

FIXATION DES METAUX LOURDS, FER, ZINC, CUIVRE, PLOMB,
PAR CERTAINES PROTEINES SERIQUES DES ANIMAUX MARINS.

par

M. PINTA
ORSTOM
BONDY

R. TRAN
ORSTOM
BONDY

et

W. GHIDALIA
Université Paris VI
PARIS

Convention de Recherche avec le Ministère de l'Environnement :
CCB - 78.119

PLAN

1. Introduction.
2. Matériel et Méthodes.
3. Expériences de contamination.
4. Résultats et discussion.

1. INTRODUCTION.

Parmi les nombreux types de pollution en milieu marin, les métaux lourds à l'état de traces constituent une source de danger certain, aussi bien sur le plan écologique vis-à-vis des systèmes aquatiques, que sur la chaîne alimentaire.

Les études consacrées à ce problème ont mis à jour le rôle hautement toxique d'éléments tels que le mercure, le cadmium et le plomb, en raison de leur accumulation chez certains organismes marins et de leur transmission à travers les échelons de la chaîne biologique.

En fait, les connaissances actuelles sont surtout basées sur des recherches qui ont été menées à la suite de pollutions accidentelles, lorsque l'on constate l'apparition de perturbations morphologiques ou physiologiques chez l'homme ou chez des espèces directement comestibles par l'homme (poissons, crustacés ...). Ces recherches permettent, dans la plupart des cas, de remonter à l'origine des troubles observés. Cependant, l'identification de l'agent polluant responsable peut prendre un certain temps, du fait de la difficulté d'établir un diagnostic sur et du laps de temps qui peut s'écouler entre l'apparition des perturbations et leur constat. De plus, cette démarche à posteriori fournit peu de renseignements sur les mécanismes d'action de la substance incriminée.

C'est sur ce thème que sera essentiellement consacré ce travail. Nous avons tenté d'apporter quelques précisions sur les modalités d'action d'un élément tel que le plomb, choisi en raison de ses effets toxiques bien connus chez l'homme (saturnisme, troubles des fonctions rénales, ...) et de son importance en tant que métal polluant pour l'environnement de façon générale.

Une telle étude pouvait être envisagée sous deux aspects :

- soit en prélevant des échantillons d'organismes évoluant dans un milieu supposé pollué en plomb afin d'étudier leur physiologie et de déterminer les teneurs en métal dans leurs organes,
- soit en reproduisant expérimentalement un milieu marin artificiel, puis en mettant dans ce milieu l'espèce animale étudiée en présence de plomb à des concentrations fixées.

L'intérêt de cette dernière méthode réside dans la simplification du milieu contaminé, ce qui permet de mettre en cause directement le métal en question et d'établir une corrélation entre la présence de cet élément dans le milieu et l'apparition de certaines perturbations physiologiques chez l'espèce étudiée.

C'est sous cet aspect que sera abordé ce travail. Il s'agit d'étudier le comportement de l'espèce *Macropipus puber*, crabe comestible, en milieu marin artificiel additionné de quantités connues de plomb.

Des recherches préalables (Convention de Recherche 1975-1976) ont abouti à la mise au point d'un protocole expérimental permettant de mettre en évidence une fixation effective de plusieurs métaux (Fe, Zn, Cu, Pb), par une fraction des protéines sériques de *Macropipus puber*, par simple mise en contact de ces éléments avec du sérum.

En continuité avec ces essais d'ajout de métal sur du sérum prélevé, une série d'expériences préliminaires à ce travail a été menée sur deux de ces métaux (cuivre et plomb), dans le but d'obtenir des renseignements sur leur cinétique d'action.

L'ensemble des résultats a montré que les protéines sériques ont un comportement différent vis-à-vis des deux éléments étudiés ; cette différence peut s'expliquer par le fait que le cuivre est le métal constitutif de l'hémocyanine, protéine majeure du sérum des crustacés, alors que le plomb n'a pas un rôle biologique connu chez ces organismes.

De plus, l'étude cinétique a révélé, aussi bien pour le cuivre que pour le plomb, que la phase de fixation est toujours suivie d'une phase de désorption ou relargage du métal par les protéines.

La méthode de contamination en milieu marin artificiellement reproduit permet de vérifier si les phénomènes de fixation et de relargage observés lors de ces essais chimiques se produisent réellement chez les crustacés vivants.

Cette étude comprend trois essais correspondant à la contamination de plusieurs lots de crabes, dans une eau de mer synthétique contenant des concentrations en plomb variant de 1 µg/ml à 0,01 µg/ml. Des échantillons de sérum sont prélevés sur les animaux, à des temps déterminés, avant et après contact avec le milieu pollué. Le plomb est dosé d'une part dans le sérum total, d'autre part sur la fraction protéique.

2. MATERIEL ET METHODES.

2.1. Matériel animal.

Les lots d'étrilles sont fournis, sur commande, par un pêcheur de Bretagne, et arrivent dans la Région Parisienne après une nuit de transport, sans précaution particulière. Leur provenance est, par

conséquent, exactement la même que celle des crabes destinés aux consommateurs sur les marchés.

Pour les besoins expérimentaux, les critères de sélection sont basés sur une taille moyenne, correspondant à une surface de carapace de 8 cm x 6 cm, et sur la plus grande vivacité possible. Ces crabes doivent être suffisamment vigoureux pour s'adapter aux conditions expérimentales et résister aux ponctions répétées.

Les étrilles sont groupées par quinzaine dans de grands bacs d'eau de mer artificielle placés dans une pièce maintenue constamment à 15°C et éclairée artificiellement suivant un rythme circadien. Un bulleur et un filtreur d'eau assurent l'aération et la filtration du milieu à l'intérieur des bacs. L'eau de mer est obtenue par dissolution de sels synthétiques Hw-Wimex, à une concentration de 35 g/l, pour une densité mesurée de 1,022. Ces sels reconstituent un milieu artificiel contenant les bioéléments indispensables à la conservation des organismes marins.

1/ semaine Durant la semaine qui précède les expériences, l'eau de mer est changée deux fois par 1/ et des moules crues sont fournies comme nourriture aux animaux. Cet apport est interrompu pendant le temps que dure les essais.

2.2. Méthodes.

Après un séjour dans un bac d'eau de mer contaminée en nitrate de plomb, les crabes sont ponctionnés à des temps déterminés. Les sérums sont soumis à une électrophorèse pour séparer la fraction protéique. Le dosage du plomb se fait, d'une part directement sur les sérums pour déterminer la quantité de plomb absorbée dans le sérum total, d'autre part sur les fractions électrophorétiques après solubilisation dans un acide, pour apprécier la part de plomb fixée au niveau des protéines sériques.

Ce protocole opératoire nécessite la mise en oeuvre de deux méthodes microanalytiques : l'électrophorèse et la spectrométrie d'absorption atomique sans flamme.

2.2.1. L'électrophorèse.

On peut, en première approximation, considérer le sérum des crustacés comme une solution de protéines dans un milieu très voisin de l'eau de mer.

Du fait des très faibles quantités de sérum dont nous disposons et de la haute sensibilité analytique qu'exige le dosage du plomb, la microtechnique d'électrophorèse sur bande d'acétate est la plus appropriée pour la séparation des protéines. Cette séparation se fait sur des bandes d'acétate de cellulose Cellogel (17 x 2,5 cm) en présence d'un tampon phosphate monopotassique à pH 6,4 qui permet d'isoler l'ensemble des protéines sériques en une seule fraction.

La quantité de sérum déposée au départ par application unique est de 3 µl. La migration s'effectue dans les conditions suivantes :

- différence de potentiel : 180 V
- intensité de courant : 25 mA
- durée de migration : 45 minutes.

Chaque électrophorèse correspond à l'analyse d'un sérum et comprend six bandes :

- une bande témoin sans dépôt,
- cinq bandes avec dépôt du même sérum dont une est soumise à une coloration à l'amidoschwartz afin de révéler l'emplacement des protéines. Seule, cette dernière n'est pas destinée au dosage.

Une fois les protéines localisées par comparaison avec la bande colorée, les bandes à analyser sont découpées à ce niveau avec une lame de verre, en fractions de 1 cm². Celles-ci sont solubilisées pendant 24 heures dans de petits piluliers en verre contenant 1 ml d'acide nitrique 10 %, puis subissent une agitation ultrasonique à froid pendant 5 minutes, ce qui permet la dissolution du métal fixé à 85 %.

Il est absolument nécessaire de faire au moins quatre applications répétées du même sérum et d'éviter toute contamination par du plomb lors des nombreuses opérations pour assurer la plus grande justesse possible des résultats lors du dosage.

La précision de cette méthode varie de 10 à 15 %.

2.2.2. La spectrométrie d'absorption atomique sans flamme.

La détermination du plomb dans les sérums et dans les fractions protéiques solubilisées revient à doser le plomb à des teneurs de quelques dizaines de ng/ml,

- soit dans un milieu organique chargé en sels,
- soit dans une solution acide concentrée.

La spectrométrie d'absorption atomique électrothermique permet, à la fois, de détecter les quantités de plomb en très faibles traces et de résoudre les problèmes liés à la complexité de ces matrices.

Rappelons brièvement le principe de cette méthode.

L'échantillon introduit dans un four en graphite subit les étapes suivantes :

- séchage de la matrice,
- décomposition des éléments en présence d'un gaz inerte,
- atomisation du métal par chauffage électrothermique. Les atomes sont mesurés par absorption et les concentrations en plomb sont déterminées par rapport à une gamme étalon.

a) Milieux "eau de mer" et "sérum total".

La programmation thermique mise au point par RIANDEY, GAVINELLI et PINTA (1980) a été appliquée dans ce cas, pour l'analyse des sérums et de l'eau de mer, avant et après contamination (1). L'emploi du programme à chauffage rapide est nécessaire pour corriger les fortes absorptions non spécifiques dues à la présence, dans les matrices, de NaCl à des concentrations voisines de 35 % soit 3,5 % après dilution par dix des échantillons.

TABLEAU 1.

Programme optimum pour le plomb dans une matrice "eau de mer" et "sérum total".

Cycle	1	2	3	4	5	6
Température °C	100	400	400	960	20	2200
Temps de montée s	15	15	1	0	1	1
Temps d'isotherme s	15	15	5	3	5	5
Débit d'argon ml/mn	300	300	10	10	300	300

1 : Séchage - 2-3 : Décomposition - 4 : Atomisation -
5 : Refroidissement - 6 : Nettoyage.

La sensibilité est améliorée d'environ 2 à 3 fois en diminuant le balayage d'argon au cycle d'atomisation. La décomposition se fait en deux temps pour réduire progressivement le courant d'argon et obtenir un débit minimal juste au moment de l'atomisation.

b) Fraction protéique.

Après solubilisation du support en acétate, le plomb fixé au niveau de la fraction protéique se trouve dissous dans un volume de 1 ml d'acide nitrique 10 %. C'est à partir de cette solution que se fait le dosage du métal.

RIANDEY,

La programmation thermique pour le plomb, en fonction d'une matrice nitrique, a été étudiée par CAILLOT (1974), PINTA et RIANDEY (1975) et LINHARES et PINTA (1975) (2-4). Ce programme a été repris et adapté au cas des échantillons qui nous concernent, en modifiant légèrement les températures d'atomisation et de décomposition afin d'améliorer la sensibilité.

Ce dosage est rendu délicat par la "décomposition" du support en acétate par l'acide nitrique, ce qui rend la solution hétérogène et chargée en matière organique. Nous nous trouvons devant l'alternative suivante :

analyser

- les échantillons rapidement, dans les 24 heures qui suivent l'agitation ultrasonique,
- ou enlever, avec précaution, le support en acétate avec une pince en plastique, ce qui constitue un risque de contamination.

TABLEAU 2.

Programme optimum pour le plomb dans une matrice nitrique.

Cycle	1	2	3	4	5
Température °C	100	550	550	2000	20
Temps de montée s	15	15	1	1	1
Temps d'isotherme s	15	15	5	5	5
Débit d'argon ml/mn	300	300	10	10	300

c) Propriétés analytiques de la méthode.

Un système d'injection automatique de l'échantillon dans le four en graphite permet une répétabilité moyenne de 5 %. La sensibilité absolue mesurée par le rapport $\Delta(\text{Pb})/(\Delta A)$ est de l'ordre de $0,3 \times 10^{-9}$ g pour une absorption de 1 %. La limite de détection pour le plomb est de 10^{-11} g.

La courbe d'étalonnage (Fig. 1) montre que le domaine analytique est compris entre $2 \cdot 10^{-6}$ g/l et $40 \cdot 10^{-6}$ g/l pour la sensibilité indiquée.

En matière d'analyse d'ultratraces, les causes d'erreur prépondérantes proviennent des risques de contamination à toutes les étapes des opérations, viennent ensuite les absorptions non spécifiques, puis éventuellement, les interférences chimiques notamment pour les matrices "eau de mer" pour les échantillons étudiés.

Afin de pallier à ces multiples inconvénients, des précautions rigoureuses sont prises pour éviter tout risque de contamination ; les manipulations ont lieu dans des locaux dont l'atmosphère est à empoussiérage contrôlé. L'acide nitrique est de qualité "suprapur" Merck et le chlorure de sodium de qualité "specpur" Johnson Matthey. Les divers blancs sont systématiquement mesurés : blanc "four vide", blanc "milieu HNO_3 10 %", blanc "matrice NaCl", blanc "support acétate".

L'utilisation d'un spectromètre Perkin-Elmer 400, équipé d'un dispositif de correction de fond simultanée à arc au deutérium, permet la correction totale des absorptions non spécifiques indésirables dues aux matrices chargées en NaCl. Cette correction est contrôlée régulièrement par analyse des échantillons avec et sans l'effet de la lampe à deutérium.

La méthode de l'étalonnage complexe est employée pour les échantillons en milieu "eau de mer" ; il s'agit de faire une gamme de $Pb(NO_3)_2$ dans du NaCl à 35 %.

2.2.3. La méthode du "Biuret".

La technique retenue pour le dosage des protéines sériques est la méthode colorimétrique dite du "Biuret".

Le principe de la réaction est le suivant : les fonctions $-CONH_2$, $-CH_2NH_2$, $-C(NH)(NH_2)$ ou $-C_3NH_2$, des protéines réagissent en présence du réactif de Biuret (solution de NaOH et de $Cu(SO_4)_2$) pour donner une coloration bleue-violette dont l'intensité est mesurable au spectrophotomètre, à la longueur d'onde 340 nm (5-6).

Cette méthode est utilisée généralement pour le dosage des protéines, albumines et globulines du sang humain. Les concentrations en protéines des échantillons sont déterminées par rapport à une droite établie grâce à un étalon de référence qui est une solution d'albumine synthétique à une concentration donnée.

Appliquée au dosage des protéines sériques de crustacés, la technique du Biuret ne permet pas de donner des résultats rigoureusement justes ; elle est utilisée à titre semi-quantitatif, pour faire des comparaisons de teneurs entre les crabes, l'erreur de précision étant de 3 %.

2.3. Expression des résultats.

2.3.1. Unités.

Résultats concernant le dosage direct des protéines et du plomb total du sérum :

- concentration en protéines sériques : mg/ml
- concentration en plomb dans le sérum : $\mu g/ml$ sérum.

Résultats concernant l'analyse des fractions protéiques :

- concentration en plomb : μgPb fixé par les protéines/ml sérum.

2.3.2. Graphes.

Les résultats se traduisent graphiquement par des courbes de cinétique en fonction du temps :

- 1 - variation de la teneur en plomb sérique en fonction du temps,
- 2 - variation de la teneur en plomb fixé par les protéines en fonction du temps.

3. EXPERIENCES DE CONTAMINATION.

3.1. Protocole commun.

Les expériences sont menées sur des lots homogènes de dix crabes mâles. Le prélèvement de l'hémolymphe se fait par ponction avec une seringue de 1 ml, au niveau du sinus situé à la base des pattes marcheurs, aux temps suivants :

- 1 jour avant contamination du milieu (J-1), c'est-à-dire lorsque le crabe se trouve dans son état physiologique normal, le jour J étant le début de l'essai de contamination ;
- J+1, J+2, J+3 (ou 4), J+7 jours après contamination du milieu par du Pb à différentes concentrations.

Les volumes prélevés (environ 0,2 ml par ponction) sont immédiatement mis à centrifuger pendant dix minutes, à 4000 tours/mn. Le surnageant recueilli constitue le sérum et correspond à l'hémolymphe débarrassée des cellules sanguines.

Quelques gouttes de sérum sont destinées à l'électrophorèse et le reste est conservé, à 4°C, dans des tubes bouchés hermétiquement.

3.2. Contamination par une eau contenant 1 µg/ml de plomb.

Deux lots de crabes sont étudiés parallèlement aux temps J-1, J+1, J+2 et J+3 :

- un lot "témoin" dans une eau de mer sans ajout de métal,
- un lot séjournant dans une eau contenant 1 µg/ml de plomb sous forme de $Pb(NO_3)_2$.

Le premier but est de retrouver des traces de plomb dans le sérum, auquel cas on pourra affirmer que les barrières physiologiques naturelles telles que les épithéliums branchiaux et les téguments du crabe, ne constituent pas un système de filtration sélectif vis-à-vis de ce métal. Le dosage des fractions protéiques permettront, dans un second temps, de vérifier si les phénomènes de fixation et de relargage se produisent lorsque les crabes se trouvent dans un milieu marin reconstitué.

3.3. Contamination par une eau contenant 0,1 µg/ml de plomb.

Compte tenu des résultats de l'expérience précédente, cet essai est fait sur deux séries de crabes, dans une eau de mer contaminée par 0,1 µg/ml en Pb dont une série sert de témoin d'observation (non ponctionnée), l'autre à l'analyse. L'étude cinétique se fait pendant sept jours pour suivre la stabilisation ou la décroissance des phénomènes.

L'observation du lot témoin permet de déterminer le taux de mortalité dû uniquement à la toxicité du métal.

3.4. Contamination par une eau contenant 0,01 µg/ml de plomb.

Un lot de dix crabes séjournant dans une eau de mer contaminée à 0,01µg/ml en Pb subissent des ponctions aux temps J-1, J+1 et J+2.

La moitié du lot est alors remise dans une eau non contaminée et les ponctions poursuivies pendant cinq jours sur les dix crabes.

La comparaison des résultats entre les crabes décontaminés et les autres permet de savoir s'il existe une accélération du relargage du plomb lorsque le séjour en milieu pollué est interrompu.

4. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

4.1. Contamination par une eau contenant 1 µg/ml.

4.1.1. Résultats avant contamination.

Les contrôles effectués sur les crabes avant contamination par le plomb donnent les résultats suivants : tableau 3.

TABLEAU 3 - Teneurs en plomb et en protéines des sérums.

Crabes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne des 10
Pb µg/ml sérum	0,007	0,016	0,015	0,009	0,020	0,004	0,013	0,008	0,004	0,016	0,011
Protéines mg/ml sérum	57,37	56,03	64,62	52,76	61,32	59,35	62,30	55,40	55,40	63,30	58,78

La teneur moyenne en plomb du sérum des crabes à l'état normal est de 0,011 µg/ml. Nous ne pouvons préciser si ce plomb trouvé dans le sérum total se trouve lié ou non aux protéines, étant donné la limite de détection relative de l'absorption atomique qui est de 0,0005 µg/ml.

En effet, une concentration moyenne en plomb de 0,011 µg/ml, diluée environ 1000 fois - 3 µl de sérum repris dans 1 ml d'acide nitrique - après l'électrophorèse, ne peut être détectée au dosage car elle est très inférieure à la limite de détection.

La concentration moyenne en protéines totales des sérums étudiés est de 58 mg/ml.

L'eau de mer synthétique testée avant l'introduction des crabes et avant toute contamination par du plomb, a une concentration en plomb inférieure à 0,0005 µg/ml.

4.1.2. Résultats après contamination.

Le tableau 4 donne les teneurs en plomb dosées dans le sérum et dans la fraction protéique, au bout de 1 jour, 2 j et 3 j d'immersion des crabes n° 1 à 5 dans l'eau de mer contenant 1 µg/ml de plomb.

TABLEAU 4 - Teneurs en plomb dans le sérum et dans la fraction protéique après contamination des crabes.

(1) Pb sérique : µg/ml sérum

(2) Pb protéique : µgPb protéique/ml sérum.

Crabes contaminés	1	2	3	4	5	Moyenne des 5
J + 1						
Pb sérique (1)	4,28	3,46	1,41	4,30	2,48	3,18
Pb protéique (2)	3,93	2,80	0,73	3,88	1,96	2,66
J + 2						
Pb sérique	5,12	5,10	5,30	4,50	5,77	5,15
Pb protéique	4,80	8,46	5,10	4,00	4,50	4,60
J + 3						
Pb sérique	4,76	5,34	5,43	2,28	4,34	4,43
Pb protéique	4,70	3,83	3,13	1,40	3,46	3,30

L'analyse des concentrations moyennes pour les cinq crabes mène aux conclusions suivantes.

- On retrouve effectivement du plomb dans le sérum de tous les crabes contaminés ; ce plomb se situe en majeure partie au niveau de la fraction protéique.
- La comparaison des résultats aux trois temps étudiés met en évidence deux phases successives : dans une première phase, les concentrations en plomb sérique augmentent jusqu'à un maximum au temps

J+2 puis diminuent légèrement par la suite. Le plomb protéique suit la même évolution que le plomb sérique pour chaque échantillon de sérum.

Les résultats individuels montrent que les concentrations sont d'une grande variabilité aux temps J+1 et J+3 alors qu'elles sont plus homogènes au temps J+2. Cela signifie qu'à J+1 et J+3 correspondant respectivement aux phases croissantes et décroissantes des concentrations, le comportement des crabes, vis-à-vis du plomb, est variable d'un individu à l'autre. Par contre, le maximum de concentration en plomb sérique et en plomb protéique atteint au bout de deux jours semble être du même ordre de grandeur pour tous les crabes.

4.1.3. Evolution des teneurs en plomb sérique et en plomb protéique en fonction du temps de contamination des crabes (graphe 1).

Les courbes moyennes pour l'ensemble des crabes étudiés mettent en évidence la fixation du plomb par les protéines sériques au fur et à mesure que le crabe absorbe le métal en quantité croissante dans son sérum. Compte tenu de la précision des mesures, on peut dire que les protéines fixent la quasi totalité du plomb sérique. Ceci se produit dans les 48 h suivant l'immersion des crabes dans le milieu pollué. Il est intéressant de noter que la concentration maximale en plomb sérique atteinte aux alentours de 48 h de contamination est, en moyenne, de 5 µg/ml, soit cinq fois plus que la teneur en plomb du milieu.

Après leur maximum, les courbes en plomb sérique et en plomb protéique subissent toutes deux une nette décroissance : le sérum est moins concentré en plomb par rapport à J+2 et la fraction protéique a relâché une partie du métal qu'elle avait fixé jusque là ; cependant, une grande proportion de plomb reste encore liée à leur niveau. La courbe (S-P) traduit ce phénomène de relargage du plomb protéique, amorcé au bout de 48 h de séjour des crabes dans l'eau polluée.

Il aurait été intéressant de prolonger l'essai au delà de trois jours mais la totalité des crabes contaminés sont morts entre cinq et huit jours après leur contact avec le plomb. On peut attribuer ces décès à l'effet toxique du métal polluant car les crabes témoins (n° 6 à 10), conservés dans les mêmes conditions expérimentales mais en milieu exempt de plomb, sont restés vivants plus de six semaines en eau de mer artificielle.

La comparaison des concentrations en protéines et des quantités maximales de plomb fixé par ces mêmes protéines, pour chaque sérum, indique qu'il existe une relation de proportionnalité entre les deux résultats. Autrement dit, plus la teneur en protéines sériques est élevée, plus la quantité maximale en plomb fixé est grande. Cette proportionnalité n'est cependant pas étroite, ce qui peut s'expliquer par le fait que les conditions électrophorétiques choisies ne permettent de séparer que la totalité des protéines et non pas la fraction des protéines impliquées uniquement dans la fixation du plomb.

4.2. Contamination par une eau contenant 0,1 µg/ml.

4.2.1. Résultats après contamination.

l'étude

Compte tenu des résultats de l'essai précédent, il était nécessaire de poursuivre/au-delà de trois jours mais, dans cet essai, la teneur en plomb de l'eau a été diminuée afin de ne pas provoquer la mort à court terme des crabes contaminés.

Deux lots de dix crabes ont été mis en contact avec une eau de mer contenant 0,1 µg/ml de plomb. L'un des lots n'est pas ponctionné et sert de témoin d'observation ; l'autre lot, destiné aux analyses, est ponctionné aux temps J-1, J+1, J+2, J+4 et J+7.

Le tableau 5 indique les résultats obtenus par analyse des sérums du deuxième lot.

Les faits observés dans l'essai précédent sont confirmés : dans les premiers jours de contamination des crabes, les teneurs en plomb sérique et protéique augmentent dans tous les sérums puis ces teneurs diminuent par la suite.

L'expérience prolongée jusqu'à sept jours a permis d'apporter les précisions suivantes.

- Le maximum, aussi bien pour le plomb sérique que protéique, est atteint au bout de un à deux jours de contact avec le milieu pollué. Au-delà de ce maximum, les teneurs en plomb sérique diminuent légèrement et tendent à se stabiliser entre quatre et sept jours de contamination alors que les teneurs en plomb protéique subissent une chute qui s'accroît avec le temps.
- L'étude de la variabilité des concentrations en plomb protéique, pour un temps donné, montre que les résultats sont plus dispersés autour de la moyenne aux temps J+4 et J+7, qu'ils ne le sont aux temps J+1 et J+2. On peut en déduire que, dans un premier intervalle de temps, entre J et J+2, au fur et à mesure que la concentration en plomb augmente dans le sérum, les protéines fixent ce plomb en quantité relativement égale, d'un crabe à l'autre, jusqu'à ce que la quantité maximale en plomb sérique soit atteinte. Dans un second temps, ces mêmes protéines relâchent une partie du plomb qu'elles avaient fixé mais ce relargage se fait à des vitesses différentes d'un crabe à l'autre.

On retrouve donc les deux phénomènes observés lors de l'essai précédent : fixation de la majeure partie du plomb sérique par les protéines puis relargage progressif de ce plomb. Ce relargage peut être total pour certains crabes (n° 7, 8 et 9) chez lesquels il n'a pas été détecté de trace de métal au niveau de la fraction protéique au bout de sept jours.

4.2.2. Evolution des teneurs en plomb sérique et en plomb protéique en fonction du temps de contamination (graphe 2).

La courbe moyenne pour l'ensemble des sérums traduit des phénomènes observés.

TABLEAU 5 - Teneurs a) en plomb et en protéines des sérums avant contamination (J-1) ;
 b) en plomb sérique et protéique après contamination (J+1, J+2, J+4, J+7).

S : Plomb sérique
 P : Plomb protéique.

Crabes n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne des 10	C.V. %
J-1												
S-1 µg/ml	0,003	0,003	0,002	0,004	0,011	0,003	0,004	0,006	0,002	0,002	0,004	
Protéines mg/ml	69,53	71,91	70,32	70,30	63,96	69,53	68,73	59,19	67,94	65,55	67,69	
J+1												
S+1 µg/ml	1,13	1,64	1,15	1,17	0,87	1,08	1,16	0,82	1,06	1,02	1,10	20,00
P+1 µg/ml	0,90	1,40	1,00	1,05	0,70	0,60	1,00	0,60	0,80	0,80	0,88	
J+2												
S+2 µg/ml	1,21	1,74	1,26	1,25	1,06	1,16	1,10	0,78	0,79	0,85	1,12	21,00
P+2 µg/ml	1,00	1,60	1,19	0,90	0,80	1,00	0,90	0,60	0,60	0,60	0,90	
J+4												
S+4 µg/ml	0,97	1,19	1,06	0,99	0,92	1,25	0,66	0,60	0,61	0,72	0,89	28,29
P+4 µg/ml	0,80	0,80	1,00	0,50	0,80	1,00	1,30	0,40	0,40	0,40	0,64	
J+7												
S+7 µg/ml	1,01	1,23	1,00	0,96	0,93	0,76	0,70	0,67	0,65	0,60	0,85	51,31
P+7 µg/ml	0,10	0,10	0,36	0,16	0,16	0,43	0,03	0	0	0,30	0,16	

Dans les deux jours qui suivent la contamination des crabes, les protéines fixent, en moyenne, 80 % du plomb sérique. La teneur maximale en plomb fixée atteint 0,90 µg/ml de sérum, soit environ dix fois plus que la teneur dans le milieu contaminé. Après ce maximum, le relargage du métal est amorcé entre trois et quatre jours et, par la suite, s'accroît avec le temps de contamination.

On peut constater que la courbe moyenne en plomb protéique présente une asymétrie qui indique que la vitesse de fixation du plomb par les protéines est de deux à trois fois supérieure à la vitesse de relargage du métal. La fixation et la désorption du plomb mettent donc en jeu soit des mécanismes différents, soit un même mécanisme dépendant de paramètres différents (présence d'ions Ca^{++} ou autres catalyseurs chimiques).

Bien que représentative du comportement de l'ensemble des crabes expérimentés, les courbes moyennes ne mettent, cependant, pas en évidence, les particularités propres à chaque échantillon de sérum. L'étude des résultats individuels a permis de classer les sérums en deux catégories suivant que leur maximum en plomb protéique se situe à J+1 ou J+2. Ces catégories sont représentées graphiquement par les courbes du graphe 3. Ces deux types de courbes (a) et (b) ont la même allure que la courbe moyenne pour l'ensemble des crabes (graphe 2) ; mais, dans le cas des crabes N° 1 à 6 (b), le maximum en plomb protéique est atteint au bout de deux jours et correspond à environ 1 µg/ml, alors que dans le cas des crabes n° 7 à 10 (b), le maximum a lieu dès le premier jour de contamination et se situe vers 0,8 µg/ml. Autrement dit, dans la première catégorie, la quantité maximale de plomb fixée par les protéines est supérieure à celle de la deuxième catégorie mais le maximum est atteint plus tardivement.

Cette différence pourraît s'expliquer par le fait que les crabes se trouvaient dans des états physiologiques différents, correspondant à des stades différents du cycle de mue caractéristique de la vie des crustacés décapodes. En effet, les travaux de MARTIN et CECCALDI sur l'évolution des protéines de l'hémolymphe chez *Carcinus maenas* durant le cycle d'intermue (7) ont mis en évidence une variation du taux de ces protéines en fonction du stade de mue :

- immédiatement après la mue et jusqu'au stade C1-C2, la teneur en protéines est faible (15 mg/ml) suite à la dilution de son milieu intérieur après absorption par l'animal d'une forte quantité d'eau ;
- par la suite, cette teneur peut atteindre des valeurs très fortes (jusqu'à 40 mg/ml au stade C4), l'animal devant reconstituer ses réserves protéiques et en accumuler de nouvelles pour assurer son augmentation de volume.

Dans notre cas, la concentration moyenne des crabes n° 1 à 6 est de 69,25 mg/ml alors que celle des crabes N° 7 à 10 est sensiblement inférieure.

De plus, les résultats montrent qu'il existe une relation de proportionnalité entre la teneur en protéines totales et la quantité maximale de plomb fixée par ces protéines.

L'ensemble de ces résultats permet d'émettre l'hypothèse que la quantité maximale de métal fixée par les protéines sériques est liée à l'état physiologique du crabe et, par conséquent, à son stade dans le cycle de mue.

L'observation des étrilles dans le milieu contaminé a apporté des arguments en faveur de l'hypothèse concernant l'influence du stade de mue sur les effets produits par le métal polluant sur la biologie du

crustacé : dès les premiers jours de contact avec le plomb, les crabes n° 1 à 6 ont perdu beaucoup de vigueur par rapport au reste et sont tous morts entre neuf et douze jours, après l'ajout du plomb dans le milieu, alors que les crabes n° 7 à 10 leur ont survécu d'une semaine. Cela veut dire que les crabes qui seraient au stade imminent de leur mue seraient plus sensibles à l'effet toxique du métal.

Les crabes du lot témoin, non ponctionné, sont également tous morts entre dix et vingt jours de contamination ; ce qui met bien en évidence le rôle toxique du plomb sur les crabes expérimentés, que ceux-ci subissent ou non des ponctions répétées pouvant les perturber.

4.3. Contamination dans une eau contenant 0,01 µg/ml.

4.3.1. Evolution des teneurs en plomb sérique et en plomb protéique en fonction du temps de contamination.

Le tableau 6 donne les teneurs en plomb trouvées dans le sérum d'un lot de dix crabes, avant et après contamination, dans un milieu dont la concentration du métal est dix fois plus faible que dans l'essai précédent, soit 0,01 µg/ml. Les crabes ont été ponctionnés aux temps J-1 puis J+1, J+2, J+4 et J+7. Immédiatement après la ponction J+2, la moitié du lot a été remise dans une eau de mer non contaminée en plomb.

Les sérums prélevés aux temps J+4 et J+7 proviennent donc :

- a) des crabes n° 1 à 5 qui ont été en contact permanent avec l'eau polluée,
- b) des crabes n° 6 à 10 qui sont restés deux jours (J à J+2) en milieu contaminé et qui ont été transférés en eau "propre" (de J+2 à J+7).

L'analyse des échantillons prélevés au temps J-1 montre :

- a) une grande variabilité des concentrations en protéines totales d'un crabe à l'autre (40 à 70 mg/ml), ce qui laisse prévoir une variabilité dans les quantités de plomb fixées par ces protéines ;
- b) l'existence de traces de plomb dans le sérum des crabes à l'état normal, de l'ordre de 0,005 µg/ml, alors que la teneur en plomb dans l'eau de mer synthétique est d'environ 0,0005 µg/ml.

Après contamination, le dosage du plomb donne les résultats suivants.

Dans le sérum total on trouve des teneurs en plomb variant de 0,001 à 0,21 µg/ml, suivant les échantillons et suivant le temps de contamination. La concentration maximale en plomb sérique est, en moyenne, de 0,15 µg/ml soit quinze fois plus élevée que celle de l'eau contaminée.

Au niveau de la fraction protéique on retrouve également du plomb en concentrations légèrement inférieures à celles du plomb sérique pour chaque échantillon, ce qui indique qu'une grande partie du métal dosé dans le sérum se trouve liée aux protéines.

Cependant, si le dosage du plomb directement sur le sérum permet de détecter jusqu'à 0,0001 µg/ml, il n'est pas possible de détecter une

TABLEAU 6 - Teneurs a) en plomb et en protéines des sérums avant contamination (J-1) ;
 b) en plomb sérique et protéique après contamination (J+1, J+2, J+4, J+7).

S : Plomb sérique
 P : Plomb protéique

Crabes n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Moyenne des 10
J-1											
S-1 µg/ml	0,004	0,003	0,006	0,009	0,002	0,005	0,002	0,001	0,002	0,005	0,004
Protéines mg/ml	49,64	59,19	68,73	60,78	63,17	63,17	70,33	57,60	69,53	67,15	63,13
J+1											
S+1 µg/ml	0,038	0,220	0,210	0,098	0,063	0,160	0,090	0,135	0,214	0,224	0,129
P+1 µg/ml	0,030	0,210	0,200	0,080	0,060	0,460*	0,080	0,130	0,210	0,220	0,122
J+2											
S+2 µg/ml	0,154	0,061	0,087	0,135	0,255*	0,160	0,215	0,167	0,069	0,056	0,122
P+2 µg/ml	0,140	0,060	0,080	0,130	0,130*	0,130	0,200	0,160	0,060	0,060	0,113
J+4											
S+4 µg/ml	0,139	0,054	0,061	0,120	0,100	0,032	0,030	0,110	0,032	<0,0001	0,075
P+4 µg/ml	0,130	0,050	0,060	0,110	0,100	0,030	0,030	0,100	0,030	<0,030*	0,071
J+7											
S+7 µg/ml	0,098	0,031	0,034	0,135	0,012	0,001	0,033	0,034	0,011	0,001	0,060
P+7 µg/ml	0,090	0,030	0,030	0,100	<0,030*	<0,030*	0,030	0,030	<0,030*	<0,030*	0,051

* Couples de résultats qui n'ont pas été pris en compte dans la moyenne :
 - soit parce que l'un des deux chiffres est une erreur par excès,
 - soit parce que l'un des deux chiffres est inférieur à la limite de détection.

concentration inférieure à 0,030 $\mu\text{g/ml}$ au niveau des fractions protéiques solubilisées. Rappelons que ces dernières sont obtenues après une séparation électrophorétique de 3 μl de sérum seulement ; les protéines isolées sont ensuite reprises dans 1 ml d'acide, ce qui constitue une dilution par environ 1000. Pour être détectables, les teneurs en plomb dosées dans cette solution doivent être supérieures à 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ (limite de détection de l'absorption atomique), c'est-à-dire ramenées à l'unité de sérum, supérieures à 0,03 $\mu\text{g/ml}$.

Si l'on considère l'ensemble des résultats, on constate que les concentrations de J+1 et J+2 sont largement supérieures à celles de J+4 et J+7 : dans les 48 h qui suivent la contamination, les teneurs en plomb augmentent dans les sérums, atteignent un maximum puis diminuent progressivement et tendent à se stabiliser au-delà de J+4. Les rapports plomb protéique/plomb sérique indiquent, qu'en moyenne, 95 % du métal qui se trouve dans le sérum, sont fixés sur la fraction protéique.

Ces résultats confirment ceux des essais précédents ; dès les premiers jours de contamination, au fur et à mesure que la concentration en plomb augmente dans le sérum, les protéines fixent le métal en quantité croissante. Les maximums en plomb sérique et protéique sont atteints entre un et deux jours de contamination et coïncident.

Par la suite, on assiste à un phénomène qui n'a pas été observé antérieurement : après le maximum, les concentrations en plomb sérique et en plomb protéique diminuent mais suivent une évolution parfaitement parallèle ; le rapport plomb protéique/plomb sérique reste constant jusqu'à J+7.

La décroissance des teneurs en plomb sérique peut s'expliquer par le fait qu'après avoir absorbé massivement le métal dans un premier temps, l'organisme du crabe met en place un mécanisme de régulation qui permet d'équilibrer la concentration du sérum avec celle du milieu extérieur.

En ce qui concerne les fractions protéiques, la diminution des teneurs en plomb, à ce niveau, entre J+4 et J+7, correspond effectivement à un relargage car le dosage des protéines donne une concentration constante entre ces deux temps ; cela signifie qu'une même quantité de protéines fixe le plomb sérique dans un premier temps puis en relâche une partie par la suite. On retrouve bien le phénomène de désorption mais, dans ce cas, les quantités de plomb relâchées par les protéines ne restent pas dans le sérum, contrairement à ce qui avait été vu dans les essais précédents. La similitude des résultats, pour l'ensemble des crabes du lot, permet d'affirmer que la contamination avec une eau contenant 0,01 $\mu\text{g/ml}$ en plomb fait apparaître un phénomène qui n'a pas été mis en évidence avec une eau dix ou cent fois plus polluée.

Ceci doit être mis en relation avec la concentration choisie (0,010 $\mu\text{g/ml}$) qui est relativement faible et proche de celle qui a été détectée dans le sérum normal (0,005 $\mu\text{g/ml}$).

Les courbes moyennes des teneurs en plomb sérique et en plomb protéique, en fonction du temps de contamination (graphe 4), traduisent l'ensemble des observations qui se dégagent des résultats obtenus par analyse des sérums. Les conclusions générales des essais précé-

dents sont confirmées par ces courbes. La cinétique des phénomènes est à peu près la même ; la fixation du plomb par les protéines est immédiate et le maximum est atteint rapidement alors que la phase de désorption est plus lente et se fait progressivement.

4.3.2. Effets de la décontamination.

a) *Etude des résultats obtenus par analyse des sérums et des fractions protéiques (essai de contamination par 0,01 µg/ml en plomb).*

Le tableau 7 indique les moyennes des teneurs en plomb sérique et protéique pour les deux lots de crabes contaminés et décontaminés. Ces moyennes ont été calculées à partir des résultats individuels du tableau 6.

TABLEAU 7 - Moyenne des teneurs en plomb sérique et en plomb protéique des crabes contaminés (A) et décontaminés (B).

Lot A : crabes n° 1 à 5, contaminés de J à J+7.

Lot B : crabes n° 6 à 10, contaminés de J à J+2 puis décontaminés de J+2 à J+7.

S : Plomb sérique

P : Plomb protéique.

		Lot A	Lot B
		µg/ml	µg/ml
J+1	S	0,125	0,133
	P	0,116	0,128
J+2	S	0,119	0,125
	P	0,108	0,120
J+4	S	0,094	0,051
	P	0,090	0,047
J+7	S	0,074	0,039
	P	0,062	0,030

Plomb dosé dans le sérum total : d'après le tableau 7, les crabes des deux lots A et B ont à peu près le même comportement vis-à-vis du plomb, pendant les deux premiers jours de contact, avec le milieu pollué. Les teneurs moyennes en plomb sérique des deux lots sont comparables et peu différentes de la moyenne calculée sur les dix sérums du tableau 6, entre J et J+2, c'est-à-dire pendant la phase d'augmentation de ces teneurs.

Par la suite, le transfert du lot B dans une eau "propre", jusqu'à la fin de l'essai, entraîne une différence dans les résultats entre les deux lots. Après J+2, les concentrations en plomb sérique diminuent chez tous les crabes mais cette diminution est plus accentuée chez ceux du lot décontaminé. Cette différence est observable dès J+4, ce qui veut dire que les effets de la décontamination ont lieu dès 48 h après le contact des crabes pollués avec l'eau "propre".

Ce transfert dans un milieu exempt de plomb a donc permis aux crabes d'accélérer l'élimination des quantités de plomb dont leur sérum s'est enrichi pendant le séjour en milieu pollué. Les concentrations moyennes à J+4 et J+7, pour les deux lots, montrent qu'en cinq jours de décontamination, les teneurs en plomb sérique du lot B ont diminué de moitié par rapport à celle du lot A. Il faut également noter que les crabes contaminés de façon continue ont tendance, au bout d'une semaine, à équilibrer la concentration en plomb de leur sérum avec celle du milieu extérieur (0,01 µg/ml) alors qu'à J+7 certains des crabes décontaminés ont une teneur en plomb sérique égale ou très inférieure à 0,01 µg/ml.

Plomb dosé au niveau des fractions protéiques : après J+2 où les concentrations moyennes en plomb ont atteint leur maximum dans les deux lots, la diminution des teneurs en plomb sérique est accompagnée d'une chute des teneurs en plomb protéique. Ce phénomène de relargage du plomb par les protéines est encore plus accentué chez les crabes du lot B dont les protéines relâchent jusqu'à 75 % du plomb qu'elles avaient fixé au maximum, au bout de cinq jours de décontamination.

Cependant, étant donné la limite de détection élevée due à la combinaison des deux méthodes (électrophorèse et absorption atomique), il ne sera pas possible de préciser si les protéines relâchent plus de 75 % du plomb qu'elles avaient fixé. Pour cette raison, dans le cadre de cet essai, nous ne pouvons conclure si une décontamination à long terme peut aboutir à un relargage total des quantités de métal fixées par les protéines sériques.

Malgré les limites imposées par les seuils de détection des méthodes utilisées, cet essai a permis de mettre en évidence une différence dans le comportement des protéines sériques vis-à-vis du plomb, entre les crabes en contact permanent avec l'eau polluée et ceux qui ont été transférés dans une eau propre après un court séjour dans le même milieu.

L'observation des étrilles confirme cette différence : les crabes qui ont été décontaminés sont restés vivants quatre à cinq semaines après la fin de l'essai, alors que les autres sont morts peu de temps après leur dernière ponction (J+7).

b) Etude des électrophorégrammes (contamination par 0,01 µg/ml en plo.

Rappelons que la visualisation de la fraction protéique sur les électrophorégrammes se fait par révélation à l'amido Schwartz qui colore les protéines en bleu avec une intensité proportionnelle à leur concentration.

La comparaison des électrophorégrammes correspondant aux échantillons de sérums prélevés et analysés, aboutit à des conclusions fort intéressantes ; la figure 2 met en évidence les diverses fractions obtenues après migration des protéines du sérum n° 2, représentatif de l'ensemble des sérums étudiés.

- Au temps J-1, la coloration met en évidence deux bandes de protéines : l'une foncée (bande I), l'autre plus claire (bande II), mesurant respectivement 0,7 cm et 0,5 cm d'épaisseur. Les distances de migration (longueur dépôt d'origine-front de migration) sont de 4,5 cm et 3,5 cm (Fig. 2 a). C'est l'aspect usuel que présente la fraction protéique du sérum de *Macropipus puber*, isolée après électrophorèse en tampon phosphate, qui permet une séparation groupée de l'ensemble des protéines.

(Précisons que, dans un premier temps, nous ne nous sommes pas attachés à localiser la fixation du plomb sur l'une ou l'autre de ces bandes).

Dans l'état actuel des connaissances, la bande I correspond à l'hémocyanine, protéine majeure du sérum, jouant un rôle dans le transport de l'oxygène, alors que la bande II n'a pas été identifiée de façon précise pour sa fonction.

Les dix sérums présentent des électrophorégrammes à peu près identiques entre eux, avec une distance de migration relativement constante. La seule différence porte sur l'intensité de coloration des bandes protéiques, résultant de la concentration, plus ou moins forte, des protéines en présence.

- Par contre, les électrophorégrammes effectués au temps J+1, donc un jour après la contamination, présentent une légère modification dans l'aspect des bandes protéiques (Fig. 2 b). La bande I ne subit pas de changement (même distance de migration, même épaisseur) mais, à côté de la bande II apparaît une légère trace colorée qui indique la présence d'une fine bande (III) dont la distance de migration est d'environ 2,7 cm et la largeur variable suivant les sérums. Sur les dix échantillons étudiés, sept d'entre eux présentent cette variation.

- Au temps J+2 d'autres modifications sont intervenues : la distance de migration de la bande I est variable d'un sérum à l'autre, la différence maximale étant de 0,5 cm. Sur l'ensemble des électrophorégrammes, la bande II est beaucoup moins apparente qu'au temps J+1. La coloration révèle plusieurs fines bandes (IV) qui sont peu nettes et dont les distances de migration varient de 1,5 à 3 cm (Fig. 2 c).

- Au temps J+4 les modifications observées au temps précédent sont encore plus accentuées : la distance de migration de la bande I est encore plus variable d'un sérum à l'autre ; l'écart maximal est de 1,3 cm. La bande II n'est plus visible du tout. Les bandes IV sont toujours présentes ; l'une d'entre elles se distingue de façon constante, sur les dix échantillons, par une coloration plus nette ; sa distance de migration est d'environ 1,5 cm (Fig. 2 d).

- Au temps J+7 les électrophorégrammes ont le même aspect qu'au temps J+4, à une exception près : les protéines du sérum n° 2 ont retrouvé leur migration normale, semblable à celle du temps J-1, avant la contamination (Fig. 2e2). Or, ce sérum provient d'un crabe qui a été remis en eau "propre" après 48 h de séjour dans l'eau polluée. Afin de préciser les effets de la décontamination, une électrophorèse a été effectuée à partir de sérums prélevés au temps J+15, sur les crabes qui ont survécu : *les sérums des crabes contaminés de façon continue entre J et J+15 / donnent des électrophorégrammes identiques ; ceux-ci ne comportent plus qu'une seule fraction protéique, avec les mêmes caractéristiques que la bande I (Fig. 2 f1). *les sérums des crabes décontaminés après J+2 présentent une particularité remarquable : sur tous les électrophorégrammes on retrouve les deux bandes I et II ; les

distances de migration sont redevenues constantes d'un sérum à l'autre et identiques à celles du temps J-1 (Fig. 2 f2).

L'ensemble de ces observations mène aux conclusions suivantes.

- a) La fixation du plomb par les protéines sériques induit certaines modifications dans la structure de celles-ci ; ceci se traduit par des changements dans leur comportement électrophorétique qui affectent aussi bien la mobilité que l'aspect des fractions protéiques visualisées.
- b) Ces modifications sont surtout remarquables au temps J+2, c'est-à-dire lorsque les teneurs en plomb sérique et en plomb protéique sont maximales.
- c) En ce qui concerne la bande I, il semble que la fixation du métal n'ait pas introduit de changement visible dans son aspect. Celui-ci reste constant sur les quinze jours suivant la contamination, pour l'ensemble des sérums soumis à l'électrophorèse aux temps J-1, J+1, J+2, J+7 et J+15. Par contre, une légère diminution de la distance de migration a été notée à partir de J+4 ; une étude portant sur de nombreux sérums permettrait de vérifier si cette différence est statistiquement significative.
- d) Les changements intervenus au niveau de la bande II sont plus difficilement interprétables : l'apparition des bandes III et IV peut être due :
 - soit à une décomposition progressive de la bande II ; dans ce cas, on peut conclure que c'est la structure de la (ou des) protéine (s) constituant la bande II qui a subi une modification ou bien le plomb fixé a provoqué une désorganisation de cette structure ou bien celle-ci a été réorganisée de façon à permettre la fixation du métal ;
 - soit à une disparition de la bande II par hydrolyse des chaînes peptidiques, au profit de nouvelles bandes III et IV dont la synthèse est consécutive à la présence du plomb dans le sérum.

Quel que soit le mécanisme qui a lieu effectivement dans le sérum, on peut affirmer que le contact du crabe avec l'eau polluée de façon continue entraîne, au bout de quinze jours, un changement irréversible dans la structure des protéines sériques. Il faut noter que cette irréversibilité a lieu alors que l'analyse des sérums montre, dès J+7, une nette diminution des teneurs en plomb sérique et protéique, et une tendance à la stabilisation de ces teneurs vers une concentration proche de celle du milieu extérieur.

- e) La modification la plus importante concerne les sérums des crabes ayant été décontaminés. Malgré 48 h de contact avec l'eau polluée pendant lesquelles on a observé une fixation du plomb par les protéines, la décontamination en eau "propre" a permis aux protéines de retrouver leur comportement électrophorétique normal. Ceci signifie que les modifications qui ont été observées sur les bandes I et II sont réversibles si le séjour en milieu pollué est court et suivi d'un retour vers un milieu exempt de polluant. Cette réversibilité notée au temps J+15, chez tous les crabes décontaminés, peut d'ailleurs intervenir plus tôt puisqu'elle a lieu chez le

↳ noter

crabe n° 6 au temps J+7, c'est-à-dire dès le cinquième jour de décontamination. L'ensemble de ces observations est confirmée par les dosages au temps J+7 qui indiquent des teneurs en plomb sérique et protéique très faibles, proches de la limite de détection.

Les conclusions tirées de l'étude des électrophorégrammes confirment les résultats obtenus par le dosage du plomb au niveau des fractions protéiques. De plus, elles permettent de préciser que la fixation du métal est accompagnée de modifications structurales des protéines dont la réversibilité est liée au temps de contact des crabes avec le milieu pollué.

5. CONCLUSIONS - DISCUSSION.

Les expériences de contamination en milieu naturel artificiellement reproduit ont permis de mettre en évidence, chez les crabes vivants, les phénomènes de fixation et de relargage du plomb par les protéines sériques, observés lors des essais chimiques.

L'étude cinétique a apporté des précisions concernant les modalités d'action du polluant.

Le contact des crabes avec de l'eau de mer synthétique polluée en plomb entraîne, dans les 24 h qui suivent la contamination, une fixation de quantités croissantes du métal aboutissant à un maximum, suivie d'une phase de relargage partiel du plomb fixé. Pour des concentrations en polluant variant entre 0,01 et 1 µg/ml, ces mécanismes sont observables pendant une semaine après le début de la contamination.

En ce qui concerne la fixation : les quantités de plomb fixées au niveau des protéines sont proportionnelles aux quantités absorbées par le crabe dans son sérum, elles-mêmes fonction de la concentration en métal du milieu. Les résultats des trois essais ont permis de tracer la courbe mettant en relation les quantités maximales de plomb fixé par les protéines et la concentration du plomb dans le milieu (graphe 5). Cette courbe présente un plateau qui correspond au seuil de saturation en plomb des protéines ; la concentration du polluant pour lequel ce seuil est atteint est d'environ 1 µg/ml et confirme la valeur déduite des essais chimiques qui était de 0,9 µg/ml.

La quantité fixée maximale, pour une concentration donnée en plomb, varie avec la teneur en protéines sériques et paraît être liée au stade du cycle de mue du crabe. Les crustacés possédant un milieu intérieur de composition variable selon leur état physiologique, il serait intéressant de vérifier ultérieurement si la capacité de fixation est constante ou peut varier tout au long de ce cycle.

En ce qui concerne la désorption : le relargage du plomb a toujours lieu après la première phase de fixation, quelle que soit la quantité

fixée par les protéines.

L'essai de décontamination a permis :

- a) de conclure qu'un transfert des crabes dans une eau "propre", après un court séjour dans l'eau polluée, accélère la désorption ;
- b) de mettre en évidence l'importance de ce phénomène puisque la survie du crabe pollué semble dépendre des quantités de métal relâchées par les protéines. En effet, dans tous les essais, la mortalité affecte, à plus ou moins longue échéance, les crabes contaminés sauf dans le troisième essai où la décontamination a permis le relargage d'au moins 75 % du plomb fixé.

Ce mécanisme de désorption aurait donc pour rôle d'aider l'organisme du crabe à lutter contre les effets toxiques du métal polluant. La survie du crustacé est d'autant plus prolongée que les quantités qui restent fixées au niveau des protéines sont faibles lorsque la phase désorption s'est stabilisée.

Au niveau de la structure des protéines, la fixation et le relargage se traduisent par des modifications qui semblent affecter particulièrement l'une des fractions protéiques et dont la réversibilité dépend du temps de contact du crabe avec le milieu contaminé.

Ce travail a permis d'apporter quelques faits nouveaux sur le comportement des protéines sériques de l'espèce *Macropipus puberulus* à-vis d'un métal lourd tel que le plomb qui est connu en tant que source de pollution fréquente dans les milieux marins.

Il serait nécessaire, dans une prochaine étape, d'apporter des précisions concernant la fraction protéique impliquée dans les mécanismes observés et d'aboutir éventuellement à l'identification de la (ou des) protéine (s) mise (s) en jeu. Une telle étude apporterait non seulement des renseignements sur le plan biochimique mais elle pourrait, en plus, préciser si l'hémocyanine, protéine servant de pigment respiratoire chez les crustacés décapodes, est concernée par les phénomènes observés ; il serait intéressant, dans ce cas, de savoir si cette fonction biologique est perturbée lorsque le crabe se trouve en milieu pollué.

BIBLIOGRAPHIE.

- (1) RIANDEY, C., GAVINELLI, R., PINTA, M., - 1980 - Spectrochim.Acta, 35 B, 765-773.
- (2) CAILLOT, C., - 1974 - Etude des processus de l'atomisation par voie thermoélectrique et de leurs perturbations en spectrométrie d'absorption atomique. Thèse 3ème Cycle, Paris VI.
- (3) PINTA, M., RIANDEY, C., - 1975 - Analisis, 3, 2, 86-93.
- (4) RIANDEY, C., LINHARES, P., PINTA, M., - 1975 - Analisis, 3, 6, 303-311.
- (5) GORNALL, G., BARDAWILL, J., DAVID, M., - 1949 - J.Biol.Chem., 177, 751-763.
- (6) KINGSLEY, G.R., - 1953 - Standard Methods of clinical chemistry, I, 88-97.
- (7) MARTIN, J.L., CECCALDI, H.J., - 1969 - C.R.Bull.Soc.Biol., 11, T 163, 2362-2365.

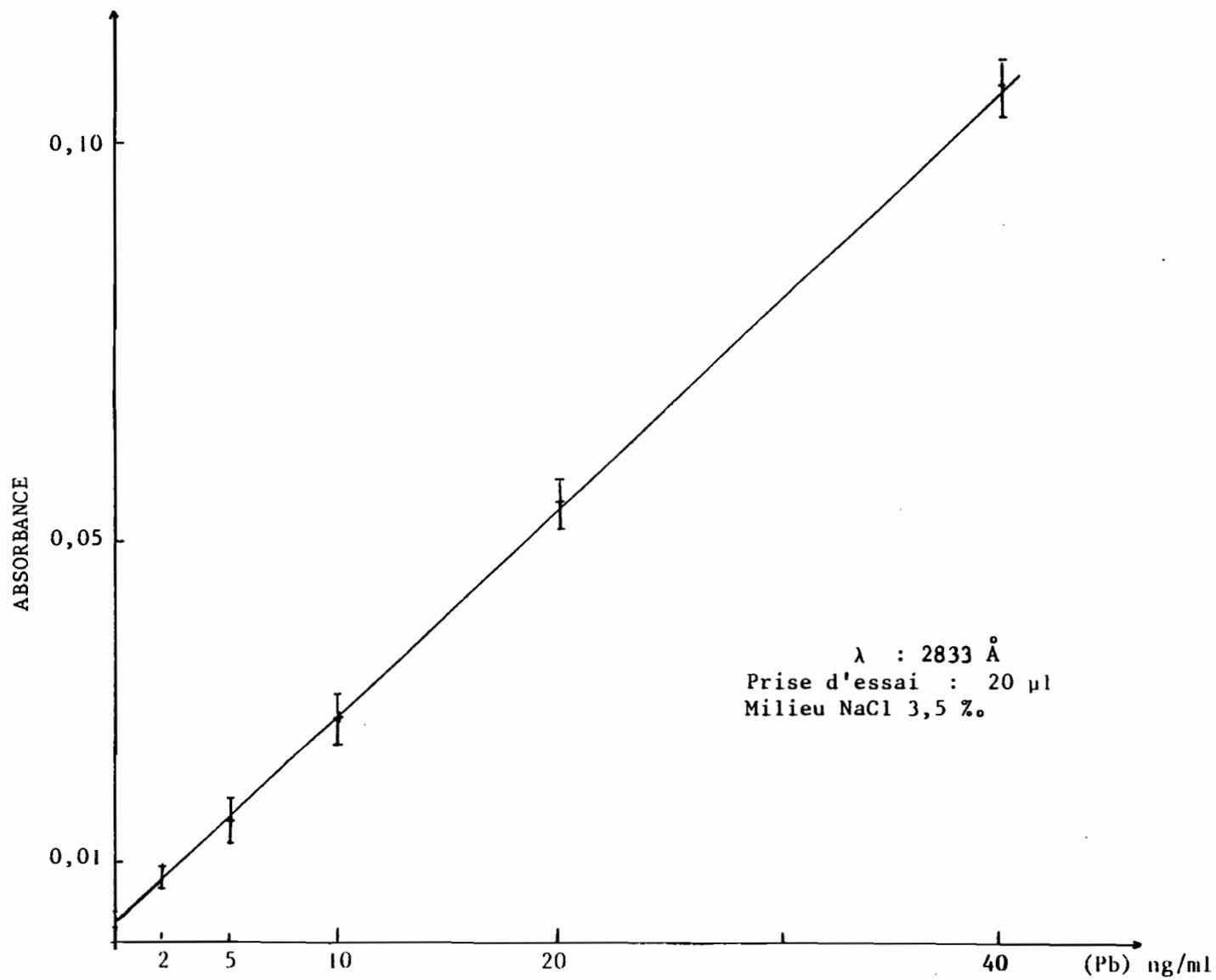


Figure 1 - Courbe d'étalonnage du PLOMB.

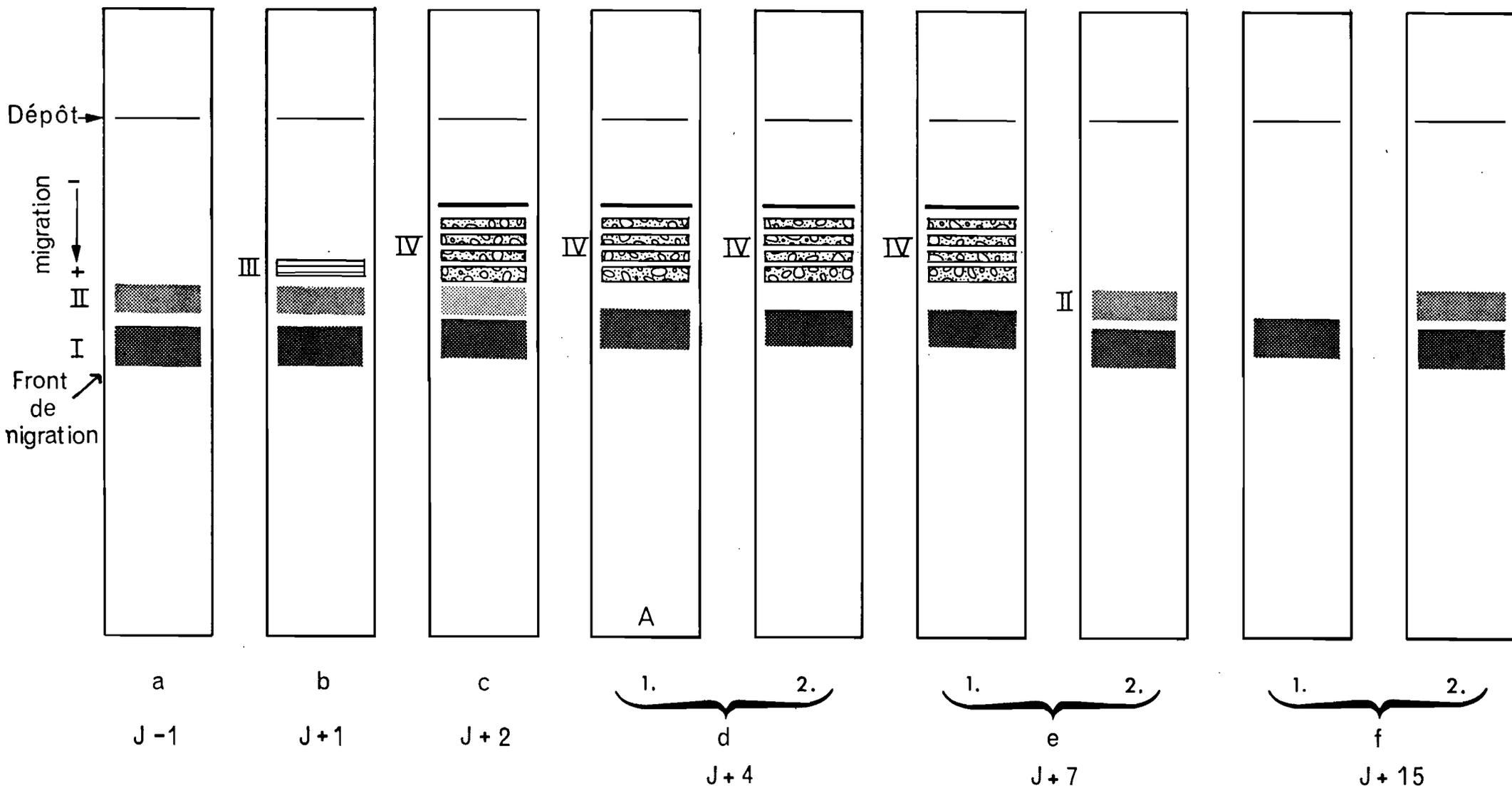
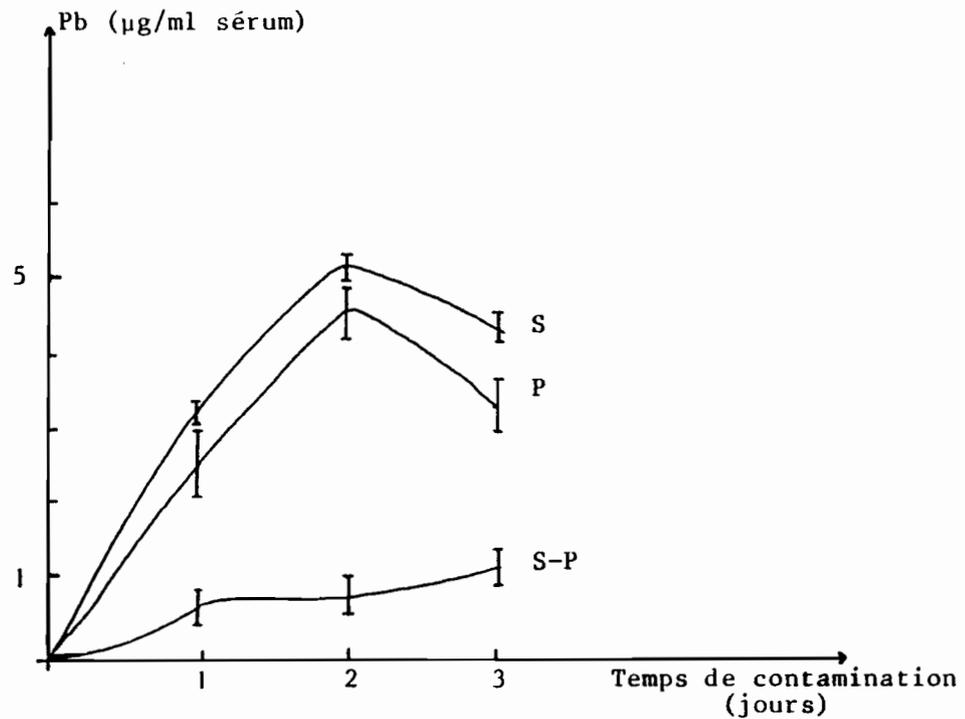


Figure 2 - Electrophorégrammes obtenus après migration des protéines sériques du sérum n° 2

. avant contamination a : J-1

. après contamination b : J+1 ; c : J+2 ; d : J+4 ; e : J+7 ; f : J+15.

d2, e2, f2 : décontaminés.

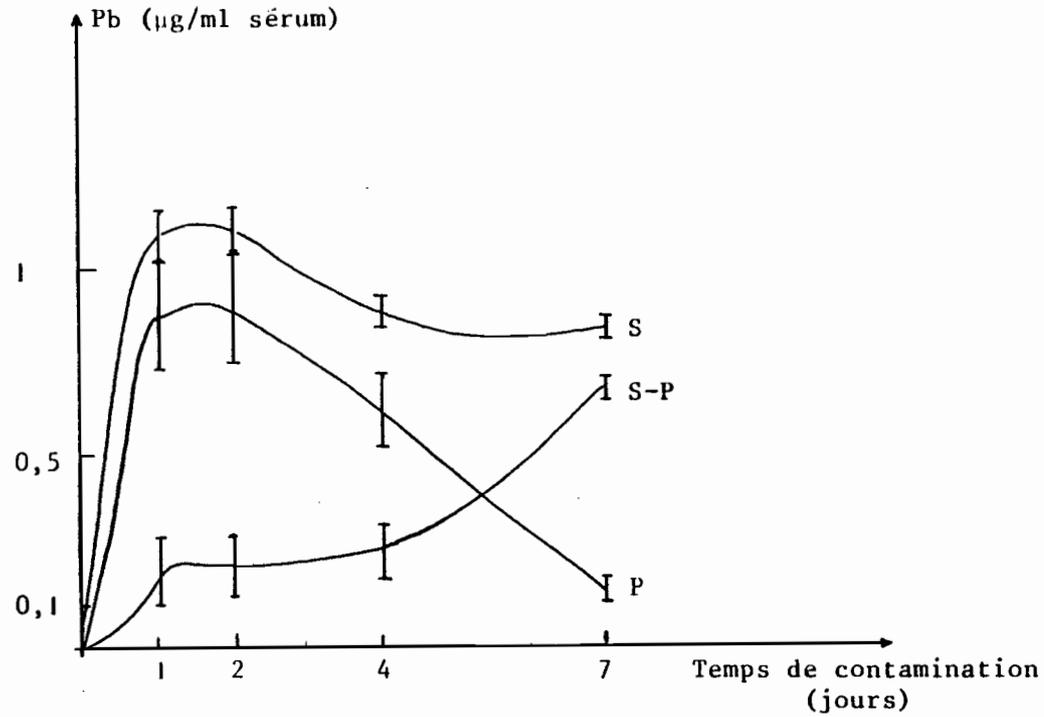


Graph 1 - Courbe moyenne des teneurs en PLOMB sérique et en PLOMB protéique en fonction du temps de contamination (crabes 1 à 5).

Eau de mer à 1 µg/ml en plomb sous forme de $Pb(NO_3)_2$

S : courbe des teneurs en plomb sérique.

P : courbe des teneurs en plomb protéique.

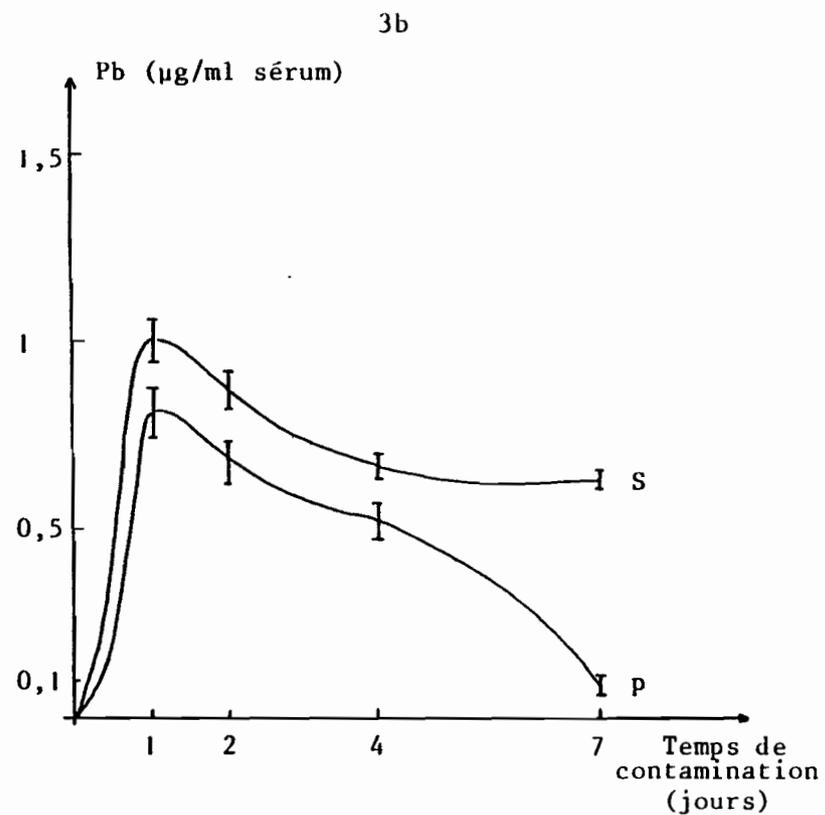
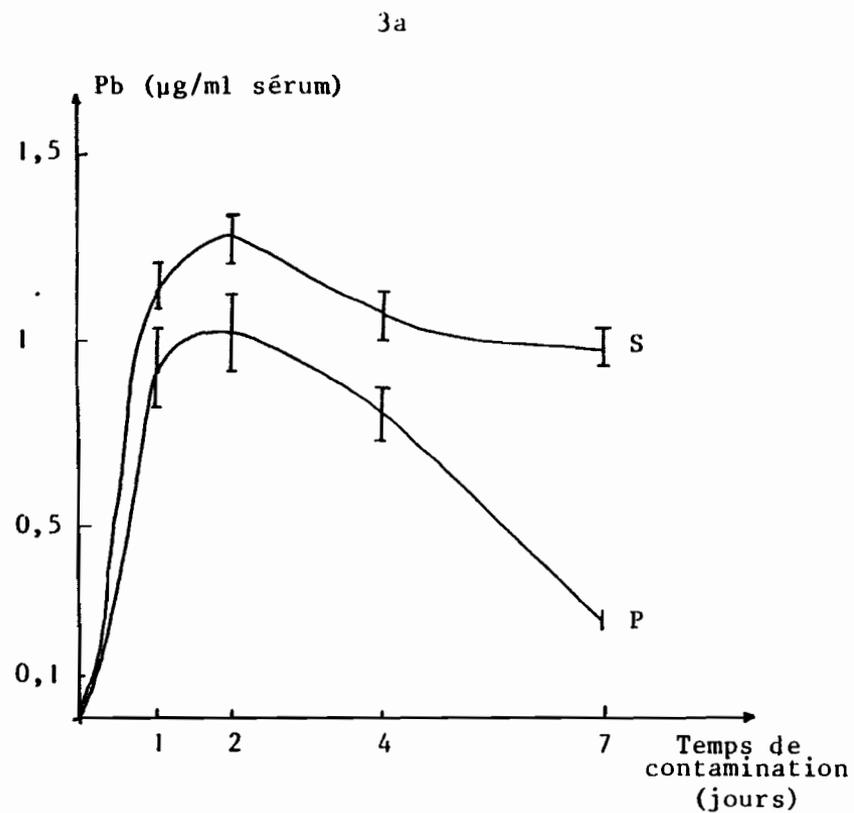


Graph 2 - Courbe moyenne des teneurs en PLOMB sérique et en PLOMB protéique en fonction du temps de contamination (crabes 1 à 5).

Eau de mer à 0,1 µg/ml en plomb.

S : courbe des teneurs en plomb sérique.

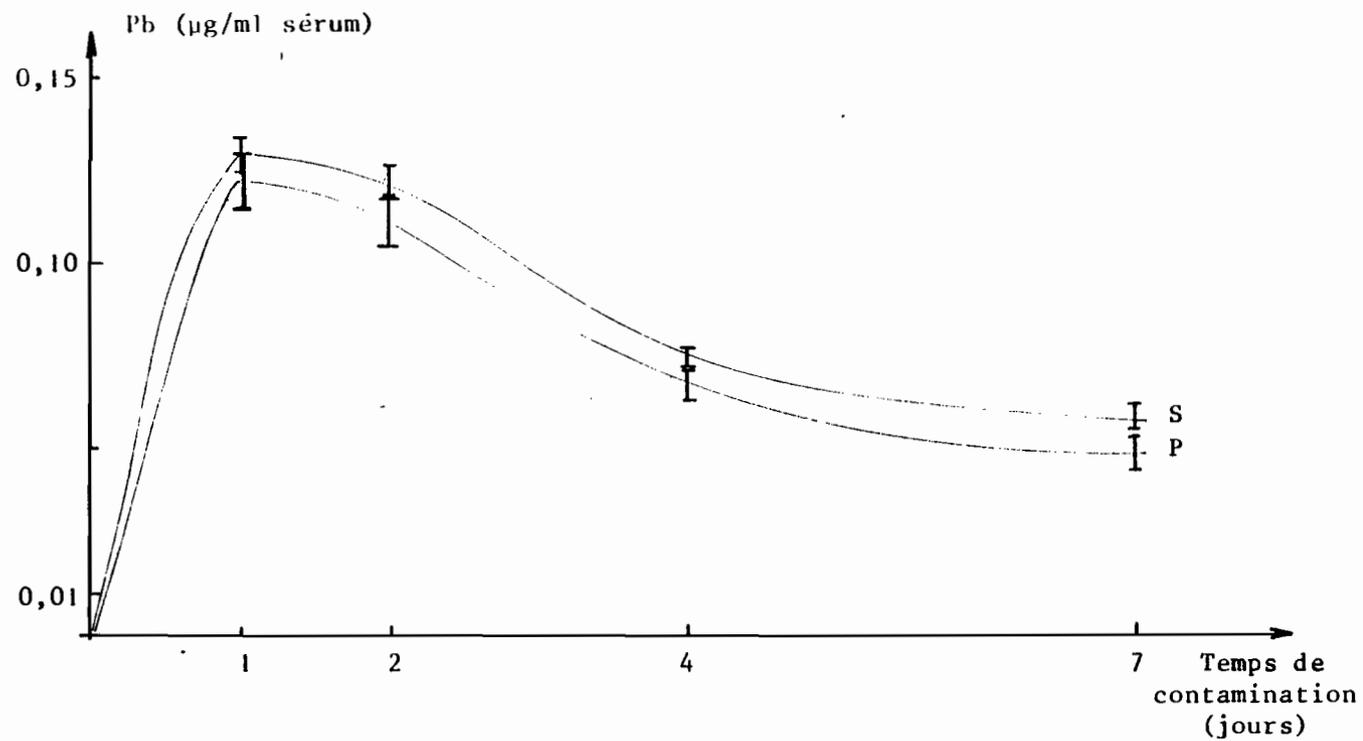
P : courbe des teneurs en plomb protéique.



Graph 3 - Courbe moyenne des teneurs en PLOMB sérique et en PLOMB protéique en fonction du temps de contamination.

3a : crabes n  1, 2, 3, 4, 5, 6.

3b : crabes n  7, 8, 9, 10.

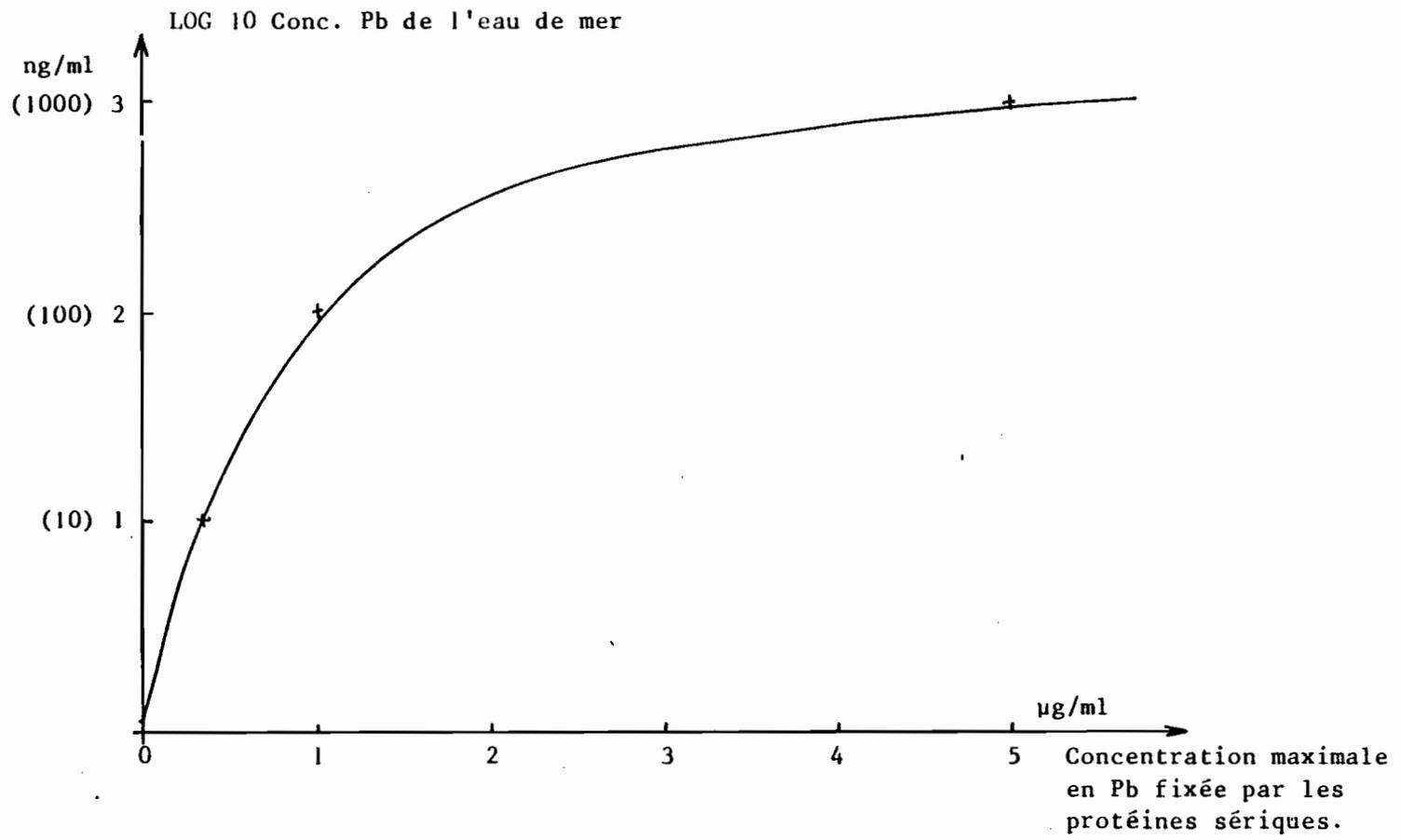


GRAPHE 4 - Courbe moyenne des teneurs en PLOMB sérique et en PLOMB protéique en fonction du temps de contamination.

Eau de mer à 0,01 $\mu\text{g/ml}$ en plomb.

S : courbe des teneurs en plomb sérique.

P : courbe des teneurs en plomb protéique.



GRAPHE 5 - Concentrations maximales en PLOMB fixées par les protéines sériques en fonction de la teneur en PLOMB dans l'eau de mer.