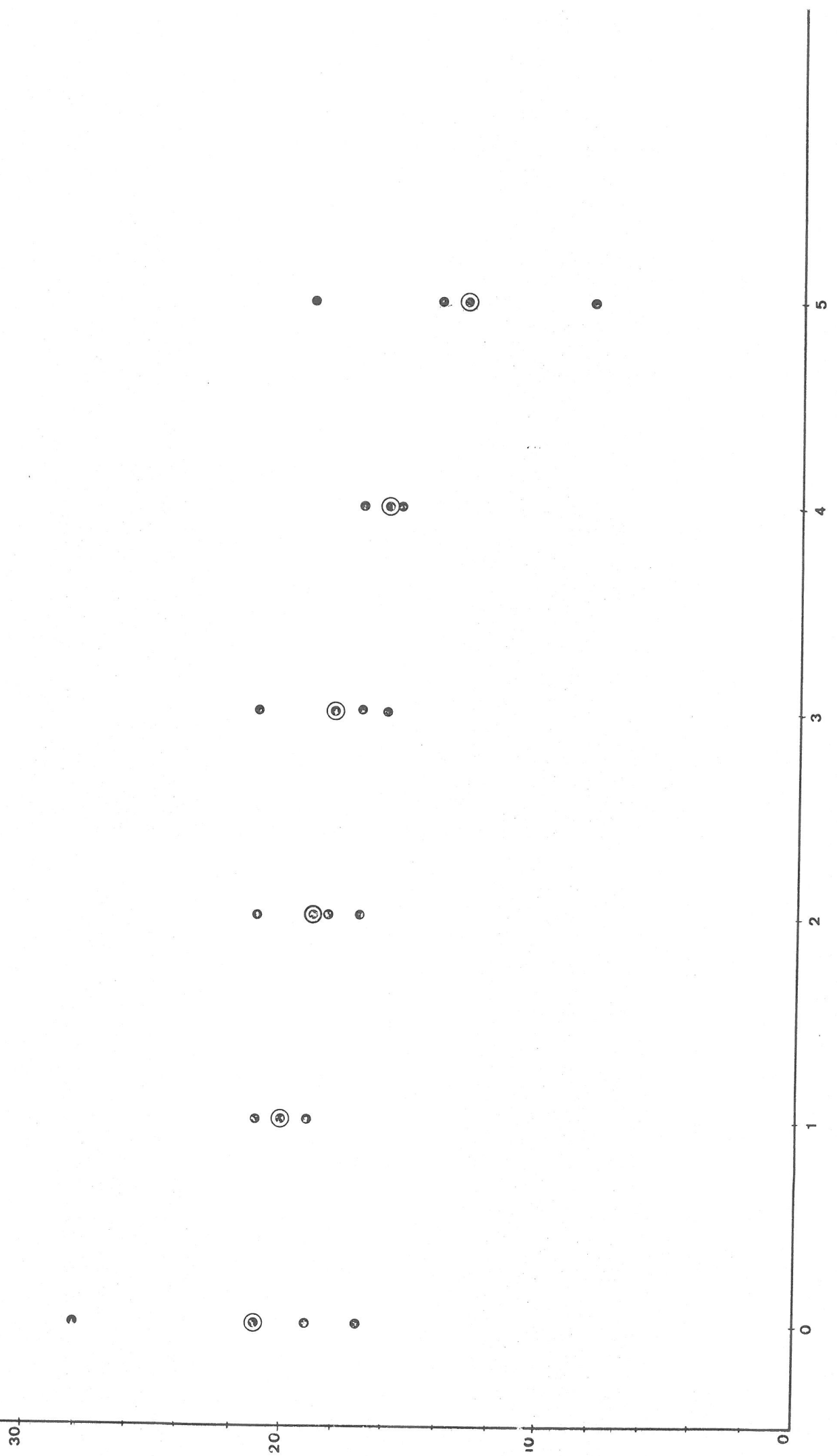
Consommation d'O₂ en fonction du temps

les courbes sont ramenées à 20mm Hg



GRAPH. 2

activité de la déshydrogénase succinique dans les podia DO/mg de protéines et min. [$\times 10^{-4}$]



temps dans la solution de cuivre heures

Accumulation de cuivre dans les PODIA

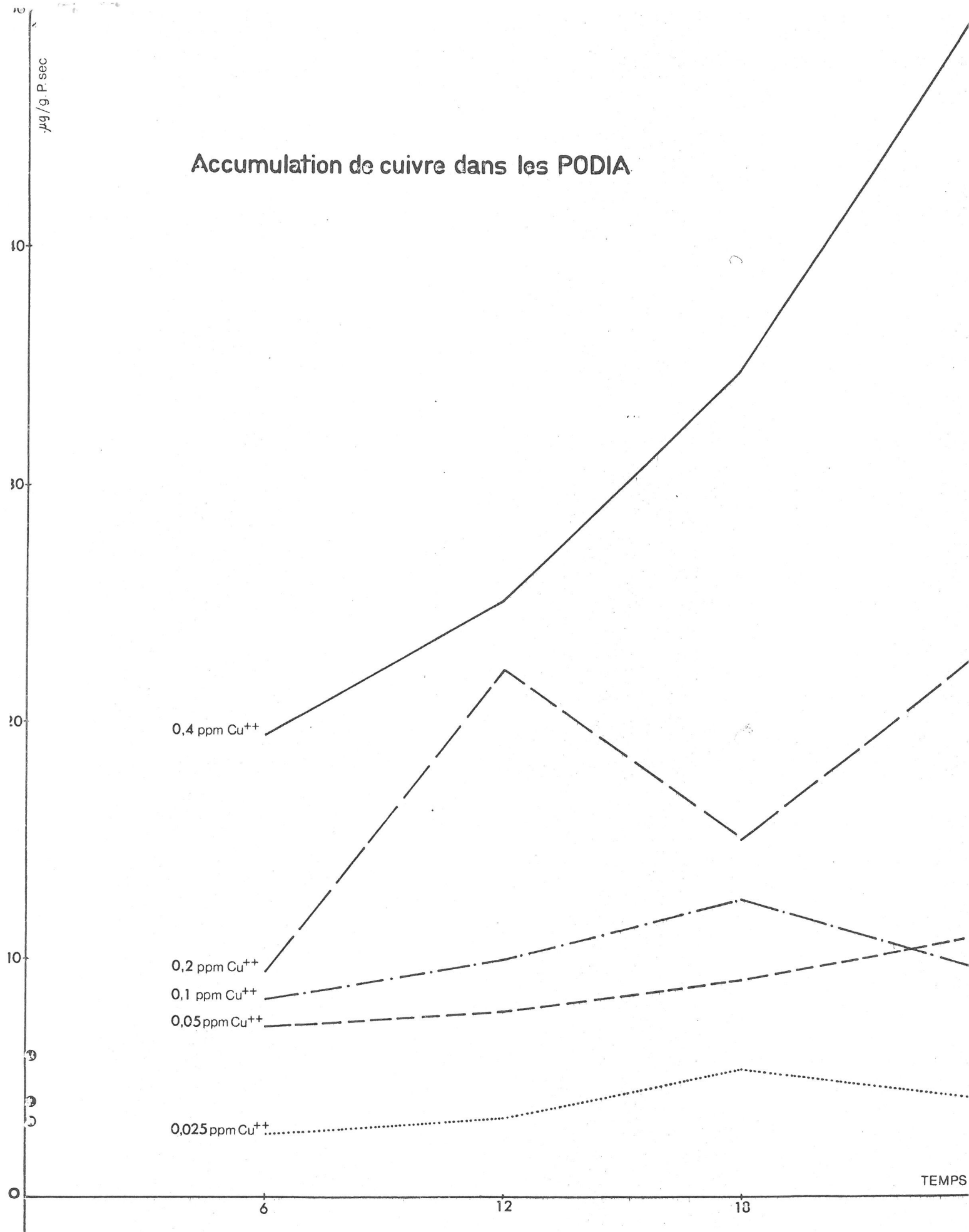


FIG.4.: Accumulation du Cu dans les podia chez *Asterias rubens* en fonction du temps et de la teneur en Cu^{2+} de l'eau.

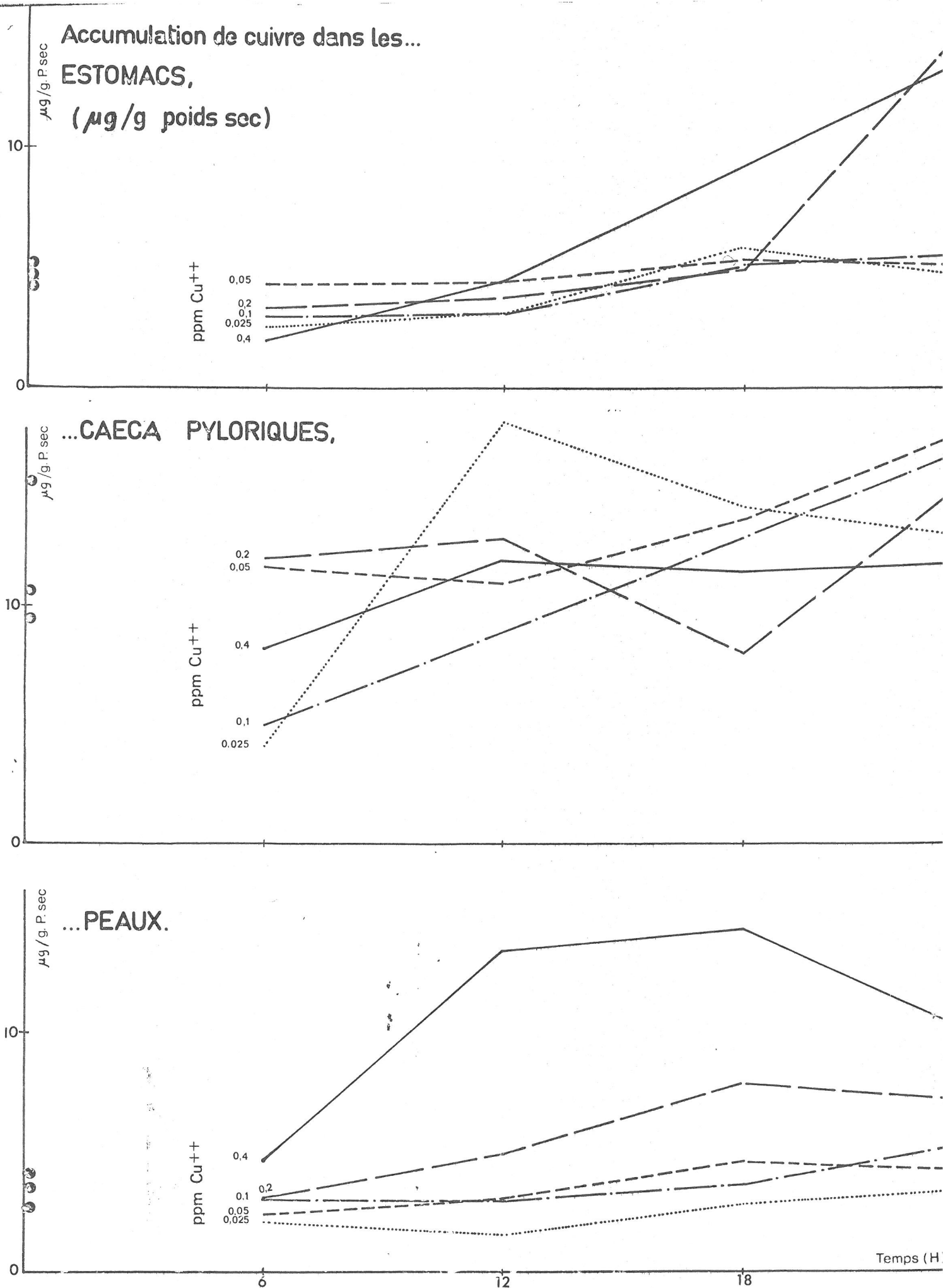


FIG.5.: Accumulation du Cu dans divers organes d'*Asterias rubens* en fonction du temps et de la teneur en Cu^{2+} de l'eau.