

C.I.P.S.

MODELE MATHEMATIQUE DE LA
POLLUTION EN MER DU NORD.

TECHNICAL REPORT
1973/BIOL.-SYNTHESE 05

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

EFFETS DES METAUX LOURDS SUR LES INVERTEBRES MARINS

Ch. PERPEET & M. VLOEBERGH

Laboratoire de Zoologie -U.LB

EFFETS DES METAUX LOURDS SUR LES TISSUS D'ASTERIAS RUBENS

Si expérimentalement on fait séjourné des *Asterias rubens* dans un milieu contaminé par des métaux lourds (cuivre, mercure), on remarque que ceux ci s'accumulent principalement dans les pieds ambulacraires ou podions. L'importance de ces tentacules est grande . En effet ils permettent non seulement la locomotion et l'alimentation, mais ils interviennent en outre dans les phénomènes respiratoires, phénomènes particulièrement sensibles à l'action des métaux lourds.

A. Milieu non contaminé

Dans un premier temps, nous avons étudié la structure microscopique de podions sains. Les résultats obtenus firent l'objet d'une publication (PERPEET et JANGOUX; 1973). En résumé , les podions comprennent cinq couches tissulaires, à savoir : - un épithélium externe (cellules de revêtement, cellules granuleuses, mucocytes) recouvert par une cuticule.

- une zone nerveuse (Ces deux premières couches renferment en outre des fibrilles musculaires transversales).
- Une couche conjonctive
- Une strate musculaire longitudinale
- Un épithélium interne en contact avec le liquide ambulacraire. (Fig. 1 et 2).

B. Milieu contaminé par le cuivre

Trois aquariums sont remplis d'eau de mer synthétique 32‰. Le premier est utilisé tel quel (témoin), tandis qu'aux autres, on 0,1 et 1 ppm de cuivre (citrate de cuivre). Une *Asterias rubens* est placée dans chacun des bacs et après des temps variant de 0 heure à quatre jours, on prélève de chaque individu quelques podions. En fin d'expérience (après trois et quatre jours), les animaux sont disséqués et certains organes internes (caecums pyloriques et estomac cardiaque) sont examinés.

Les organes sont fixés au Bouin ou au formol, enrobés, coupés à 7 microns et colorés. Les colorations effectuées sont les suivantes :

- Trichrome de Masson (topographie générale)
- Bleu Alcian -Phloxine (Mucopolysaccharides acides)
- Benzidine tétrazotée (composés protéiques)
- Ziehl Neelsen (lipoprotéines ,lipofuschines).

a) Concentration de 1 ppm Cu^{++}

Pendant les cinq premières heures de contamination on ne note aucune modification tissulaire perceptible dans les podions. A partir de cinq heures, les mouvements des pieds ambulacraires sont fortement réduits, l'organisation des cellules de revêtement externes de la hampe se modifie et il y apparaît quantité de grains protéiques de taille et d'aspect variable; les limites cellulaires deviennent progressivement moins distinctes ~~et on assiste à~~, les noyaux disparaissent et on assiste à un plissement de la cuticule suivi de son détachement. Il se produit également un morcellement de la sécrétion des mucocytes.

Après 24 heures de contamination ,la cuticule disparaît au niveau de la hampe et l'épithélium externe de la ventouse est à son tour attaqué (disparition progressive des "secretory packets").

Par la suite , l'effet du polluant agit en profondeur, amenant la destruction des fibrilles musculaires transversales.

Après trois jours de ce traitement ,on note un envahissement de la lumière ambulacraire par les coelomocytes; envahissement suivi de près par la mort de l'animal. (Fig. 3 et 4).

b) Concentration de 0,1 ppm de Cu^{++}

Dans ce cas, les modifications tissulaires ne s'observent qu'après 24 heures de contamination. Celles ci affectent essentiellement l'épithélium externe de la hampe et la cuticule qui le recouvre. Même après 4 jours d'observations on ne note aucune action sur la ventouse.

Dans nos conditions expérimentales, quelle que soit la concentration de cuivre utilisée ,on n'observe jamais de variations histologiques au niveau des organes digestifs examinés.

C. Discussion

L'action du cuivre sur les tissus des podions est incontestable, même à des concentrations relativement faibles. Après 24 heures de séjour en milieu contaminé par le cuivre (0,1 ppm) ,on remarque (Technical report ,Physiologie:synthèse C6, 1972)une concentration d'environ 10 ppm dans les podions. Or les caecums pyloriques d'Astérie saine et prélevée à Knokke montrent également une concentration moyenne d'environ 10 ppm, concentration qui ne semble pas les affecter. En fait les modes d'intoxication sont très différents: le contact des podions avec le cuivre est brutal ,tandis que au niveau des caecums pyloriques(organes de réserve),de très faible quantité de métal y ont été progressivement absorbé. En effet le cuivre absorbé par les caecums pyloriques est intimement associé à la nourriture de l'animal.

Divers auteurs ont également décrit des nécroses de tissus d'animaux soit plongés dans un milieu pollué, soit injectés par ces mêmes métaux. A des doses de 1 à 3,2 ppm de

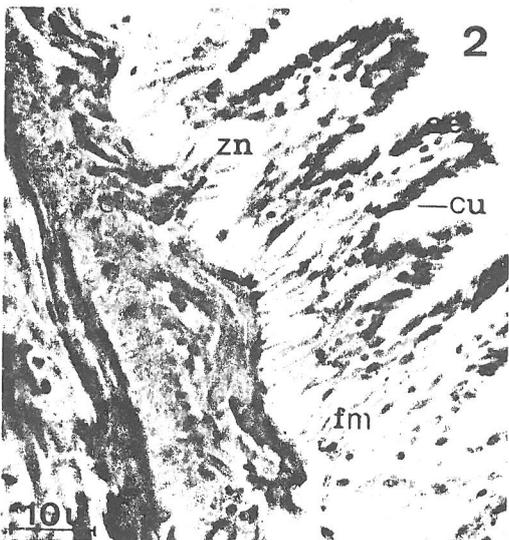
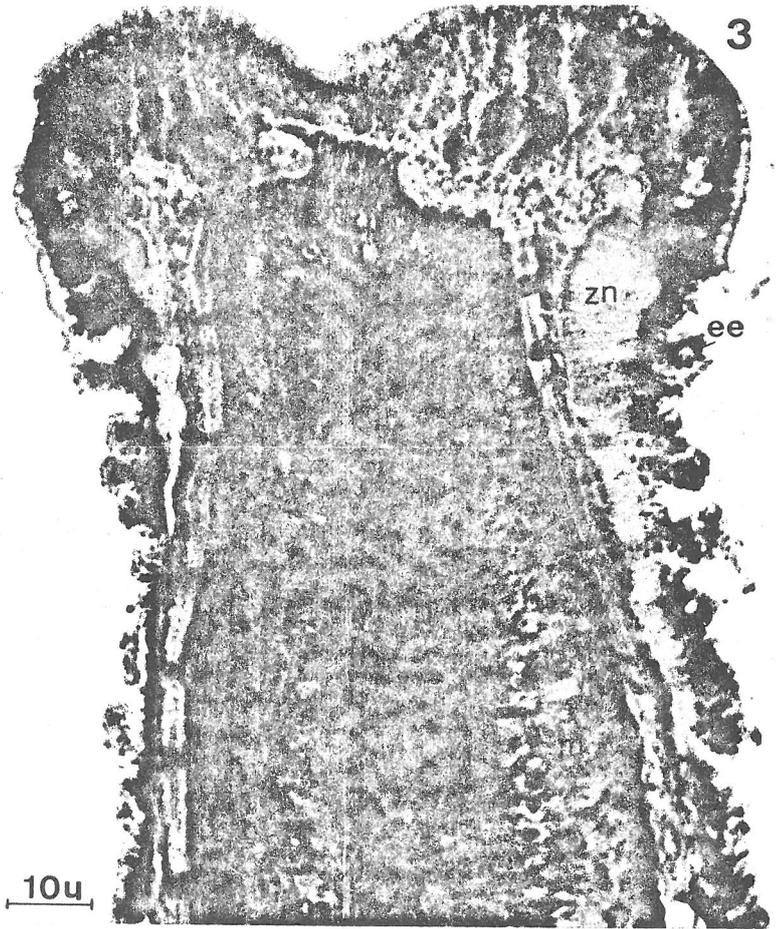
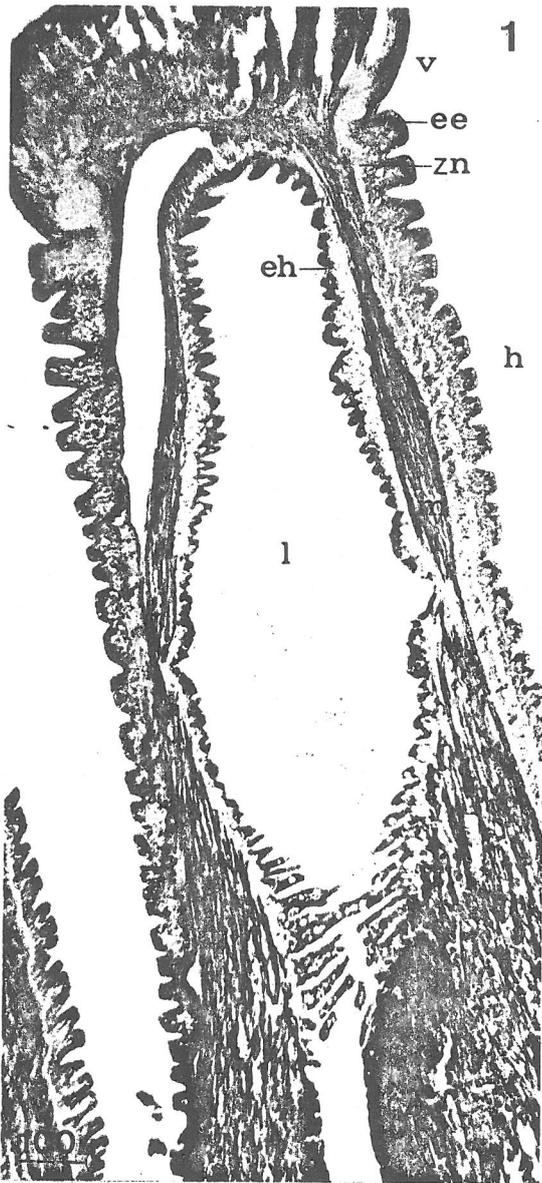
cuiivre, BAKER (1969) remarque que les cellules du rein et des branchies de *Pseudopleuronectes americanus* (poisson) se vacuolisent et se désintègrent. GARDNER et YEVICH (1970) étudiant l'action histologique du cadmium sur un autre poisson *Fundulus heteroclitus*, décrivent une nécrose de l'épithélium de l'intestin ainsi que des cellules des tubes proximaux du rein.

Idéalement on devrait pouvoir suivre sur coupe histologique le trajet du polluant . Malheureusement ,les seuils de sensibilité des méthodes préconisées pour la révélation des métaux sur coupes sont trop élevés. De plus l'utilisation du cuivre 64 à des fins autoradiographiques est rendue impossible par la brièveté de demi vie de cet élément.

Pour la suite de nos recherches, nous envisagerons essentiellement la pollution du mercure ; cet élément nous permet d'utiliser la technique autoradiographique . Par le biais de cette méthode ,nous pourons distinguer les divers processus de contamination et plus particulièrement la contamination directe (animal plongé dans le polluant) et alimentaire (animal nourri de proies contaminées).

Bibliographie

Baker; 1969 : J. Fish. Res. Board Canada; 26(4): 2785
 Gardner and Yevich; 1970 : J. Fish. Res. Board Canada; 27(12): 2185
 Perpeet et Jangoux; 1973 : Forma e Functio;6 : 191



Légendes des figures

- Figure 1 : Coupe longitudinale de podion témoin(Trichrome de Masson).
- Figure 2 : Coupe longitudinale de l'épithélium externe de la hampe du podion témoin(Trichrome de Masson).
- Figure 3 : Coupe longitudinale de podion après un séjour de trois jours dans 1 ppm de Cu^{++} (Trichrome de Masson).
- Figure 4 : Coupe longitudinale de l'épithélium externe de la hampe de podion après trois jours dans 1ppm de Cu^{++} (Trichrome de Masson).

c : conjonctif; cu : cuticule; ee : épithélium externe; eh : épithélium interne ou hydrocoeliel; fm : fibrille musculaire transversale; h : hampe; l : lumière; m : muscles longitudinaux; v : ventouse; zn : zone nerveuse.

DOSAGE DE METAUX LOURDS DANS LES MOULES (MYTILUS
EDULIS) PROVENANT DES CÔTES FRANCAISES ET BELGES
ET DE L' ESTUAIRE DE L' ESCAUT

Nous avons choisi quatre lieux de prélèvement situés non loin de l'embouchure de l' Escaut : Hoofdplaat (10 Km), Terneuzen (30 Km), Perkpolder (55 Km) et Knokke. Un cinquième lot d'animaux (animaux "témoins") provenait de la baie de Morgat (Finistère, France), réputé non pollué.

A chaque endroit 70,80 ou 90 moules furent prélevées et groupées par dizaines en fonction de leur taille. Chaque lot de dix moules fut ensuite traité en fonction du métal à révéler. Nous obtenons ainsi de 7 à 9 valeurs de concentration en métal pour chaque lieu de prélèvement. Il est bien évident qu'avec un tel échantillonnage, l'interprétation rigoureuse du phénomène est impossible. Aussi nous sommes-nous contentés en un premier temps d'une approximation basée essentiellement sur le calcul de la moyenne et de l'écart type.

Le transport des échantillons s'est fait dans de la glace. La conservation en laboratoire a été effectuée en deep-freezer.

A. Mercure

Les moules furent broyées par lot de dix dans un broyeur du type JKA-WERK Mod. A 10

Les minéralisations se firent selon la méthode de THORPE (1970) adaptée.

Les mesures ont été effectuées sur un spectrophotomètre d'absorption atomique VARIAN type Techtron AA 5

Les résultats obtenus sont repris dans le tableau I et le graphique 1

B. Cuivre, zinc, plomb, cadmium, fer et chrome

Chaque lot de dix moules fut séché à 110° et ensuite calciné à 450°. Le résidu fut repris à l' HCl concentré

et amené à un volume de 50 ml par de l'eau distillée. Les mesures furent faites à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique PERKIN-ELMER à double faisceaux 303.

Les résultats obtenus sont repris dans les tableaux 2,3,4,5,6,7 et les graphiques 2,3,4,5,6,7.

Tableau I : Concentration en mercure ($\mu\text{g Hg/kg}$ poids frais) de broyats de *Mytilus edulis*

MORGAT		KNOKKE		HOOFDPLAAT		TERNEUZEN		PERKPOLDER	
* 2 à 2,5	30	2,5 à 3	139	2,5 à 3,5	125	2,5 à 3	297	2 à 2,5	110
2,5 à 3,5	0	2,5 à 3	25	3 à 3,5	44	3 à 4,5	85	2 à 2,5	32
2,5 à 3,5	25	2,5 à 3	17	3 à 4	60	3,5 à 4	106	2 à 2,5	63
3 à 3,5	26	3 à 3,5	71	3 à 4	38	4 à 4,5	49	2 à 2,5	106
3 à 3,5	33	3 à 3,5	62	4 à 4,5	24	4 à 5	114	2,5 à 3	262
3 à 3,5	64	3 à 3,5	13	4 à 4,5	58	4 à 5	70	2,5 à 3	61
3 à 3,5	9	3 à 3,5	9	4 à 5	30	4 à 5	94	2,5 à 3,3	40
3 à 4	0	3 à 3,5	19			4,5 à 6	84		
3 à 4	0					5 à 5,5	100		
\hat{m} : 20 \pm 20		\hat{m} : 40 \pm 40		\hat{m} : 50 \pm 30		\hat{m} : 110 \pm 60		\hat{m} : 100 \pm 70	

* dimension de la moule (cm)

Graphique I

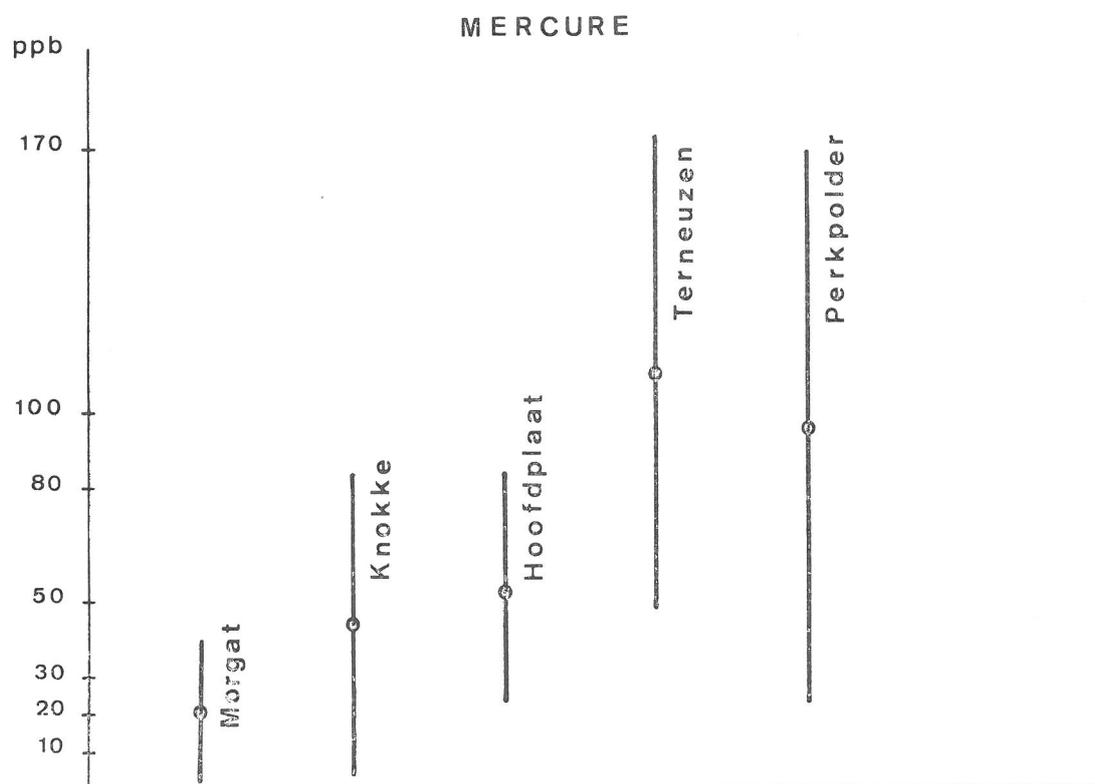


Tableau 2 : Concentration en cuivre de *Mytilus edulis*
($\mu\text{g Cu/g}$ poids sec)

MORGAT		KNOKKE		HOOFDPLAAT		TERNEUZEN		PERKPOLDER	
*2 à3	11,43	2 à3	11,54	3,5	16,03	3,5	12,68	2 à2,5	13,66
2,5à3,5	11,09	2,5à3	14,86	3 à4	11,34	3 à4,5	13,73	2 à2,5	20,50
3 à3,5	9,47	2,5à3,5	9,81	3,5à4,5	10,72	3,5à4,5	10,66	2 à2,5	24,42
3 à3,5	9,61	3 à3,5	11,77	3,5à4,5	13,10	4 à4,5	12,89	2 à3	15,08
3 à4	11,52	3 à3,5	11,27	3,5à4,5	12,01	4 à4,5	12,79	2,5à3	11,58
3 à4	9,41	3 à3,5	11,85	4 à4,5	12,81	4 à5	12,15	2,5à3	11,18
2,5à5	10,42	3 à3,5	9,45	4 à5	10,56	4,5à5	13,98	2,5à3,5	10,84
3,5à5	7,17	3 à3,5	9,47	4,5à5	10,99	4,5à5	23,69		
$\hat{m} : 10 \pm 1$		$\hat{m} : 11 \pm 2$		$\hat{m} : 12 \pm 2$		$\hat{m} : 14 \pm 4$		$\hat{m} : 15 \pm 5$	

* dimension de la moule (cm)

Graphique 2

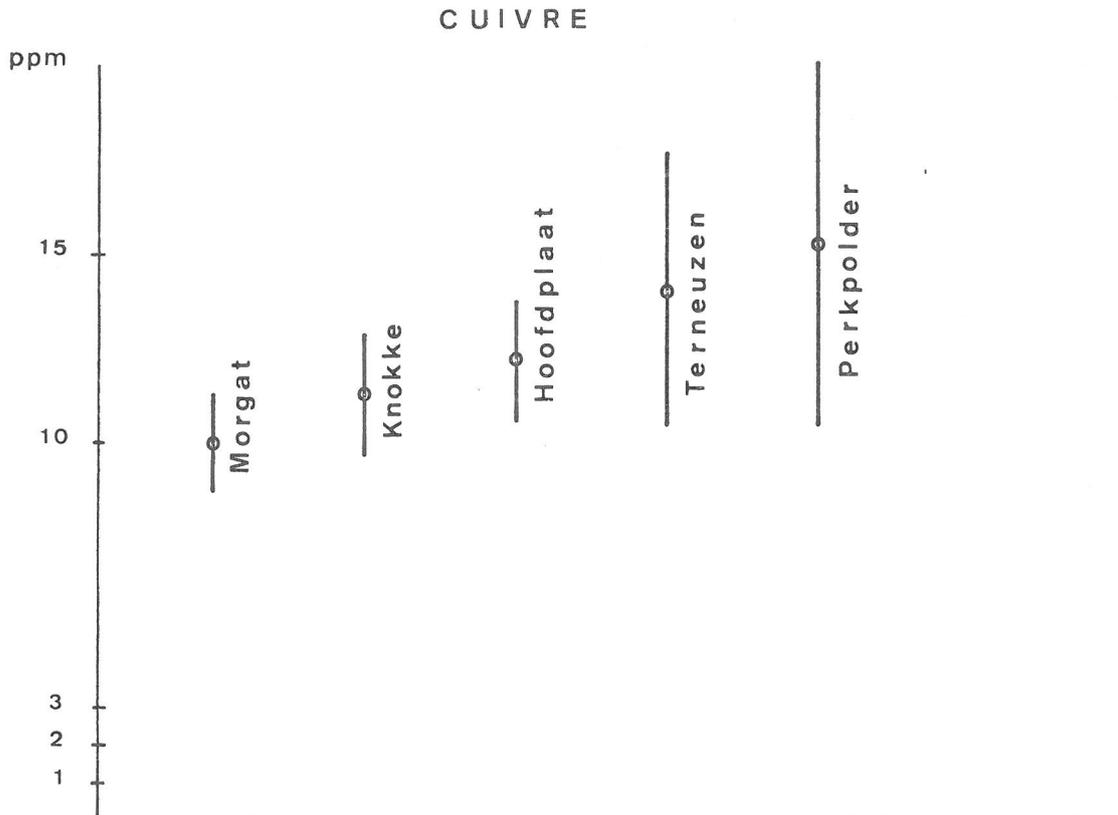


Tableau 3 : Concentration en zinc de Mytilus edulis
(µg Zn/g poids sec)

MORGAT	KNOKKE	HOOFDPLAAT	TERNEUZEN	PERKPOLDER
197,44	158,62	235,34	230,55	246,85
273,39	112,92	146,91	233,38	278,18
243,40	123,70	153,58	201,04	233,25
225,02	153,94	134,10	266,72	196,05
193,35	152,70	182,11	195,05	255,59
216,46	128,34	137,63	213,21	256,98
231,48	205,71	133,40	232,92	262,26
194,91	135,31	205,49	187,99	
$\hat{m} : 222 \pm 25$	$\hat{m} : 151 \pm 30$	$\hat{m} : 166 \pm 34$	$\hat{m} : 220 \pm 23$	$\hat{m} : 247 \pm 24$

Pour les dimensions des moules : voir tableau 2

Graphique 3

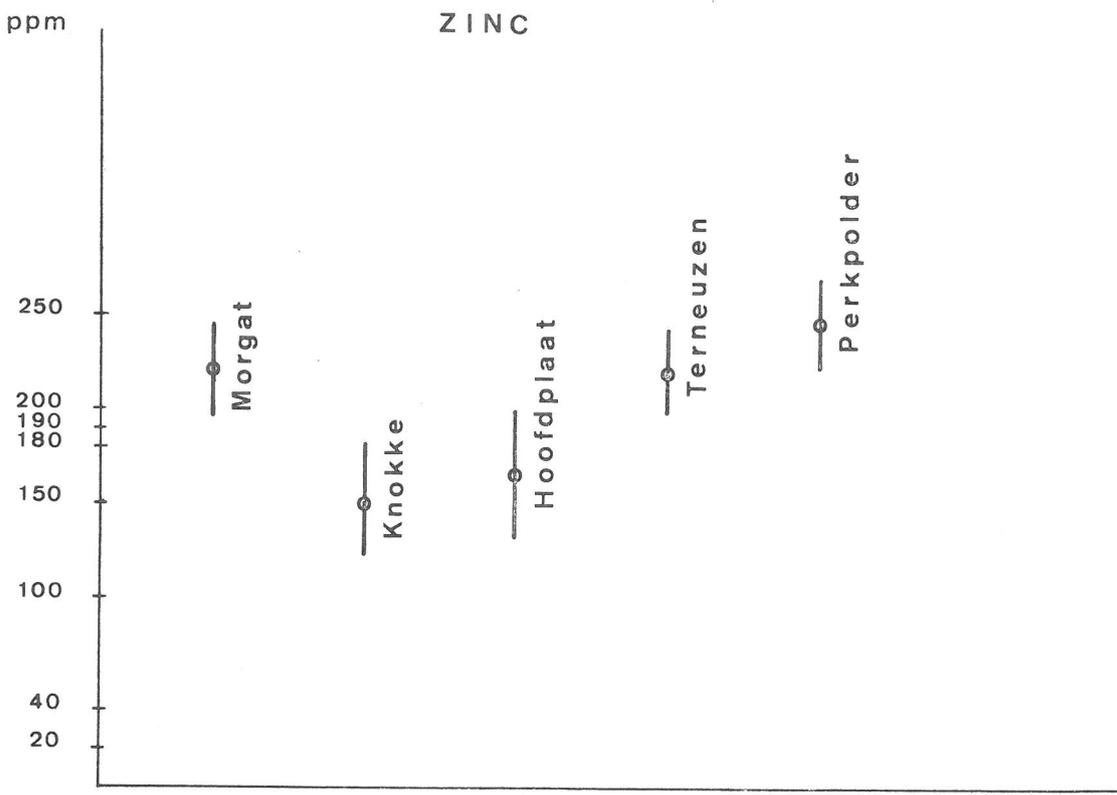


Tableau 4 : Concentration en plomb de Mytilus edulis
($\mu\text{g Pb/g}$ poids sec)

MORGAT	KNOKKE	HOOFDPLAAT	TERNEUZEN	PERKPOLDER
15,90	7,56	23,49	17,64	14,18
10,55	13,34	13,36	20,30	17,39
9,74	6,77	10,34	9,82	10,08
15,38	6,16	10,81	20,67	13,03
14,22	10,01	12,25	11,63	14,58
9,60	6,63	10,73	21,75	13,11
12,50	5,99	11,53	13,86	16,11
17,26	7,59	12,38	18,12	
$\hat{m} : 13 \pm 3$	$\hat{m} : 8 \pm 2$	$\hat{m} : 13 \pm 4$	$\hat{m} : 17 \pm 4$	$\hat{m} : 14 \pm 2$

Pour les dimensions des moules : voir tableau 2

Graphique 4

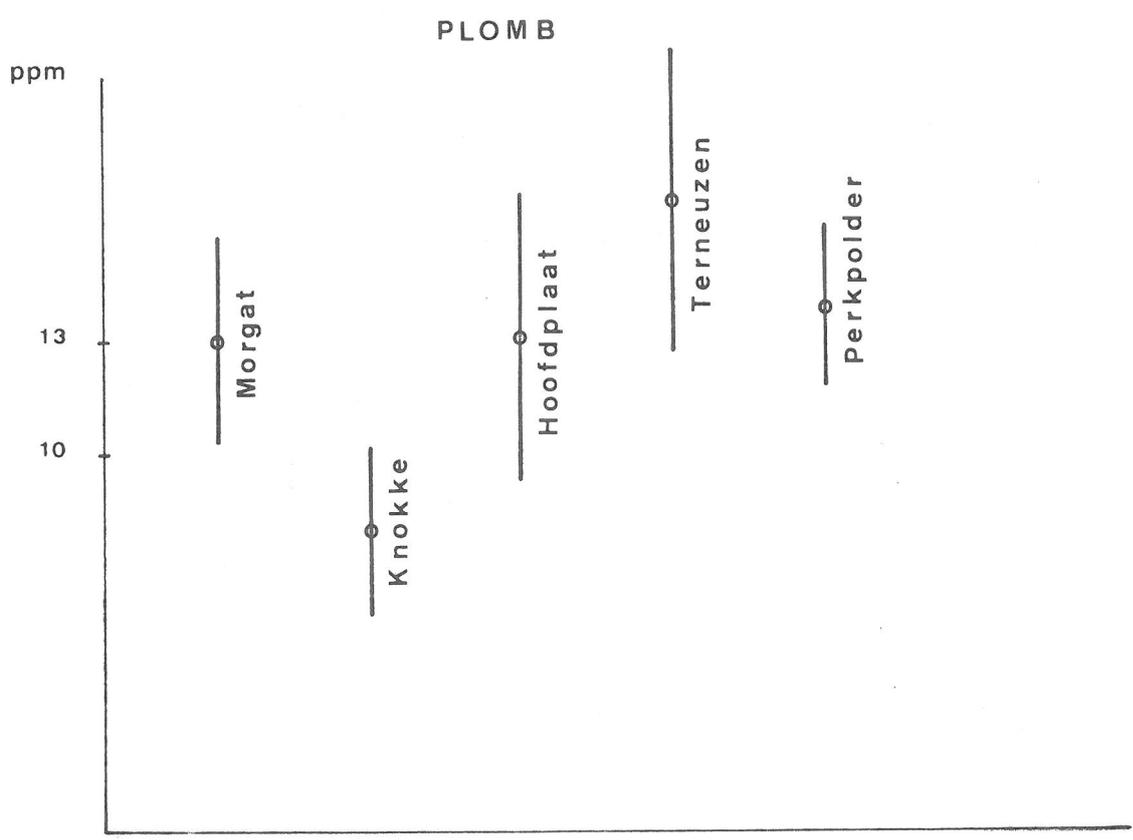


Tableau 5 : Concentration en cadmium de *Mytilus edulis*
($\mu\text{g Cd/g}$ poids sec)

MORGAT	KNOKKE	HOOFDPLAAT	TERNEUZEN	PERKPOLDER
0	1,35	2,50	6,91	11,55
1,11	1,48	2,83	10,65	8,78
0,45	1,50	2,46	8,24	11,03
0	2,11	3,11	11,74	9,05
1,03	1,81	3,40	11,90	10,86
1,04	1,41	1,91	10,41	8,60
1,47	2,55	3,77	14,74	15,29
0,55	2,03	3,99	12,73	
$\hat{m} : 0,7 \pm 0,5$	$\hat{m} : 1,8 \pm 0,4$	$\hat{m} : 3,0 \pm 0,6$	$\hat{m} : 10,9 \pm 2,2$	$\hat{m} : 10,7 \pm 2,1$

Pour les dimensions des moules : voir tableau2

Graphique 5

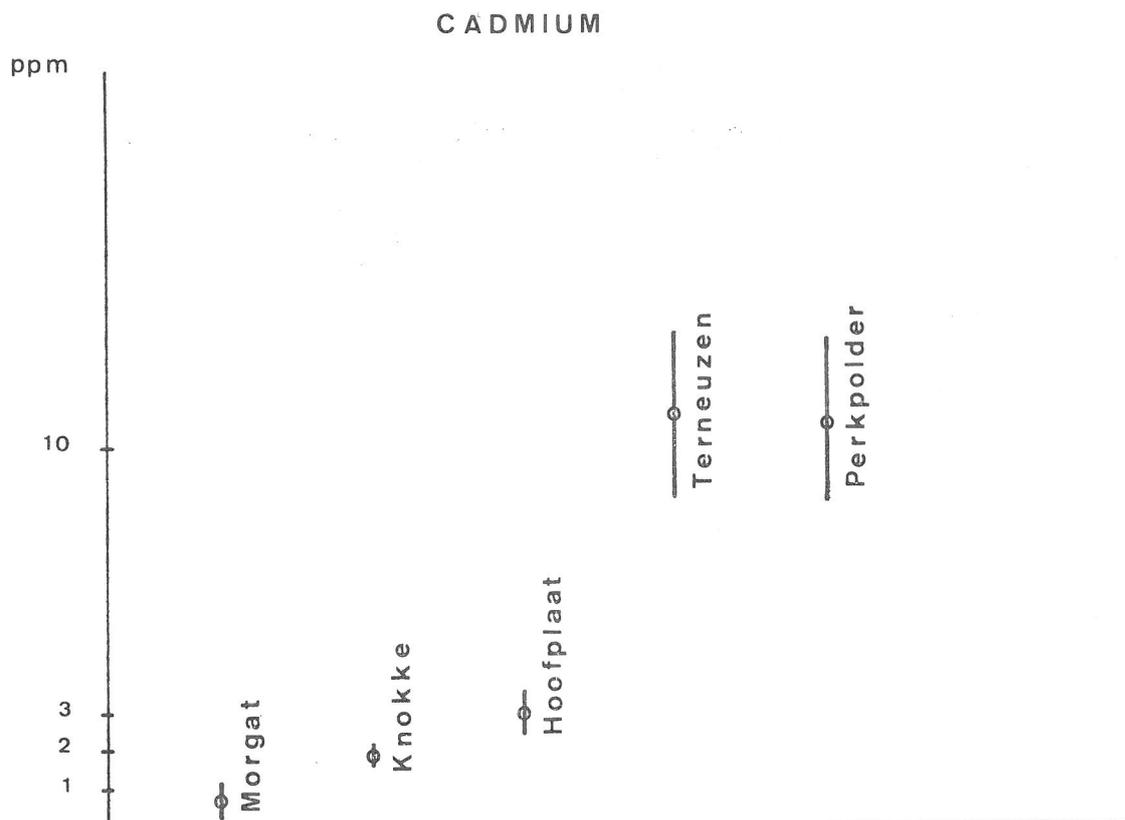


Tableau 6 : Concentration en fer de Mytilus edulis
($\mu\text{g Fe/ g poids sec}$)

MORGAT	KNOKKE	HOOFDPLAAT	TERNEUZEN	PERKPOLDER
364	948	3104	1614	1418
369	1159	1186	1374	2343
563	754	1043	808	1442
348	604	1184	1327	1885
329	727	1401	1064	1543
314	790	1223	1488	1501
376	740	1023	1475	2054
349	863	1398	8619	
$\hat{m} : 380 \pm 70$	$\hat{m} : 820 \pm 150$	$\hat{m} : 1450 \pm 610$	$\hat{m} : 1310 \pm 250$	$\hat{m} : 1740 \pm 330$

Pour les dimensions des moules : voir tableau 2

Graphique 6

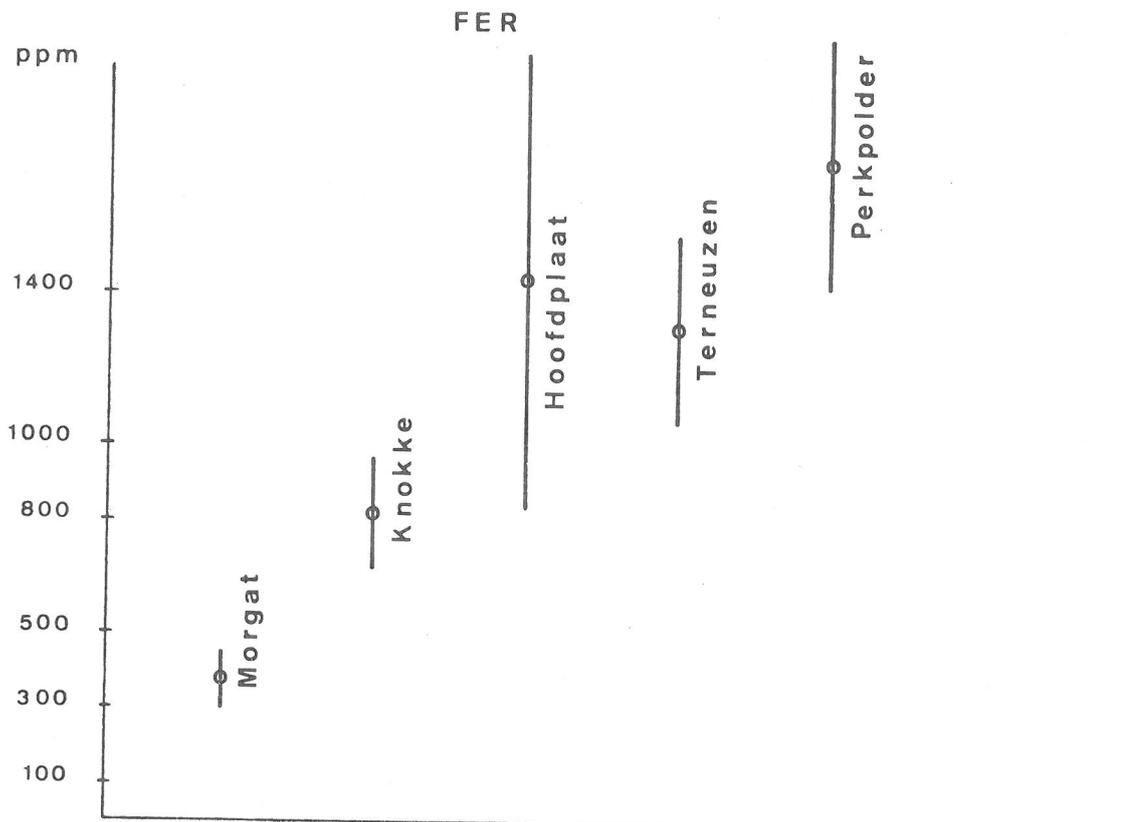
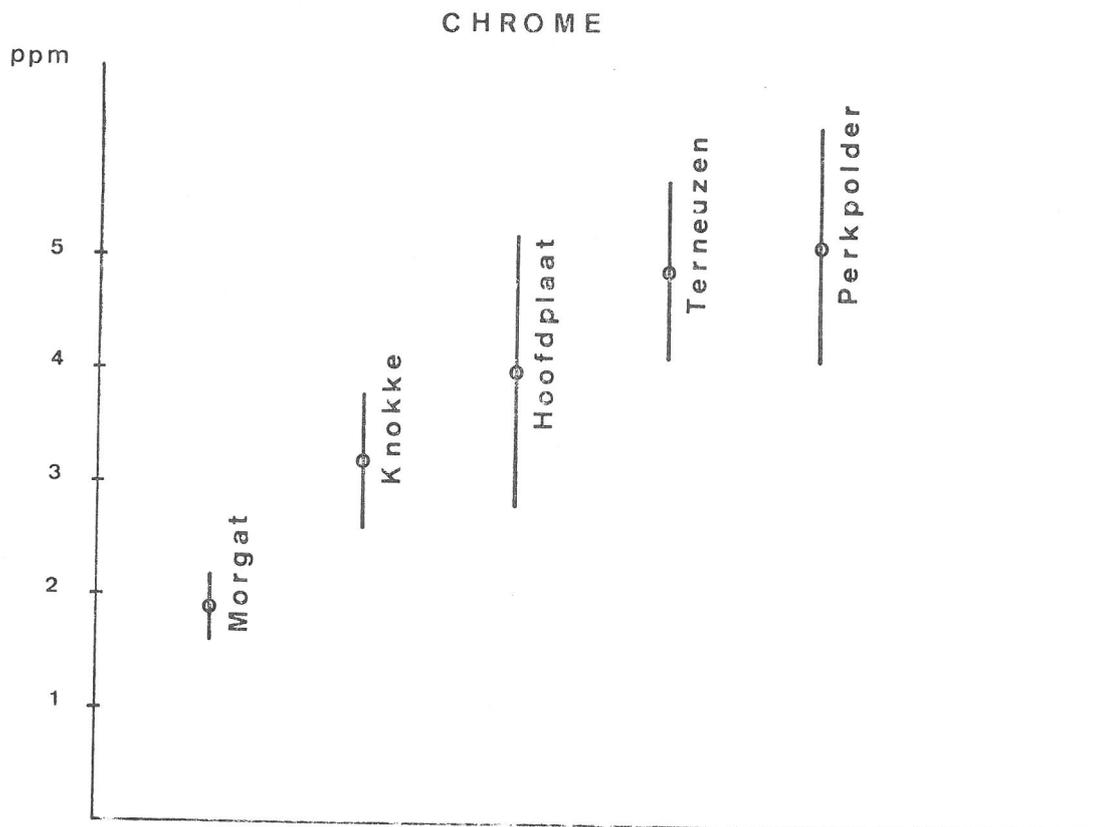


Tableau 7 : Concentration en chrome de *Mytilus edulis*
($\mu\text{g Cr/g poids sec}$)

MORGAT	KNOKKE	HOOFDPLAAT	TERNEUZEN	PERKPOLDER
2,08	3,54	7,01	5,76	5,25
2,36	3,33	3,30	5,33	7,32
1,80	2,72	3,30	3,30	4,58
1,30	2,11	4,24	5,74	4,52
2,06	3,64	3,68	4,05	4,34
1,88	3,95	2,83	4,56	4,73
1,62	2,55	3,42	4,81	4,72
1,69	3,59	4,28	5,92	
$\hat{m} : 2,0 \pm 0,3$	$\hat{m} : 3,2 \pm 0,6$	$\hat{m} : 4,0 \pm 1,2$	$\hat{m} : 5,0 \pm 0,8$	$\hat{m} : 5,1 \pm 1,0$

Pour les dimensions des moules : voir tableau 2

Graphique 7



C. Conclusions

La constatation la plus importante est qu'il n'y a apparemment aucune relation entre la grandeur des moules, et donc leur âge , et la concentration en métal lourd. Il est certain également que les moules d'une même station ont des concentrations en métal lourd très variable et ceci particulièrement pour le mercure.

Lorsqu' on examine les moyennes des concentrations obtenues à chaque station (tout en tenant compte des écarts types), il est possible d'observer une tendance générale pour tous les métaux analysés : les moules de l'Escaut contiennent de plus fortes concentrations en métal lourd que celles des autres localités. Les teneurs en métal lourd des moules de Knokke et de Morgat ne sont pas différentes bien que légèrement plus faible à Morgat. On peut remarquer les curieuses concentrations en plomb et en zinc dans les moules de Morgat, peut être y a-t-il déversement de ces métaux dans la baie ? Remarquons enfin que les concentrations en métaux lourds des moules recueillies à Perkpolder et Terneuzen sont très semblables et ce malgré la différence de taille des individus des deux populations. Cette différence est bien sûr sous la dépendance générale des conditions du milieu (variation de salinité principalement).

INCORPORATION DU MERCURE DANS DIFFERENTS INVERTEBRES
MARINS (MYTILUS EDULIS ET ASTERIAS RUBENS).

L'incorporation du métal peut être étudiée avec grande précision en utilisant le mercure radiactif (Hg 203). Nous avons donc mis au point cette méthode et quelques résultats préliminaires peuvent dès à présent être communiqués.

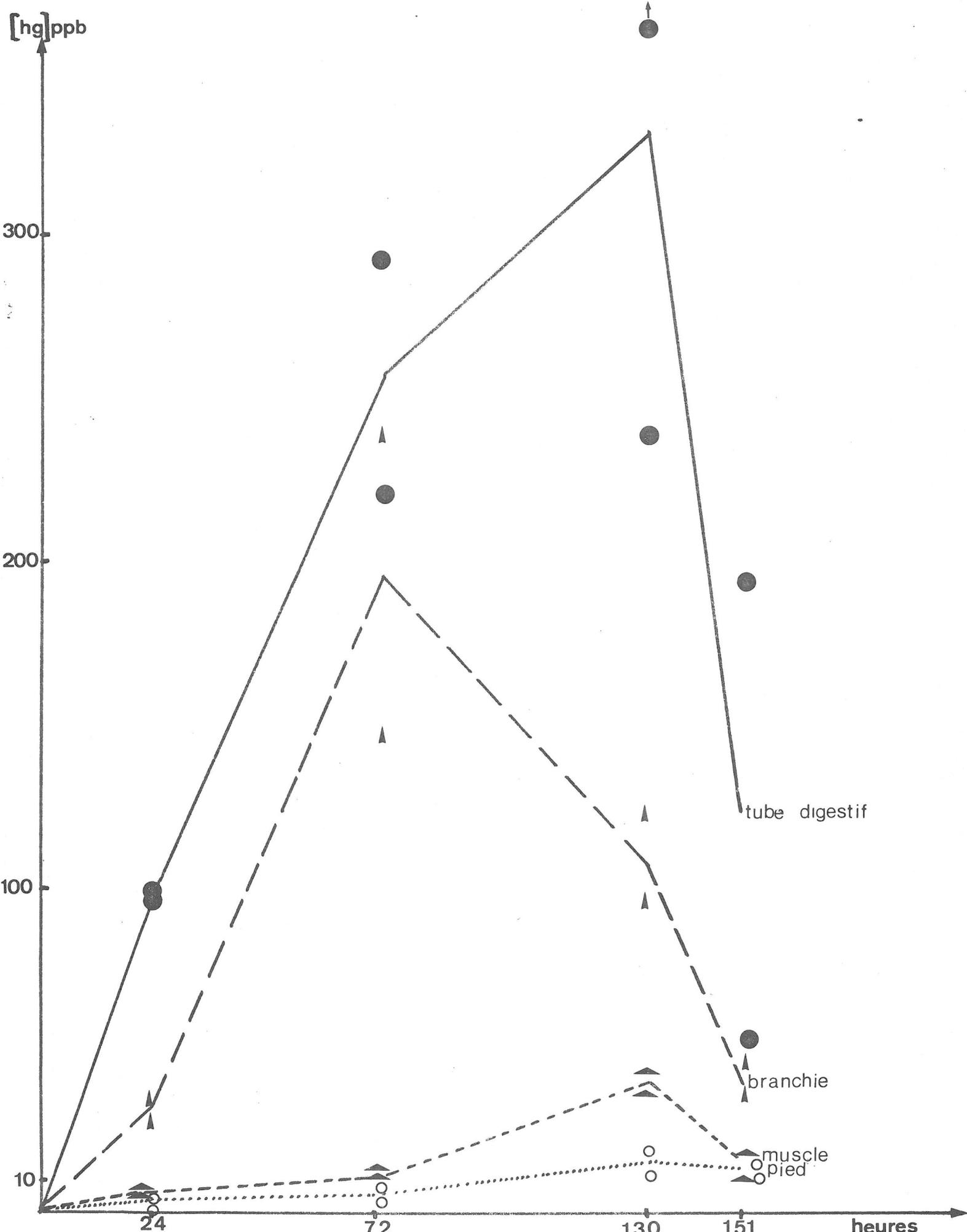
Les dosages s'effectuent à l'aide d'un spectro à scintillation liquide PACKARD TRI-CARB 3375.

Une remarque s'impose dès à présent . A de fortes concentration (ex. 1 ppm) le métal s'accumule rapidement dans les branchies de la moule entraînant la mort de l'animal. A de faibles concentrations (ex. 5 ppb) le mercure ,s'il pénètre les branchies, se retrouve surtout dans l'appareil digestif de la moule et n'entraîne pas la mort du bivalve.

Graphique 8 : incorporation de mercure 203 (en solution) dans les moules.

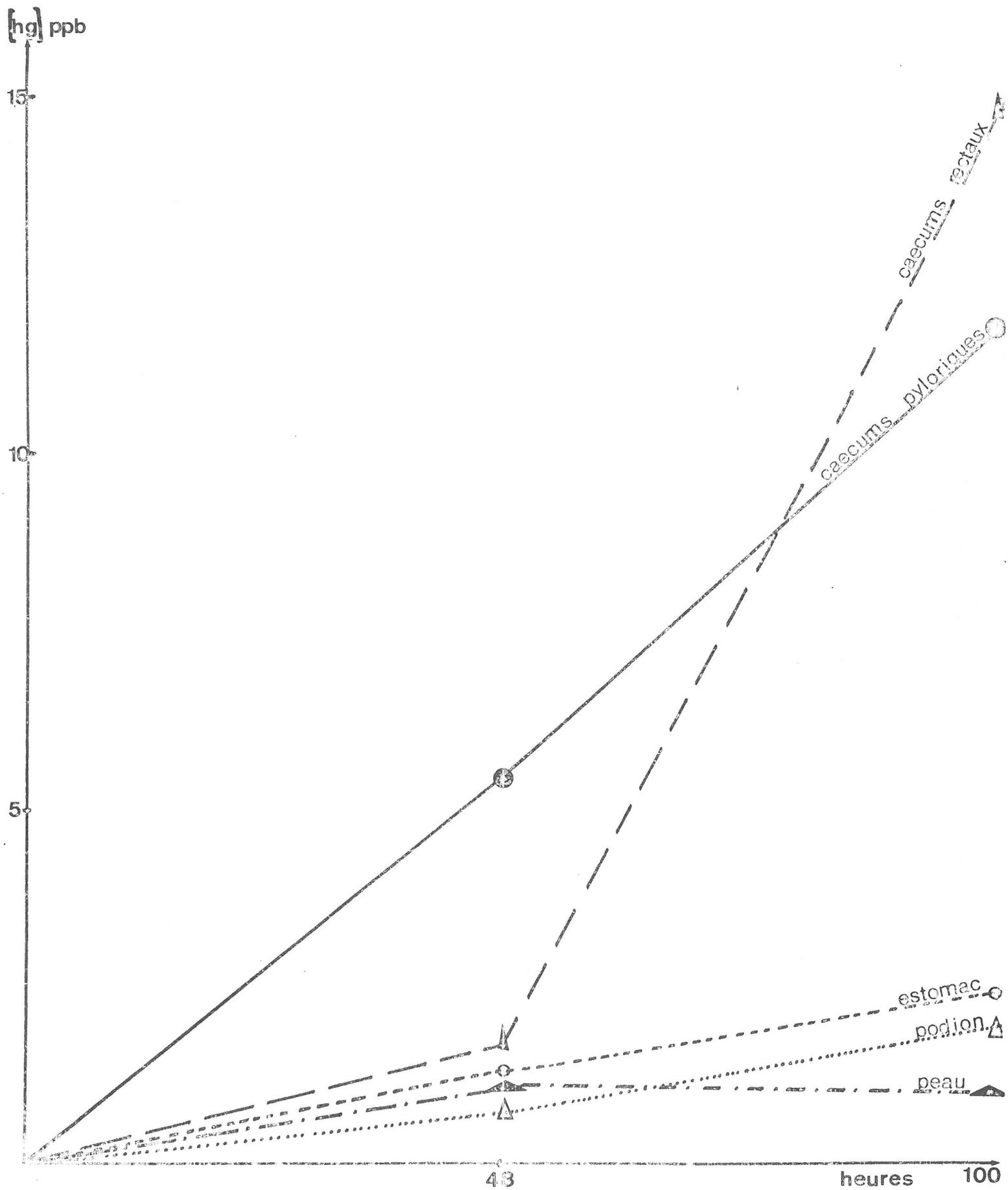
Graphique 9 : incorporation de mercure 203 dans les astéries s'alimentant de moules contaminées (les moules utilisées ont séjourné 24 heures dans un milieu contenant 5 ppb de mercure 203.).

GRAPH. 8 : INCORPORATION DE HG 203(5ppb) PAR LES MOULES



GRAPH. 9 : INCORPORATION DE HG 203 DANS ASTERIAS RUBENS

NOURRIES PAR DES MOULES CONTAMINEES



DISCUSSION

Des rapports publiés dans le cadre de la CIPS, comme des données de la bibliographie, il ressort que la pollution des animaux marins par les métaux lourds est le résultat de phénomènes particulièrement complexe.

Fermi les métaux polluants, le mercure est celui dont les effets sont le plus connu. Heureusement, comme le disent GAVIS et FERGUSON (1972), ses effets sont localisés et en ce sens il est contrôlable. Lors d'un déversement, il est prouvé que le mercure s'adsorbe en grande majorité sur les particules en suspension. Citons à ce propos les résultats de CRANSTON et BUCKLEY (1972) qui montrent que non loin d'un lieu de déversement, la "teneur" en mercure des particules en suspension est de l'ordre de 10 ppm alors qu'ils n'observent que 0,1 ppm de mercure en solution. Signalons également que le métal s'adsorbe préférentiellement sur des particules de diamètre inférieur à 16 microns (DE GROOT, 1971).

Une fois adsorbée, le mercure sera véhiculé sur des distances variables, généralement courtes, avant que les particules qui le transportent sédimentent (HASSELRODT, 1967, en eau douce ; l'exemple de Minamata en eau de mer). Selon les conditions du milieu, le mercure précipité peut être soit immobilisé, soit redistribué et ce sous l'action de bactéries (GAVIS et FERGUSON, 1972). Dans le cas qui nous occupe (estuaire de l'Escaut) et pour autant que les particules supportant le mercure n'aient pas encore précipité, elles le feront probablement dans la zone de floculation de l'estuaire. En d'autres termes, il n'est pas absolument certain que tout le mercure déversé se retrouve dans la chaîne alimentaire.

La concentration de mercure retrouvé dans les moules de l'estuaire est due essentiellement à la quantité de métal se trouvant en solution (ou en suspension) au delà de la zone de floculation. En première approximation, il semble que le

mercure ne soit présent qu'en faible quantité à ce niveau ; en effet les valeurs maximales enregistrées par les moules ne dépassent guère 0,2 ppm. Ces résultats seront vérifiés prochainement à partir d'un grand échantillonnage statistique. On peut cependant se demander si la moule est réellement un bon indicateur de pollution (animal test) ? Les concentrations de mercure trouvées dans ces bivalves sont-elles toujours proportionnelles à la concentration de mercure du milieu, ou autrement dit les concentrations de mercure des bivalves fluctuent-elles parallèlement aux concentrations de mercure du milieu ? Ou bien la moule se contente-t-elle de concentrer le métal sans l'éliminer ? Il est encore trop tôt pour répondre à cette double question et nous nous proposons d'effectuer dans ce sens diverses manipulations en laboratoire, manipulations utilisant le mercure radioactif.

Bibliographie

- Cranston R. and Buckley D. , 1972 : Environ.Sc. Technol. 6(3) : 274
- De Groot A., De Goeij JJ. and Zegers C. , 1971 : Geologie en Mijnbouw 50(3) : 393
- Gavis J. and Ferguson J. , 1972 : Water Research 6 : 989
- Hasselrot T. , 1967 : Inst. Fresh Water Research report 48 : 102
- Thorpe V. , 1971 : J. AOAC 54(1) : 206

Remerciements

Nous remercions vivement Messieurs Bette, Molle, et Wollast qui nous ont permis de travailler dans leur laboratoire ainsi que les membres de ces laboratoires qui nous ont toujours reçu avec bienveillance. Nous remercions Madame Lupant pour ses conseils avisés et Madame Lekehal pour avoir vérifié nos dosages de Cadmium dans les moules.