

T H E S E présentée
pour l'obtention
du
DIPLOME de DOCTEUR de 3e CYCLE
à
L'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE
- Paris 6 -

spécialité : SCIENCES NATURELLES
mention : NUTRITION

par
Rosette TRAN

SUJET : CONTAMINATION D'UN CRUSTACÉ COMESTIBLE (*Macropipus Puber*)
PAR LE PLOMB ET LE FER : COMPORTEMENT DES PROTÉINES PLASMATIQUES

soutenu le

19 Avril 1984

devant la Commission d'examen :

MM.	M. PASCAUD	Président
	C. FRAYSSINET	
	M. PINTA	
	W. GHIDALIA	

REMERCIEMENTS.

Je tiens, ici, à rendre hommage à toutes les personnes qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail.

J'adresse mes profonds remerciements :

A Monsieur M.PASCAUD, Professeur à l'Université Paris 6, Directeur du Laboratoire de Physiologie Métabolique et Nutrition, qui m'a fait l'honneur d'assurer la présidence de mon jury. Je lui exprime toute ma gratitude pour l'attention qu'il a accordée à mes recherches tout au long de mon 3ème cycle.

A Monsieur C.FRAYSINET, Professeur à l'Université Paris 6, Maître de Recherche au CNRS, qui a accepté de faire partie de mon jury et d'examiner ce travail.

A Monsieur M.PINTA, Directeur de Recherche à l'ORSTOM, qui m'a accueillie dans son laboratoire, a bien voulu diriger cette thèse et en assurer la correction. Qu'il veuille bien trouver, ici, ma respectueuse reconnaissance pour les conseils et l'aide qu'il m'a prodigués dans la partie méthodologique de ce travail.

A Monsieur W.GHIDALIA, Chargé de Recherche au CNRS, à qui je dois le thème de cette étude et qui a bien voulu accepter de juger ce travail. Je le remercie particulièrement pour les heures qu'il m'a consacrées et que je savais précieuses.

Je remercie très vivement :

Le Personnel du Laboratoire de Spectrographie de l'ORSTOM pour l'aide technique qu'il m'a apportée et tout particulièrement Mesdames M.VILLETTE et M.L.RICHARD qui m'ont aidée, conseillée et encouragée avec beaucoup de gentillesse. Je tiens à rendre hommage à leur compétence et à leur dévouement.

Madame M.F.RIANDEY, Biochimiste à l'ORSTOM, avec qui j'ai eu souvent l'occasion de discuter de mes résultats. Je la remercie vivement de m'avoir fait bénéficier de ses connaissances et de ses conseils.

Monsieur J.M.LEBLANC, Chargé de Recherche à l'ORSTOM, qu'il soit chaleureusement remercié pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et pour ses critiques très constructives.

Monsieur F.ABO, Docteur-Ingénieur, dont l'amitié et le soutien moral m'ont été particulièrement précieux dans les moments d'incertitude et de découragement.

Enfin, je dédie ce travail à mes parents en témoignage de ma reconnaissance profonde.

Ce travail a été entrepris dans le cadre d'une convention de recherche entre le Ministère de l'Environnement et du Cadre de Vie (convention 78-119) et le Laboratoire de Spectrographie de l'Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer, BONDY.

TABLE DES MATIERES.

REMERCIEMENTS

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I - MATERIEL ET METHODES.

1. MATERIEL BIOLOGIQUE	7
1.1. Provenance et choix des animaux	7
1.2. Dispositif expérimental	8
1.3. Obtention du plasma	8
2. METAUX ETUDIES	10
2.1. Elément toxique : le plomb	10
2.2. Eléments d'intérêt physiologique : le fer et le cuivre	15
2.2.1. Le fer	15
2.2.2. Le cuivre	16
3. PROTOCOLE EXPERIMENTAL	17
4. TECHNIQUE D'ANALYSE	18
4.1. Dosage des protéines plasmatiques	18
4.1.1. Principe de la réaction du Biuret	20
4.1.2. Mode opératoire	20

4.2.	Séparation des protéines plasmatiques	21
4.2.1.	Principe de l'électrophorèse	21
4.2.2.	Mode opératoire	22
4.3.	Dosage des métaux	24
4.3.1.	Principe du dosage	24
4.3.2.	Application aux échantillons étudiés	27
4.3.3.	Programmation thermique pour le dosage du plomb, du fer et du cuivre	30
4.3.4.	Propriétés analytiques de la méthode	39
5.	EXPRESSION DES RESULTATS	41
5.1.	Calculs et unités	41
5.1.1.	Dosage des protéines	41
5.1.2.	Dosage des métaux	41
5.2.	Graphes	43

CHAPITRE II - RESULTATS : EVOLUTION DES TENEURS EN PLOMB, FER, CUIVRE DANS LE PLASMA ET AU NIVEAU DES FRACTIONS PROTEIQUES EN FONCTION DU TEMPS DE CONTAMINATION DES ANIMAUX.

1.	ACTION DU PLOMB	47
1.1.	Essai 1 : eau de mer contaminée à 0,01 mg/l en plomb	47
1.1.1.	Etude des électrophorégrammes	48
1.1.2.	Dosage des protéines plasmatiques	51
1.1.3.	Dosage du plomb	55
1.1.4.	Dosage du cuivre	60
1.2.	Essai 2 : eau de mer contaminée à 0,1 mg/l en plomb	63
1.2.1.	Etude des électrophorégrammes	64
1.2.2.	Dosage des protéines totales et du plomb	64
1.3.	Essai 3 : eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en plomb	68
1.3.1.	Etude des électrophorégrammes	69
1.3.2.	Dosage des protéines plasmatiques	71
1.3.3.	Dosage du plomb	78
1.3.4.	Dosage du cuivre	86
1.4.	Essai 4 : eau de mer contaminée à 1 mg/l en plomb	96
1.5.	Conclusion	99
2.	ACTION DU FER	100
2.1.	Essai 5 : eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en fer	100

2.1.1.	Etude des électrophorégrammes	101
2.1.2.	Dosage des protéines plasmatiques	103
2.1.3.	Dosage du fer	107
2.1.4.	Dosage du cuivre	117
2.2.	Conclusion	124

CHAPITRE III - DISCUSSION.

1.	TENEURS EN PLOMB, FER, CUIVRE, DOSEES DANS L'EAU DE MER ET DANS L'HEMOLYMOHE AVANT CONTAMINATION	127
1.1.	Dans l'eau de mer	127
1.2.	Dans le plasma et au niveau des protéines plasmatiques ...	128
1.2.1.	Le plomb	129
1.2.2.	Le fer	130
1.2.3.	Le cuivre	130
2.	ACCUMULATION DU PLOMB ET DU FER DANS LE PLASMA	133
3.	FIXATION SUR LES PROTEINES PLASMATIQUES	137
3.1.	Localisation sur les fractions isolées par électrophorèse	138
3.2.	Conséquences	140
3.2.1.	Précipitation des protéines de la fraction 2	140
3.2.2.	Teneur en cuivre des fractions protéiques	142
4.	EFFETS DE LA DECONTAMINATION	142
	CONCLUSION GENERALE	147
	BIBLIOGRAPHIE	151

INTRODUCTION.

Parmi les nombreux types de pollution en milieu marin, les métaux lourds -ainsi appelés parce qu'ils peuvent être précipités de leurs sels solubles, à des fins analytiques, sous forme de sulfures insolubles- constituent une source de danger certain, aussi bien sur le plan écologique vis-à-vis des systèmes aquatiques, que sur la chaîne alimentaire (AUBERT et al., 1973 ; BITTEL, 1973 ; MARTIN et al., 1976).

Les études consacrées à ce problème ont mis à jour le rôle hautement toxique d'éléments tels que le mercure (JOHNSON, 1976 ; JOHNSON et al., 1979), le cadmium (QURESHI, 1979 ; TUCKER, 1980) et le plomb (VICENTE et al., 1976), en raison de leur accumulation chez certains organismes marins et de leur transmission à travers les échelons de la chaîne biologique (DONNIER, 1972 ; GEORGES, 1980 ; MARTIN, 1979).

Les résultats de ces travaux présentent d'autant plus d'intérêt que des problèmes de pollution du milieu marin ont un impact direct, du point de vue nutritionnel, sur la santé de l'homme consommateur des produits de la mer.

En fait, les connaissances actuelles sont surtout basées sur des recherches qui ont été menées à la suite de pollutions constatées, lorsque se manifestent des perturbations morphologiques ou physiologiques chez l'homme ou chez des espèces directement comestibles par l'homme : poissons, crustacés, mollusques (BOYDEN, 1974 ; MARTIN, 1979 ; MARTINEIC, 1980 ; METAYER et al., 1982 ; PEDEN, 1973). 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 sûr 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 à 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 (GOYER et al., 1972 ; UNDERWOOD, 1971) et de son importance en tant que métal polluant pour l'environnement de façon générale (BARBIER, 1976). A titre de comparaison avec cet élément, le fer qui existe à l'état de traces et possède une fonction biologique connue chez la plupart des êtres vivants (BOWEN, 1966 ; WILLIAMS, 1971) a également retenu notre attention.

Une telle étude pouvait être envisagée sous deux aspects :

- soit en prélevant des échantillons d'organismes évoluant dans un milieu supposé pollué, afin d'étudier leur physiologie et de déterminer les teneurs en métal dans leurs organes : cette méthode a été fréquemment adoptée jusqu'ici ;
- soit en reproduisant expérimentalement un milieu marin artificiel, puis en mettant dans ce milieu l'espèce animale étudiée en présence des métaux choisis 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'étrille (*Macropipus puber*), crabe comestible, en milieu marin-contaminé artificiellement.

Ces recherches ont tenté de préciser les répercussions qu'entraîne, au niveau des protéines de l'hémolymphe, un enrichissement du milieu, en métaux tels que le plomb et le fer. Cette étude est susceptible de

fournir des renseignements sur les mécanismes d'action de ces éléments en précisant s'il s'agit ou non d'une compétition qui s'instaurerait entre ces derniers et un autre métal nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme de ces animaux. Il s'agit du cuivre qui entre dans la constitution de l'hémocyanine, protéine majeure de l'hémolymphe ; cette cuproprotéine assure la fonction respiratoire chez les crustacés décapodes, groupe auquel appartient l'espèce étudiée.

Les recherches menées par PINTA et al. (1978) ont abouti à la mise au point d'un protocole expérimental permettant de mettre en évidence une fixation effective de plusieurs métaux (Pb, Fe, Cu, Zn), par une fraction des protéines sériques de *Macropipus puber*, par simple mise en contact de ces éléments avec du sérum.

La méthode de contamination en milieu marin artificiellement reproduit permet de vérifier si le phénomène de fixation, constaté lors de ces essais chimiques, se produit réellement chez les crustacés vivants.

Cette étude comprend cinq essais correspondant à la contamination de plusieurs lots de crabes, dans une eau de mer synthétique contenant des concentrations en plomb variant de 0,01 mg/l à 1 mg/l et une concentration de 0,7 mg/l en fer. Des échantillons d'hémolymphe sont prélevés sur les animaux, à des temps déterminés, avant et après contact avec le milieu expérimentalement contaminé, afin d'étudier la cinétique d'action de ces éléments. Les métaux sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique, d'une part dans le plasma, d'autre part sur la fraction protéique isolée par électrophorèse.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES.

CHAPITRE I

MATERIEL ET METHODES.

1. MATÉRIEL BIOLOGIQUE.

La littérature fournit peu de références sur des travaux concernant l'espèce *Macropipus puber* (étrille) alors que d'autres crabes comestibles comme le tourteau "*Cancer pagurus*", le crabe enragé "*Carcinus moenas*" ou l'araignée de mer "*Maia squinado*", ont fait l'objet de vifs intérêts (BUSSELEN, 1970 ; MARKL et al., 1979 ; ROCHU et al., 1979).

Cette préférence peut s'expliquer par la petite taille et la grande fragilité de ce crustacé, critères qui le rendent peu adapté aux conditions expérimentales des essais en laboratoire. D'autre part, n'entrant pas dans la catégorie établie des "gros crustacés" (AUFFRET, 1979) qui comprend la langouste, le tourteau, l'araignée, ce petit crabe présente moins d'intérêt au point de vue commercial. Néanmoins, il est fort apprécié des consommateurs de fruits de mer et recherché par les pêcheurs amateurs des côtes de Bretagne et de Normandie. De plus, sa pêche ne subissant aucune réglementation précise, une pollution accidentelle entraînerait des risques de contamination certains sur l'homme.

1.1. PROVENANCE ET CHOIX DES ANIMAUX.

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 précautions particulières. Leur provenance est, par conséquent, 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 expériences ont été menées sur des individus mâles uniquement, de façon à exclure d'emblée toutes les substances protéiques et glycoprotéiques impliquées dans le processus d'ovogenèse chez les femelles.

Macropipus puber, comme tous les crustacés, présente des changements périodiques de carapace ; l'intervalle de temps séparant deux mues consécutives est donc marqué par d'importantes variations des teneurs des différents constituants du sang. Dans un souci d'homogénéité des résultats, les spécimens ont été choisis au stade C₄ (état de repos physiologique).

1.2. DISPOSITIF EXPERIMENTAL.

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 environ 12 heures par jour. 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. Cette eau de mer artificielle a été analysée afin de comparer sa composition en éléments majeurs et en éléments traces étudiés avec celle d'une eau de mer recueillie sur le lieu de collecte des animaux (région de Roscoff) (tableau 1).

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

Dans ces conditions expérimentales, la durée de vie moyenne des animaux est d'environ dix semaines.

1.3. OBTENTION DU PLASMA.

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 marcheuses. Les

TABLEAU 1 - Composition de l'eau de mer en principaux éléments majeurs et en éléments traces étudiés.

Eléments Echantillons	Teneurs moyennes en éléments majeurs en mg/l (ppm)						Teneurs moyennes en éléments traces en mg/l (ppm)		
	Na	Cl	Mg	Ca	K	SO ₄	Pb	Fe	Cu
* Sels synthétiques HW WIMEX dissous dans de l'eau distillée (35 g/l).	9100	17300	1157	281	291	1900	≤0,0004 (1)	0,003 à 0,006	0,002 à 0,005
* Echantillons prélevés dans la Manche (Roscoff)	8940	17500	1206	408	370	2600	0,0004 à 0,001	0,003 à 0,008	0,002 à 0,006
** Eau de mer	10500	19350	1350	400	380	2710	0,00003	0,003	0,003

* Résultats de nos analyses.

** D'après GOLDBERG (1965), BERTINE (1972) et ROBERTSON (1972).

(1) Limite de détection du plomb en absorption atomique.

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 plasma et correspond à l'hémolymphe débarrassée des cellules sanguines. Quelques gouttes de plasma sont destinées à l'électrophorèse et le reste, destiné à l'analyse, est conservé à 4°C dans des tubes bouchés hermétiquement.

Le volume prélevé à chaque ponction correspond à environ 1 % du volume total d'hémolymphe chez l'étrille (LOCKWOOD, 1968).

2. MÉTAUX ÉTUDIÉS.

L'étude de l'action des métaux lourds sera abordée, ici, sous deux aspects :

- certains éléments peuvent être franchement toxiques pour des teneurs dans l'environnement extrêmement faibles et encore mal connues, tel est le cas du plomb ;
- d'autres éléments, comme le fer et le cuivre, peuvent avoir des effets néfastes au-dessus et en-dessous de leur concentration physiologique.

2.1. ELEMENT TOXIQUE : LE PLOMB.

Les teneurs moyennes du plomb dans l'eau de mer sont très basses, de l'ordre de 0,02 à 0,04 µg/l (GOLDBERG, 1965). On estime à 250000 tonnes par an la masse de plomb qui parvient aux océans à partir de l'atmosphère. A cette quantité s'ajoute une fraction de 100000 tonnes qui provient du lessivage des sols et des retombées atmosphériques dont une partie parvient à la mer. En 45 ans, le niveau du plomb dans les océans de l'hémisphère nord a quadruplé, passant de 0,015 à 0,07 µg/l (VICENTE, 1978).

Lessources : le plomb est actuellement considéré comme l'un des métaux lourds les plus toxiques, après le mercure, et l'on a constaté que sa concentration dans l'eau de mer a augmenté au cours de ces dernières années, à la suite de l'usage accru de certains pigments plombifères dans les peintures anticorrosives des coques de navires (BELLINGER, 1972 ;

CHAUVIN, 1963), ainsi que dans l'essence, sous forme de plomb tétraéthyle, comme antidétonnant. La combustion des carburants renfermant du plomb tétraéthyle et tétraméthyle produit des particules de ce métal qui passent dans l'atmosphère et contribuent ainsi à la contamination de la biosphère par l'intermédiaire du cycle biogéochimique du plomb.

A la suite de nombreuses études qui visent à évaluer les risques de contamination imputés à cette source de plomb, il apparaît que la pollution de l'environnement par cet élément n'atteint pas, à l'heure actuelle, un niveau suffisant pour mettre en danger les biocénoses terrestres (RAMADE, 1977).

En milieu marin, le problème se pose en d'autres termes : il existe actuellement de graves incertitudes quant à l'évaluation exacte des quantités de plomb d'origine terrigène qui parviennent à la mer. En effet, à côté de l'apport provenant de l'industrie automobile, il existe de nombreuses sources de pollution par ce métal provenant de rejets d'industries telles que l'imprimerie, la papeterie, la raffinerie du pétrole, la fabrication d'engrais et de colorants, etc. (MARTIN et al., 1976).

Ce sont ces diverses sources qui représentent un réel danger de pollution des zones côtières et des estuaires par le plomb, du fait du rejet direct de leurs déchets dans la mer.

Par ailleurs, il est nécessaire de considérer les égoûts qui peuvent contenir de fortes concentrations en métaux lourds. Ainsi, l'analyse des eaux usées de la région de Montréal, au cours de l'été 1972, a mis en évidence des teneurs en plomb variant de 0,005 mg/l à 0,460 mg/l (MARTIN et al., 1976).

Face à ces risques accrus de pollution par le plomb, les mesures imposées par la réglementation concernant le rejet des polluants métalliques s'avèrent tout à fait insuffisantes, voire inadaptées à l'évolution des technologies modernes. L'observation de ces faits montre, par ailleurs, que la violation de ces mesures est fréquente (QUENEUDEC, 1969).

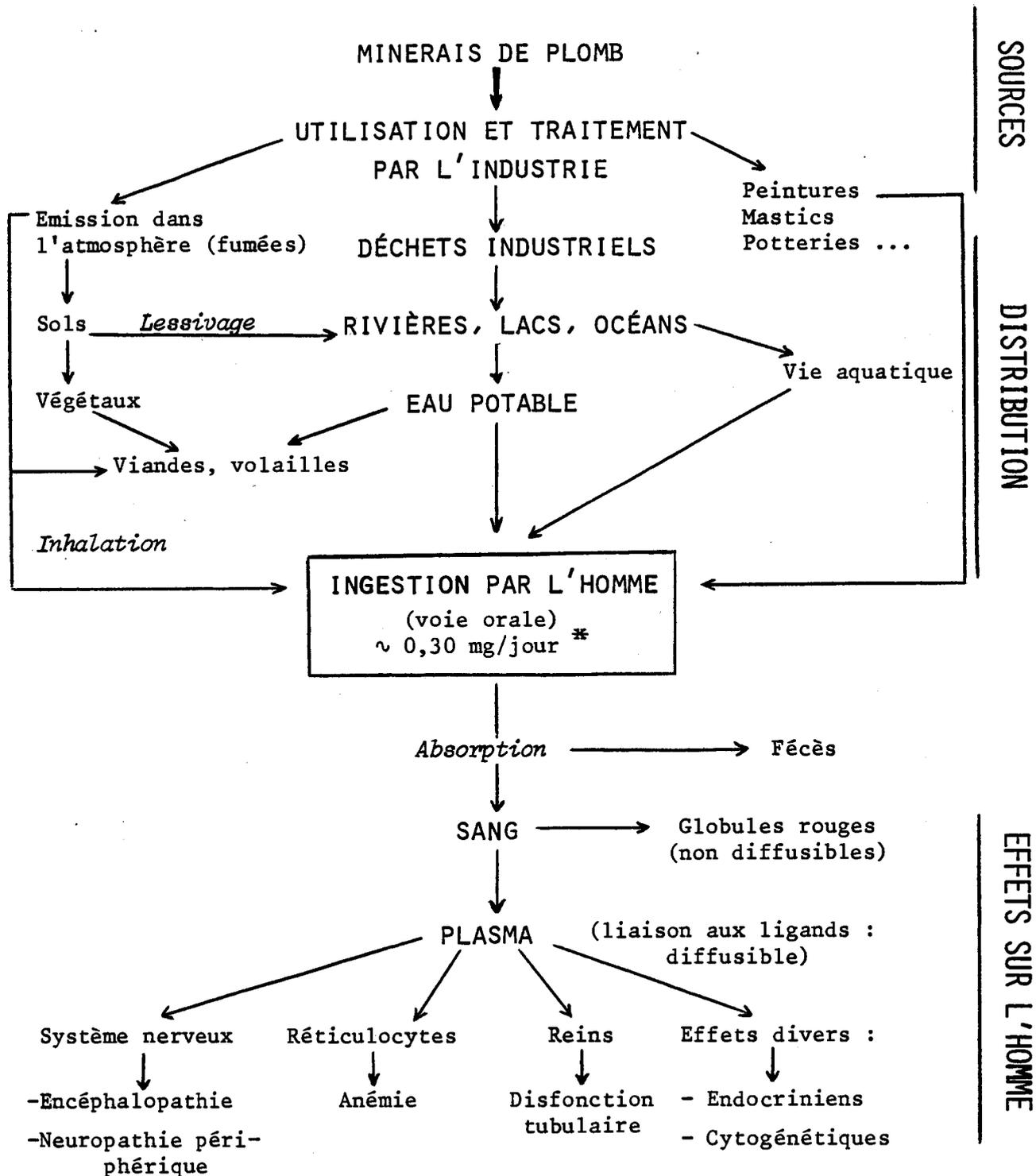


FIGURE 1 - Contamination de l'environnement par le plomb et effets toxiques sur l'homme (GOYER et al., 1972).

* Dose moyenne non pathologique.

C'est en raison de son rôle préoccupant dans les problèmes de pollution actuels que cet élément a été choisi comme centre d'intérêt de notre étude.

Chez l'homme, les effets d'une contamination par ce métal dus essentiellement à des intoxications professionnelles (saturnisme) sont bien connus (GOYER et al., 1972 ; UNDERWOOD, 1971).

La figure 1 résume les différentes voies de contamination par cet élément ainsi que les principaux effets sur la santé de l'homme.

Les atteintes se manifestent essentiellement à trois niveaux.

- Dans le système nerveux, les effets du plomb sont de nature aussi bien structurale que fonctionnelle ; ils concernent le cerveau, la moelle épinière ainsi que les nerfs sensitifs et moteurs. Au niveau du système nerveux central, la pathologie est caractérisée par de graves encéphalopathies alors que les quantités de plomb sont relativement faibles, ce qui suggère que le tissu nerveux est très sensible aux effets toxiques du plomb ;
- Au niveau du système hématopoiétique, l'action du plomb se traduit par une diminution de la synthèse de l'hème ainsi qu'une augmentation du taux de destruction des globules rouges, conduisant à une anémie.

Certaines étapes de la synthèse de l'hème (composante de l'hémoglobine intervenant dans le transport de l'oxygène) ont lieu dans les mitochondries.

L'action du plomb au cours de ce processus de synthèse est connue à deux niveaux :

- . cette action peut être détectée par la mesure de la d-amino-lévulinique acide déshydrogénase. Un taux de 70 à 80 µg de plomb dans 100 ml de sang inhibe cette enzyme à près de 98 %. Il en résulte une augmentation d'acide d-amino-lévulinique dans le sérum et dans l'urine ;
 - . à l'étape finale de la synthèse de l'hème, le plomb diminue l'incorporation du fer dans la molécule protéique. D'après les connaissances actuelles résultant d'intoxications expérimentales, il semble que le plomb agisse sur l'activité de la ferro-lyase, enzyme impliquée dans la réaction d'incorporation des molécules de fer dans l'hème.
- au niveau du système rénal : du fait de leur fonction excrétoire, les reins sont impliqués dans le métabolisme de cet élément. Il est compréhensible qu'ils soient l'un des sièges des effets toxiques du métal.

Ces effets se traduisent par une diminution de la réabsorption des petites molécules organiques (acides aminés, glucose, acide urique ...) qui résulte d'une diminution de l'énergie nécessaire au transport de ces substances. On pense que cet effet reflète une action directe du métal sur les mitochondries.

La réponse caractéristique des cellules rénales humaines et animales exposées au plomb expérimentalement est la formation intranucléaire de complexes plomb-protéines dans lesquels le plomb est lié sous une forme non diffusible. C'est au niveau de ces complexes que l'on retrouve la plupart du plomb dans les cellules tubulaires du rein lorsque la dose contaminante est augmentée. Certains auteurs émettent l'hypothèse selon laquelle ce stockage, sous forme non-diffusible, permet aux reins d'excréter d'importantes quantités de plomb.

Chez les organismes marins, l'action du plomb est moins bien connue, chaque espèce réagissant à une concentration différente, avec une variation significative en fonction du stade de développement de l'individu ; ceci est surtout marqué chez les espèces comme les crustacés qui possèdent un cycle de mue dont le passage d'un stade à un autre s'accompagne d'importantes variations physiologiques (PASSANO, 1960).

Les concentrations choisies au cours de nos essais tiennent compte :

- des résultats de AUBERT et al. (1975) qui observent chez la moule (*Mytilus edulis*) un phénomène de concentration du plomb pour une teneur de 1 mg/l et un seuil de toxicité voisin de 16 mg/l ;
- des expériences de contamination réalisées par VINCENTE et al. (1965), chez des mollusques aussi différents que la coque (Lamellibranche) et l'aplysie (gastéropode Opisthobranche), qui montrent que ces animaux, placés dans une eau contaminée à 3 mg/l, sont capables de concentrer le plomb dans leur organisme avec un facteur de 28 par rapport au milieu extérieur. Cependant, ces auteurs notent que les témoins avaient déjà une concentration de 1,65 ppm, ce qui peut s'expliquer soit par le fait que les aplysies possèdent des facteurs de concentration élevés, soit que le milieu dans lequel elles vivaient était déjà pollué d'une façon importante.

Nous avons déterminé nos concentrations de façon à nous situer théoriquement en-dessous du seuil de mortalité constaté par les premiers auteurs, et de façon à nous placer dans des conditions expérimentales proches de celles de VICENTE et al. qui ont utilisé la même méthode que nous : essai de contamination en laboratoire et dosage du plomb par absorption atomique. L'échelle de concentrations expérimentales choisies

(0,01 à 1 mg/l en plomb), bien que théorique dans le cadre de cette étude, correspond, au moins pour les trois concentrations inférieures, à des teneurs contaminantes qui peuvent être atteintes dans la réalité, surtout lorsqu'il s'agit de pollutions accidentelles massives. (RAMADE, 1977).

2.2. ELEMENTS D'INTERET PHYSIOLOGIQUE : LE FER ET LE CUIVRE.

Ces deux métaux entrent dans la constitution de composés biochimiquement indispensables à l'organisme : enzymes, pigments respiratoires. Du fait de leur appartenance à la classe des métaux de transition ($\text{Fe}^{2+/3+}$, $\text{Cu}^{+/2+}$, $\text{Mn}^{2+/3+}$, $\text{Co}^{2+/3+}$), ils interviennent fréquemment lors des réactions d'oxydo-réduction dans les systèmes biologiques.

2.2.1. Le fer.

C'est l'un des métaux les plus répandus dans les organismes vivants (UNDERWOOD, 1971). Il intervient dans des processus enzymatiques comme catalyseur ; c'est le cas pour la plupart des enzymes de la famille des oxygénases. Il peut également être un constituant des molécules enzymatiques mêmes, et plus particulièrement de celles intervenant dans les transferts d'oxygène, telle que la cytochrome oxydase.

L'état d'oxydation du fer dépend du type de ligand auquel il est attaché : bivalent pour la myoglobine, trivalent pour les catalases ou sous forme réduite et oxydée dans le cas des cytochromes.

Dans le règne animal, cet élément est un constituant de nombreux pigments respiratoires, parmi lesquels l'hémoglobine chez les vertébrés. Le rôle du fer dans le transport de l'oxygène par l'hémoglobine est essentiel chez l'homme.

Chez les organismes marins, la présence du fer a été détectée chez de nombreuses espèces (GOLDBERG, 1957), au niveau de certaines réactions enzymatiques ou dans les processus respiratoires.

Les expériences menées par GEORGES (1980) sur la moule (Mollusque) mettent en évidence une accumulation du fer pour des teneurs variant entre 0,007 et 0,5 mg/l dans une eau contaminée artificiellement. Cette accumulation est linéaire dans le temps et proportionnelle à la teneur

dans l'eau. Cependant, le facteur de concentration est trente fois plus faible que pour le plomb.

Une étude réalisée chez le crabe *Cancer irroratus*, par MARTIN (1974), révèle que le fer, bien que présent à de très faibles teneurs dans l'eau de mer, en moyenne 3,5 µg/l (GOLDBERG, 1965), est concentré environ 5000 fois dans l'organisme de cet animal.

Chez l'espèce *Macropipus puber* qui fait l'objet de notre étude, GHIDALIA et al. (1972), utilisant des techniques autoradiographiques, ont montré que certaines protéines sériques pouvaient fixer du fer.

Le fer est donc un métal qui, potentiellement, peut être accumulé par tous les organismes vivants. Les crabes, en milieu marin en particulier, semblent capables d'en accumuler à des taux relativement élevés.

Nous avons consacré un essai à l'étude de l'action d'un milieu enrichi en fer sur le comportement des protéines de *Macropipus puber* vis-à-vis de ce métal.

Nous devons cependant préciser que la concentration étudiée, assez élevée, a été choisie en fonction des concentrations retenues pour le plomb, notre but étant de comparer le comportement des protéines vis-à-vis de ces deux métaux pour une même concentration dans le milieu.

2.2.2. Le cuivre.

Bien avant d'avoir été reconnu comme oligo-élément essentiel chez les mammifères et les oiseaux, la présence de cet élément a été mise en évidence dans le sang de nombreux gastropodes, arthropodes et de certains organismes marins (UNDERWOOD, 1971) ; chez ces derniers, le cuivre a été retrouvé, en majorité, au niveau de l'hémocyanine, pigment respiratoire des crustacés dont la structure n'a pas encore été déterminée.

Actuellement, il est unanimement reconnu que l'hémocyanine est une cu-proprotéine. Toutefois, dans l'hémolymphe du crabe, la caractérisation de cette protéine par détection du cuivre reste circonspecte (GHIDALIA et al., 1971) : d'après l'étude électrophorétique et immunochimique du sérum de *Macropipus puber*, réalisée par GHIDALIA (1969), l'existence d'au moins une protéine sérique autre que l'hémocyanine, contenant également du cuivre, n'est pas exclue. L'étude quantitative et électro-

phorétique effectuée par MARTIN et al. (1977) sur l'hémolymphe de *Carcinus moenas*, montre, par contre, que tout le cuivre dosé au niveau des protéines est fixé sur les fractions correspondant à l'hémocyanine. De même, la valence du cuivre dans l'hémocyanine est, à l'heure actuelle, grandement controversée. En effet, s'il est communément admis que le métal est cuivreux dans le pigment réduit, les opinions divergent lorsqu'il est question de son état dans l'oxyhémocyanine. Pour certains auteurs le cuivre hémocyanique ne changerait pas de valence au contact de l'oxygène de l'air et resterait à l'état cuivreux. Le phénomène serait analogue à celui déjà constaté pour le fer, dans le cas d'un autre pigment respiratoire : l'hémoglobine. Dans les deux cas, il y aurait oxygénation et non pas oxydation du métal lors des processus respiratoires. Pour d'autres auteurs, par contre, la moitié des ions cuivreux présents dans l'hémocyanine réduite passerait à l'état cuivrique dans l'oxyhémocyanine, au sein de laquelle coexisteraient les deux états de valence de cet élément (KLOTZ et al., 1955).

Les connaissances sur la présence et le rôle du cuivre dans l'hémocyanine restant encore entâchée d'imprécisions, notre but se limitera à déterminer quantitativement les concentrations de cet élément dans le plasma de *Macropipus puber* et d'étudier l'influence de la contamination des animaux par le plomb ou le fer sur ces concentrations. En suivant l'évolution du taux de cuivre protéique en fonction du temps de contact avec le milieu contaminé, notre objectif est de savoir, dans le cas où les protéines plasmatiques fixent le plomb ou le fer, si une compétition s'instaure entre l'un de ces éléments et le cuivre protéique.

3. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL.

Après un séjour dans un bac d'eau de mer contaminée par du nitrate de plomb $Pb(NO_3)_2$, ou par du sulfate de fer ferreux $Fe(SO_4)$, solutions de sels stables et solubles dans l'eau de mer, les crabes sont ponctionnés aux temps suivants :

- 1 jour avant contamination du milieu (J-1), 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, J+15 après contamination du milieu.

Le tableau 2 indique les concentrations en plomb et en fer étudiées ainsi que le protocole opératoire correspondant aux différents essais. Les analyses effectuées avant et après contact des crustacés avec le milieu contaminé consistent à déterminer :

- la concentration en protéines plasmatiques totales,
- la teneur en métal (Pb, Fe, Cu) dans le plasma,
- la teneur en métal (Pb, Fe, Cu) au niveau des protéines plasmatiques isolées après électrophorèse.

Ces analyses nécessitent la mise en oeuvre d'une méthode de dosage par spectrophotométrie (protéines) et de deux méthodes microanalytiques : l'électrophorèse sur bande d'acétate et la spectrométrie d'absorption atomique sans flamme (Pb, Fe, Cu).

4. TECHNIQUES D'ANALYSE.

4.1. DOSAGE DES PROTÉINES PLASMATIQUES.

La technique employée pour le dosage des protéines plasmatiques totales est la méthode colorimétrique classique du "Biuret" qui offre de nombreux avantages pratiques : simple, rapide et peu onéreuse, elle nécessite de très faibles quantités d'échantillons (30 μ l de plasma par dosage).

Introduite par KINGSLEY en 1939, elle a été modifiée et adaptée depuis par de nombreux utilisateurs parmi lesquels : GORNALL et al. (1949), HENRY et al. (1957), PETERS (1968), qui sont parvenus à la mise au point d'une méthode standard de détermination des protéines du sang humain. Bien qu'il existe une incertitude sur le choix de l'étalon de référence, la technique du Biuret a été retenue dans ce travail pour le

TABLEAU 2 - Calendrier des essais.

ESSAI	1	2	3	4	5
Concentrations étudiées (mg Pb ou Fe / l eau de mer)	<div style="border: 1px solid black; padding: 2px; display: inline-block;"> 0,01 0,1 0,7 1 </div>				0,7
	Plomb				Fer
Temps de contact des animaux avec l'eau contaminée (jours)	Lot A : 7 B : 2	7	Lot C : 15 D : 2	3	lot E : 2 lot F : 4
Jours de prélèvement de l'hémolymphe	J-1, J+1 J+2 J+4 J+7	J-1, J+1 J+2 J+4 J+7	J-1, J+1 J+2 J+4 J+7 J+15	J-1, J+1 J+2 J+3	J-1, J+1 J+2 J+4 J+7 J+15
Eléments dosés dans le plas- ma et au niveau des protéi- nes	plomb et cuivre	plomb	plomb et cuivre	plomb	fer et cuivre

dosage des protéines des crabes, faute d'une technique mieux adaptée aux protéines de crustacés.

4.1.1. Principe de la réaction du Biuret.

Le principe de la réaction est le suivant : les fonctions $-\text{CONH}_2$, $-\text{CH}_2\text{NH}_2$, $-\text{C}(\text{NH})(\text{NH}_2)$ ou $-\text{C}_3\text{NH}_2$, des protéines réagissent en présence du réactif de Biuret (solution de NaOH et de $\text{Cu}(\text{SO}_4)_2$) pour donner une coloration bleue-violette dont l'intensité est mesurable au spectrophotomètre, à la longueur d'onde 540 nm.

Cette méthode est généralement utilisée pour le dosage des albumines et globulines humaines. Les concentrations en protéines sont déterminées par rapport à une droite établie grâce à un étalon de référence.

4.1.2. Mode opératoire.

Dans la pratique, 30 μl de plasma sont dilués au centième dans de l'eau distillée, puis additionnés de 2 ml de réactif du Biuret d'origine commerciale. La solution est introduite dans une cuve en quartz placée sur le chemin du faisceau incident d'un spectrophotomètre.

L'étalon de référence utilisé est une solution d'albumine synthétique à une concentration donnée. Le choix de cet étalon est motivé par les raisons suivantes :

- BERNHARD (1951), dans ses travaux concernant le problème d'étalonnage de la méthode du Biuret, considère l'albumine comme un étalon fiable par ses qualités de pureté et de stabilité dans le temps. Ce dernier critère est important car il permet l'utilisation d'une même solution étalon pour l'ensemble des échantillons ;
- ROCHE et al. (1934) ont montré que la composition en acides aminés de l'hémocyanine, protéine majeure de l'hémolymphe des crustacés, est très proche de celle de l'albumine humaine.

La technique colorimétrique du Biuret est d'une grande fiabilité ; ses utilisateurs indiquent une erreur de précision d'environ 2 % en ce qui concerne les protéines du sang humain (BIO-MERIEUX, 1981). Appliquée au dosage des protéines plasmatiques de crustacés, la précision est du

même ordre ; cependant, cette méthode n'a pas été utilisée dans le but de faire une analyse quantitative des plasmas mais uniquement pour faire des comparaisons de teneurs en protéines entre les crabes.

4.2. SEPARATION DES PROTEINES PLASMATIQUES.

Après centrifugation de l'hémolymphe, une aliquote du plasma obtenu est immédiatement soumise à une électrophorèse pour isoler les protéines.

Parmi les nombreuses techniques dérivées du principe de l'électrophorèse ou de la chromatographie qui sont utilisées pour la séparation des protéines (LEGETT-BAILEY, 1962), l'électrophorèse de zone est sans doute la plus adaptée à cette étude car elle offre la possibilité de se combiner parfaitement avec l'absorption atomique employée, ici, pour le dosage des métaux en trace.

4.2.1. Principe de l'électrophorèse.

Il est basé sur la propriété de mobilité des molécules chargées, placées dans un champs électrique.

Les protéines sont composées d'acides aminés dont les chaînes latérales possèdent des fonctions ionisables: COOH , NH_2 , $=\text{NH}$, $-\text{NH}-$, SH , OH . Placées dans une solution tampon, à un pH donné, ces protéines acquièrent une charge globale nette qui leur permet de se déplacer vers l'un des pôles établi par un champ de potentiel. Cette migration est fonction : de la composition en acides aminés, du poids moléculaire, de la structure, de la forme de la protéine (CHIN, 1970).

Dans le choix des conditions, deux paramètres jouent un rôle primordial :

- le tampon dont la nature, le pH et la force ionique déterminent la mobilité électrophorétique,
- le support qui influence la migration en tenant compte des caractéristiques de la protéine. Les supports généralement utilisés sont groupés en deux catégories (PASTEWKA et al., 1966) :
 - les gels de polyacrilamide, d'amidon ou de sephadex, sont des supports dits sélectifs car leur structure les rend discrimi-

nants vis-à-vis de la taille, du poids moléculaire et de la forme de la protéine ;

- le gel d'agarose et l'acétate de cellulose qui présentent une structure lâche n'entravant pas la libre circulation de la protéine ; sur ce type de support dit non filtrant, la migration des molécules ne s'effectue qu'en fonction de leur charge.

Fréquemment utilisée en sérologie pour l'étude des protéines du sang humain (albumines, globulines, isoenzymes) et développée depuis une dizaine d'années pour l'étude des protéines de l'hémolymphe des crustacés (CECCALDI et al., 1976 ; FINE et al., 1975 ; GHIDALIA et al., 1971), l'électrophorèse sur bande d'acétate, longuement décrite par de nombreux auteurs (MOODY et al., 1975 ; MOSS, 1979 ; WILKINSON, 1970), a été retenue pour cette étude. Outre sa rapidité, cette technique offre l'avantage de remplir les conditions de travail compatibles avec le dosage des métaux en trace :

- les opérations simples et peu nombreuses qu'elle comporte, permettent d'éviter les risques éventuels de contamination de l'échantillon lors de manipulations répétées ;
- l'acétate de cellulose, matière organique, peut se décomposer en présence de l'acide nitrique qui est employé en absorption atomique comme solvant pour la solubilisation des métaux. L'utilisation de bandes d'acétate de cellulose Cellogel (17 x 2,5 cm), de provenance commerciale, offre la possibilité de contrôler la pureté du matériel en éléments traces (Pb, Fe, Cu), ce qui n'est pas le cas avec les gels fabriqués par nos laboratoires ;
- cette technique nécessite de faibles quantités d'échantillons, avantage appréciable dans l'étude d'une espèce comme l'étrille chez laquelle le prélèvement répété d'une quantité d'hémolymphe supérieure à 0,2 ml risquerait d'entraîner une perturbation du milieu intérieur.

4.2.2. Mode opératoire.

Les bandes d'acétate de cellulose conservées à 4°C, dans une solution de méthanol à 40 %, sont séchées avec du papier filtre et immergées 15 minutes dans un tampon phosphate monopotassique à pH 6,4.

Ces bandes sont ensuite positionnées par série de 6, sur un portoir dont les bords trempent de part et d'autre dans les réservoirs remplis de tampon d'une cuve à électrophorèse SEBIA, modèle S 60 N.

Le tampon utilisé permet d'isoler l'ensemble des protéines plasmatiques en évitant la multiplication du nombre de fractions électrophorétiques correspondant à une seule protéine, l'objectif de départ étant de doser les métaux au niveau de la totalité des protéines.

Composition du tampon : 500 ml de phosphate monopotassique $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,1 M sont additionnés d'une quantité convenable de soude NaOH 1 M (11,6 ml) pour obtenir un pH à 6,4 et complétés à 1000 ml.

La quantité de sérum déposée au départ par application unique est de $3\ \mu\text{l}$ (environ 0,18 mg de protéines). La migration s'effectue dans les conditions suivantes :

- différence de potentiel : 180 V (10 V/cm)
- intensité de courant : 25 mA
- durée de migration : 45 mn
- température ambiante.

Chaque électrophorèse correspond à l'analyse d'un échantillon de plasma et comprend six bandes :

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

L'amidoschwarz (Amido Black 10 B) est fréquemment employé pour la révélation des protéines sur support d'acétate (MAURER, 1971). Il est obtenu en faisant dissoudre 0,5 g d'Amido Black dans 100 ml d'acide acétique glacial dilué à 10 % dans du méthanol. Ce colorant réagit avec les groupes basiques des protéines pour donner une coloration bleu-violette très rapidement (3 à 5 minutes). Ce gain de temps est précieux car, pendant cette opération, les protéines se trouvant sur les bandes à analyser peuvent terminer leur migration ; une coloration trop longue risque donc de fausser leur localisation.

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 $1\ \text{cm}^2$. 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 %. C'est à partir de cette solution que se fait le dosage du plomb, du fer et du cuivre protéique.

Les électrophorogrammes colorés sont immergés dans un bain de colorant pour éliminer l'excès de colorant, séchés, puis transparisés dans les conditions suivantes :

- décoloration : 20 minutes dans une solution de 500 ml méthanol + 100 ml acide acétique + 400 ml eau distillée ;
- déshydratation : une minute dans du méthanol pur ;
- transparisation : 5 minutes dans une solution de 75 ml méthanol + 20 ml acide acétique + 5 ml diacétone-alcool.

Ces électrophorogrammes sont conservés comme témoin de migration des protéines de chaque plasma analysé. Ils seront également désignés sous le nom de "protéinogrammes".

4.3. DOSAGE DES METAUX.

4.3.1. Principe du dosage.

La partie analytique de cette étude consiste à mettre au point une méthode de microanalyse sur de très faibles quantités d'échantillons de nature biologique et de chercher les conditions optimales de dosage du plomb, du fer et du cuivre, dans le plasma et dans les fractions protéiques solubilisées (TRAN et al., 1983).

La détermination des éléments traces dans les milieux biologiques fait appel fréquemment à la spectrométrie d'absorption atomique électrothermique, en raison de ses principales caractéristiques : sensibilité et précision (FUKAI et al., 1978 ; FUKAI et al., 1980 ; ROUSSELET, 1979). De plus, la technologie moderne offre à notre usage des appareillages relativement simples à manipuler et capables, néanmoins, de hautes performances dans le domaine analytique.

La spectrométrie d'absorption atomique est une technique d'analyse physique s'appuyant sur le principe d'absorption atomique qui est une propriété physico-chimique spécifique de chacun des éléments.

Principe de l'absorption atomique.

Le principe d'absorption est lié à celui d'émission : il s'appuie sur la loi émise par KIRCHOFF, en 1859, selon laquelle tout corps chimique à l'état d'atome est susceptible d'absorber les radiations qu'il est capable d'émettre dans des conditions déterminées.

Lorsqu'un atome excité passe d'un niveau d'énergie E_h à un niveau inférieur E_b , émettant une radiation spectrale de fréquence ν caractéristique de l'élément, la variation d'énergie $E_h - E_b$ est retrouvée sous forme d'un quantum d'énergie rayonnante $h\nu$ (figure 2).

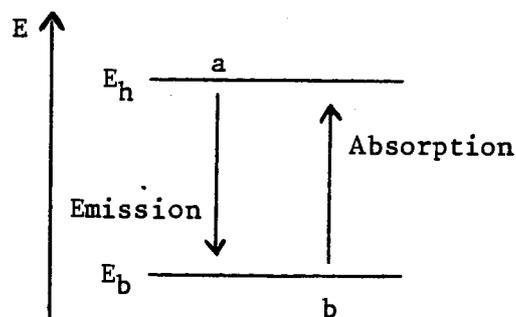


FIGURE 2 - Emission-Absorption.

- a : Emission d'une raie de fréquence $\nu = \frac{E_h - E_b}{h}$
 (loi de Bohr).
 b : Absorption de la même raie.
 h : Constante de Planck.

Application à la spectrométrie d'absorption atomique.

Lorsqu'un flux de photons monochromatiques d'intensité I_0 traverse un milieu absorbant de longueur l , constitué par une population d'atomes produit par l'échantillon, ce faisceau en émerge avec une intensité I telle que

$$I = I_0 e^{-klN_0 \lambda}$$

k : coefficient d'absorption atomique

N_0 : nombre d'atomes présents à l'état fondamental

λ : longueur d'onde caractéristique de l'élément.

- si l'on considère que la population N d'atomes à l'état libre se trouve pratiquement en totalité sous forme d'atome à l'état fondamental, c'est-à-dire $N = N_0$,
- si la concentration C de l'élément se traduit par $C = k'N$.

Il en résulte que l'absorbance $A = \log I_0/I = K.C.l.$.

D'après cette relation, la concentration C est proportionnelle à l'absorbance A ; en fait, il n'y a linéarité entre A et C que dans un domaine limité de concentrations.

La figure 3 montre le schéma théorique d'un appareil d'analyse par absorption atomique.

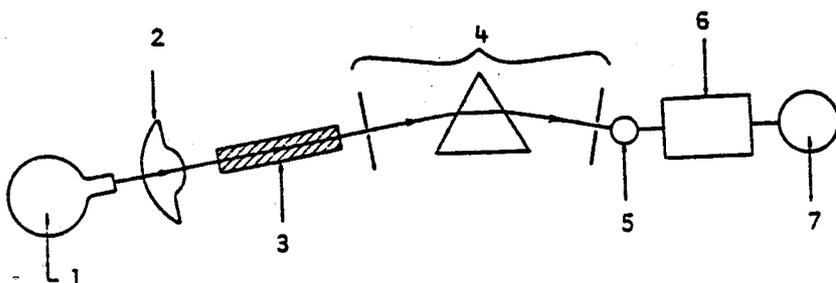


FIGURE 3 - Schéma de principe d'un appareil d'absorption atomique.
 1 - Source d'émission ; 2 - modulateur ; 3 - source d'atomisation ; 4 - monochromateur ; 5 - P.M. ;
 6 - amplificateur ; 7 - récepteur.

Appareillage.

Le spectrophotomètre employé est de type monofaisceau (Perkin-Elmer, modèle 400), doté d'un système de correction de fond permettant de corriger les absorptions non spécifiques. La source de photons est une lampe à cathode creuse qui a l'avantage d'émettre un flux lumineux, d'intensité constante dans le temps, et un spectre de raies fines (FULLER, 1977). L'atomisation se fait dans un four en graphite, chauffé par effet Joule. Le four utilisé (Perkin-Elmer, modèle HGA 500) est muni d'un système de commande informatisé qui permet de contrôler les paramètres thermiques (température, montée, durée) lors des étapes de prétraitement thermique qui précèdent l'atomisation.

Le résultat est donné sous forme de pic d'absorbance, par un récepteur de mesure. L'absorption atomique étant une méthode comparative, les concentrations réelles dans l'échantillon sont déterminées par rapport à une gamme étalon établie à partir d'une solution de concentration connue en élément dosé.

Procédure d'analyse.

Une prise d'essai de 20 μl est introduite dans le four avec une micropipette. L'analyse est faite dans un environnement inerte d'argon pour éviter la formation d'oxyde et les combustions aux températures élevées. Le programme de chauffage comporte les étapes suivantes :

- séchage : l'échantillon est désolvaté ; le solvant est éliminé par évaporation, à une température voisine de 10°C .
- décomposition : l'élément est décomposé de son sel en présence d'un gaz inerte. Au cours de cette étape, les anions formés sont chassés, la matière organique détruite, la matrice est décomposée thermiquement ;
- atomisation : par chauffage électrothermique, le métal est dissocié à l'état d'atomes neutres qui absorbent le faisceau cathodique. Le signal est enregistré par le récepteur de mesure et se traduit par un pic d'absorbance ;
- nettoyage : ce cycle effectué à haute température (2200°C) est destiné à éviter l'effet de mémoire avant l'introduction de l'échantillon suivant.

Le deuxième cycle est le plus délicat car il peut donner lieu à des pertes s'il est conduit à température trop élevée, en particulier en présence de chlorures, de composés organiques ou de métaux volatils.

4.3.2. Application aux échantillons étudiés.

Définition du problème analytique.

La détermination du plomb, du fer et du cuivre, dans les fractions protéiques solubilisées et dans le plasma, revient à doser ces métaux à des teneurs variant de quelques ng/ml à quelques dizaines de $\mu\text{g/ml}$, respectivement :

- dans un milieu organique chargé en sels,
- et dans une solution acide concentrée contenant de la matière organique décomposée (acétate de cellulose).

La spectrométrie d'absorption atomique électrothermique permet, à la fois, de détecter ces métaux à des concentrations de l'ordre du ppb

(partie par billion), de résoudre les problèmes liés à la complexité de leur matrice et de travailler sur de très faibles quantités d'échantillons.

Problèmes généraux liés au dosage des éléments traces par absorption atomique électrothermique.

En matière d'analyse d'ultratraces par absorption atomique en fours, les causes d'erreurs prépondérantes proviennent des risques de contamination à toutes les étapes des opérations, viennent ensuite les absorptions non spécifiques, souvent considérables vis-à-vis du signal spécifique, puis les éventuelles interférences chimiques.

Contamination.

La détermination des éléments traces au four se fait sur des prises d'essai "microchimiques" (20 μ l), si bien que les quantités absolues d'éléments dosés sont de l'ordre du picogramme (10^{-12} g). Ces teneurs contaminent fréquemment l'atmosphère, notamment en ce qui concerne les éléments étudiés : plomb, fer et cuivre, ce qui induit des erreurs par excès. Des précautions rigoureuses doivent être prises pour éviter tout risque de contamination. PINTA et al. (1979) préconisent des mesures multiples, à cet effet :

- manipulations dans des locaux dont l'atmosphère est à empoussiérage contrôlé,
- utilisation de matériel de grande propreté et de réactifs spécialement purifiés : l'acide nitrique est de qualité "suprapur" Merck et le chlorure de sodium de qualité "specpur" Johnson Matthey,
- contrôle de la pureté par des témoins : blanc "four vide", blanc "milieu HNO_3 10 %", blanc "matrice NaCl", blanc "support acétate".

Absorption non spécifique.

La mesure d'absorption enregistrée doit être spécifique de l'élément dosé. Dans les atomiseurs électrothermiques, il n'est pas rare que l'absorption spécifique ne représente qu'une faible partie de l'absorption totale, notamment dans le cas de milieux très complexes qui conduisent à des interactions sur l'élément dosé (CZOBIK et al., 1974 ; RIANDEY, 1979). La partie non spécifique de l'absorption se compose :

- principalement d'une absorption parasite résultant de particules non dissociées et conduisant à une augmentation dans tout le spectre,

- parfois d'une absorption moléculaire limitée dans le spectre et résultant de composés stables dans les conditions d'atomisation données. Elle est liée à la composition de la matrice à analyser et aux différentes réactions chimiques qui conduisent à la formation des corps chimiques difficiles à dissocier.

Ces deux types d'absorptions non spécifiques, parfois difficiles à distinguer dans la pratique, constituent, avec les contaminations accidentelles, des sources prépondérantes d'erreur dans l'analyse.

Nous sommes parvenus à maîtriser ces causes d'erreur en combinant les trois méthodes suivantes :

- mesure de la densité optique avec et sans l'aide du système de correction de fond constitué par une lampe au deutérium destinée à mesurer les absorptions non spécifiques pour les éléments dont les raies sont situées dans le domaine de longueur d'onde de cette lampe, autrement dit 190 à 325 nm. Par un montage électronique approprié, le signal dû à l'élément est mesuré, exempt de toute absorption non spécifique ;
- mesure à la longueur d'onde de l'élément à partir d'une matrice synthétique exempte de l'élément à doser ;
- mesure de l'absorption non spécifique à une longueur d'onde correspondant à une raie non absorbable de l'élément (cas du plomb).

Problèmes particuliers liés à l'analyse du plasma et des fractions protéiques solubilisées.

Les problèmes posés par l'analyse de nos échantillons sont essentiellement dus à la complexité de leurs matrices.

En matière d'absorption atomique, les perturbations causées par les effets d'un milieu complexe sur l'élément dosé sont appelées "effets de matrice". Cette action est généralement une source de fortes absorptions non spécifiques qui se traduisent par une erreur en excès sur les pics d'absorbance.

Dans les conditions habituelles de dosage, le système de correction de fond est systématiquement utilisé. Cependant, dans certains cas, ce système est inefficace vis-à-vis d'absorptions non spécifiques trop fortes, lorsque l'absorbance de ces dernières dépasse 0,43. Pour résoudre

dre ce problème, nous avons été amenés à chercher une solution adaptée à chaque type de matrice, en intervenant sur les différents paramètres, lors de la programmation thermique.

4.3.3. Programmation thermique pour le dosage du plomb, du fer et du cuivre.

La recherche des conditions optimales de dosage : sensibilité, précision et exactitude, est fonction de la nature des échantillons et des caractéristiques chimiques de leur matrice. Elle dépend donc de chaque cas.

Nous appuyant sur des méthodes déjà étudiées pour la détermination du plomb (BELCHER, 1972 ; BOITEAU, 1978 ; NORVAL, 1972), du fer (MACHIROUX, 1976 ; SCHRAMMEL, 1973) et du cuivre (GARDINER, 1961 ; GLENN, 1971), dans l'eau de mer ou dans les milieux biologiques (ROBINSON, 1974), nous avons établi une programmation thermique adaptée au dosage de chacun de ces métaux dans le plasma et dans les fractions protéiques solubilisées.

Recherche des conditions optimales de programmation thermique.

Le cycle de séchage se fait dans des conditions pratiquement identiques pour tous les échantillons.

Par contre, les températures et la durée des cycles suivants (décomposition et atomisation) nécessitent une mise au point approfondie afin d'obtenir une atomisation maximale, spécifique de l'élément.

Nous avons utilisé la méthode de programmation variable étudiée par PINTA et RIANDEY (1975) qui permet d'établir les doubles courbes de prétraitement thermique-atomisation. On fixe la température d'atomisation à une valeur très élevée (2500°C par exemple), puis on cherche la valeur maximale de température de décomposition qui donne la plus forte absorption. En conservant cette température, on fait alors varier la température d'atomisation en recherchant toujours la valeur d'absorption la plus élevée. On obtient respectivement la courbe de prétraitement thermique et la courbe d'atomisation de l'élément.

Pour la première, le point important est la température maximale de

décomposition (sans perdre de l'élément dosé) ; dans la pratique, elle correspond à la dernière mesure après laquelle l'absorbance commence à décroître.

Pour la seconde courbe, c'est la température optimale d'atomisation (qui confère la plus forte absorbance) qui sera retenue.

La figure 4 représente les deux courbes de décomposition et d'atomisation en faisant les mesures point par point, sur une prise d'essai de 20 μ l de solution étalon à 0,02 μ g/ml en plomb, en milieu HNO_3 5 %.

La gamme étalon établie avec ce programme thermique montre que le domaine analytique varie de 0,005 μ g/ml à 0,05 μ g/ml (figure 5).

Les programmes thermiques mis au point pour chacun des trois éléments étudiés (plomb, fer et cuivre), ainsi que les domaines analytiques, sont indiqués dans le tableau 3.

Remarque : le cycle de refroidissement permet simplement d'obtenir un tracé graphique complet du signal d'absorbance après l'apparition du pic d'atomisation.

La sensibilité est améliorée d'environ deux à trois 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.

Application.

1°) Les programmes thermiques en milieu nitrique ont été établis pour l'analyse des fractions protéiques solubilisées.

Rappelons que ces dernières sont obtenus après séparation électrophorétique des protéines plasmatiques qui sont mises en solution avec leur support d'acétate de cellulose dans un volume de 1 ml d'acide nitrique concentré. C'est à partir de ce milieu que se fait le dosage des métaux.

L'étape finale de mise en solution doit faire l'objet de précautions particulières afin d'éviter tout risque de contaminations accidentelles et d'une mise au point préalable en ce qui concerne le choix du solvant : sa nature, sa concentration, son volume final, doivent permettre de se placer dans des conditions optimales de dosage de l'élément.

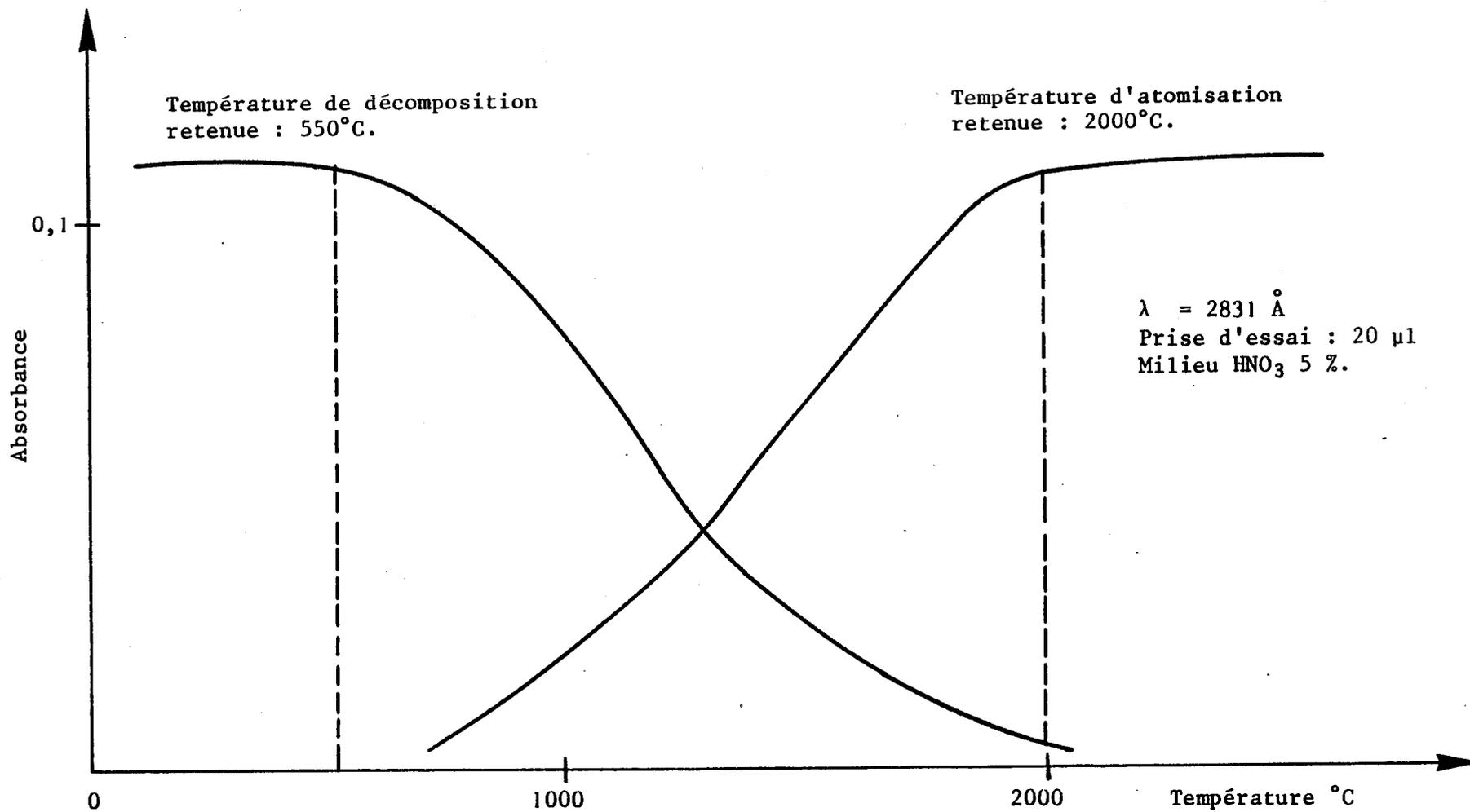


FIGURE 4 - Détermination des températures optimales de décomposition et d'atomisation du plomb en chauffage normal.

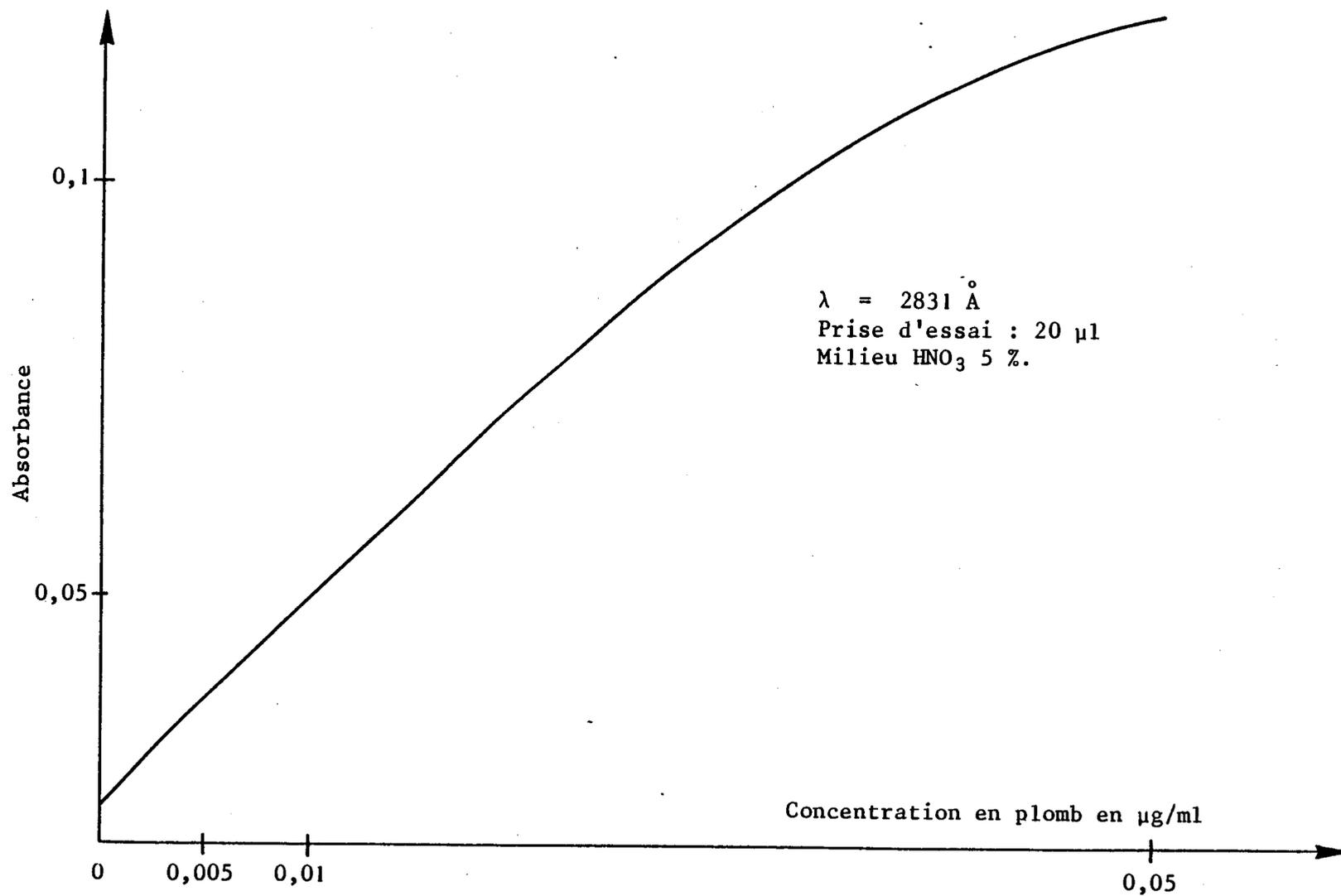


FIGURE 5 - Courbe d'étalonnage du plomb.

TABLEAU 3 - Conditions optimales de dosage du plomb, du fer et du cuivre, en milieu nitrique.

	Cycle	1	2	3	4	5
	PLOMB	Température °C	100	550	550	2000
Temps de montée s		15	15	-	1	1
Temps d'isotherme s		15	15	5	5	5
Débit d'argon ml/mn		300	300	10	10	300
Domaine analytique : 3 à 30 µg/l						
FER	Température °C	100	1000	1000	2600	20
	Temps de montée s	10	10	1	1	1
	Temps d'isotherme s	20	20	5	5	5
	Débit d'argon ml/mn	300	300	50	50	300
	Domaine analytique : 5 à 50 µg/l					
CUIVRE	Température °C	110	1000	1000	2500	20
	Temps de montée s	20	10	-	1	1
	Temps d'isotherme s	20	15	4	4	5
	Débit d'argon ml/mn	300	300	50	50	300
	Domaine analytique : 20 à 200 µg/l					

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

L'acide nitrique est souvent utilisé comme milieu d'attaque et sa combinaison avec les éléments donne des nitrates stables, ce qui permet une décomposition à température élevée et une élimination de la matrice à cette étape.

Dans le cas de nos échantillons, lorsque l'attaque se fait avec cet acide, à une concentration de 10 % qui permet la dissolution complète du support, la durée d'utilisation du four en graphite est raccourcie de 50 %. Or, si l'on diminue la concentration en acide à 5 %, la dissolution du support d'acétate n'est pas totale ; ceci se traduit, au re-

gard, par l'aspect trouble des échantillons et au dosage par une augmentation du signal d'absorbance due à des absorptions non spécifiques.

Cet effet de matrice se manifeste également par une augmentation de la viscosité du milieu (perturbation d'ordre physique, RIANDEY, 1979) qui diminue considérablement la répétabilité des mesures.

Il a été nécessaire de faire une étude sur différentes concentrations d'acide variant de 1 à 10 % pour chaque élément, afin d'établir un compromis qui permette d'éviter les inconvénients cités, tout en tenant compte de la rentabilité du matériel.

2°) Programmation thermique pour l'analyse du plasma et de l'eau de mer, avant et après contamination.

La mise au point des programmes thermiques en milieu nitrique nous a permis d'étudier les conditions de dosage d'éléments réfractaires dans une matrice plus volatile. Dans ce cas, l'analyte supporte sans perte un prétraitement thermique, à température élevée, ce qui permet d'éliminer sa matrice au cours du cycle de décomposition et par là d'obtenir une absorbance spécifique de l'élément dosé.

Dans le cas inverse, à savoir le dosage d'un élément volatil dans une matrice réfractaire, de sérieuses difficultés apparaissent. Le dosage du plomb dans le plasma ou dans l'eau de mer, tous deux chargés en sels de chlorure de sodium, en est un exemple type.

Cas du plomb.

Le plomb, comme le cadmium ou l'arsenic, est un élément volatil ; il n'est donc pas possible d'appliquer une température de décomposition élevée pour éliminer les sels de sodium qui constituent la matrice, sans risque de perdre l'élément au cours du prétraitement thermique. En fait, il est possible d'appliquer une température élevée mais pendant un temps très court, au cycle de décomposition (800°C, 1 s).

RIANDEY et al. (1980) procédant ainsi se sont aperçus qu'il n'y avait pas de perte de plomb. Malheureusement, l'élimination des sels de sodium est insignifiante ; les absorptions non spécifiques demeurent considérables. Les difficultés proviennent du fait que le NaCl est un composé réfractaire qui résiste à l'action de hautes températures. Sa présence, à des concentrations élevées (35 g/l), est à l'origine de fortes perturbations au cycle d'atomisation qui ne sont que partiellement cor-

rigées par le système de correction de fond.

Pour résoudre ce problème, de nombreuses solutions ont été proposées portant, toutes, sur des séparations préalables (BAILEY et al., 1975). Cependant, des absorptions non spécifiques importantes subsistent, ce qui rend ces traitements chimiques partiellement satisfaisants.

Nous avons eu recours à une autre méthode : le modèle de four que nous avons utilisé permet d'appliquer la méthode de chauffage rapide mise au point par RIANDEY et al. (1980) qui offre l'avantage de maîtriser l'effet de matrice dû aux concentrations élevées en NaCl, uniquement par modification des conditions de chauffage. Il s'agit d'appliquer immédiatement la température d'atomisation (temps de montée : < 1 s). Par cette méthode, la température optimale d'atomisation (960°C) est bien plus basse que celle retenue pour le chauffage normal (figure 6).

Le chlorure de sodium qui a une volatilité analogue à celle du plomb, commence à se volatiliser vers 800°C mais à 960°C son absorption non spécifique atteint à peine 0,3 unité d'absorbance donc tout à fait corrigible par le système de correction de fond.

Le chauffage rapide permet donc, lorsqu'on veut doser un élément volatil dans une matrice de volatilité voisine, de "sortir" l'élément de sa matrice sans covolatiliser cette dernière et de maîtriser les perturbations qui rendent les dosages directs impossibles ou inexacts.

Cas du fer et du cuivre.

Pour ces éléments, la matrice NaCl pose moins de problème.

D'une part, les teneurs en fer et cuivre, dans les échantillons de plasma, sont suffisamment élevées pour nécessiter une dilution par un facteur de 20, 50 ou 100, ce qui diminue proportionnellement la charge en sels.

D'autre part, ces deux éléments étant plus réfractaires, il est possible de décomposer la matrice à très haute température (1400°C) pour éliminer le chlorure de sodium à l'étape de décomposition, sans perdre de l'élément.

Les programmes thermiques étudiés pour le dosage du plomb, du fer et du cuivre, en matrice "chlorure de sodium", sont indiqués dans le tableau 4. Ces programmes ont été utilisés pour l'analyse du plasma et

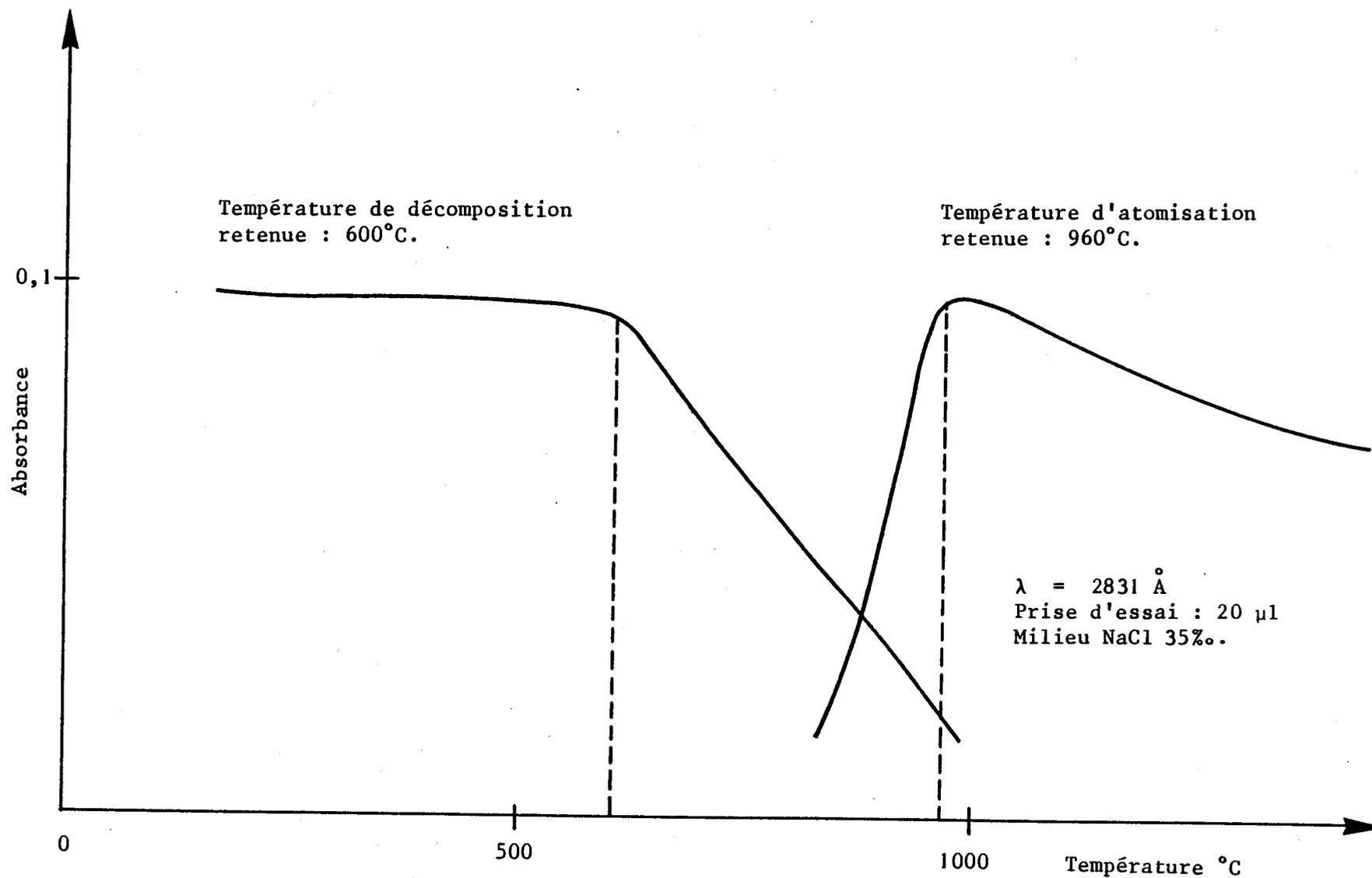


FIGURE 6 - Détermination des températures optimales de décomposition et d'atomisation du plomb en chauffage rapide.

de l'eau de mer avant et après contamination.

Pour se placer dans les mêmes conditions de matrice, la méthode de l'étalonnage complexe a été employée. Il s'agit de faire une gamme de plomb (sous forme $Pb(NO_3)_2$) dans du NaCl 35 g/l.

TABLEAU 4 - Conditions optimales de dosage du plomb, du fer et du cuivre en milieu chlorure de sodium.

	Cycle	1	2	3	4	5	6
	PLOMB	Température °C	100	600	600	960	20
Temps de montée s		15	15	-	< 1	1	1
Temps d'isotherme s		15	15	5	3	5	5
Débit d'argon ml/mm		300	300	10	10	300	300
Domaine analytique : 2 à 50 ng/ml							
FER	Température °C	100	1400	1400	2600	20	2200
	Temps de montée s	10	10	-	1	1	1
	Temps d'isotherme s	20	20	5	5	5	5
	Débit d'argon ml/mm	300	300	50	50	300	300
Domaine analytique : 5 à 50 ng/ml							
CUIVRE	Température °C	110	1300	1300	2500	20	2200
	Temps de montée s	20	10	-	1	1	1
	Temps d'isotherme s	20	15	4	4	4	5
	Débit d'argon ml/ml	300	300	50	50	300	300
Domaine analytique : 50 à 500 ng/ml							

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

4.3.4. Propriétés analytiques de la méthode.Précision.

Chaque échantillon est dosé, en moyenne, trois à cinq fois. Le résultat retenu est la moyenne arithmétique de ces répétitions. Un système d'injection automatique dans le four en graphite permet une répétabilité de 5 %. Le tableau 5 indique la précision du dosage des trois éléments étudiés dans le plasma et dans les fractions protéiques solubilisées.

TABLEAU 5 - Etude statistique de la précision du dosage du plomb, du fer et du cuivre dans les échantillons de plasma et dans les fractions protéiques solubilisées.

Eléments	PLOMB		FER		CUIVRE	
	A	B	A	B	A	B
Dilution	1/100	-	1/100	-	1/200	-
1 *	3,4	0,010	2,4	0,008	70	0,18
2	3,7	0,012	2,3	0,008	68	0,19
3	3,9	0,011	2,2	0,009	66	0,20
4	3,6	0,011	2,6	0,008	67	0,20
5	3,4	0,010	2,5	0,008	64	0,20
6	3,8	0,011	2,5	0,010	65	0,19
7	4,0	0,010	2,4	0,008	69	0,20
8	3,5	0,010	2,3	0,007	70	0,20
9	3,4	0,010	2,5	0,008	66	0,20
10 *	3,4	0,012	2,4	0,008	65	0,20
\bar{x}	3,61	0,0107	2,41	0,0082	66,9	0,196
s	0,22	0,0008	0,21	0,0009	2,28	0,007
C.V. %	6,09	7,69	4,87	7,6	3,41	3,57

* : dix mesures ont été faites sur le même échantillon.

A : Echantillon de plasma d'un crabe en contact deux jours avec une eau de mer à 0,7 µg/ml en plomb.
Prélèvement à J+1.

(µg Pb, Fe Cu total/ml plasma).

B : Fraction protéique solubilisée correspondant aux protéines isolées du plasma A.

(µg Pb, Fe, Cu protéique/3 µl plasma).

\bar{x} : Moyenne.

s : Ecart-type.

C.V. % : Coefficient de variation.

Sensibilité.

En absorption atomique au four, la sensibilité est mesurée par le rapport $\Delta A/\Delta C$. Ce paramètre dépend de la production d'atomes neutres présents dans l'échantillon et dépend donc essentiellement de l'étape d'atomisation. Si les conditions thermiques de la programmation permettent une atomisation optimale, la sensibilité obtenue peut être très grande.

Cette sensibilité s'exprime par la concentration en élément qui donne 1 % d'absorption.

Le tableau 6 indique les sensibilités obtenues pour le plomb, le fer et le cuivre, avec les programmes thermiques précédemment cités.

TABLEAU 6 - Limites de détection et sensibilités en milieux nitrique et chlorure de sodium.

MILIEU NITRIQUE		PLOMB $\lambda = 2831 \text{ \AA}$	FER $\lambda = 2483 \text{ \AA}$	CUIVRE $\lambda = 3247 \text{ \AA}$
Sensibilité ⁽¹⁾	Relative (ng/ml)	0,3	2	3
	Absolue (ng) ⁽²⁾	0,006	0,04	0,06
Limite de détection	Relative (ng/ml)	0,1	0,4	1
	Absolue (ng) ⁽²⁾	0,002	0,008	0,02
MILIEU CHLORURE DE SODIUM				
Sensibilité ⁽¹⁾	Relative (ng/ml)	0,5	2,5	3
	Absolue (ng) ⁽²⁾	0,010	0,05	0,06
Limite de détection	Relative (ng/ml)	0,4	1	2
	Absolue (ng) ⁽²⁾	0,008	0,020	0,04

(1) Sensibilité donnée pour 1 % d'absorption.

(2) Sensibilité et limite de détection absolues rapportées à un volume analysé de 20 μ l.

Limite de détection.

C'est la plus faible valeur de la concentration que la méthode d'analyse permette de mesurer. Dans la pratique, c'est la concentration en élément qui donne une absorbance égale à deux fois le bruit de fond.

Le tableau 6 donne les limites de détection pour les trois métaux dosés.

5. EXPRESSION DES RÉSULTATS.

5.1. CALCULS ET UNITES.

5.1.1. Dosage des protéines.

La concentration en protéines plasmatiques totales est obtenue en multipliant la concentration donnée par le dosage spectrophotométrique par un facteur de dilution constant (100).

5.1.2. Dosage des métaux.

- Dans le plasma, les teneurs en plomb, fer et cuivre, sont exprimées en μg métal/ml plasma.
- Dans les fractions protéiques solubilisées, les teneurs en métaux fixés au niveau des protéines (plomb, fer ou cuivre) sont exprimées en μg métal protéique/ml plasma.

La teneur finale en métal protéique est ramenée à l'unité de plasma (1 ml) pour pouvoir comparer avec la teneur en métal plasmatique.

Le tableau 7 résume les calculs intermédiaires et les unités employées en fonction des analyses effectuées.

TABLEAU 7 - Calculs intermédiaires et unités utilisées en fonction des analyses effectuées.

Analyse		Symbole utilisé	Dilution	Calcul	Unité
Protéines totales		I	100	x dilution	mg/ml plasma
Métaux	Pb plasmatique	II	10, 50	x dilution	µg/ml plasma
	Fe plasmatique	IV	ou		
	Cu plasmatique	P1	100		
	Pb protéique	III		$\frac{Q^* \times 1000}{3 \text{ (ou } 6)}$	µg métal protéique/ml plasma
	Fe protéique	V		$\frac{\text{III ou V}}{\text{I}}$	µg métal/mg protéines (ppm)
Cu protéique	-				

* Quantité de Pb, Fe ou Cu dans le volume final de HNO₃ = concentration donnée par le dosage divisé par 1 (volume final = 1 ml)
2 (volume final = 0,5 ml).

5.2. GRAPHES.

Les résultats se traduisent graphiquement par des courbes de cinétique en fonction du temps de contact des animaux avec le milieu contaminé.

- Courbes II : variation de la teneur en plomb plasmatique,
- Courbes IV : variation de la teneur en fer plasmatique,
- Courbes III : variation de la teneur en plomb protéique,
- Courbes V : variation de la teneur en fer protéique.



CHAPITRE II

RESULTATS : EVOLUTION DES TENEURS EN PLOMB, FER, CUIVRE
DANS LE PLASMA ET AU NIVEAU DES FRACTIONS PROTEIQUES
EN FONCTION DU TEMPS DE CONTAMINATION DES ANIMAUX.

CHAPITRE II

RESULTATS : EVOLUTION DES TENEURS EN PLOMB, FER, CUIVRE
DANS LE PLASMA ET AU NIVEAU DES FRACTIONS PROTEIQUES EN
FONCTION DU TEMPS DE CONTAMINATION DES ANIMAUX.

1. ACTION DU PLOMB.

1.1. ESSAI 1 : Eau de mer contaminée à 0,01 mg/l en plomb.

Cet essai est réalisé sur trois lots de crabes expérimentés pendant sept jours, dont un lot témoin non contaminé.

L'essai a été arrêté lorsque les dosages du plomb protéique chez les animaux contaminés ont révélé des teneurs trop faibles pour être détectables.

Les animaux ont été mis en contact avec un milieu contaminé à 0,01 mg/l en plomb :

- le lot A pendant sept jours,
- le lot B pendant deux jours,

avant d'être transférés dans une eau non contaminée.

Le but de cet essai est de savoir, dans un premier temps, si le contact des crustacés avec le milieu contaminé à cette concentration en plomb entraîne un enrichissement du plasma, c'est-à-dire si les barrières physiologiques naturelles telles que les épithéliums branchiaux et les téguments du crabe constituent ou non un système de filtration sélectif vis-à-vis de ce métal.

L'analyse des fractions protéiques permet de savoir si la fixation du plomb observée lors des essais chimiques se produit réellement chez

les crabes vivants contaminés expérimentalement. Si tel est le cas, il est important :

- de connaître, par le dosage des protéines plasmatiques, la teneur totale en protéines et de savoir si cette dernière subit des variations,
- de préciser si la fixation du plomb a une influence sur la teneur en cuivre constitutif des protéines plasmatiques.

L'étude du lot B contaminé pendant deux jours a pour but d'observer les effets d'une contamination à court terme et de les comparer à ceux d'une exposition continue ; la durée de contamination (2 jours) a été choisie, à posteriori, en fonction des résultats obtenus avec les essais à long terme.

Les analyses effectuées sur les échantillons de plasma et sur les fractions protéiques solubilisées portent donc sur :

- la concentration en protéines plasmatiques totales,
- les teneurs en plomb plasmatique et protéique,
- les teneurs en cuivre plasmatique et protéique.

1.1.1. Etude des électrophorégrammes.

Avant d'étudier les résultats obtenus par les différents dosages, l'observation des électrophorégrammes témoins correspondant aux différents temps de séjour des animaux dans l'eau contaminée, apporte des renseignements fort intéressants (figure 7).

- Au temps J-1, la coloration spécifique des protéines met en évidence deux bandes : l'une foncée (bande 1), l'autre plus claire (bande 2), 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. C'est l'aspect usuel que présente la fraction protéique du plasma de *Macropipus puber*, isolée après électrophorèse en tampon phosphate (pH 6,4), qui permet une séparation groupée de l'ensemble des protéines.

MANWELL et BAKER (1963), en localisant l'hémocyanine par référence à son activité péroxydasique, ont montré que cette molécule représente la protéine quantitativement la plus importante dans le sérum des arthropodes.

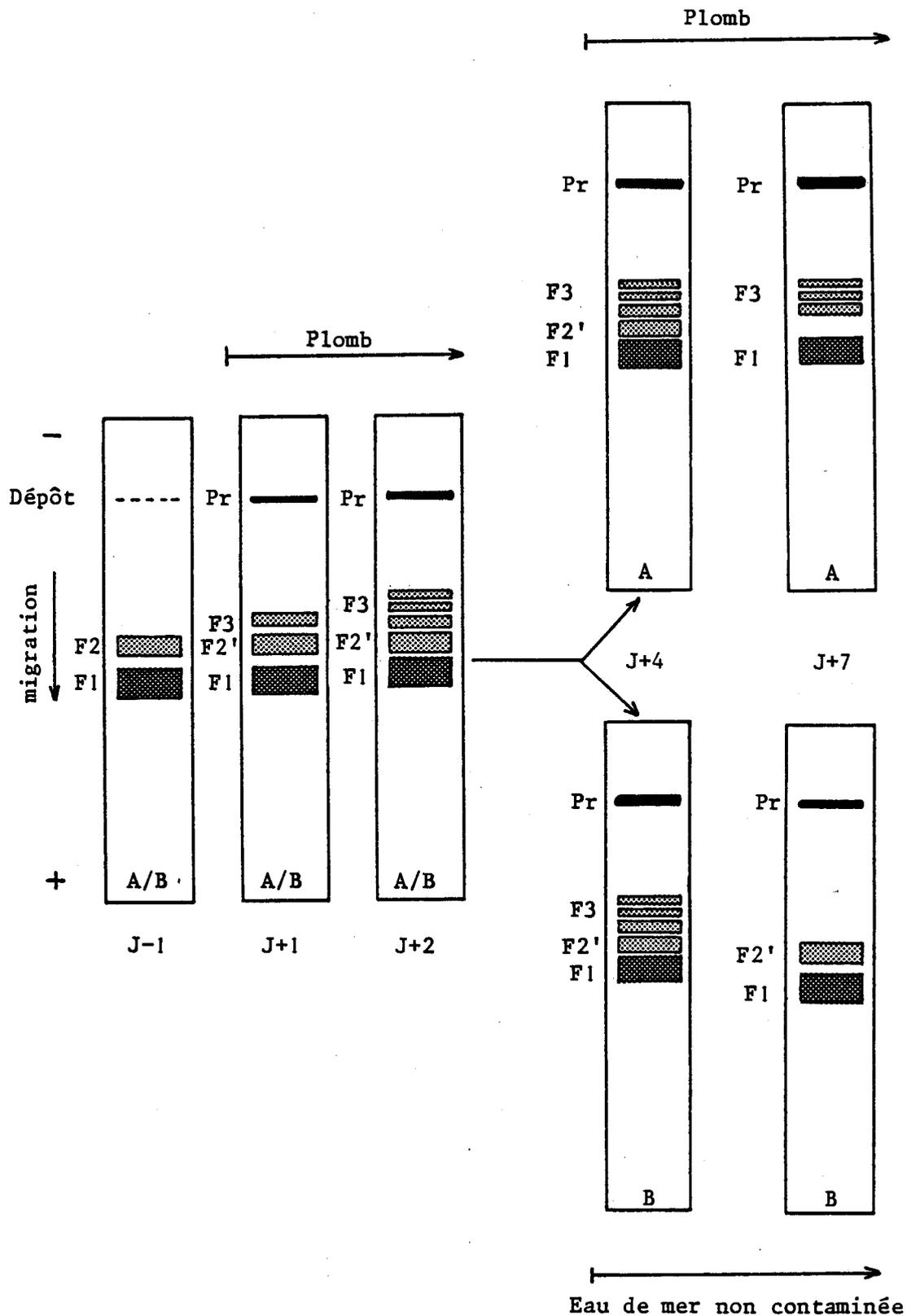


FIGURE 7 - Eau de mer à 0,01 mg/l en plomb.
 Protéines plasmatiques séparées par électrophorèse sur
 acétate de cellulose, en tampon $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, pH 6,4.
 Crabes A : contaminés pendant 7 jours.
 Crabes B : contaminés pendant 2 jours.
 F1, F2, F2', F3 : fractions protéiques.
 Pr : précipité.

Chez les crabes, dans l'état actuel des connaissances, la bande 1 correspond à l'hémocyanine, protéine majeure du plasma de ces animaux alors que la bande 2 n'a pas été identifiée de façon précise pour sa fonction.

Les différents plasmas 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.

- Dès le contact des animaux avec le plomb et tout au long de l'essai, les électrophorégrammes présentent des modifications qui affectent principalement la bande 2.

En ce qui concerne les crabes A, les modifications se traduisent par l'apparition, dès le premier jour (J+1), d'une légère bande 3 dont la distance de migration est inférieure à celle de la bande 2 et à laquelle succède plusieurs bandes fines entre le deuxième et le septième jour. Dans le même intervalle de temps, on constate la disparition progressive de la bande 2 et l'apparition d'agrégats de nature protéique au niveau du dépôt. Ces protéines qui n'ont pas migré pendant l'électrophorèse, forment un résidu de plus en plus foncé en fonction du temps.

Quant aux électrophorégrammes correspondant aux protéines des crabes B, le transfert des animaux dans une eau non contaminée, après deux jours de contact avec le plomb, entraîne l'inversement des phénomènes observés chez les crabes A, c'est-à-dire le retour des électrophorégrammes à leur aspect initial.

Précisons que les électrophorégrammes provenant d'un lot de crabes témoins non contaminé ne présentent aucune modification dans le temps, ni dans la migration, ni dans l'aspect des bandes protéiques.

Le contact des animaux avec une eau contaminée à 0,01 mg/l a donc introduit des modifications dans la migration des protéines. Ces perturbations sont réversibles si les animaux sont remis dans une eau non polluée en plomb après deux jours de contamination.

1.1.2. Dosage des protéines plasmatiques.

L'apparition sur les électrophorégrammes d'un résidu coloré par l'amidochwarz, au niveau du dépôt, indique qu'une partie des protéines a perdu sa propriété de mobilité et n'a pas migré pendant l'électrophorèse. Ce phénomène est dû :

- soit au fait que ces protéines proviennent d'un plasma qui n'est pas frais, ce qui n'est pas le cas puisque les électrophorèses sont effectuées immédiatement après les ponctions,
- soit au fait que ces protéines ne sont pas en solution dans le plasma, autrement dit qu'elles sont sous forme précipitée (SEBIA, 1979).

Afin de vérifier que ce deuxième cas correspond bien au phénomène que nous avons décrit, une centrifugation a été effectuée, dans des conditions déterminées par plusieurs essais, sur les plasmas dont les protéinogrammes révèlent un résidu protéique au niveau du dépôt.

Cette opération ayant pour but d'isoler les protéines précipitées dans le culot, le surnageant recueilli doit correspondre uniquement aux protéines restées en solution dans le plasma. Ceci a été vérifié :

- en comparant les électrophorégrammes d'un plasma normal, avant et après centrifugation : l'aspect des bandes protéiques est identique ;
- en comparant les électrophorégrammes d'un crabe contaminé, avant et après centrifugation du plasma : la coloration au niveau du dépôt disparaît sur l'électrophorégramme issu du plasma centrifugé sans que l'aspect des différentes bandes protéiques soit modifié ;
- en dosant les protéines plasmatiques totales d'un crabe normal, avant et après centrifugation du plasma : les deux valeurs trouvées sont identiques ;
- en dosant les protéines plasmatiques totales du même crabe une fois contaminé par le plomb, avant et après centrifugation du plasma. Le plasma intact donne un résultat identique à celui obtenu avant contamination du crabe ; le plasma centrifugé donne une valeur inférieure à celle du plasma intact.

L'ensemble de ces vérifications permet d'affirmer qu'une centrifugation effectuée à 20000 tours/mn (67000 g), pendant 15 minutes, n'introduit pas de modification sur les protéines d'un plasma normal, ni sur leurs propriétés électrophorétiques, ni sur leur teneur totale.

Par contre, sur un plasma de crabe contaminé, cette opération permet d'éliminer les protéines précipitées du plasma ; la disparition du résidu coloré par l'amidoschwarz au niveau du dépôt sur les électrophorogrammes issus des plasmas centrifugés, permet d'affirmer qu'il s'agit bien de protéines précipitées ayant perdu leur propriété de mobilité électrophorétique.

Le dosage des protéines totales, avant et après centrifugation du plasma, permet de mettre en évidence la formation progressive du précipité protéique en fonction du temps de contamination.

Les résultats obtenus par analyse du plasma, avant et après centrifugation (tableau 8), correspondent respectivement à la concentration en protéines plasmatiques totales (Ia) et à la concentration en protéines restées en solution (Ib). La concentration en protéines précipitées est déduite de la différence Ia-Ib. Le tableau 9 montre l'évolution des protéines plasmatiques totales ainsi que celle des protéines précipitées. Les résultats n'indiquent aucune variation significative sur la concentration en protéines totales, ni pour les crabes A, ni pour les B. Par contre, la teneur en protéines précipitées subit des variations qui sont en relation avec le temps de contamination des animaux. Pour les crabes A, ces variations se traduisent par une augmentation progressive entre J et J+7, pour les crabes B par une augmentation jusqu'à J+2 et une diminution par la suite.

Le dosage du plasma après centrifugation a donc permis de mettre en évidence la présence de protéines sous forme précipitée et de suivre l'évolution de leur teneur dans le plasma, en fonction du temps de contamination des animaux.

Ces premiers résultats concordent avec l'aspect des électrophorogrammes :

- pour les crabes A : l'apparition d'un précipité de plus en plus important entre J et J+7,
- pour les crabes B : le même phénomène se produit pendant les deux jours où les animaux se trouvent dans le milieu contaminé ; le précipité n'est plus détectable dans le plasma lorsque les crabes sont transférés dans un milieu non contaminé. Ce phénomène fera l'objet d'une discussion détaillée au chapitre III.

TABLEAU 8 - Eau de mer à 0,01 mg/l en plomb.
Teneurs en protéines plasmatiques en mg/ml plasma.

Crabes A : contaminés 7 jours - Crabes B : contaminés 2 jours.

Crabes A		1	2	3	4	5	\bar{x}	s	CV. %
J-1	Ia	50	59	69	61	63	60,40	6,91	11,44
	Ib	50	59	69	60	63	60,20	6,90	11,46
J+1	Ia	50	59	69	61	63	60,40	6,91	11,44
	Ib	50	58	67	60	62	59,40	6,22	10,47
J+2	Ia	50	59	69	61	63	60,40	6,91	11,44
	Ib	48	57	66	59	61	58,10	6,61	11,36
J+4	Ia	49	59	68	60	63	59,80	6,97	11,66
	Ib	47	56	65	58	60	57,20	6,61	11,56
J+7	Ia	50	59	69	61	63	60,40	6,91	11,44
	Ib	47	57	64	58	59	57,00	6,20	10,80

Crabes B		6	7	8	9	10	\bar{x}	s	CV. %
J-1	Ia	63	70	58	70	67	65,60	5,12	7,80
	Ib	63	71	57	70	67	65,60	5,12	7,80
J+1	Ia	63	70	58	70	67	65,60	5,12	7,80
	Ib	61	70	57	68	66	64,60	5,31	8,25
J+2	Ia	63	70	58	70	67	65,60	5,12	7,80
	Ib	61	68	56	68	64	63,40	5,07	8,00
J+4	Ia	63	70	58	70	67	65,40	4,92	7,52
	Ib	62	69	56	68	66	64,20	5,31	8,27
J+7	Ia	63	70	58	70	67	65,60	5,12	7,80
	Ib	63	69	58	70	67	65,40	4,92	7,52

Ia : sans centrifugation du plasma
Ib : après centrifugation du plasma.

TABLEAU 9 - Eau de mer à 0,01 mg/ml en plomb.
Evolution de la teneur moyenne en protéines précipitées et de la teneur moyenne en plomb fixé sur ces protéines.

Crabes A : contaminés 7 jours - Crabes B : contaminés 2 jours.

Crabes A	Ia mg/ml	Ib mg/ml	Ia-Ib mg/ml	$\Delta(Ia-Ib)$	(Pb) _{pr} µg/ml
J-1	60,40	60,20	*	$\left. \begin{array}{l} + 2,20 \\ + 0,40 \\ + 1,00 \end{array} \right\}$	-
J+2	60,40	58,20	2,20		0,012
J+4	59,80	57,20	2,60		0,020
J+7	60,40	57,00	3,60		0,025
Variation totale de J-1 à J+7	*	-3,80	+3,60		+0,025

Crabes B	Ia	Ib	Ia-Ib	$\Delta(Ia-Ib)$	(Pb) _{pr}
J-1	65,60	65,60	*	$\left. \begin{array}{l} + 2,20 \\ - 1,00 \\ - 1,20 \end{array} \right\}$	-
J+2	65,60	63,40	2,20		0,014
J+4	65,40	64,20	1,20		0,013
J+7	65,60	65,40	*		-
Variation totale de J-1 à J+2	*	-2,20	+2,20		+0,014
de J+2 à J+7	*	+2,00	-2,20		-0,014

Ia - Ib : protéines précipitées
(Pb)_{pr} : plomb dosé au niveau du précipité
* : non détectable.

La concentration en protéines totales restant constante quel que soit le temps de contamination, cela signifie que les modifications observées sur les électrophorégrammes concernent une même quantité de protéines.

La question qui se pose est de savoir s'il existe une relation entre l'apparition de la bande 3 ainsi que la formation du précipité, et la disparition progressive de la bande 2.

1.1.3. Dosage du plomb.

Le tableau 10 indique les concentrations en plomb plasmatique et protéique pour les deux lots de crabes A et B, mis en contact avec une eau contaminée à 0,01 mg/l de plomb, respectivement pendant 15 jours et 2 jours.

Le plomb protéique a été dosé :

- dans les protéines totales (III_t) correspondant à toutes les bandes protéiques et le précipité,
- dans les fractions protéiques (III_f) correspondant aux bandes seulement (protéines qui ont migré).

Le dosage du plomb plasmatique ayant donné des teneurs en plomb total comprises entre 0,001 µg/ml et 0,224 µg/ml, les teneurs en plomb protéique inférieures à 0,030 µg/ml (variant de 0,001 µg/ml à 0,030 µg/ml) n'ont pu être détectées dans les fractions protéiques solubilisées, étant donné la limite de détection du plomb protéique qui est de 0,030 µg/ml. C'est pour cette raison que :

- l'expérience a été arrêtée à J+7, les teneurs en plomb protéique n'étant plus détectables chez les crabes D après 7 jours d'essai,
- le plomb a été dosé sur les protéines totales d'une part, et sur les fractions qui ont migré d'autre part ; la différence entre les deux teneurs en plomb correspond à la teneur fixée au niveau du précipité protéique, teneur trop faible en elle-même pour être détectée après solubilisation du précipité,
- le plomb a été dosé sur l'ensemble des fractions protéiques et non sur chaque fraction séparément.

Le contrôle effectué à J-1 montre que le plomb existe à une teneur

TABLEAU 10 - Eau de mer à 0,01 mg/l en plomb.
Teneurs en plomb dans le plasma (II) et au niveau des
protéines plasmatiques (III).

Crabes A : contaminés pendant 7 jours - Crabes B : contaminés pendant 2 jours.

Crabes A		1	2	3	4	5	\bar{x}	s	CV. %
J-1	II III _t	0,004 *	0,003 *	0,006 *	0,009 *	0,002 *	0,004 *	0,002	69,37
J+1	II III _t	0,038 0,030	0,220 0,210	0,210 0,200	0,098 0,080	0,063 0,060	0,125 0,116	0,084 0,083	67,40 71,76
J+2	II III _t III _f	0,154 0,140 0,125	0,061 0,060 0,056	0,087 0,080 0,061	0,135 0,130 0,120	0,255 0,130 ⁻ 0,110	0,109 0,102 0,090	0,042 0,038 0,037	39,24 37,86 41,18
J+4	II III _t III _f	0,139 0,130 0,110	0,054 0,050 0,035	0,061 0,060 0,041	0,120 0,110 0,083	0,100 0,100 0,082	0,094 0,090 0,070	0,036 0,033 0,031	39,17 37,68 45,06
J+7	II III _t III _f	0,098 0,090 0,056	0,031 0,030 0,030	0,034 0,030 0,030	0,135 0,100 0,035	0,012 <0,030 ⁻ <0,030	0,074 0,062 0,037	0,050 0,037 0,012	67,54 59,68 33,48

TABLEAU 10 - Suite.

Crabes B	6	7	8	9	10	\bar{x}	s	CV. %
J-1 II III ^t	0,005 *	0,002 *	0,001 *	0,002 *	0,005 *	0,003 *	0,001	62,36
J+1 II III ^t	0,160 0,460 ⁻	0,090 0,080	0,135 0,130	0,214 0,210	0,224 0,220	0,165 0,160	0,064 0,066	38,79 41,25
J+2 II III ^t III ^f	0,160 0,130 0,110	0,215 0,200 0,185	0,167 0,160 0,150	0,069 0,060 0,048	0,056 0,060 0,051	0,133 0,122 0,108	0,068 0,061 0,060	51,32 50,66 55,83
J+4 II III ^t III ^f	0,032 0,030 0,030	0,030 0,030 0,030	0,110 0,100 0,046	0,032 0,030 0,030	0,001 <0,030 ⁻ <0,030	0,051 0,047 0,034	0,039 0,035 0,008	76,47 74,47 23,53
J+7 II III ^t III ^f	0,010 <0,030 ⁻ 0,030	0,033 0,030 0,030	0,034 0,030 0,030	0,011 <0,030 ⁻ <0,030	0,001 <0,030 ⁻ <0,030	<0,033 <0,030 <0,030		

- II : µgPb total/ml plasma.
 III^t : µgPb protéique total/ml plasma.
 III^f : µgPb fixé au niveau des fractions protéiques/ml plasma.
 - : Résultats qui n'ont pas été pris en compte dans la moyenne :
 soit parce que l'un des chiffres est une erreur par excès,
 soit parce que l'un des chiffres est inférieur à la limite de détection.
 * : non détectable.

moyenne de 0,004 $\mu\text{g/ml}$ dans le plasma des animaux à l'état normal. Des analyses effectuées sur le plasma des crabes témoins non contaminés, indiquent une teneur en plomb du même ordre ; précisons que cette teneur reste constante pour chaque crabe, tant que les animaux restent en milieu non contaminé.

Nous ne pouvons préciser si ce plomb dosé dans le plasma se trouve sous forme libre ou liée, le cas échéant s'il est fixé par les protéines plasmatiques. En effet, une telle teneur, ramenée à un volume de 6 μl (quantité maximale de dépôt d'électrophorèse) et diluée dans 1 ml d'acide, correspond à une quantité absolue de 0,0005 ng dans les conditions de dosage. Cette quantité ne peut être détectée car elle est très inférieure à la limite de détection du plomb qui est de 0,002 ng (chap. I, § 3.4.3., tableau 6).

L'étude des résultats, après contamination, met en évidence un enrichissement du plasma en plomb et une fixation de plus de 90 % de l'élément au niveau des protéines totales dans les deux premiers jours. Les teneurs maximales en plomb plasmatique et protéique coïncident et sont atteintes pendant ces deux jours. Par la suite, ces teneurs chutent aussi bien pour le lot A que pour le lot B :

- chez les crabes A, le plomb plasmatique décroît linéairement entre J+1 et J+7 ; à J+7, la teneur plasmatique a diminué de 40 % par rapport au maximum. L'évolution du plomb protéique suit celle du plomb plasmatique ;
- chez les crabes B, le transfert des animaux en milieu non contaminé accentue la décroissance des teneurs plasmatiques et protéiques amorcée après J+1. Ceci se traduit par une chute marquée entre J+2 et J+4 de ces teneurs, lesquelles se stabilisent entre J+4 et J+7, à une valeur égale à 20 % de la teneur maximale.

Ces variations sont illustrées par les courbes de la figure 8 qui mettent en évidence l'évolution des teneurs plasmatiques et protéiques chez les deux lots de crabes.

En ce qui concerne le pourcentage de plomb protéique par rapport au plomb total, le rapport Pb protéique/Pb plasmatique (IIIIt/II) varie de 93 à 95 %, quels que soient le lot de crabes et le temps considéré.

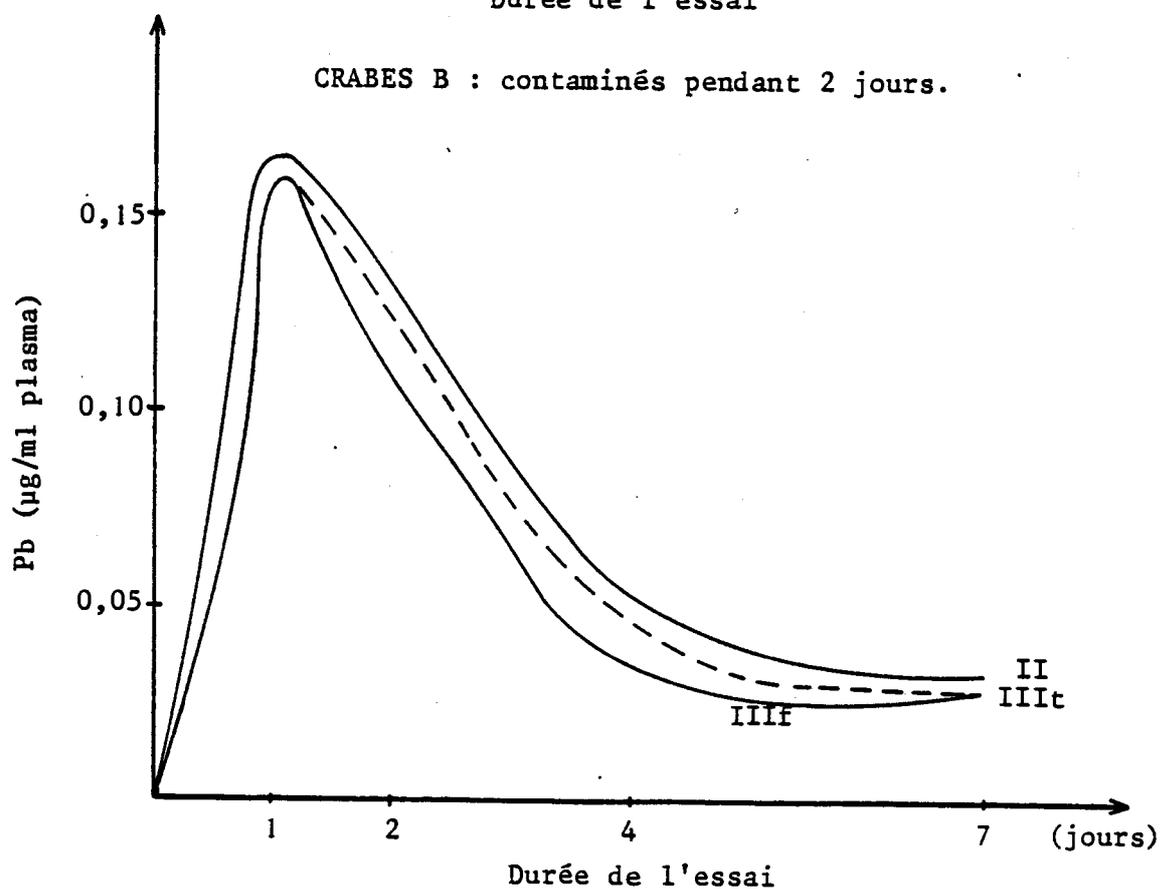
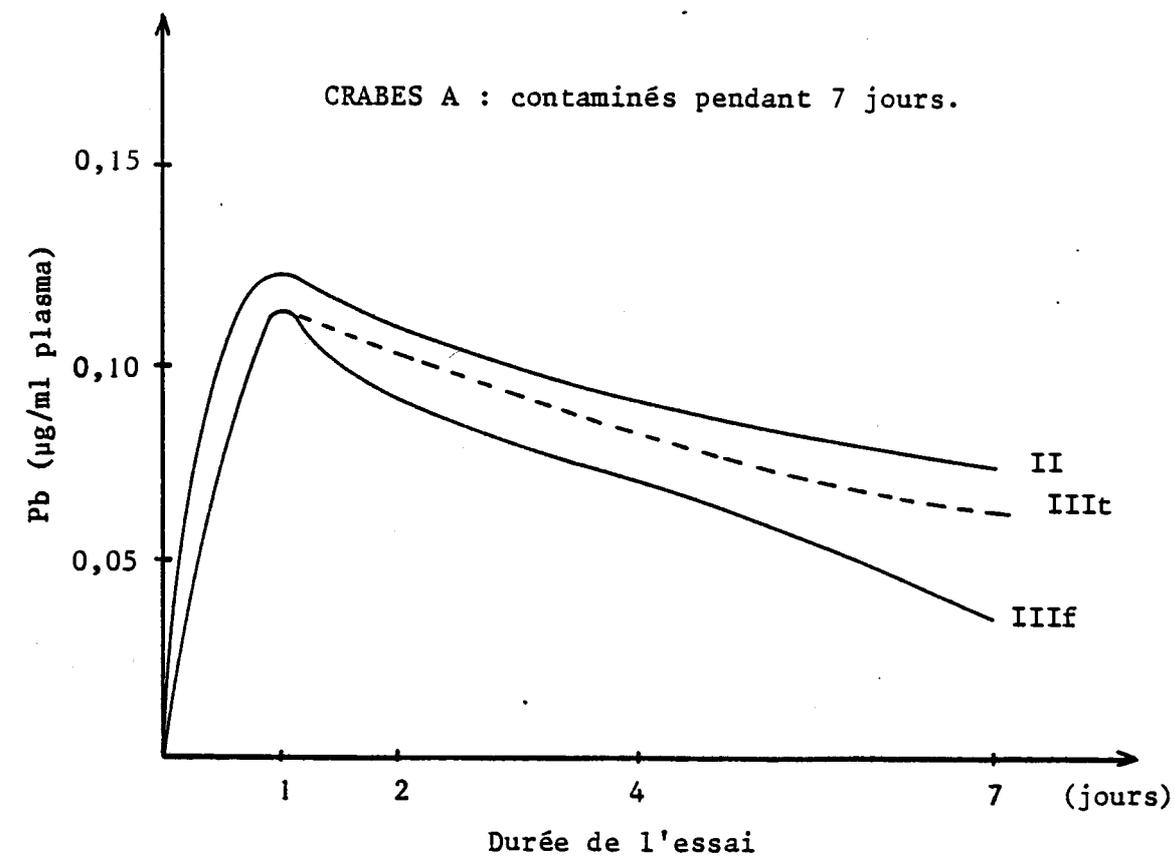


FIGURE 8 - Eau de mer à 0,01 mg/l en plomb.
Evolution des teneurs en plomb plasmatique (II) et en plomb protéique (III).

IIIIf : fractions protéiques.

IIIIt : protéines totales (IIIIf + précipité).

La différence entre le plomb protéique total et le plomb fixé au niveau des fractions protéiques (IIIIt - IIIIf) permet de déduire les teneurs en plomb fixé au niveau des protéines précipitées (tableau 9, colonne (Pb)pr). L'évolution de ces teneurs montre qu'elles augmentent avec le temps de contamination (crabes A) alors qu'elles diminuent et s'annulent lorsque les animaux sont remis en eau non contaminée (crabes B).

La comparaison des teneurs en plomb fixé aux protéines précipitées et en protéines précipitées elles-mêmes, montre que ces deux valeurs varient de façon identique en fonction du temps de contamination des animaux, ce qui permet d'établir une relation entre la fixation de l'élément et son action précipitante sur ces protéines.

En conclusion, les résultats du dosage du plomb dans le plasma et au niveau des protéines plasmatiques, dans cet essai, ont fait apparaître trois points importants :

- la diminution des teneurs en plomb plasmatique et protéique, après 24 h de contamination, indique qu'après un premier temps d'accumulation dans le plasma et de fixation sur les protéines, les quantités de plomb ne se stabilisent pas à leur valeur maximale mais sont éliminées du plasma ;
- le transfert des animaux dans l'eau non contaminée permet d'accélérer la décroissance des teneurs en plomb plasmatique et protéique, et de diminuer ces teneurs de 90 % par rapport à leur valeur maximale, alors que cette diminution n'est que de 40 % chez les crabes gardés en eau contaminée ;
- puisque le transfert des animaux dans l'eau non contaminée permet l'élimination des protéines précipitées (disparition du précipité sur les électrophorégrammes et teneurs en protéines précipitées non détectables dans le plasma), cela signifie que le phénomène de précipitation est bien dû à l'action du métal sur certaines protéines plasmatiques.

1.1.4. Dosage du cuivre.

Le dosage du cuivre a été effectué sur les mêmes échantillons que pour celui du plomb. Les résultats donnent les teneurs en cuivre constitu-

TABLEAU 11 - Eau de mer à 0,01 mg/l en plomb.
Teneurs en cuivre dans le plasma (II) et au niveau des protéines
plasmatiques (III).

Crabes A	1	2	3	4	5	\bar{x}	s	CV. %	
J-1	II	64	68	81	72	75	72,00	6,51	9,04
	III	63	67	80	71	74	71,00	6,51	9,17
	III/II	98,44	98,53	98,77	98,61	98,67	98,60	0,12	0,12
J+1	II	63	69	81	72	76	72,20	6,83	9,46
	III	62	69	80	70	75	71,20	6,76	9,49
	III/II	98,41	100,00	98,77	97,22	98,68	98,61	0,99	1,00
J+2	II	65	70	80	72	74	72,20	5,49	7,60
	III	65	69	79	71	74	71,60	5,27	7,36
	III/II	100,00	98,57	98,75	98,61	100,00	99,18	0,74	0,75
J+4	II	65	69	80	71	76	72,20	5,89	8,16
	III	64	68	78	70	75	71,00	5,56	7,83
	III/II	98,46	98,55	97,50	98,59	98,68	98,35	0,48	0,49
J+7	II	64	69	80	72	75	72,00	6,04	8,39
	III	63	68	79	72	74	71,20	6,05	8,50
	III/II	98,44	98,55	98,75	100,00	98,67	98,88	0,63	0,64

TABLEAU 11 - Suite.

Crabes B	6	7	8	9	10	\bar{x}	s	CV. %	
J-1	II	75	80	69	81	76	76,20	4,76	6,25
	III	74	79	68	80	75	75,20	4,76	6,33
	III/II	98,67	98,75	98,55	98,77	98,68	98,68	0,08	0,08
J+1	II	74	81	69	80	75	75,80	4,86	6,41
	III	74	80	67	80	74	75,00	5,38	7,11
	III/II	100,00	98,77	97,10	100,00	98,67	98,78	1,24	1,26
J+2	II	74	80	70	81	75	76,00	4,52	5,95
	III	73	80	69	80	75	75,40	4,72	6,26
	III/II	98,65	100,00	98,57	98,77	100,00	99,19	0,73	0,74
J+4	II	75	80	70	80	75	76,00	4,18	5,50
	III	75	78	69	79	74	75,00	3,93	5,24
	III/II	100,00	97,50	98,57	98,75	98,67	98,69	0,88	0,89
J+7	II	74	80	68	80	76	75,60	4,98	6,59
	III	73	79	68	79	74	74,60	4,61	6,18
	III/II	98,65	98,75	100,00	98,75	97,37	98,68	0,08	0,08

II : Cuivre plasmatique ($\mu\text{g Cu total/ml plasma}$).
 III : Cuivre protéique total ($\mu\text{g Cu protéique/ml plasma}$).
 III/II : Cuivre protéique/cuivre plasmatique (%).

tif des protéines plasmatiques et permettent de suivre l'évolution de ces teneurs en fonction du temps de contamination des animaux par le plomb.

Le tableau 11 indique les concentrations plasmatiques et protéiques dosées respectivement dans :

- les échantillons de plasma des crabes A et B,
- les protéines totales (fractions et précipité).

Les teneurs en cuivre plasmatique varient entre 64 et 81 $\mu\text{g/ml}$ suivant les individus et restent constantes pour chaque animal tout au long de l'essai. Les rapports Cu protéique/Cu plasmatique indiquent que 99 % du cuivre total est lié aux protéines.

L'évolution de la teneur en cuivre au niveau des protéines, en fonction du temps de contamination, ne montre pas de variation significative dans le sens d'une diminution, ce qui signifierait qu'il n'y a pas d'interaction négative entre la fixation du plomb et la teneur en cuivre constitutif des protéines, pour une teneur en plomb dans l'eau égale à 0,01 mg/l. La même étude pour une concentration en plomb plus élevée (essai 3) permettrait, soit de confirmer ce résultat, soit de mettre en évidence l'existence de cette interaction mais à partir d'une certaine teneur en plomb dans l'eau.

1.2. ESSAI 2 : Eau de mer contaminée à 0,1 mg/l en plomb.

Cet essai est réalisé sur deux séries de crabes ponctionnés aux temps J-1, J+1, J+2, J+4, J+7. L'une des séries, mise en contact avec une eau de mer contaminée à 0,1 mg/l en plomb, est destinée à l'analyse ; l'autre, gardée en milieu non contaminé, sert de témoin d'observation.

Cet essai a pour but d'observer les effets de la contamination par une concentration dix fois plus élevée que celle de l'essai 1. Il s'agit d'une part d'étudier le comportement électrophorétique des protéines plasmatiques, d'autre part de déterminer les concentrations en plomb accumulées dans le plasma et celles fixées par les protéines.

1.2.1. Etude des électrophorégrammes.

L'observation des électrophorégrammes (figure 9) montre, dès le premier jour, l'apparition au niveau du dépôt d'un précipité de nature protéique qui s'accroît jusqu'au septième jour, ainsi que l'apparition, dans la même période, d'une bande protéique 3, de mobilité inférieure à celle de la bande 2, au fur et à mesure que celle-ci disparaît. Au bout de sept jours de contamination, les électrophorégrammes présentent, outre la bande 1 dont l'aspect est identique au temps témoin, une légère trace à la place de la bande 2 ainsi qu'un précipité foncé au niveau du dépôt.

La comparaison de ces électrophorégrammes avec ceux des crabes A, dans l'essai 1, montre que, pour des teneurs en plomb dans le milieu qui diffèrent d'un facteur 10, les mêmes modifications affectent la mobilité des protéines en fonction du temps de contamination.

1.2.2. Dosage des protéines totales et du plomb.

Les analyses effectuées sur le plasma et les fractions protéiques solubilisées portent sur :

- la concentration en protéines plasmatiques totales,
- la concentration en plomb plasmatique et protéique.

Précisons que le plomb protéique a été dosé seulement au niveau des protéines qui ont migré après électrophorèse (bandes 1, 2, 3).

Les résultats reportés sur le tableau 12 indiquent que le contact avec le milieu contaminé entraîne un enrichissement du plasma en plomb d'un facteur de 10 par rapport au milieu et d'un facteur de 200 par rapport au plasma initial.

La fixation du métal par les protéines plasmatiques s'effectue selon les modalités suivantes (figure 10) :

- dans un premier temps, les teneurs en plomb plasmatique et protéique augmentent parallèlement jusqu'à un maximum qui est atteint au bout de un à deux jours suivant les individus ;
- au-delà du maximum, entre le deuxième et le septième jour, les teneurs en plomb plasmatique diminuent légèrement et tendent à se stabiliser alors que celles en plomb protéique subissent une chute qui

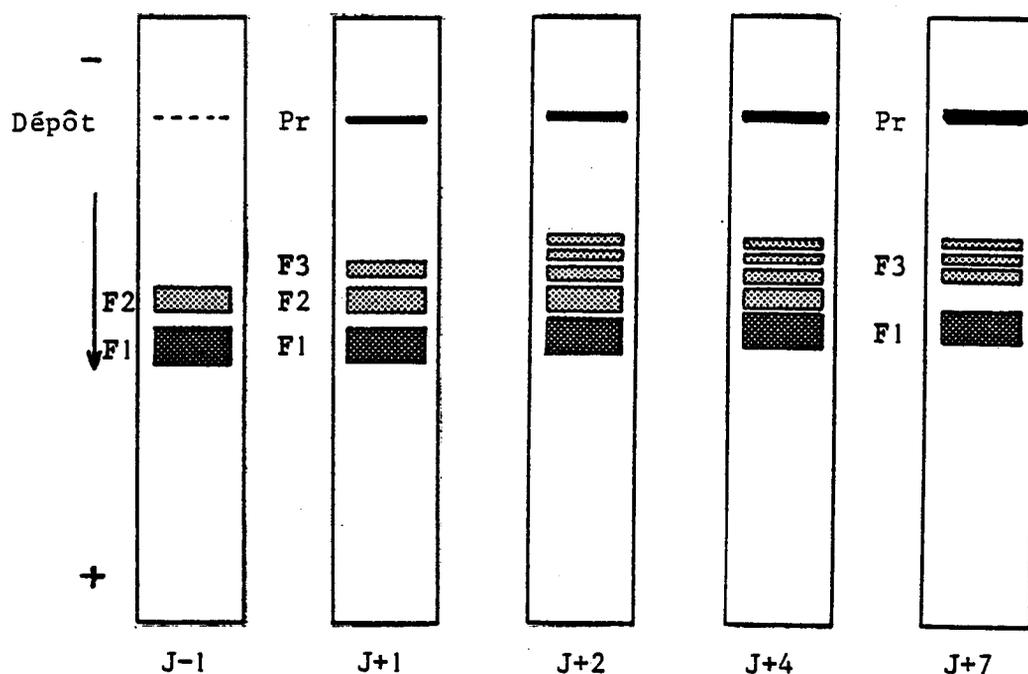


FIGURE 9 - Contamination des crabes par une eau de mer à 0,1 mg/l en plomb, pendant 7 jours.
Protéines plasmatiques séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose, en tampon $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, pH 6,4.

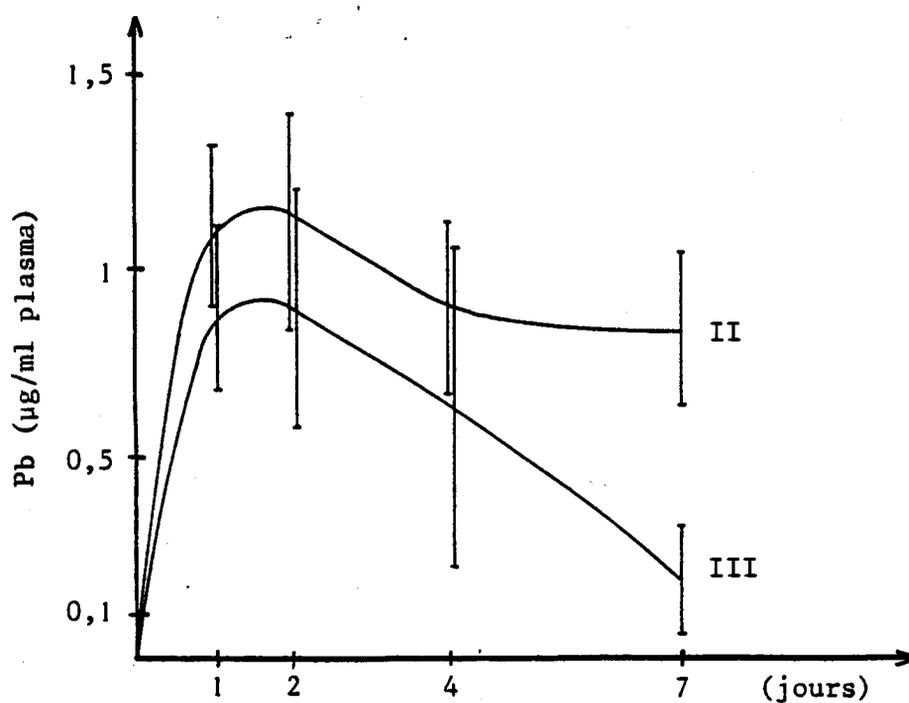


FIGURE 10 - Eau de mer à 0,1 mg/l en plomb.
Evolution des teneurs en plomb plasmatique (II)
et en plomb protéique (III).

TABLEAU 12 - Eau de mer à 0,1 mg/l en plomb.
Teneurs en protéines plasmatiques (I), en plomb dans le plasma (II) et en plomb au niveau des protéines plasmatiques.

Crabe		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	\bar{x}	s	CV. %
Analyse														
J-1	I	70	72	70	70	64	70	69	59	68	66	67,89	3,85	5,68
	II	0,003	0,003	0,002	0,004	0,011	0,003	0,004	0,006	0,002	0,012	0,005	0,003	60,00
	III	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		
J+1	I	70	72	71	70	64	71	69	59	68	66	68,00	4,00	5,88
	II	1,13	1,64	1,15	1,17	0,87	1,08	1,16	0,82	1,06	1,02	1,10	0,22	19,97
	III	0,90	1,40	1,00	1,05	0,70	0,60	1,00	0,60	0,80	0,80	0,88	0,24	27,58
J+2	I	70	72	70	70	64	69	69	59	68	65	67,60	3,86	5,71
	II	1,21	1,74	1,26	1,25	1,06	1,16	1,10	0,78	0,79	0,85	1,12	0,28	25,46
	III	1,00	1,60	1,19	0,90	0,80	1,00	0,90	0,60	0,60	0,60	0,90	0,31	34,56
J+4	I	69	72	70	70	64	69	69	59	68	66	67,60	3,86	5,71
	II	0,97	1,19	1,06	0,99	0,92	1,25	0,66	0,60	0,61	0,72	0,89	0,23	25,84
	III	0,80	0,80	1,00	0,50	0,80	1,00	1,30	0,40	0,40	0,40	0,64	0,43	65,15
J+7	I	70	72	70	70	64	70	69	59	68	66	67,90	3,89	5,73
	II	1,01	1,23	1,00	0,96	0,93	0,76	0,70	0,67	0,65	0,60	0,85	0,20	23,53
	III	0,10	0,16	0,36	0,16	0,43	0,10	0,03	0,16	0,36	0,30	0,20	0,14	70,00

I : mg/ml
 II : μgPb total/ml plasma
 III : μgPb protéique/ml plasma
 * : non détectable.

s'accroît avec le temps. Le rapport Pb protéique/Pb plasmatique, égal à 90 % avant le maximum, n'est plus que de 22 % au bout de sept jours ;

- malgré les variations des concentrations en plomb protéique observées entre J+2 et J+7, les teneurs en protéines plasmatiques totales restent remarquablement constantes pour tous les individus.

L'étude comparative des résultats analytiques et des électrophorégrammes montre que les modifications observées sur ces derniers ont lieu après que les quantités maximales en plomb fixées par les protéines aient été atteintes.

En particulier, l'évolution du précipité est intéressante à noter : sur les électrophorégrammes, ce précipité paraît de plus en plus important entre le deuxième et le septième jour, alors que les analyses indiquent, dans le même temps, une diminution du plomb dosé au niveau des fractions qui ont migré. Le plomb plasmatique total restant constant entre J+2 et J+7, la question qui se pose est de savoir si la différence (Pb plasmatique total - Pb au niveau des fractions) est localisée au niveau des protéines précipitées. C'est ce que nous essaierons de déterminer dans l'essai suivant, en analysant les protéines précipitées elles-mêmes.

Les résultats de cet essai ont donc mis en évidence, à la suite du contact des animaux avec un milieu contaminé à 0,1 mg/l, un enrichissement du plasma en plomb et une fixation de cet élément au niveau des protéines plasmatiques suivant une cinétique comparable à celle de l'essai 1.

L'observation des étrilles dans le milieu contaminé montre que, dès les premiers jours de contact avec le plomb, les crabes analysés ont perdu beaucoup de vigueur par rapport au lot témoin et sont tous morts entre neuf et vingt jours, après l'ajout du métal dans le milieu, alors que les témoins leur ont survécu de sept à huit semaines.

Ces faits témoignent bien de l'effet toxique du plomb qui se traduit par la mortalité des crabes contaminés ; notons que cette mortalité intervient à une échéance plus ou moins longue suivant les individus étudiés (9 à 20 jours), ce qui laisse à penser que la résistance des animaux à cette concentration en plomb est variable d'un individu à l'autre.

1.3. ESSAI 3 : Eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en plomb.

Dans l'ordre chronologique des expériences de contamination par le plomb, cet essai a été réalisé en dernier.

Les différentes analyses ont donc été effectuées en fonction des résultats obtenus avec l'ensemble des essais 1, 2 et 4, dans le but de confirmer et de compléter ces derniers. C'est la raison pour laquelle cet essai présente les résultats les plus détaillés parmi la série d'expériences concernant l'action du plomb.

Les essais 1, 2 et 4 ayant donné des résultats analogues en ce qui concerne l'effet du plomb sur la migration électrophorétique des protéines, cet essai se propose donc, après mise au point de la technique analytique, de localiser le métal sur les différentes fractions protéiques et sur le précipité. Compte tenu de la limite de détection du plomb protéique, nous avons dû choisir une concentration en plomb dans l'eau suffisamment élevée afin de nous permettre de détecter cet élément au niveau des différentes fractions protéiques et du précipité.

Cet essai est réalisé sur deux séries de crabes expérimentés pendant quinze jours et ponctionnés aux temps J-1, J+1, J+2, J+4, J+7 et J+15.

La première série (crabes C) est mise en contact avec un milieu contaminé à 0,7 mg/l en plomb, pendant toute la durée de l'essai.

La deuxième série (crabes D), après deux jours dans le même milieu, est transférée dans une eau de mer non contaminée.

Dans chaque lot, certains des animaux servent de témoins d'observation, les autres sont destinés à l'analyse.

La durée de cet essai correspond à la durée de vie maximale des animaux dans le milieu contaminé. Malgré une teneur en plomb relativement élevée, les animaux particulièrement vigoureux à leur arrivée au laboratoire ont survécu bien plus longtemps que ceux de l'essai 4 où la teneur en plomb est légèrement supérieure (1 mg/l).

L'expérience a pu être menée pendant quinze jours, ce qui a permis de mettre en évidence des phénomènes qui n'ont pu être observés dans les autres essais.

L'objectif de cet essai est essentiellement de déterminer, au niveau des différentes fractions protéiques, les teneurs en plomb fixé par chaque fraction, et de suivre l'évolution de ces teneurs en fonction du temps de contamination des animaux.

Les résultats de l'essai 1 ayant montré que le transfert des animaux dans une eau non polluée permet une diminution de la teneur en plomb protéique total, il est intéressant de savoir si cette diminution se réalise également avec une concentration 70 fois plus élevée et, le cas échéant, de préciser la fraction protéique concernée.

La même démarche que dans l'essai 1 a été suivie en ce qui concerne les teneurs en cuivre constitutif des protéines plasmatiques.

1.3.1. Etude des électrophorégrammes.

Les électrophorégrammes (figure 11) présentent les modifications déjà constatées dans les essais précédents, concernant la migration des différentes fractions protéiques :

- apparition, dès le premier jour (J+1), d'une légère bande 3 de mobilité inférieure à celle de la bande 2 et à laquelle succèdent plusieurs bandes fines entre le deuxième et le septième jour ;
- disparition progressive de la bande 2 au bout de quinze jours ;
- apparition d'un agrégat protéique au niveau du dépôt.

L'expérience menée sur quinze jours permet de montrer que :

- chez les crabes C contaminés de façon continue, la disparition des bandes 2 et 3 est complète au terme de l'essai,
- chez les crabes D contaminés puis transférés en eau saine, seule la bande 2 réapparaît avec un aspect identique au témoin.

Ces résultats permettent de penser que l'action du plomb se traduit au bout de quinze jours par la précipitation complète de la bande 2, phénomène qui semble être entièrement réversible lorsque la contamination est interrompue et les crabes remis en eau non contaminée au bout de deux jours.

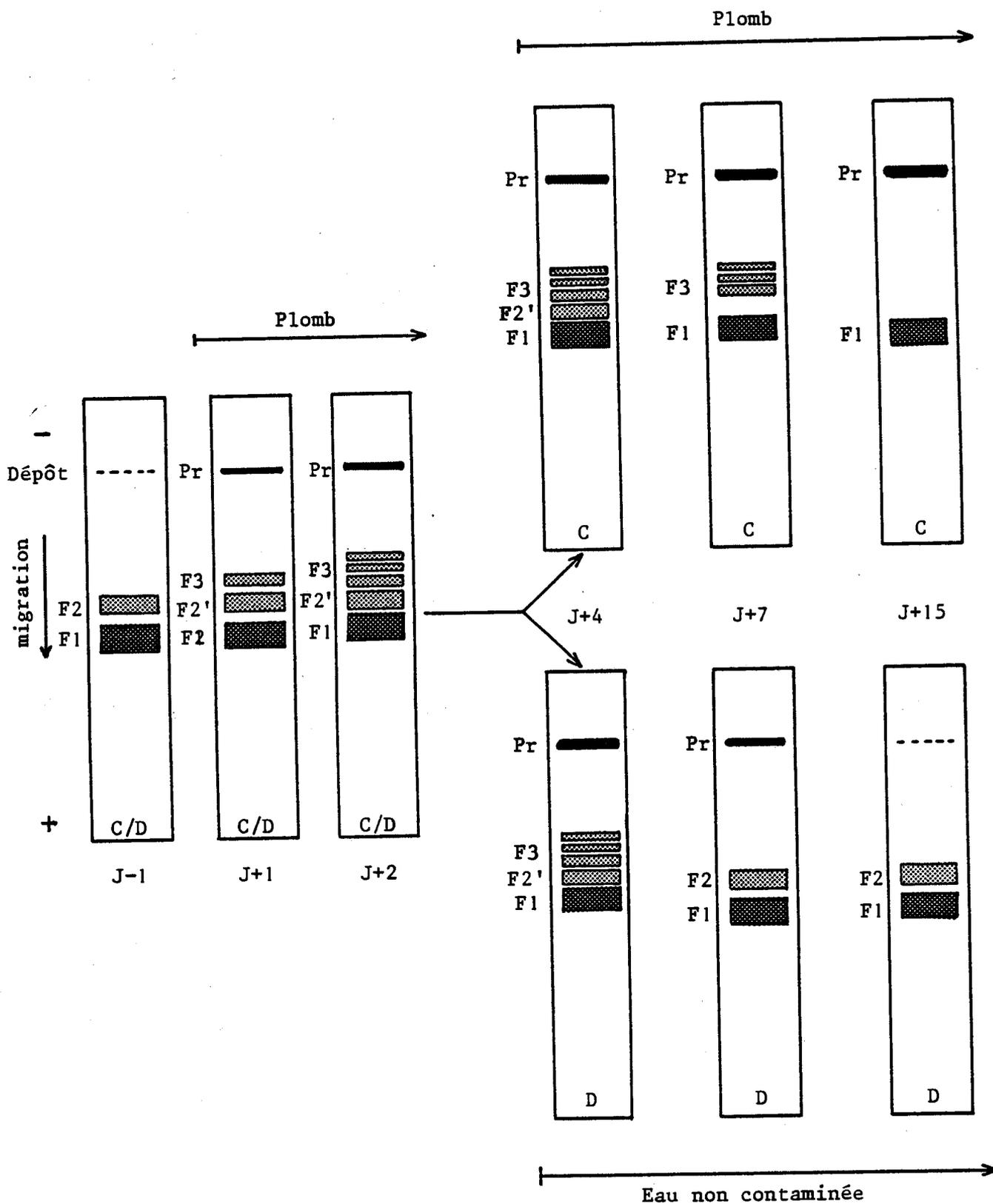


FIGURE 11 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb.
 Protéines plasmatiques séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose, en tampon $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, pH 6,4.

CRABES C : contaminés pendant 15 jours.

CRABES D : contaminés pendant 2 jours.

Pr : précipité.

1.3.2. Dosage des protéines plasmatiques.

Le dosage des protéines a été effectué avant et après centrifugation du plasma, dans les mêmes conditions que l'essai 1 (§ 1.1.2), afin de mettre en évidence la présence de quantités croissantes de protéines sous forme précipitée, en fonction du temps de contamination.

Les résultats du tableau 13 montrent que la teneur en protéines plasmatiques totales reste constante pendant l'essai, pour les deux lots de crabes, alors que celle en protéines précipitées subit des variations significatives. Ces variations se traduisent pour les crabes C, par une augmentation progressive des protéines précipitées ; pour les crabes D, la teneur en protéines précipitées augmente tant qu'ils sont en contact avec l'eau contaminée mais cette teneur diminue dès que ce contact est interrompu et s'annule en cinq jours de décontamination des animaux (tableau 14). Ces premiers résultats concordent avec l'aspect des électrophorégrammes ; nous avons constaté :

- pour les crabes C, l'apparition d'un précipité de plus en plus important entre J et J+15,
- pour les crabes D, le même phénomène pendant les deux jours où les animaux se trouvent dans le milieu contaminé ; le précipité disparaît lorsque les crabes sont transférés en eau non polluée.

L'étude comparée des électrophorégrammes et des concentrations en protéines précipitées confirme et complète les résultats des essais précédents. La fixation du plomb, sur certaines protéines plasmatiques (bande 2), introduit des modifications dans l'état physicochimique de celles-ci, aboutissant à leur précipitation complète au bout de quinze jours de contamination.

C'est le cas des crabes à J+15 : la concentration en protéines précipitées, calculée à ce temps (3,75 mg/ml), correspond donc à la teneur en protéines de la bande 2 ; cette teneur correspond à 5,85 % des protéines plasmatiques totales, le reste étant constitué par les protéines de la bande 1.

TABLEAU 13 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb.
Teneurs en protéines plasmatiques
en mg/ml plasma.

Crabes C		1	2	3	4	\bar{x}	s	CV. %
J-1	Ia	65	68	61	63	64,25	2,98	4,64
	Ib	65	67	61	63	64,00	2,58	4,03
J+2	Ia	65	67	61	63	64,00	2,58	4,03
	Ib	63	65	59	61	62,00	2,58	4,16
J+4	Ia	65	67	61	63	64,00	2,58	4,03
	Ib	62	65	59	60	61,50	2,64	4,29
J+7	Ia	65	67	61	63	64,00	2,58	4,03
	Ib	62	64	58	60	61,00	2,58	4,23
J+15	Ia	65	68	61	63	64,25	2,98	4,64
	Ib	61	63	58	59	60,25	2,21	3,67

Crabes D		6	7	8	9	\bar{x}	s	CV. %
J-1	Ia	64	67	65	67	65,75	1,50	2,28
	Ib	64	67	65	67	65,75	1,50	2,28
J+2	Ia	64	67	65	67	65,75	1,50	2,28
	Ib	62	65	62	65	63,50	1,73	2,72
J+4	Ia	64	67	65	67	65,75	1,50	2,28
	Ib	63	66	64	66	64,75	1,50	2,32
J+15	Ia	64	67	65	67	65,75	1,50	2,28
	Ib	64	67	66	67	66,00	1,41	2,14

Crabes C : contaminés pendant 15 jours

Crabes D : contaminés pendant 2 jours

Ia : Sans centrifugation du plasma

Ib : Après centrifugation du plasma.

TABLEAU 14 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb.
Evolution de la teneur moyenne en
protéines précipitées et de la teneur
moyenne en plomb fixé sur ces protéines.

Crabes C	Ia mg/ml	Ib mg/ml	Ia-Ib mg/ml	$\Delta(Ia-Ib)$ mg/ml	(Pb) _{pr} ug/ml	
J-1	64,25	64,00	0,25		-	
J+2	64,00	62,00	2,00		+ 1,75	0,48
J+4	64,00	61,50	2,50		+ 0,50	1,19
J+7	64,00	61,00	3,00		+ 0,50	2,11
J+15	64,25	60,25	4,00		+ 1,00	2,73
Variation de J-1 à J+15	*	-3,75	+3,75		+2,73	

Crabes D	Ia	Ib	Ia-Ib	$\Delta(Ia-Ib)$	(Pb) _{pr}	
J-1	65,75	65,75	*		-	
J+2	65,75	63,50	2,25		+ 2,25	0,51
J+4	65,75	64,75	1,00		- 1,25	0,47
J+15	65,75	66,00	0,25		- 0,75	-
Variation de J-1 à J+2	*	-2,25	+2,25		+0,51	
J+2 à J+15	*	+2,50	-2,00		-0,51	

Ia-Ib : Protéines précipitées

(Pb)_{pr} : Plomb dosé au niveau du précipité

* : non détectable.

TABLEAU 15 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb, 15 jours.
Teneurs en plomb dans le plasma (II), au niveau des différentes fractions protéiques et du précipité (III).

Crabes C		1	2	3	4	\bar{x}	s	CV. %		
J-1	II	0,013	0,005	0,011	0,007	0,009	0,003	33,33		
	III _t	*	*	*	*	*				
J+1	II	3,40	3,67	3,58	3,65	3,57	0,12	3,44		
	III	F1	0,40	0,36	0,38	0,34	0,37	2,99	6,98	
		F2'	1,82	2,10	2,01	2,04	1,99		0,12	6,08
		F3	0,52	0,70	0,63	0,68	0,63		0,08	12,79
		Pr	*	*	*	*	*			
J+2	II	3,41	3,70	3,60	3,74	3,61	0,14	4,08		
	III	F1	0,37	0,37	0,43	0,39	0,39	3,01	7,25	
		F2'	0,93	1,08	1,03	1,10	1,03		0,07	7,37
		F3	1,50	1,61	1,54	1,72	1,59		0,09	6,06
		Pr	0,45	0,50	0,47	0,50	0,48		0,02	5,10
J+4	II	3,05	3,31	3,27	3,37	3,25	0,13	4,29		
	III	F1	0,39	0,35	0,36	0,53	0,40	1,86	20,85	
		F2'	0,41	0,47	0,33	0,60	0,45		0,11	25,30
		F3	0,85	1,09	1,21	0,85	0,91		0,18	19,78
		Pr	1,20	1,09	1,16	1,31	1,19		0,09	7,73

TABLEAU 15 - Suite

Crabes C		1	2	3	4	\bar{x}	s	CV. %	
J+7	II	3,13	3,08	3,23	3,29	3,18	0,09	2,99	
	III	F1	0,45	0,31	0,35	0,35	0,36	0,97	16,59
		-	-	-	-	-	-		
		F3	0,52	0,58	0,65	0,69	0,61		
	Pr	2,10	2,03	2,13	2,20	2,11	0,06	10,69	
J+15	II	2,82	3,20	3,41	3,37	3,20	0,26	8,41	
	III	F1	0,41	0,33	0,37	0,43	0,38	0,38	11,67
		-	-	-	-	-	-		
		-	-	-	-	-	-		
	Pr	2,37	2,93	2,84	2,80	2,73	0,24	9,13	

II : μgPb total/ml plasma - III : μgPb protéique/ml plasma

F1 : Fraction protéique 1 initiale

F2 : Fraction protéique 2 initiale

F2'

F3 : Fraction protéique 2 décomposée en 2' et 3

Pr : Précipité

* : Non détectable

- : Fraction inexistante.

TABLEAU 16 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb, 2 jours.
Teneurs en plomb dans le plasma (II), au niveau des différentes fractions protéiques et du précipité (III).

Crabes D		6	7	8	9	\bar{x}	s	CV. %			
J-1	II	0,007	0,003	0,012	0,009	0,007	0,003	42,56			
	III	*	*	*	*	*					
J+1	II	3,54	3,69	3,33	3,41	3,49	0,15	4,51			
	III	F1	0,47	0,48	0,34	0,41			0,42	2,91	15,37
		F2'	1,78	1,89	1,73	1,79			1,79		3,74
		F3	0,70	0,75	0,66	0,69			0,70		5,35
		Pr	*	*	*	*			*		
J+2	II	3,59	3,75	3,44	3,32	3,52	0,18	5,29			
	III	F1	0,49	0,45	0,37	0,40			0,42	2,99	12,65
		F2'	1,03	1,10	0,99	0,86			0,99		10,18
		F3	1,55	1,77	1,57	1,45			1,58		8,48
		Pr	0,52	0,47	0,56	0,50			0,51		7,55
J+4	II	1,26	1,42	1,33	1,19	1,30	0,09	7,56			
	III	F1	0,42	0,50	0,32	0,40			0,41	0,70	18,03
		F2'	*	*	*	*			*		
		F3	0,28	0,35	0,29	0,24			0,29		15,68
		Pr	0,50	0,49	0,45	0,47			0,47		4,72

TABLEAU 16 - Suite

Crabes D		6	7	8	9	\bar{x}	s	CV. %	
J+7	II	0,62	0,88	0,77	0,69	0,74	0,11	15,09	
	III	F1	0,41	0,50	0,33	0,42	0,40	0,08	20,55
		F2	*	*	*	*	*		
		-	-	-	-	-	0,40		
	Pr	0,17	0,23	0,27	0,25	0,23	0,04	18,78	
J+15	II	0,51	0,47	0,35	0,44	0,44	0,06	15,46	
	III	F1	0,49	0,46	0,35	0,44	0,43	0,06	14,02
		F2	*	*	*	*	*		
		-	-	-	-	-	0,43		
		-	-	-	-	-	-		

II : μgPb total/ml plasma
 III : μgPb protéique/ml plasma
 - : fraction inexistante
 * : non détectable.

1.3.3. Dosage du plomb.

Les concentrations en plomb, dosées dans le plasma et au niveau des fractions protéiques, sont indiquées dans le tableau 15 pour les crabes C, dans le tableau 16 pour les crabes D.

L'évolution des teneurs moyennes en plomb plasmatique et protéique met en évidence les faits suivants :

- Dès le contact des animaux avec le milieu contaminé, le plasma s'enrichit d'une quantité considérable en plomb dont la majeure partie est fixée par les protéines. Le rapport Pb protéique/Pb plasmatique, égal à 83 % dès le premier jour, atteint 99 % au bout du deuxième jour.
- Le plomb plasmatique atteint à J+2 un maximum qui est d'environ 3,5 µg/ml, soit cinq fois la teneur dans l'eau de mer contaminée. Le maximum en plomb protéique se situe au même temps, ce qui signifie que la quantité en plomb fixée par les protéines est fonction de la teneur en métal dans le plasma.
- A partir de J+4, les différences observées dans les résultats entre les crabes C et D indiquent que les teneurs en plomb plasmatique et protéique, ainsi que la localisation du métal au niveau des différentes fractions protéiques, dépendent de la durée de séjour des animaux dans le milieu contaminé.
- L'ensemble des résultats obtenus par analyse des fractions protéiques solubilisées montre :
 - . que l'on retrouve du plomb, non seulement au niveau des différentes bandes protéiques, mais également au niveau du précipité,
 - . que les concentrations dosées dans les différentes fractions dépendent de la bande protéique considérée ainsi que du temps de séjour des crabes dans l'eau polluée.
- Les courbes de cinétique de fixation du plomb, en fonction du temps de contamination, mettent en évidence les principales différences :
 - . Chez les crabes C (figure 12), maintenus quinze jours en contact avec le plomb, après leur maximum, les concentrations en plomb plasmatique diminuent légèrement et tendent à se stabili-

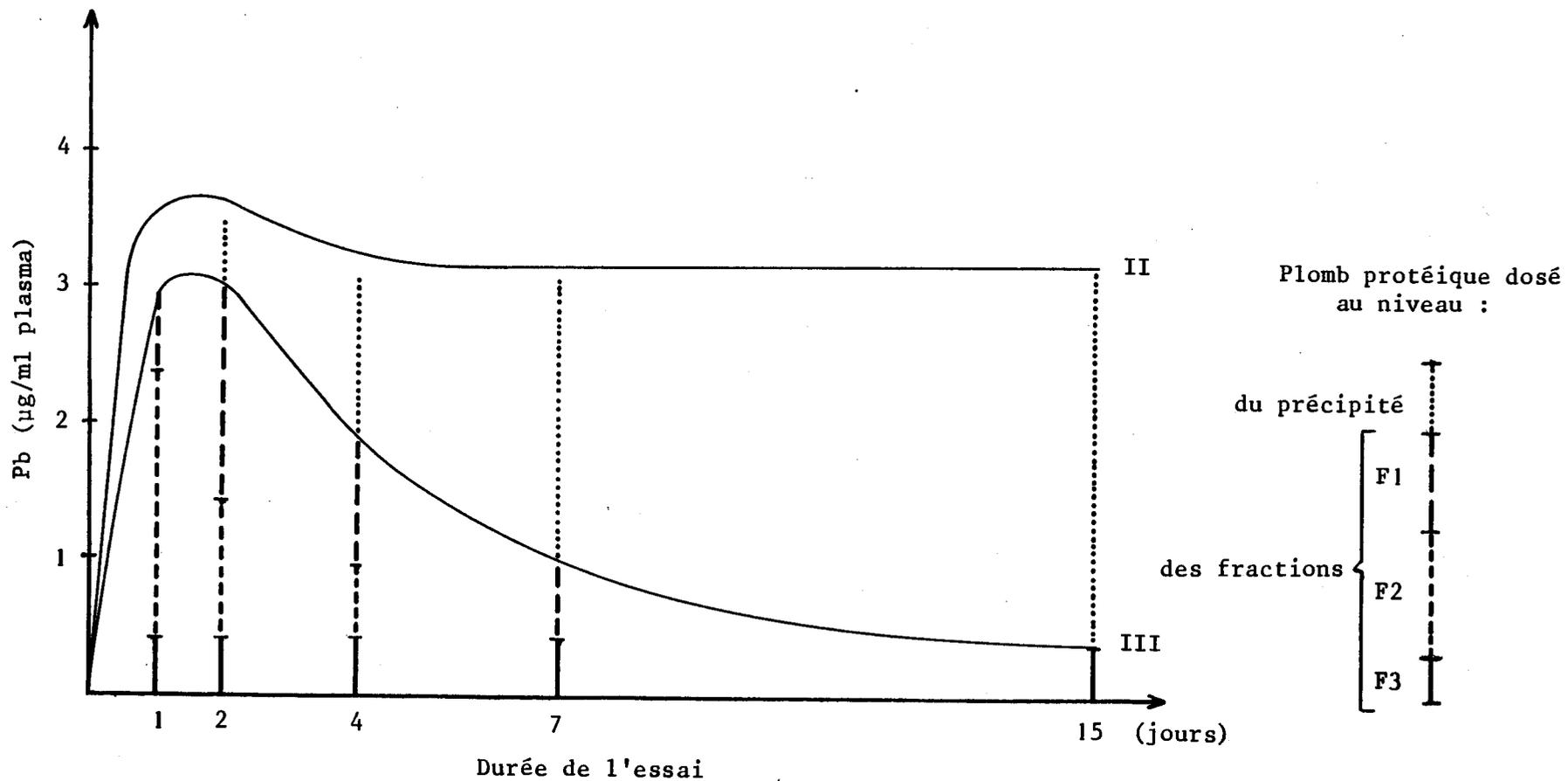


FIGURE 12 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb.
 Evolution des teneurs en plomb plasmatique (II) et en plomb protéique (III) des crabes C contaminés pendant 15 jours.

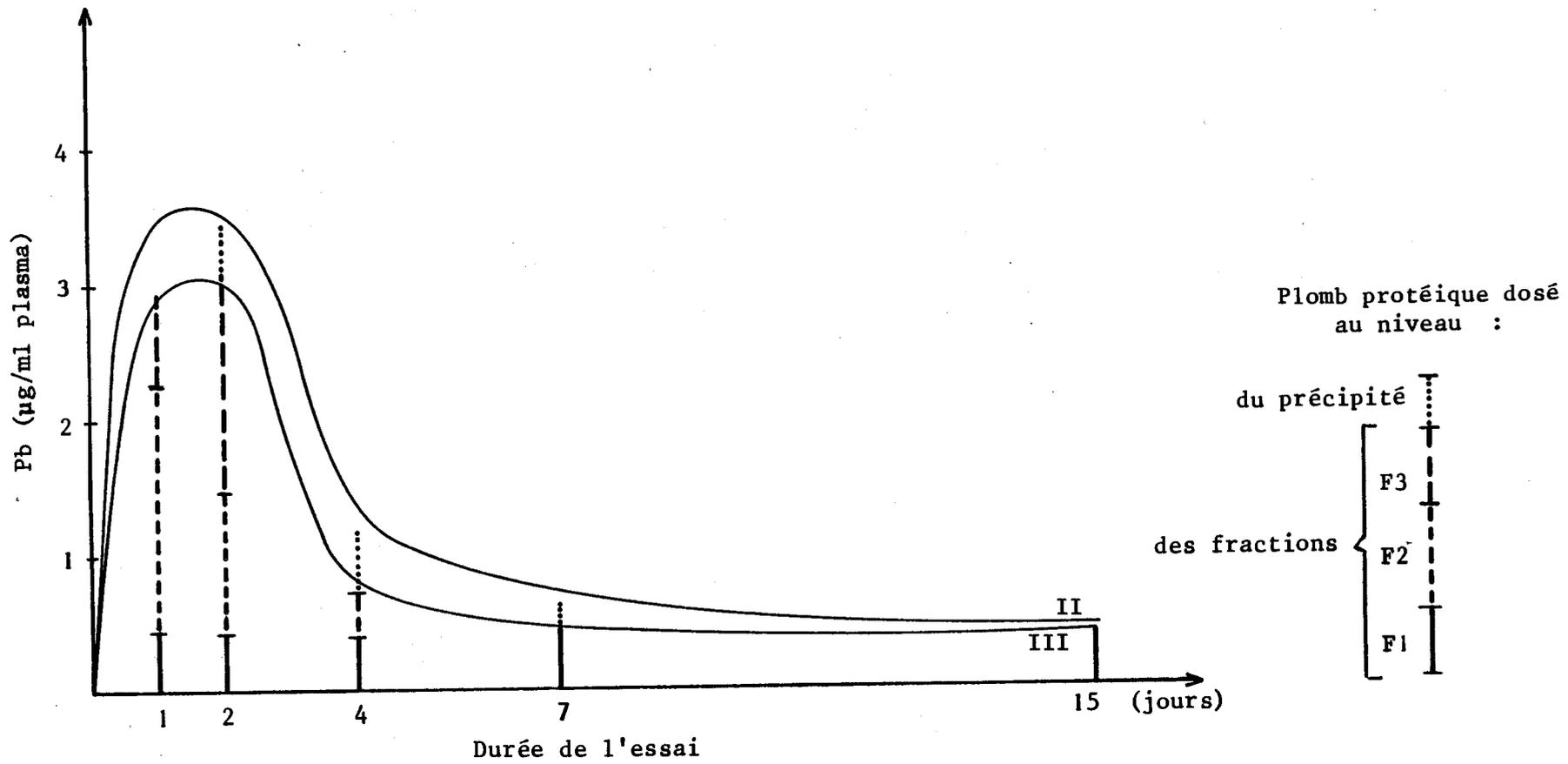


FIGURE 13 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb.
Evolution des teneurs en plomb plasmatique (II) et en plomb protéique (III) des crabes D contaminés pendant 2 jours.

ser entre J+2 et J+15. Dans le même temps, le plomb protéique réparti dans les bandes 1, 2', 3, et dans le précipité est dosé en majeure partie au niveau de ce dernier. A partir de J+2 un phénomène intéressant est noté : la totalité du plomb dosé dans les fractions 1, 2' et 3 (protéines qui ont migré) diminue progressivement à mesure que le plomb dosé dans le précipité augmente dans les mêmes proportions. La chute des teneurs en plomb protéique avait été observée dans les essais 1 et 2 où cet élément avait été dosé sur la totalité des fractions séparées par l'électrophorèse (précipité exclus).

A J+15 les bandes 2 et 3 ayant totalement disparu sur les protéinogrammes, il n'existe donc pas de fraction protéique correspondante. Le plomb protéique est retrouvé dans la fraction 1 et en grande proportion dans le précipité.

- . Chez les crabes D (figure 13), le transfert des animaux dans l'eau non contaminée, au bout de 48 heures, entraîne une très nette diminution du plomb plasmatique entre J+2 et J+15. Ceci se traduit au niveau du plomb protéique par une diminution des concentrations en plomb dosées dans les fractions 2', 3 et Pr. A J+15, la bande 3 et le précipité ayant disparu, seules subsistent la fraction d'origine et la fraction 2 reconstituée. Le plomb protéique à J+15 n'est retrouvé que dans la fraction 1.

Le transfert des crabes dans un milieu non contaminé, après deux jours d'exposition au plomb, fait apparaître des différences remarquables par rapport aux animaux exposés de façon continue pendant quinze jours. Ces différences se situent au niveau de la localisation du plomb dans les différentes fractions protéiques analysées, ainsi que dans la teneur de l'élément dans ces fractions.

Les teneurs dosées dans les fractions protéiques, données en concentrations, ont été exprimées en pourcentage par rapport au plomb protéique total, ce qui permet de mieux comprendre la répartition de l'élément dans ces fractions et ainsi de mettre en évidence les différences apparues à partir de J+4 entre les crabes C et D (tableau 17).

TABLEAU 17 - Eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en plomb.
Répartition du plomb dans les fractions protéiques et dans le précipité en pourcentage par rapport au plomb protéique total.

Crabes	Lot C - contaminé 15 jours					Lot D - contaminé 2 jours				
Analyse Ponction	E	B	F	Pb _F	Pb p.tot.	E	B	F	Pb _F	Pb p.tot.
J-1		Dépôt ↓ 2 1	F2 F1	* *	*		2 1	F2 F1	* *	*
J+1		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	* 21,07 66,56 12,37	2,99		Pr 3 2' 1	F F3 F2' F1	* 24,05 61,51 14,43	2,91
J+2		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	13,75 45,56 29,51 11,17	3,49		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	14,57 45,14 28,29 12,00	3,50
J+4		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	39,02 29,84 14,75 13,11	3,05		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	40,17 24,79 * 35,04	1,17
J+7		Pr 3 1	Pr F3 - F1	68,51 20,00 11,69	3,08		Pr 2' 1	Pr - F2' F1	36,51 * 63,49	0,63
J+15		Pr 1	Pr - - F1	87,78 12,22	3,11		2 1	F2 F1	* 100,00	0,43

E : Electrophorégramme témoin - B : Bande protéique
F : Fractions protéiques - Pr : précipité
Pb_F : Plomb dosé dans les fractions protéiques et dans le précipité
plomb protéique total (%)
Pb_{p.tot.} : Plomb protéique total (µg/ml plasma)
* : non détectable.

Entre J et J+2.

Lorsque tous les animaux se trouvent dans l'eau contaminée, les pourcentages en plomb dosé dans les fractions 1, 2, 2', 3 et le précipité sont pratiquement égales entre les crabes C et D. Il est possible de les comparer car la teneur en plomb protéique totale est la même pour les deux lots.

- Le plomb dosé dans la fraction 1 correspond à 12 % du plomb protéique total et reste constant de J à J+2.
- Le plomb dosé dans la fraction 2 diminue au profit de la fraction 3 et du précipité dans les proportions indiquées dans le tableau 18.

TABLEAU 18 - Variation des teneurs en plomb dans les fractions protéiques 2', 3 et dans le précipité entre J et J+2.
Le plomb est exprimé en pourcentage par rapport au plomb protéique total dans les crabes C et D.

	Fractions		F2' %	F3 %	Pr %
	Temps				
Crabes C	J+1		66,56	21,07	*
	J+2		29,51	45,56	13,75
	Δ totale de J à J+2		-37,05	+24,49	+13,75
Crabes D	J+1		61,55	24,05	*
	J+2		28,29	45,14	14,57
	Δ totale de J à J+2		-33,26	+21,09	+14,57

Conclusion :

L'étude entre J et J+2 de la variation totale des teneurs dans les fractions 2', 3 et dans le précipité indique que la quantité en plomb qui diminue dans la fraction 2' correspond à celle retrouvée dans la fraction 3 et dans le précipité.

Entre J+2 et J+15.

- Chez les crabes C qui restent dans l'eau contaminée, les variations observées entre J et J+2 s'accroissent jusqu'à la disparition totale des bandes 2' et 3 ; c'est au niveau du précipité que l'on retrouve la totalité du plomb dosé dans ces deux fractions, entre J+4 et J+7 (tableau 19).

TABLEAU 19 - Variation des teneurs en plomb dans les fractions protéiques F2', F3 et dans le précipité, entre J+2 et J+15, dans les crabes C.

Fractions Temps	F2' %	F3 %	Pr %
J+4	14,75	29,84	39,06
J+7	-	10,06	68,51
J+15	-	-	87,78
Δ totale de J+4 à J+15	-14,75	-29,84	+48,76
	-44,59		

A J+15, après disparition complète des bandes 2' et 3, on retrouve dans le précipité 87,78 % du plomb protéique total, pourcentage qui correspond à la totalité du plomb dosé initialement dans les fractions 2' et 3 (21,07 % + 66,56 % = 87,63 %).

En conclusion aux résultats obtenus chez les crabes C, nous pouvons dire que les variations observées entre J et J+15, sur les concentrations en plomb dans les fractions protéiques 2', 3 et dans le précipité, sont relatives puisqu'elles se rapportent à une concentration en plomb protéique totale qui reste constante.

Ces variations résultent d'une différence de répartition du plomb dans les trois fractions, en fonction du temps de contamination. En définitive, elles traduisent la précipitation progressive des protéines de la bande 2 initiale, après que celle-ci ait fixé une quantité maximale de plomb au bout de deux jours de contamination des animaux.

- Chez les crabes D, deux jours après le transfert des animaux dans l'eau non contaminée, on peut déjà constater les différences avec les crabes C au niveau des teneurs en plomb protéique. Entre J+2 et J+4 les variations des concentrations, dans les fractions 2', 3 et dans le précipité, vont dans le même sens que celui noté chez les crabes C, dans la même période (diminution du plomb dans F2' et F3, augmentation dans le précipité), mais la teneur en plomb protéique total a diminué de 66 % par rapport à J+2.

Le transfert des animaux permet donc une diminution considérable des teneurs en plomb protéique, variation qui se traduit par une élimination complète de l'élément dans la fraction 2' (bien que la bande 2 reste apparente sur les électrophorogrammes), ainsi qu'une diminution de 80 % dans le précipité par rapport à J+2.

Entre J+4 et J+15 la bande 3 et le précipité ayant disparu sur les électrophorogrammes, alors que ceux-ci présentent une bande 2 identique à J-1, les seules fractions protéiques analysées sont donc F1 et F2. Le plomb n'étant pas détectable dans la fraction 2, le plomb protéique total est donc égal à la teneur dosée dans la fraction 1 qui est constante entre J+1 et J+15.

A la suite de cette étude menée sur l'évolution des teneurs en plomb, dans chaque fraction protéique, les différences observées entre les crabes C et D peuvent s'expliquer de la manière suivante :

- En ce qui concerne les teneurs en plomb protéique total, celles-ci dépendent de la teneur en plomb dans le plasma, elle-même fonction de la concentration en métal dans le milieu. Une augmentation de la concentration en plomb dans le milieu entraîne un enrichissement du plasma et une fixation de l'élément au niveau des protéines ; une diminution de cette concentration entraîne une diminution des quantités de plomb fixées ainsi que l'élimination de ces quantités hors du plasma.
- En ce qui concerne la localisation du métal dans les différentes fractions protéiques,
 - . si le contact des animaux est continu, une fois fixé aux protéines, que ce soit au niveau de la bande 1 ou de la bande 2 ini-

tiales, le plomb y reste lié par la suite ;

- . si les animaux sont transférés en eau non contaminée, le plomb reste lié aux protéines de la bande 1 mais il est éliminé au niveau de la bande 2.

L'étude comparative des résultats entre les crabes C et D, sur quinze jours d'essai, permet de conclure que la présence du plomb dans le plasma et sa fixation au niveau de la bande 2 sont bien à l'origine de la précipitation des protéines de cette bande. Chez les crabes transférés en eau non contaminée, l'aspect normal des électrophorogrammes à J+15, ainsi que l'élimination complète des quantités de plomb initialement fixées sur la bande 2, témoignent de l'action du plomb sur les protéines de cette bande.

1.3.4. Dosage du cuivre.

Le cuivre a été dosé dans tous les échantillons analysés dans cet essai, plasmas, fractions protéiques (1, 2, 2', 3) et précipité, aux temps J-1, J+2, J+4, J+7, J+15.

Les résultats obtenus par analyse des fractions protéiques correspondent aux teneurs en cuivre constitutif des protéines plasmatiques.

Il s'agit de déterminer quantitativement la concentration en cuivre protéique total ainsi que la répartition de l'élément dans les fractions 1 et 2 initiales, puis d'étudier l'évolution de ces concentrations en fonction du temps de contact des animaux avec le plomb.

Les tableaux 20 et 21 indiquent, pour les crabes C et D, les teneurs en cuivre dosées dans les fractions protéiques et dans le précipité.

Le tableau 22 donne la concentration en cuivre plasmatique total ainsi que le pourcentage du métal dans les fractions 1 et 2 (F2 étant la somme de F2', F3 et du précipité).

Les résultats montrent qu'au temps témoin J-1 le plasma contient, en moyenne 75 µg/ml de cuivre dont la majeure partie, 88 %, est fixée au niveau des protéines de la bande 1 et les 11 % restant au niveau de la bande 2. Notons que le cuivre protéique total (F1 + F2) est égal au cuivre plasmatique, ce qui signifie que la totalité du métal dosé dans

TABLEAU 20 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb, 15 jours.
Teneurs en cuivre des différentes fractions protéiques
et du précipité.

Crabes C		1	2	3	4	\bar{x}	s	CV. %	
J-1	F1	63	66	70	50	62,25	8,65	13,90	
	F2	8,31	8,03	8,73	6,46	7,88	0,99	12,58	
J+2	F1	63	66	70	50	62,25	8,65	13,90	
	F2	F2'	2,70	2,65	2,90	2,16	2,60	0,31	12,08
		F3	4,00	4,12	4,36	3,26	3,93	0,47	12,07
		Pr	1,52	1,15	1,49	0,99	1,28	0,25	20,30
J+4	F1	63	66	70	50	62,25	8,65	13,90	
	F2	F2'	1,35	1,39	1,40	1,12	1,31	0,13	10,06
		F3	2,90	2,85	3,15	2,29	2,79	0,36	12,90
		Pr	3,92	3,65	4,05	3,00	3,65	0,46	12,80
J+7	F1	63	65	69	50	61,75	8,22	13,31	
	F2	-	-	-	-	-	-	-	
		F3	1,39	1,42	1,56	1,28	1,41	0,11	8,18
J+15	F2	Pr	6,85	6,57	7,20	5,15	6,44	0,89	13,97
		-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-
J+15	F2	Pr	8,48	7,96	8,81	6,40	7,91	1,06	13,49
		-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-

F1
F2

F2'
F3
Pr

µg cuivre protéique/ml plasma.

TABLEAU 21 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb, 2 jours.
Teneurs en cuivre des différentes fractions protéiques
et du précipité.

Crabes D		6	7	8	9	\bar{x}	s	CV. %		
J-1	F1	64	66	73	72	68,75	4,42	6,49		
	F2	7,97	8,45	9,70	9,45	8,89	8,18	9,21		
J+2	F1	64	66	73	72	68,75	4,42	6,49		
	F2	F2'	2,65	2,80	3,29	3,17	2,97	8,80	0,30	10,17
		F3	3,90	4,22	4,87	4,75	4,43		0,45	10,27
		Pr	1,35	1,39	1,46	1,42	1,40		0,04	3,32
J+4	F1	64	66	73	72	68,75	4,42	6,49		
	F2	F2'	1,30	1,42	1,61	1,50	1,45	8,77	0,13	9,02
		F3	4,25	4,56	5,09	4,92	4,70		0,37	7,87
		Pr	2,37	2,40	2,89	2,85	2,62		0,28	10,72
J+7	F1	64	66	73	73	69,00	4,69	6,80		
	F2	F2'	7,95	8,39	9,81	9,36	8,87	8,87	0,85	9,58
		-	-	-	-	-	-		-	-
		Pr	*	*	*	*	*		-	-
J+15	F1	64	66	73	72	68,75	4,42	6,49		
	F2	F2'	7,80	8,49	9,62	9,55	8,86	8,86	0,87	9,91
		-	-	-	-	-	-		-	-
		-	-	-	-	-	-		-	-

F1

F2

F2'
F3
Pr

µg cuivre protéique/ml plasma.

TABLEAU 22 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb.
Teneurs en cuivre total dans le plasma (P1) et
pourcentage de cuivre dans les fractions pro-
téiques F1 et F2.

Crabes C		1	2	3	4	\bar{x}	s	CV. %
J-1	P1	72	74	79	57	70,50	9,46	13,42
	F1/P1	87,50	89,19	88,61	87,72	88,25	0,78	0,88
	F2/P1	11,52	10,81	11,12	11,32	11,19	0,30	2,71
J+2	P1	72	74	78	57	70,25	9,17	13,05
	F1/P1	87,50	88,19	89,74	87,72	88,28	1,01	1,14
	F2/P1	11,38	10,90	11,16	11,35	11,19	0,22	1,97
J+4	P1	72	74	78	57	70,25	9,17	13,05
	F1/P1	87,50	88,19	88,61	87,72	88,00	0,49	0,56
	F2/P1	11,41	10,66	10,96	11,19	11,05	0,32	2,91
J+7	P1	72	74	78	57	70,25	9,17	13,05
	F1/P1	87,50	87,84	88,46	87,72	88,13	0,40	0,45
	F2/P1	11,42	10,75	11,17	11,20	11,13	0,27	2,51
J+15	P1	72	74	78	57	70,25	9,17	13,05
	F1/P1	87,50	88,19	88,61	87,72	88,25	0,78	0,88
	F2/P1	11,74	10,70	11,21	11,18	11,20	0,42	3,79

Crabes D		6	7	8	9	\bar{x}	s	CV. %
J-1	P1	72	75	83	82	78,00	5,35	6,86
	F1/P1	88,89	88,00	87,95	87,80	88,16	0,49	0,56
	F2/P1	10,99	11,31	11,69	11,49	11,37	0,29	2,55
J+2	P1	72	75	83	82	78,00	5,35	6,86
	F1/P1	88,89	88,00	87,95	87,80	88,16	0,49	0,56
	F2/P1	10,91	11,25	11,59	11,39	11,28	0,28	2,54
J+4	P1	72	75	83	82	78,00	5,35	6,86
	F1/P1	88,89	88,00	87,95	87,80	88,16	0,49	0,56
	F2/P1	10,93	11,24	11,58	11,31	11,26	0,26	2,37
J+7	P1	73	75	83	82	78,25	4,99	6,38
	F1/P1	87,87	88,00	88,95	87,89	88,16	0,49	0,56
	F2/P1	10,96	11,23	11,84	11,37	11,35	0,36	3,25
J+15	P1	72	75	83	82	78,00	5,35	6,86
	F1/P1	87,89	88,00	87,95	87,80	88,16	0,49	0,56
	F2/P1	10,76	11,36	11,60	11,63	11,33	0,40	3,56

P1 : μg cuivre total/ml plasma

F1/P1 et F2/P1 : %

F1 et F2 correspondent aux résultats moyens des tableaux 20 et 4.

le plasma se situe au niveau des protéines, ce qui confirme les résultats de l'essai 1 (§ 1.1.4). Ces valeurs sont relativement homogènes pour l'ensemble des crabes C et D.

L'évolution de ces teneurs, en fonction du temps de contamination, est fort intéressante. Les faits les plus remarquables sont les suivants :

- entre J et J+15, le cuivre dosé dans la fraction 1 reste constant, que ce soit chez les crabes C ou les crabes D ;
- entre J+2 et J+15, la somme des concentrations en cuivre dosé dans les fractions 2', 3 et dans le précipité est constante et égale à la valeur trouvée initialement dans la fraction 2. Les variations observées pour chaque fraction résultent donc d'une répartition différente d'une même quantité de cuivre protéique initiale, aussi bien pour les crabes C que pour les crabes D.

Les figures 14 et 15 illustrent l'évolution des teneurs en cuivre dans les différentes fractions analysées pour les deux lots d'animaux.

Les différences entre le lot C exposé quinze jours et le lot D exposé deux jours au plomb apparaissent à J+4 et se situent au niveau des teneurs en cuivre dans les fractions 2', 3 et précipité, et au niveau de la localisation de l'élément dans ces fractions.

Les concentrations en cuivre dans les fractions 2', 3 et précipité, exprimées en pourcentage par rapport au cuivre protéique total, permettent de mettre en évidence ces différences ; les résultats indiqués dans le tableau 23 complètent les deux observations faites précédemment :

- le cuivre protéique total est constant entre J-1 et J+15 pour la totalité des crabes,
- le pourcentage de cuivre dans la fraction 1, égal à 89 % de la teneur en cuivre protéique total, reste constant, quel que soit le temps de contamination,
- le pourcentage de cuivre initial dans la fraction 2 est égal à 11 % du cuivre protéique total. A J+15, ce même pourcentage est retrouvé dans le précipité chez les crabes C, dans la fraction 2' chez les crabes D.

Une étude détaillée des résultats entre J+1 et J+15 permet de suivre la répartition des teneurs en cuivre dans chaque fraction.

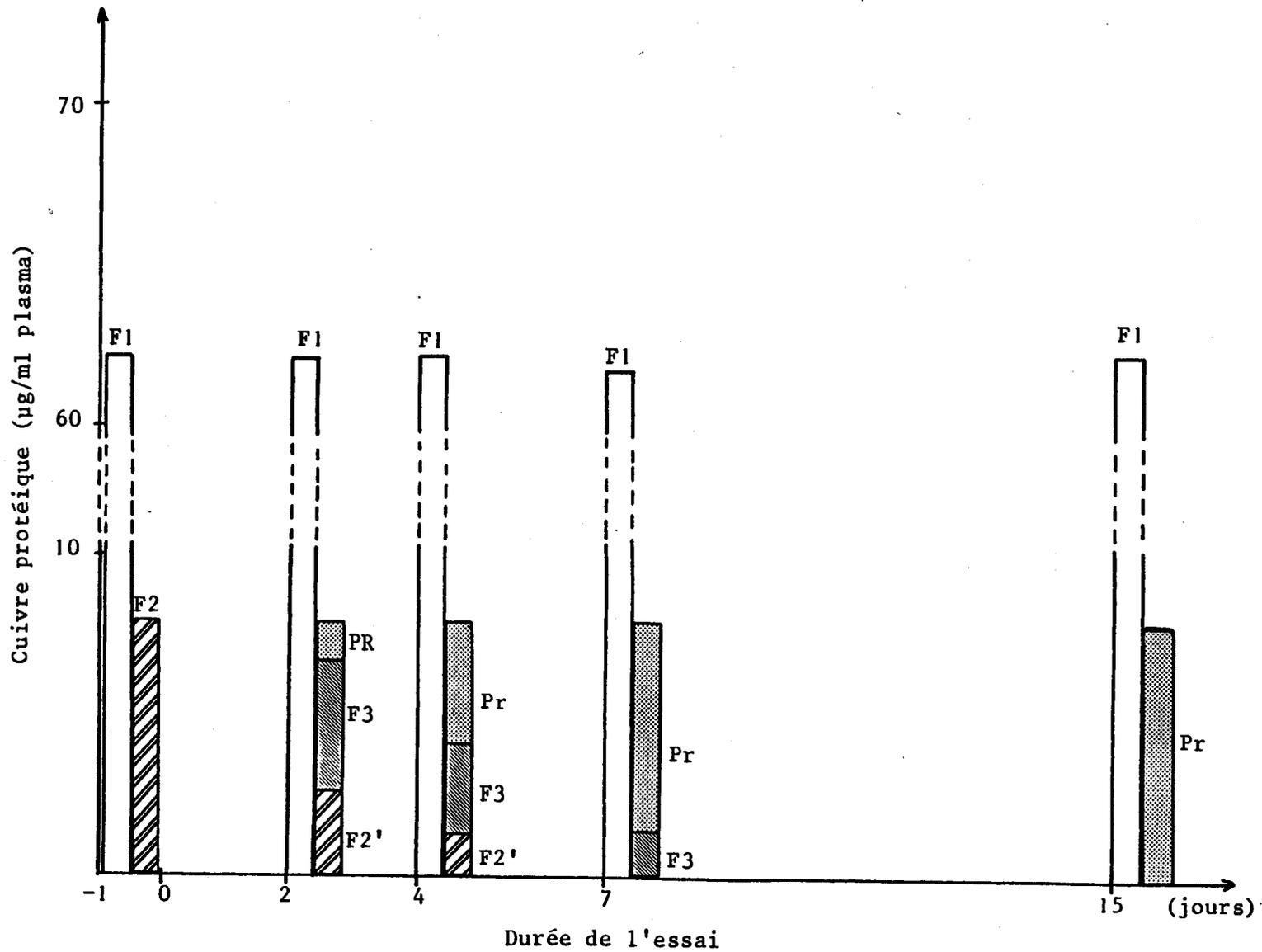


FIGURE 14 - Contamination par une eau de mer à 0,7 mg/l en plomb pendant 15 jours. Evolution des teneurs en cuivre dans les fractions protéiques (F1, F2, F2', F3) et dans le précipité (Pr).

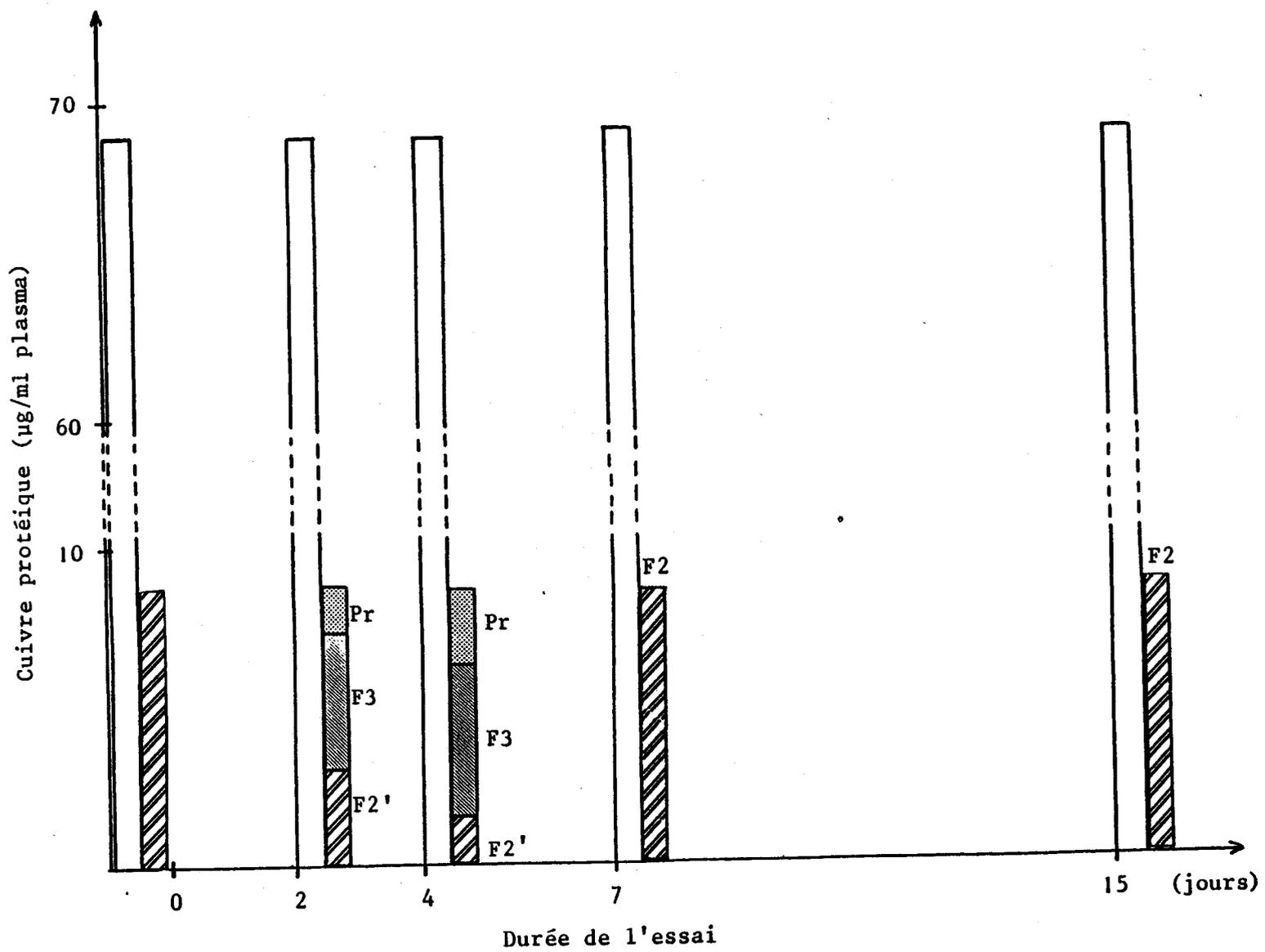


FIGURE 15 - Contamination par une eau de mer à 0,7 mg/l en plomb pendant 2 jours. Evolution des teneurs en cuivre dans les fractions protéiques (F1, F2, F2', F3) et dans le précipité (Pr).

TABLEAU 23 - Eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en plomb.
Répartition du cuivre dans les fractions protéiques et dans
le précipité en pourcentage par rapport au cuivre protéique
total.

Crabes Analyse Ponction	Lot C - contaminé 15 jours					Lot D - contaminé 2 jours				
	E	B	F	Cu _F	Cu p.tot.	E	B	F	Cu _F	Cu p.tot.
J-1		2 1	F2 F1	11,24 88,76	70,13		2 1	F2 F1	11,60 89,59	76,64
J+2		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	1,83 5,61 3,71 88,85	70,06		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	1,81 5,71 3,83 88,65	77,55
J+4		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	5,21 3,99 1,87 88,93	70,00		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	0,95 5,12 5,24 88,69	77,52
J+7		Pr 3 1	Pr F3 F1	9,25 2,03 88,72	69,60		Pr 2' 1	Pr F2' F1	* 11,39 88,61	77,87
J+15		Pr 1	Pr F1	11,27 88,73	70,16		2 1	F2 F1	11,55 89,62	76,71

Cu_F : Cuivre dosé dans les fractions protéiques et dans le précipité
cuivre protéique total (%)

Cu_{p.tot.} : Cuivre protéique total (µg/ml plasma).

- Chez les crabes C, la comparaison des pourcentages en cuivre, dans les fractions 2', 3 et dans le précipité, entre J+2 et J+7 (tableau 24), montre que la somme des quantités qui ne sont plus détectées dans les fractions 2' et 3, correspond à la totalité du cuivre dosé dans le précipité.

TABLEAU 24 - Variation des teneurs en cuivre exprimées en pourcentage par rapport au cuivre protéique total, dans les fractions protéiques F2', F3 et Pr, entre J+2 et J+7, dans les crabes C.

Fractions Temps	F2' %	F3 %	Pr %
J+2	3,71	5,61	1,83
J+4	1,87	3,99	5,21
J+7	-	2,03	9,25
Δ totale de J+2 à J+7	-3,71	-3,58	+7,42
	-7,29		

Comme sur les électrophorégrammes, les bandes 2' et 3 disparaissent progressivement alors que se forme le précipité et que, dans le même temps, le cuivre dans les fractions 2' et 3 diminue proportionnellement à l'augmentation de cet élément dans le précipité, nous pouvons émettre l'hypothèse que les protéines constituant le précipité proviennent des bandes 2' et 3.

De plus, le fait que l'on retrouve le même pourcentage en cuivre dans le précipité, à J+15, que dans la fraction 2 initiale, nous précise que les protéines du précipité sont issues de la bande 2 qui s'est décomposée en bandes intermédiaires 2' et 3 entre J et J+7.

- Chez les crabes D, deux jours après le transfert des animaux en eau non contaminée, le pourcentage de cuivre augmente dans F2', alors qu'il diminue dans F3 et dans le précipité. Ce phénomène s'accroît jusqu'à J+7 ; la somme du pourcentage en cuivre disparu dans F3 et dans le précipité correspond au pourcentage du cuivre apparu dans F2' (tableau 25).

TABLEAU 25 - Variation des teneurs en cuivre exprimées en pourcentage par rapport au cuivre protéique total, dans les fractions protéiques F2', F3 et Pr, entre J+2 et J+7, dans les crabes D.

Fractions Temps	F2' %	F3 %	Pr %
J+2	3,83	5,71	1,81
J+4	5,24	5,12	0,95
J+7	11,39	*	*
Δ totale de J+2 à J+7	+7,56	-5,71	-1,81
		-7,52	

L'ensemble des résultats obtenus par dosage du cuivre mène aux conclusions suivantes :

- Quelle que soit la durée de séjour des animaux dans l'eau contaminée en plomb et, par conséquent, quelles que soient les teneurs en plomb fixées par les protéines, la concentration en cuivre protéique total reste constante durant l'essai.
- Chez les crabes contaminés pendant quinze jours, les variations en cuivre observées dans les fractions 2', 3 et dans le précipité s'expliquent par la décomposition progressive de la bande 2 en bandes intermédiaires 2' et 3 et par la précipitation des protéines de cette bande.
- Chez les crabes remis en eau non contaminée, les variations en cuivre observées dans ces mêmes fractions s'expliquent par le phénomène inverse, c'est-à-dire par la reconstitution d'une bande 2 qui s'accompagne de la disparition de la bande 3 et du précipité.
- Les résultats obtenus par dosage du cuivre dans les fractions protéiques ont permis d'apporter certaines précisions concernant les modifications observées dans l'aspect des électrophorégrammes, entre J et J+15 : apparition des bandes 2', 3 et du précipité, ainsi que la disparition progressive de la bande 2.

1.4. ESSAI 4 : Eau de mer contaminée à 1 mg/l en plomb.

Comme dans chaque essai, une expérience préalable a été réalisée en mettant en contact un lot de crabes dans une eau de mer contaminée à la concentration en plomb étudiée afin d'observer le comportement des animaux dans ce milieu et de noter leur durée de vie. Ce test, répété plusieurs fois sur des lots différents, a révélé que la mortalité affecte les animaux entre trois et quatre jours d'essai, c'est-à-dire beaucoup plus vite que dans l'essai 3, lorsque les animaux sont contaminés avec une concentration en plomb de 0,7 mg/l.

L'étude cinétique a donc été faite sur trois jours ; le but de cet essai était simplement de confirmer les phénomènes généraux observés dans les autres essais, par le dosage des protéines plasmatiques totales et celui du plomb plasmatique et protéique.

Les résultats du tableau 26 montrent que :

- les protéines plasmatiques totales ont une teneur pratiquement constante pendant la durée de l'essai ;
- l'accumulation du plomb, dans le plasma, et sa fixation au niveau des protéines, pendant les trois premiers jours de contamination, suivent une cinétique identique à celle observée dans les essais précédents (figure 16).

En effet, on retrouve de fortes quantités de plomb dans les plasmas, dès le premier jour de contact avec le milieu contaminé. La concentration plasmatique maximale est d'environ 5 µg/ml, soit cinq fois plus que la teneur en plomb dans le milieu contaminé et 396 fois plus par rapport à celle du plasma initial.

Ce plomb se situe, en majeure partie, au niveau des protéines.

La comparaison des résultats, aux trois temps étudiés, montre, pour l'ensemble des crabes, une phase d'augmentation des concentrations pendant les deux premiers jours, suivie d'une phase légèrement décroissante.

L'observation des électrophorégrammes (figure 17) montrent les modifications déjà constatées dans les essais précédents :

TABLEAU 26 - Eau de mer à 1 mg/l en plomb.
Teneurs en protéines plasmatiques (I), en plomb dans le plasma (II)
et en plomb au niveau des protéines plasmatiques (III).

Crabe		1	2	3	4	5	\bar{x}	s	CV. %
Analyse									
J-1	I	57	56	65	53	61	58,40	4,66	7,98
	II	0,007	0,016	0,015	0,009	0,020	0,013	0,004	30,00
	III	*	*	*	*	*	*	*	*
J+1	I	58	56	65	53	61	59,60	4,61	7,73
	II	4,28	3,46	1,14	4,30	2,48	3,13	1,34	42,81
	III	3,93	2,80	0,73	3,88	1,96	2,66	1,35	50,91
J+2	I	57	56	64	53	61	58,20	4,32	7,42
	II	5,12	5,10	5,30	4,50	5,77	5,15	0,45	8,74
	III	4,80	(8,46)	5,10	4,00	4,50	4,60	0,40	8,70
J+3	I	57	56	65	53	61	58,40	4,66	7,98
	II	4,76	5,34	5,43	2,28	4,34	4,43	1,28	28,89
	III	4,70	3,83	3,13	1,40	3,46	3,30	1,21	36,82

I : mg/ml plasma - II : μgPb total/ml plasma - III : μgPb protéique/ml plasma
* : non détectable.

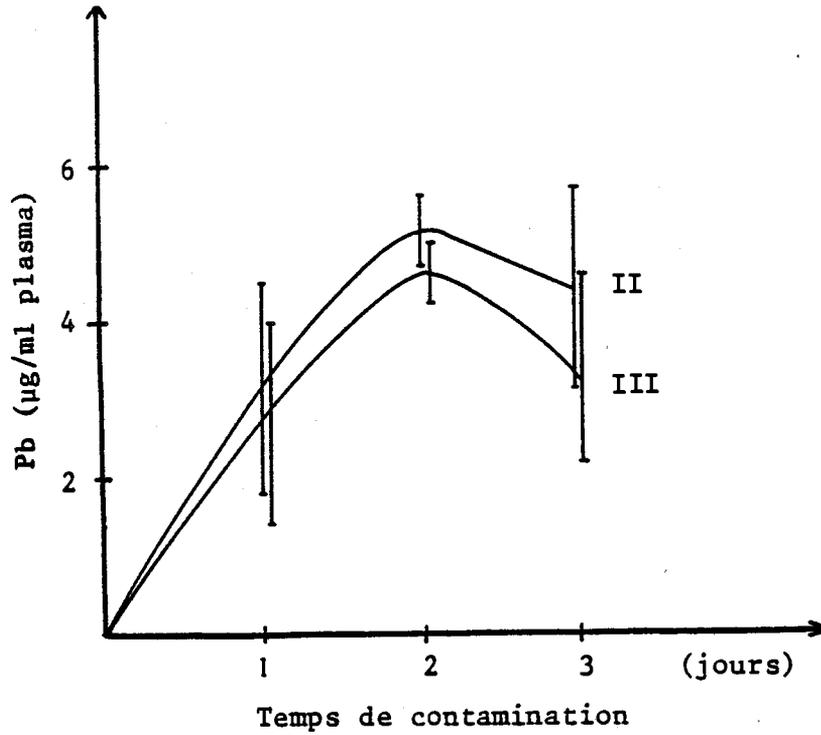


FIGURE 16 - Eau de mer à 1 mg/l. en plomb
Evolution des teneurs en plomb plasmatique (II) et en plomb protéique (III).

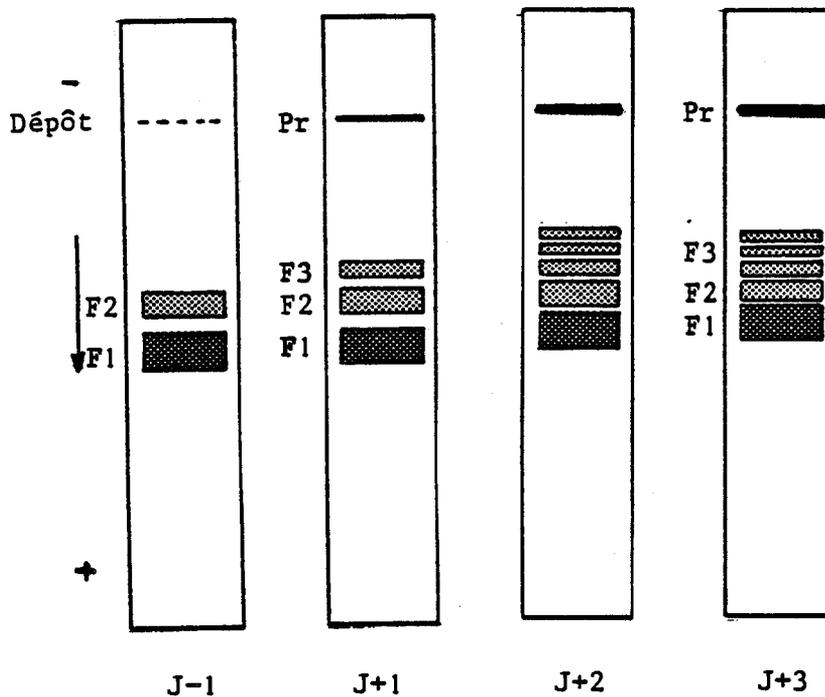


FIGURE 17 - Contamination des crabes par une eau de mer à 1 mg/l en plomb pendant 3 jours. Protéines plasmatiques séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose, en tampon $\text{PO}_4\text{H}_2\text{H}$, pH 6,4.

- apparition, dès le premier jour, d'une nouvelle bande 3, antérieure à la bande 2 initiale, puis de plusieurs bandes plus fines aux deuxième et troisième jours ;
- formation d'un précipité.

Remarque : Dans chaque essai, l'eau de mer contaminée a été analysée :

- avant introduction des animaux afin de vérifier que la teneur initiale en plomb corresponde effectivement à la teneur étudiée ;
- au cours de l'essai de contamination pour essayer de mettre en évidence une variation de la teneur en plomb dans l'eau due à l'absorption de l'élément par les crabes.

La différence entre les deux teneurs est trop faible pour pouvoir être détectée, même dans le cas de la plus forte absorption par les crabes (essai 4 : contamination par 1 mg/l en plomb).

1.5. CONCLUSION.

Les essais de contamination des crabes par une eau de mer dont la teneur en plomb varie de 0,01 à 1 mg/l, ont permis de mettre en évidence une concentration de l'élément dans le plasma, ainsi que sa fixation au niveau des protéines plasmatiques, suivant des modalités identiques pour les quatre teneurs étudiées.

Les concentrations en plomb plasmatique et protéique des animaux contaminés dépendent de la teneur de l'élément dans le milieu. L'étude cinétique montre, qu'après deux jours d'augmentation, le plomb plasmatique se stabilise à la teneur maximale en plomb protéique.

La comparaison des électrophorégrammes a mis à jour un phénomène intéressant : l'action du plomb sur les protéines plasmatiques se traduit par une diminution de leur mobilité électrophorétique ainsi que leur précipitation. Ces modifications n'affectent qu'une des fractions protéiques (fraction 2), alors que le dosage du plomb indique la présence du métal sur les fractions 1 et 2.

Les essais 2 et 4 montrent que le transfert des animaux dans une eau non polluée, après que les protéines aient fixé une quantité maximale de plomb, permet une décontamination qui se traduit sur la fraction 2 par l'élimination totale du plomb, alors que sur la fraction 1, le plomb reste fixé de façon irréversible.

La fixation du plomb sur les protéines des fractions 1 et 2 initiales n'a pas d'effet sur la teneur en cuivre de ces protéines, ni en fonction du temps de contamination des animaux, ni en fonction de la concentration de l'élément dans l'eau.

2. ACTION DU FER.

2.1. ESSAI 5 : Eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en fer.

Un essai préalable a été effectué sur deux lots de crabes témoins, non ponctionnés, mis en contact avec une eau contaminée à 0,7 mg/l en fer :

- le premier lot de façon continue afin d'observer le comportement des animaux et de noter leur durée de vie dans le milieu,
- le second lot pendant un temps déterminé avant d'être transféré dans une eau non contaminée.

Ce test a révélé :

- que les animaux perdaient leur vigueur au bout de 24 heures et que la mortalité a affecté la totalité du premier lot entre 3 et 5 jours,
- que le transfert des animaux dans un milieu non contaminé en fer, dès que ceux-ci manifestent une diminution de leurs activités physiques (entre 1 et 4 jours) permettait de prolonger leur durée de vie d'une quinzaine de jours.

En définitive, l'essai a été réalisé sur deux lots de crabes séjournant dans une eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en fer :

- le premier lot (E) a été transféré dans une eau non contaminée au bout de deux jours, à titre de comparaison avec l'essai 3 sur l'action du plomb ;
- le deuxième lot (F) a été transféré au bout de quatre jours afin de voir si cette opération, menée un jour avant que la mortalité n'intervienne, permet une décontamination des animaux au niveau du plasma.

La durée totale de l'essai correspond à la durée de vie maximale des crabes dans les conditions expérimentales.

Les crabes ont été ponctionnés aux temps J-1, J+1, J+2, J+4, J+7, J+15. Les analyses effectuées sur les échantillons de plasma et les fractions solubilisées portent sur

- le dosage des protéines plasmatiques,
- le dosage du fer,
- le dosage du cuivre.

2.1.1. Etude des électrophorégrammes.

La figure 18 représente l'aspect des électrophorégrammes correspondant aux plasmas des crabes E et F.

L'étude de ces électrophorégrammes, entre J-1 et J+15, et la comparaison entre les crabes E et F, mène aux conclusions suivantes :

- la migration des protéines des bandes 1 et 2, signalées sur les électrophorégrammes des animaux normaux, ne semble pas être modifiée par leur contact avec l'eau contaminée en fer. Entre J+1 et J+15, l'aspect de ces bandes ainsi que leur distance de migration ne présentent pas de modification visible par rapport au temps témoin J-1 ;
- après le contact des animaux avec le milieu contaminé en fer, les électrophorégrammes présentent une troisième bande protéique de mobilité inférieure à celle de la bande 2 ; l'aspect et la distance de migration de cette bande restent constants tant que les animaux séjournent dans le milieu contaminé. Au niveau du dépôt apparaît un précipité protéique de plus en plus important en fonction du temps de contamination ;
- lorsque les crabes sont remis dans un milieu non pollué en fer, leurs électrophorégrammes ne présentent plus la bande 3 mais le précipité reste visible au niveau du dépôt.

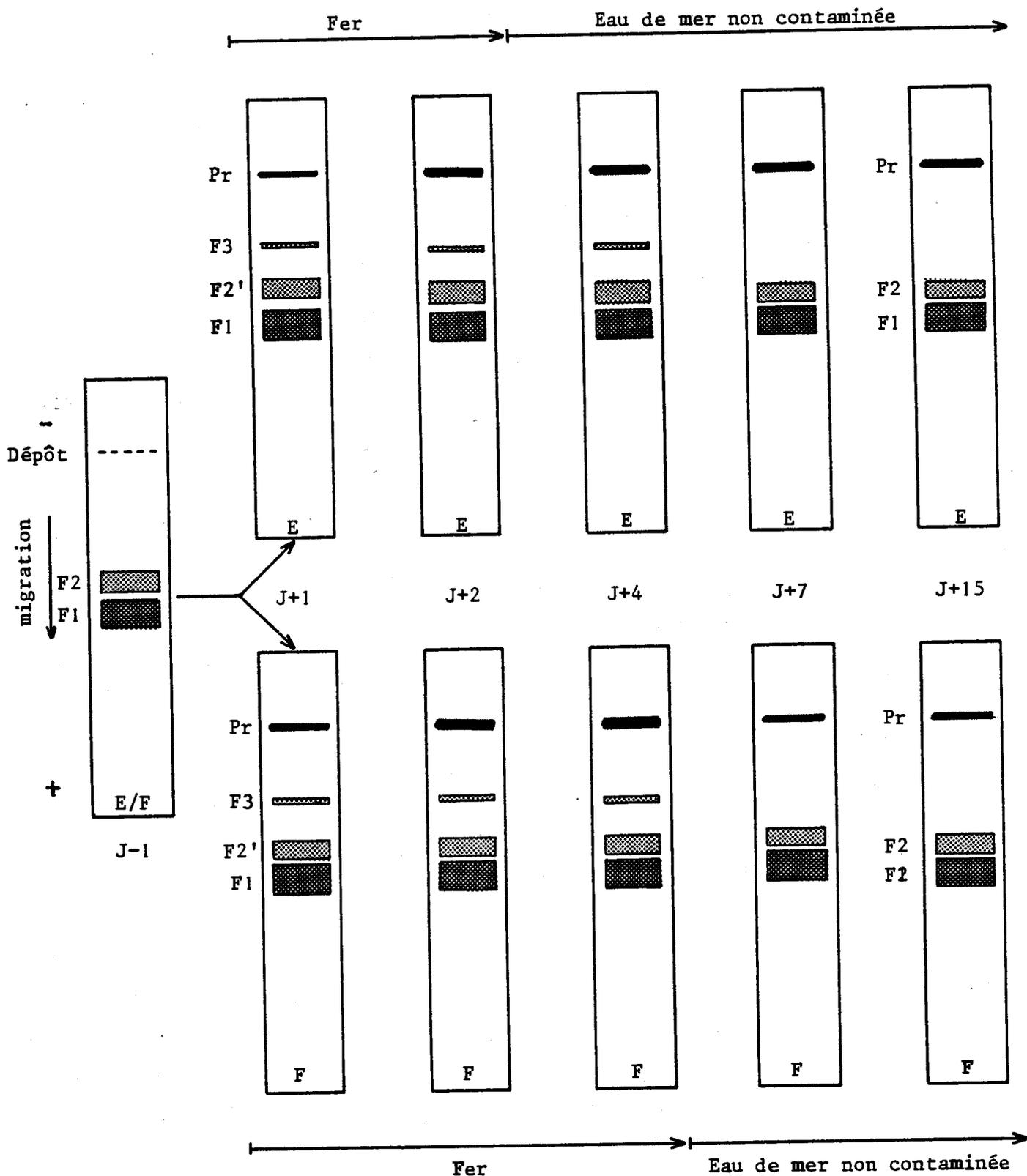


FIGURE 18 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer.
Protéines plasmatiques séparées par électrophorèse sur acétate de cellulose, en tampon $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$, pH 6,4.

CRABES E : contaminés pendant 2 jours.
CRABES F : contaminés pendant 4 jours.
F1, F2, F2', F3 : fractions protéiques.
Pr : précipité.

2.1.2. Dosage des protéines plasmatiques.

Les protéines ont été dosées sur les échantillons de plasma avant et après centrifugation de ces derniers à 20000 tours/mn (67000 g), pendant 15 minutes, afin de déterminer respectivement la teneur en protéines plasmatiques totales et la teneur en protéines précipitées, dans les conditions opératoires mentionnées au paragraphe 1.2.2. ("Action du Plomb", Essai 2).

Le tableau 27 indique, pour les lots de crabes E et F, les teneurs en protéines avant et après centrifugation du plasma.

- Les teneurs en protéines totales dans le plasma intact, au temps témoin (J-1), varient entre 59 et 69 mg/ml, avec une moyenne de 63 mg/ml pour l'ensemble des crabes. Après centrifugation du plasma, les teneurs en protéines restent les mêmes, ce qui signifie que le plasma d'un crabe normal ne contient pas de protéine sous forme précipitée.
- Entre J et J+15, l'évolution de ces teneurs est marquée par des variations qui se traduisent par une augmentation de la concentration en protéines totales, pendant le séjour des animaux dans le milieu contaminés, ainsi qu'une diminution de la concentration en protéines dans le plasma centrifugé.

La comparaison de ces résultats avec l'aspect des électrophorégrammes correspondants mène aux conclusions suivantes.

Le contact des animaux avec l'eau contaminée en fer entraîne :

- dans les deux jours qui suivent, une augmentation des protéines plasmatiques jusqu'à une teneur maximale qui se maintient si les animaux restent dans ce milieu et qui diminue jusqu'à la valeur initiale si les animaux sont transférés en eau non polluée en fer (tableaux 28 et 29). Ces variations de la concentration en protéines totales peuvent être mises en relation avec l'apparition de la bande 3, lorsque les animaux se trouvent en milieu polluée, et la disparition de cette bande chez les animaux remis en eau non contaminée ;
- une augmentation de la teneur en protéines précipitées jusqu'à une teneur maximale qui est atteinte au bout de deux jours et qui se maintient entre deux et quatre jours de contamination des animaux. Le transfert des crabes en eau non polluée entraîne une diminution par-

TABLEAU 27 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer.
Teneurs en protéines plasmatiques (mg/ml plasma).

Crabes E		1	4	6	7	10	\bar{x}	s	CV. %
J-1	Ia	64	69	60	64	59	63,20	3,96	6,27
	Ib	64	69	60	63	59	63,00	3,93	6,24
J+2	Ia	66	71	62	66	62	65,40	3,71	5,67
	Ib	64	67	59	63	59	62,40	3,43	5,50
J+4	Ia	65	71	61	65	60	64,40	4,33	6,72
	Ib	61	66	58	62	57	60,80	3,56	5,86
J+7	Ia	65	70	60	64	59	63,60	4,39	6,90
	Ib	62	68	58	62	57	61,40	4,33	7,05
J+15	Ia	64	69	60	64	58	63,00	4,24	6,73
	Ib	62	67	58	62	56	61,00	4,24	6,95

Crabes F		2	3	5	8	9	\bar{x}	s	CV. %
J-1	Ia	59	60	65	69	66	63,80	4,20	6,59
	Ib	58	60	64	69	66	63,40	4,44	7,00
J+2	Ia	61	62	68	72	69	66,40	4,72	7,11
	Ib	58	59	66	58	65	63,20	4,43	7,01
J+4	Ia	61	63	67	72	68	66,20	4,32	6,53
	Ib	58	60	64	69	65	63,20	4,32	6,84
J+7	Ia	59	60	64	68	65	63,20	3,70	5,85
	Ib	57	58	62	65	63	61,00	3,39	5,56
J+15	Ia	59	59	65	68	65	63,20	4,02	6,36
	Ib	57	57	63	67	63	61,40	4,33	7,05

Crabes E : contaminés pendant 2 jours

Crabes F : contaminés pendant 4 jours

Ia : Sans centrifugation du plasma

Ib : Après centrifugation du plasma.

TABLEAU 28 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer, 2 jours.
Evolution de la teneur moyenne en protéines précipitées et de la teneur moyenne en fer fixé sur ces protéines.

Crabes E	Ia Protéines totales	Δ Ia	Ib	Ia-Ib Protéines précipitées	Δ (Ia-Ib)	(Fe)pr
J-1	63,20	+2,20	63,00	*	+3,00	
J+2	65,40		62,40	3,00		0,05
J+4	64,40	-1,00	60,80	3,60	+0,60	0,06
J+7	63,60	-0,80	61,40	2,20	-1,60	*
J+15	63,00	-0,60	61,00	2,00	-0,20	*
Variation de J-1 à J+2	+2,20		-0,60	+3,00		+0,05
J+2 à J+15	-2,40		-1,40	-1,00		-0,05
Variation totale	*		-2,00	+2,00		*

Ia, Ib : mg/ml plasma.

(Fe)pr : Fer dosé au niveau des protéines précipitées (μ gFe protéique/ml plasma).

TABLEAU 29 - Eau de mer à 0,7 mg/ml en fer, 4 jours.
Evolution de la teneur moyenne en protéines précipitées et de la teneur moyenne en fer fixé sur ces protéines.

Crabes F	Ia Protéines totales	Δ Ia	Ib	Ia-Ib Protéines précipitées	Δ (Ia-Ib)	(Fe)pr
J-1	63,80	+2,60	63,40	0,40	+3,20	
J+2	66,40		63,20	3,20		0,06
J+4	66,20	*	63,20	3,00	*	0,06
J+7	63,20	-3,00	61,00	2,20	-0,80	0,03
J+15	63,20	*	61,40	1,80	-0,40	*
Variation de J-1 à J+4	+2,40		-0,20	+3,00		+0,06
J+4 à J+15	-3,00		-1,80	-1,20		-0,06
Variation totale	-0,60		-2,00	+1,80		*

Même légende que le tableau 28.

tielle de ces teneurs.

Ces variations sont en accord avec l'apparition et l'aspect du précipité protéique sur les électrophorégrammes. Ce précipité qui n'existe ni dans le plasma ni sur les électrophorégrammes à J-1, est visible sur ces derniers entre J+1 et J+15 ; sa coloration, proportionnelle à la quantité de protéines en présence, est foncée chez les animaux évoluant en milieu pollué, légèrement plus claire lorsque ceux-ci sont remis en eau non pollué.

Les résultats du dosage des protéines plasmatiques ont permis d'apporter certaines précisions sur l'apparition de la bande 3 et la formation du précipité protéique, à la suite du contact des animaux avec le milieu contaminé. Le dosage du fer et du cuivre, au niveau des différentes fractions protéiques et du précipité, permettra de confirmer les hypothèses émises et de mettre en évidence la cinétique de fixation du métal contaminant au niveau des protéines.

2.1.3. Dosage du fer.

Les concentrations en fer dosées dans le plasma, au niveau des différentes fractions protéiques et du précipité, sont indiquées tableau 30 pour les crabes E et tableau 31 pour les crabes F.

L'évolution de ces concentrations montre que :

- au temps témoin (J-1) le plasma des animaux contient, en moyenne, 2,7 µg/ml en fer dont la quasi-totalité se trouve liée aux protéines : 90 % au niveau de la bande 1 et le reste au niveau de la bande 2 ;
- le contact des animaux avec le milieu contaminé entraîne, pendant les deux premiers jours, une augmentation des teneurs en fer plasmatique et protéique jusqu'à une teneur maximale qui est atteinte au bout de deux jours et qui se maintient chez les crabes F gardés en milieu pollué pendant quatre jours.

Cette augmentation est réversible si l'on interrompt le séjour des crabes en milieu contaminé : les teneurs en fer plasmatique et protéique reviennent à leur valeur normale au bout de onze à treize jours dans l'eau non polluée en fer ;

TABLEAU 30 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer, 2 jours.
Teneurs en fer dosé dans le plasma (IV) et dans les différentes fractions protéiques (V).

Crabes E		1	4	6	7	10	*	s	CV. %		
J-1	IV	2,26	2,87	2,57	3,13	2,44	2,65		0,34	13,09	
	V	F1	2,06	2,44	2,32	2,96	2,24	2,40	2,53	0,34	14,17
		F2	0,10	0,22	0,15	0,07	0,11	0,13		0,05	44,52
J+1	IV	3,26	3,79	3,57	4,25	3,23	3,62		0,42	11,60	
	V	F1	2,15	2,53	2,25	2,83	2,33	2,41	3,16	0,26	11,17
		F2'	0,10	0,20	0,16	0,07	0,10	0,12		0,05	43,92
		F3	0,49	0,60	0,55	0,66	0,51	0,56		0,06	12,33
		Pr	0,06	0,07	0,06	0,07	0,06	0,06		0,005	9,13
J+2	IV	3,58	4,19	3,82	4,60	3,45	3,92		0,46	11,98	
	V	F1	2,27	2,35	2,36	2,90	2,21	2,41	3,42	0,27	11,47
		F2'	0,33	0,38	0,35	0,42	0,31	0,35		0,04	12,36
		F3	0,55	0,65	0,59	0,71	0,53	0,61		0,07	12,34
		Pr	0,05	0,06	0,05	0,07	0,05	0,05		0,008	17,89
J+4	IV	2,92	3,76	3,40	4,17	3,37	3,52		0,46	13,20	
	V	F1	2,05	2,45	3,00	2,86	3,05	2,68	3,47	0,42	15,85
		F2'	0,15	0,27	0,23	0,12	0,16	0,18		0,06	33,33
		F3	0,36	0,43	0,41	0,51	0,37	0,41		0,06	14,59
		Pr	0,06	0,03	0,08	0,07	0,09	0,06		0,02	33,33

TABLEAU 30 - Suite.

Crabes E		1	4	6	7	10	\bar{x}	s	CV. %		
J+7	IV	2,53	2,95	2,78	3,56	2,54	2,87	0,42	14,73		
	V	F1	2,15	2,39	2,42	2,99	2,35	2,46	0,31 0,07	12,60	
		F2	0,20	0,31	0,22	0,12	0,15	0,20		2,66	35,00
		-	-	-	-	-	-	-		-	-
	Pr	*	*	*	*	*	*				
J+15	IV	2,26	2,87	2,78	3,17	2,48	2,71	0,35	12,92		
	V	F1	2,12	2,41	2,39	2,86	2,20	2,39	0,28 0,06	12,02	
		F2	0,16	0,25	0,17	0,10	0,10	0,15		2,54	41,26
		-	-	-	-	-	-	-		-	-
	Pr	*	*	*	*	*	*				

IV : μgFe total/ml plasma - V : μgFe protéique/ml plasma.

- F1 : Fraction protéique 1 initiale
- F2 : Fraction protéique 2 initiale
- F2' : Fraction protéique 2 après contamination
- F3 : Fraction protéique nouvellement apparue
- Pr : Précipité
- : Fraction inexistante
- * : Non détectable.

TABLEAU 31 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer, 4 jours.
Teneurs en fer dosé dans le plasma (IV) et dans les différentes fractions protéiques (V).

Crabes F		2	3	5	8	9	\bar{x}	s	CV. %		
J-1	IV	2,48	2,46	3,36	2,87	3,11	2,85	0,39	13,78		
	V	F1	2,20	2,26	3,12	2,66	2,83	2,61	0,38	14,86	
		F2	0,12	0,12	0,16	0,14	0,15	0,13		2,74	13,76
J+1	IV	3,12	3,56	4,34	3,60	4,00	3,72	0,46	12,48		
	V	F1	2,27	2,33	3,10	2,62	2,79	2,62	0,34	13,03	
		F2'	0,11	0,12	0,15	0,13	0,15	0,13		0,01	13,76
		F3	0,48	0,54	0,66	0,55	0,61	0,57		0,06	12,12
		Pr	0,04	0,05	0,03	0,06	0,06	0,05		0,01	20,00
J+2	IV	3,49	3,72	4,77	3,78	4,11	3,97	0,49	12,52		
	V	F1	2,15	2,20	3,15	2,53	2,75	2,55	0,41	16,20	
		F2'	0,30	0,33	0,42	0,34	0,26	0,33		0,007	15,15
		F3	0,53	0,56	0,73	0,58	0,63	0,60		0,07	13,05
		Pr	0,05	0,06	0,07	0,06	0,06	0,06		0,006	11,67
J+4	IV	3,39	3,64	4,65	4,05	3,87	3,92	0,47	12,18		
	V	F1	2,15	2,30	3,27	2,55	2,80	2,61	0,44	16,86	
		F2'	0,30	0,32	0,41	0,36	0,34	0,34		0,04	12,41
		F3	0,51	0,55	0,71	0,61	0,59	0,59		0,07	11,86
		Pr	0,05	0,05	0,07	0,06	0,06	0,06		0,008	13,94

TABLEAU 31 - suite.

Crabes F		2	3	5	8	9	\bar{x}	s	CV. %	
J+7	IV	2,93	3,09	3,70	3,21	3,14	3,21	0,29	9,05	
	v	F1	2,22	2,27	3,20	2,60	2,80	2,61	0,38	14,63
		F2'	0,16	0,16	0,15	0,16	0,15	0,15	0,005	3,65
		Pr	0,03	0,03	0,04	0,03	0,03	0,03	0,004	13,33
J+15	IV	2,58	2,54	3,56	2,93	3,22	2,96	0,43	14,62	
	v	F1	2,24	2,25	3,16	2,61	2,83	2,61	0,39	15,05
		F2	0,13	0,15	0,12	0,15	0,15	0,14	0,01	10,10
		Pr	*	*	*	*	*	*		

Voir légende tableau 30.

- l'augmentation de la teneur en fer protéique est proportionnelle à celle de la teneur en fer plasmatique, ce qui signifie que les protéines fixent les quantités de fer au fur et à mesure que celles-ci s'accumulent dans le plasma ; cependant, cette fixation n'est pas totale : le rapport Fe protéique/Fe plasmatique, jusqu'à J+2 pour les crabes E et J+4 pour les crabes F, n'est que de 85 %. Compte tenu de la précision du dosage du fer, il est possible d'affirmer qu'au moins 10 % du fer plasmatique ne sont pas fixés au niveau des protéines plasmatiques, aux temps précédemment cités ;
- les quantités de fer nouvellement fixées par les protéines sont retrouvées au niveau des bandes 2' et 3 et du précipité ; aucune fixation n'a été observée au niveau de la bande 1 ;
- lorsque les animaux sont transférés dans une eau de mer polluée, la bande 3 n'étant plus visible sur les électrophorégrammes, il n'existe donc pas de fraction protéique solubilisée correspondante. La diminution de la teneur en fer protéique, dès J+7, se traduit alors par :
 - . une diminution de la teneur en fer au niveau de la bande 2, jusqu'à la valeur normale,
 - . la décroissance totale de la teneur en fer au niveau du précipité qui reste visible sur les électrophorégrammes.

Les variations des teneurs en fer dans le plasma, au niveau des différentes fractions protéiques et du précipité, sont illustrées par les courbes moyennes des figures 19 pour les crabes E, et 20 pour les crabes F.

Afin de mettre en évidence la répartition des quantités fixées par les différentes fractions et par le précipité, les teneurs en fer dosées dans ces échantillons ont été exprimées en pourcentage par rapport à la teneur en fer fixée totale.

Les résultats du tableau 32 montrent que :

- les protéines plasmatiques sont capables de fixer, au maximum, 0,90 $\mu\text{g Fe/ml}$ plasma, soit 25 à 29 % de leur teneur initiale en fer ;
- dans un premier temps, après un jour de contact des animaux avec le milieu contaminé, les quantités de fer nouvellement fixées se trouvent à 90 % au niveau de la bande 3, le reste au niveau du précipité ;

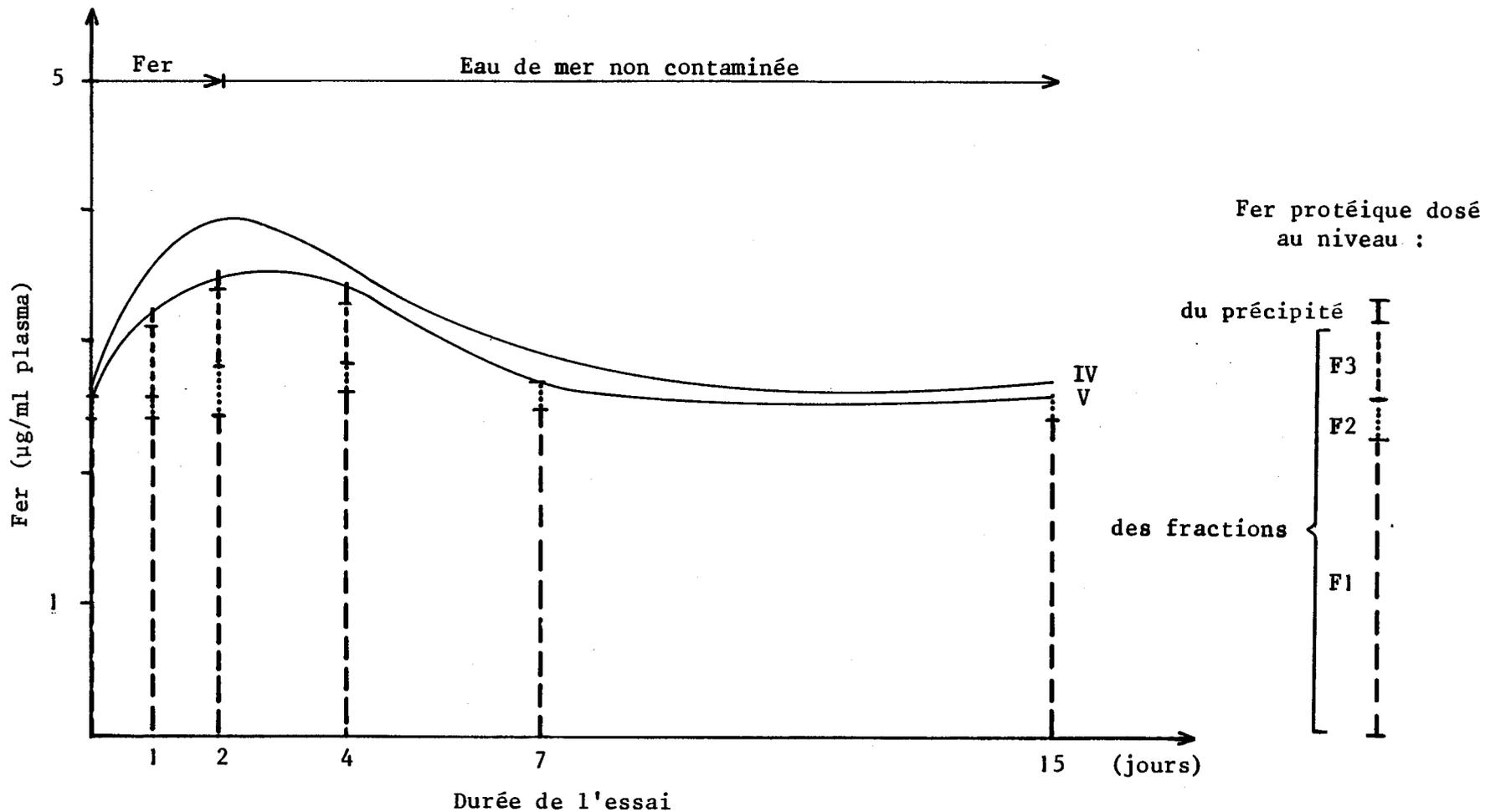


FIGURE 19 - Contamination par une eau de mer à 0,7 mg/l en fer pendant 2 jours.
Evolution des teneurs en fer plasmatique (IV) et en fer protéique (V).

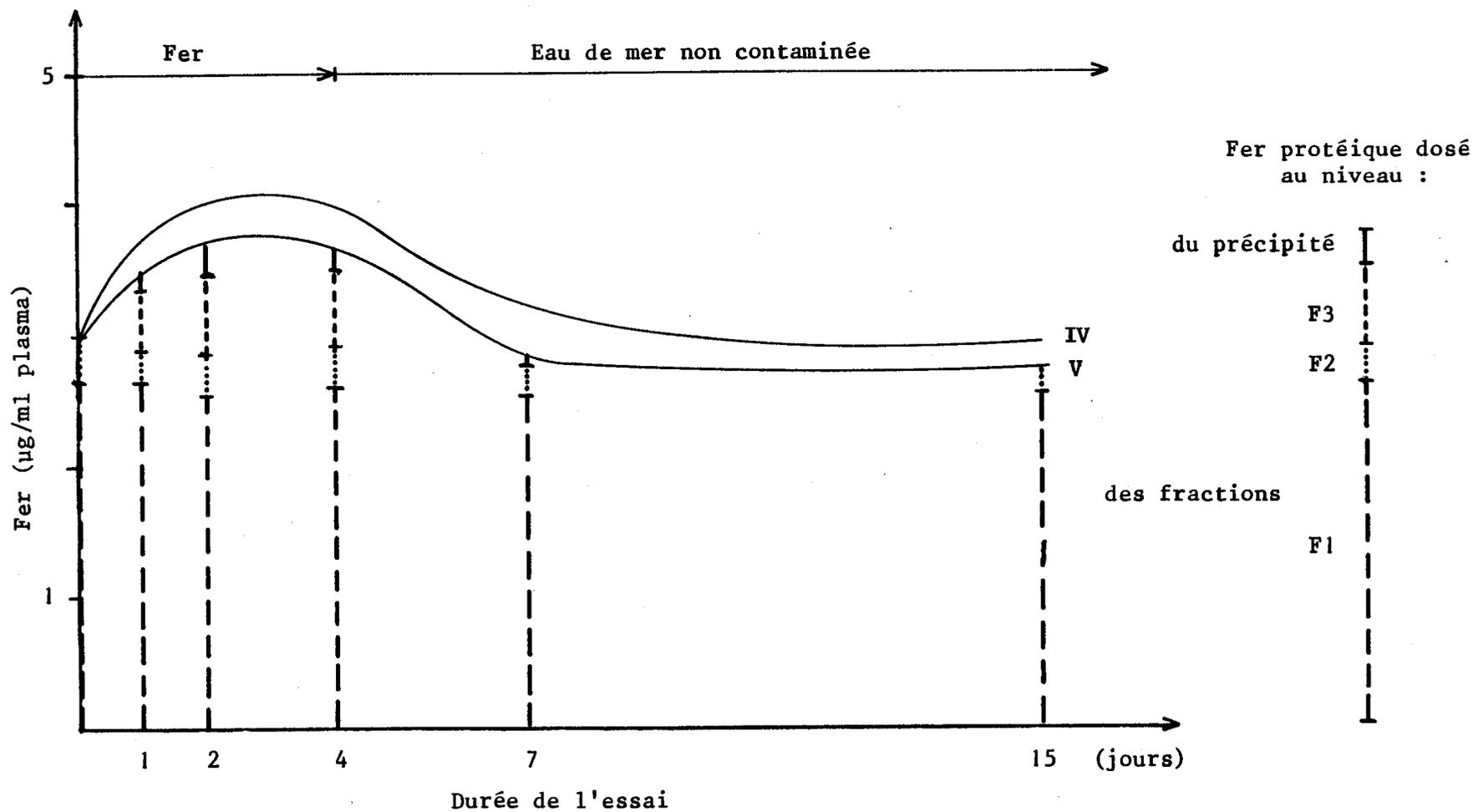
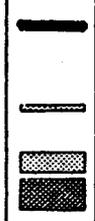
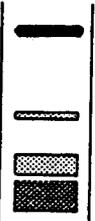
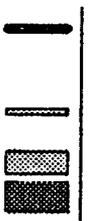


FIGURE 20 - Contamination par eau de mer à 0,7 mg/l en fer pendant 4 jours.
Evolution des teneurs en fer plasmatique (IV) et en fer protéique (V)

Tableau 32 - Eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en fer.
Répartition du fer fixé dans les fractions protéiques et dans le précipité en pourcentage par rapport au fer protéique total.

Crabes	Lot E - contaminé 2 jours					Lot F - contaminé 4 jours				
	E	B	F	Fe _F	Fe p.tot.	E	B	F	Fe _F	Fe p.tot.
J-1		2 1	F2 F1	5,14 94,86	2,53		2 1	F2 F1	4,74 95,26	2,74
J+2		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	1,75 16,37 10,23 70,47	3,42		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	1,67 16,67 9,37 72,03	3,54
J+4		Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	1,73 17,58 5,19 77,23	3,47		Pr 3 3 1	Pr F3 F3 F1	1,65 16,39 9,44 72,50	3,60
J+7		Pr 2' 1	Pr F2' F1	* 7,52 92,48	2,66		Pr 2' 1	Pr F2' F1	1,08 5,38 93,55	2,79
J+15		Pr 2' 1	Pr F2' F1	* 5,91 94,09	2,54		Pr 2' 1	Pr F2' F1	* 5,09 94,91	2,75

E : Electrophorégramme témoin - B : Bande protéique

F : Fractions protéiques - Pr : précipité

Fe_F : Fer dosé dans les fractions protéiques et dans le précipité
fer protéique total (%)

Fe_{p.tot.} : Fer protéique total (µg/ml plasma)

* : non détectable.

- dans un second temps, après deux jours de contamination, lorsque les quantités fixées sont maximales, le fer fixé est également retrouvé au niveau de la bande 2'. La répartition est alors la suivante :

68,5 % du fer est fixé au niveau de la bande 3,

24,7 % au niveau de la bande

6,7 % au niveau des protéines précipitées.

Cette répartition est la même chez les crabes F, après quatre jours de contamination ;

- dans un troisième temps, lorsque les crabes sont transférés en eau non contaminée, les teneurs fixées auparavant diminuent de 100 %, entre onze et treize jours dans ce milieu.

L'ensemble des résultats obtenus par dosage du fer mène aux conclusions suivantes :

- Lorsque les animaux sont en présence d'un milieu contaminé à 0,7 mg/l en fer, leurs protéines plasmatiques sont capables de fixer, au bout de deux jours, une teneur maximale en fer qui correspond à 25 % de leur teneur initiale. Cette fixation est totalement réversible dans un délai de dix jours si les animaux sont transférés dans une eau non contaminée, après deux à quatre jours de contamination.
- La localisation du fer fixé au niveau des différentes fractions protéiques est particulièrement intéressante : lorsque les teneurs en fer fixé sont maximales, environ 2/3 de l'élément sont fixés sur les protéines de la bande 3, le reste sur celles de la bande 2' et du précipité.
- Puisque les teneurs en fer plasmatique et protéique reviennent à leur valeur initiale lorsque les animaux sont remis en eau non contaminée, cela signifie :
 - . qu'il y a relargage total des quantités fixées par les protéines,
 - . que les quantités relarguées sont éliminées du plasma.
- De même que la cinétique de fixation du fer au niveau des différentes fractions protéiques est intéressante, les modalités d'élimination des quantités fixées sont également à noter : les protéines de la bande 2' et du précipité relarguent le fer fixé mais restent

présentes dans le plasma (bande 2' et précipité visibles sur les électrophorégrammes après J+2), alors que les protéines de la bande 3 sont entièrement éliminées du plasma avec le fer qu'elles avaient fixé.

2.1.4. Dosage du cuivre.

Le cuivre a été dosé dans tous les échantillons analysés dans cet essai : plasmas et fractions protéiques solubilisées, aux temps J-1, J+1, J+2, J+4, J+7 et J+15.

Les teneurs en cuivre dosées au niveau des différentes fractions protéiques et du précipité correspondent au cuivre constitutif des protéines plasmatiques.

Il s'agit :

- de déterminer quantitativement la concentration en cuivre protéique total ainsi que la répartition de l'élément dans les bandes 1 et 2 d'origine,
- d'étudier l'évolution de ces concentrations en fonction du temps de contact des animaux avec le milieu contaminé en fer.

Les tableaux 33 et 34 indiquent, pour les crabes E et F, les teneurs en cuivre au niveau des fractions protéiques 1, 2, 2', 3 et du précipité.

Le tableau 35 indique les concentrations en cuivre plasmatique total ainsi que le pourcentage de l'élément au niveau des protéines.

Les résultats montrent qu'au temps témoin (J-1) le plasma contient, en moyenne, 67 µg Cu/ml plasma dont la totalité est liée aux protéines : 88 % au niveau de la bande 1, le reste au niveau de la bande 2. Ces résultats sont relativement homogènes pour l'ensemble des crabes E et F.

L'étude de l'évolution des teneurs en cuivre, au niveau des fractions protéiques et du précipité, est fort intéressante.

Il en résulte que :

- la teneur en cuivre de la fraction 1 reste constante tout au long de l'essai ;
- celle de la fraction 2, égale à 8 µg Cu/ml plasma, au temps témoin, chute à 3 µg Cu/ml plasma lorsque les crabes séjournent dans le mi-

TABLEAU 33 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer, 2 jours.
Teneurs en cuivre dans les différentes fractions protéiques et dans le précipité (μg cuivre protéique/ml plasma).

Crabes E		1	4	6	7	10	\bar{x}	s	CV. %
J-1	F1	57	59	58	61	58	58,60	1,51	2,58
	F2	8,06	7,63	8,34	8,69	8,35	8,21	0,39	4,82
J+1	F1	57	59	58	61	57	58,40	1,67	2,86
	F2'	3,39	3,75	4,25	4,36	4,20	3,99	0,40	10,03
	F3	*	*	*	*	*	*	8,12	
	Pr	4,59	3,74	4,00	4,25	4,09	4,13	0,31	7,51
J+2	F1	57	59	58	61	58	58,60	1,51	2,58
	F2'	2,90	2,55	2,85	3,16	2,95	2,98	0,21	7,29
	F3	*	*	*	*	*	*	7,97	
	Pr	4,83	4,69	5,07	5,30	5,09	4,99	0,23	4,61
J+4	F1	57	59	58	61	58	58,60	1,51	2,58
	F2'	2,85	2,70	3,18	3,35	3,27	3,07	0,28	9,12
	F3	*	*	*	*	*	*	8,00	
	Pr	4,91	4,78	4,92	5,17	4,89	4,93	0,24	4,87
J+7	F1	57	59	58	61	58	58,60	1,51	2,58
	F2	3,75	3,70	4,00	4,17	4,15	3,95	0,21	6,32
	-	-	-	-	-	-	-	8,15	
	Pr	4,19	3,86	4,25	4,46	4,25	4,20	0,19	4,52
J+15	F1	57	59	58	61	58	58,60	1,51	2,58
	F2	4,10	3,85	4,35	4,44	4,35	4,21	0,24	5,70
	-	-	-	-	-	-	-	8,15	
	Pr	3,90	3,66	4,00	4,17	4,00	3,94	0,18	4,57

TABLEAU 34 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer, 4 jours.
Teneurs en cuivre dosé dans les différentes fractions protéiques
(μg cuivre protéique/ml plasma).

Crabes F		2	3	5	8	9	\bar{x}	s	CV. %
J-1	F1	59	58	62	59	61	59,80	1,64	2,74
	F2	7,69	7,96	8,58	7,91	8,63	8,15	0,42	5,2
J+1	F1	59	58	62	59	61	59,80	1,64	2,74
	F2'	4,35	3,60	4,00	4,72	4,16	4,16	0,41	9,86
	F3	*	*	*	*	*	*	8,09	
	Pr	3,68	3,82	4,20	3,85	4,10	3,93	0,21	5,34
J+2	F1	59	58	62	59	61	59,80	1,64	2,74
	F2'	3,20	3,04	2,70	2,83	2,75	2,90	0,21	7,24
	F3	*	*	*	*	*	*	7,86	
	Pr	4,56	4,85	5,20	4,90	5,30	4,96	0,29	5,85
J+4	F1	59	58	62	59	61	59,80	1,64	2,74
	F2'	2,80	2,95	3,35	3,00	3,20	3,06	0,21	6,86
	F3	*	*	*	*	*	*	7,92	
	Pr	4,60	4,75	5,00	4,80	5,17	4,86	0,22	4,53
J+7	F1	59	58	62	59	61	59,80	1,64	2,74
	F2'	3,00	3,41	3,60	3,20	3,65	3,37	0,27	6,01
	-	-	-	-	-	-	-	8,01	
	Pr	4,45	4,54	4,89	4,55	4,77	4,64	0,18	3,88
J+15	F1	58	58	61	59	61	59,40	1,51	2,54
	F2	4,30	4,37	4,75	4,50	4,90	4,56	0,25	5,48
	-	-	-	-	-	-	-	8,08	
	Pr	3,32	3,50	3,75	3,36	3,70	3,52	0,19	5,40

TABLEAU 35 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer.

Teneurs en cuivre total dans le plasma (P1) et pourcentage de cuivre dans les fractions protéiques F1 et F2.

Crabes E		1	4	6	7	10	\bar{x}	s	CV. %
J-1	P1	65	67	66	70	66	66,80	1,92	2,87
	F1/P1	87,69	88,06	87,88	87,14	87,88	87,73	0,35	0,40
	F2/P1	12,35	11,35	12,56	12,40	12,65	12,26	0,52	4,27
J+2	P1	65	67	66	70	66	66,80	1,92	2,87
	F1/P1	87,62	88,06	87,88	87,14	87,35	87,44	0,42	0,48
	F2'/P1	12,05	10,88	12,11	12,04	12,21	11,85	0,55	4,64
J+4	P1	65	67	66	70	66	66,80	1,92	2,87
	F1/P1	87,69	88,06	87,88	87,14	87,88	87,73	0,35	0,40
	F2'/P1	12,12	11,12	12,31	12,24	12,41	12,04	0,52	4,36
J+7	P1	65	67	66	70	66	66,80	1,92	2,87
	F1/P1	87,69	88,06	87,88	87,14	87,88	87,73	0,35	0,40
	F2/P1	12,37	11,32	12,58	12,41	12,63	12,26	0,53	4,39
J+15	P1	65	67	66	70	66	66,80	1,92	2,87
	F1/P1	87,69	88,06	87,88	87,14	87,88	87,73	0,35	0,40
	F2/P1	12,30	11,35	12,56	12,40	12,65	12,25	0,52	4,26

TABLEAU 35 - suite.

Crabes F		2	3	5	8	9	\bar{x}	s	CV. %
J-1	P1	66	66	70	67	70	67,80	2,04	3,01
	F1/P1	89,39	87,88	87,57	88,06	87,14	88,00	0,84	0,95
	F2/P1	11,58	12,00	12,20	11,75	12,30	11,96	0,30	0,52
J+2	P1	66	67	70	67	70	68,00	1,87	2,75
	F1/P1	89,39	86,57	87,57	88,06	87,14	88,00	0,84	0,95
	F2'/P1	11,19	11,69	11,95	11,45	12,00	11,65	0,34	2,93
J+4	P1	66	66	70	67	70	67,80	2,04	3,01
	F1/P1	89,39	87,88	87,57	87,06	87,14	87,80	0,94	1,07
	F2'/P1	11,15	11,75	11,97	11,52	12,07	11,69	0,36	3,16
J+7	P1	66	66	70	67	70	67,80	2,04	3,01
	F1/P1	89,39	87,88	87,57	87,06	87,14	88,00	0,89	0,95
	F2'/P1	11,27	11,89	12,06	11,61	12,15	11,79	0,35	3,04
J+15	P1	66	66	70	67	70	67,80	2,04	3,01
	F1/P1	89,39	87,88	87,14	88,06	87,14	87,92	0,92	1,05
	F2/P1	11,50	12,00	12,20	11,83	12,27	11,96	0,30	2,59

P1 : μg Cu total/ml plasma
 F1/P1 : cuivre dans la fraction F1/cuivre plasmatique (%)
 F2/P1 : cuivre dans la fraction F2/cuivre plasmatique (%)
 F1 et F2 : correspondent aux résultats des tableaux 33 et 34.

- lieu contaminé en fer et réaugmente jusqu'à 4 μg Cu/ml plasma lorsque les animaux sont transférés en milieu non pollué en fer ;
- il n'a pas été détecté de trace de cuivre au niveau des protéines de la bande 3, quel que soit le temps (J+1, J+2, J+4) où cette bande est présente sur les électrophorégrammes ;
 - par contre, les protéines précipitées contiennent du cuivre ; la teneur maximale (5 μg Cu/ml plasma) est atteinte entre deux et quatre jours de contamination des animaux et diminue jusqu'à 4 μg Cu/ml plasma lorsque les animaux sont remis dans une eau non contaminée.

D'après ces premières observations, la teneur en cuivre de la bande 2' et celle du précipité varient de façon inversement proportionnelle. En fait, la somme de ces deux teneurs aboutit, pour chaque crabe, à une valeur égale à la concentration en cuivre de la fraction 2 initiale.

L'augmentation de la teneur en cuivre au niveau du précipité, en fonction du temps de contamination, peut donc s'expliquer par la précipitation de quantités croissantes de protéines provenant de la bande 2 initiale, ces dernières gardant leur cuivre constitutif.

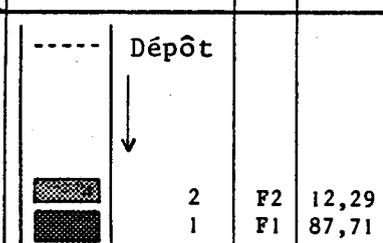
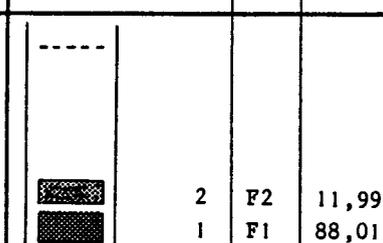
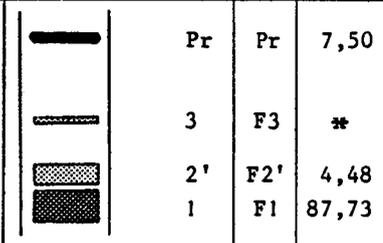
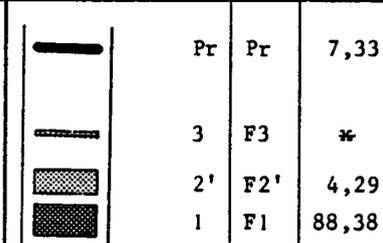
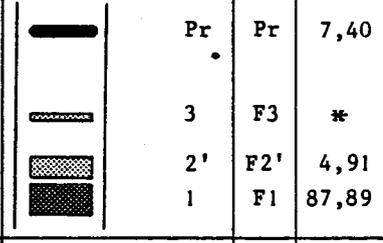
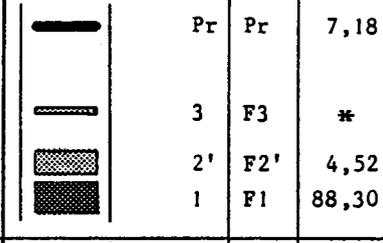
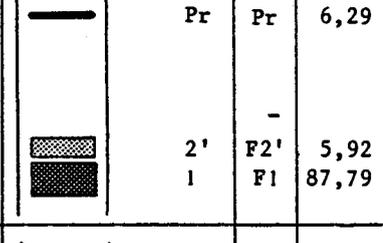
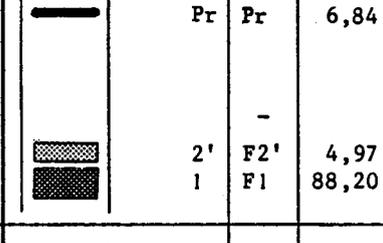
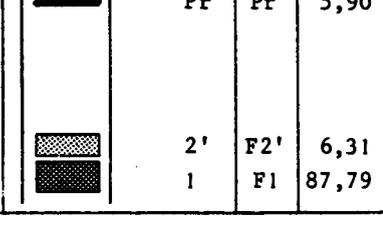
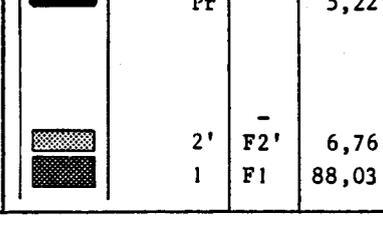
Inversement, lorsque les animaux sont transférés en eau non contaminée, le dosage des protéines plasmatiques (paragraphe 2.1.2.) a montré que le taux de protéines précipitées diminue, ce qui est en accord avec la diminution de la teneur en cuivre au niveau du précipité.

Les variations de la teneur en cuivre de la bande 2' et du précipité s'expliquent donc par la précipitation d'une partie des protéines de la bande 2 d'origine.

Si l'on considère que tout au long de l'essai le cuivre de la bande 2 initiale est réparti entre la bande 2' et le précipité, le rapport (cuivre de la bande 2' + cuivre du précipité/cuivre plasmatique) doit rester constant et égal à la valeur d'origine, soit 12 % : c'est ce que montrent les résultats du tableau 35.

Le tableau 36 résume l'ensemble de ces observations et indique le pourcentage de cuivre au niveau des fractions protéiques et du précipité par rapport au cuivre protéique total.

Tableau 36 - Eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en fer.
Répartition du cuivre dans les fractions protéiques et dans le précipité en pourcentage par rapport au cuivre protéique total.

Crabes	Lot E - contaminé 2 jours					Lot F - contaminé 4 jours						
	Analyse Ponction	E	B	F	Cu _F	Cu p.tot.	E	B	F	Cu _F	Cu p.tot.	
J-1			2 1	F2 F1	12,29 87,71	66,81			2 1	F2 F1	11,99 88,01	67,95
J+2			Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	7,50 * 4,48 87,73	66,57			Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	7,33 * 4,29 88,38	67,66
J+4			Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	7,40 * 4,91 87,89	66,60			Pr 3 2' 1	Pr F3 F2' F1	7,18 * 4,52 88,30	67,72
J+7			Pr 2' 1	Pr - F2' F1	6,29 - 5,92 87,79	66,75			Pr 2' 1	Pr - F2' F1	6,84 - 4,97 88,20	67,81
J+15			Pr 2' 1	Pr - F2' F1	5,90 - 6,31 87,79	66,75			Pr 2' 1	Pr - F2' F1	5,22 - 6,76 88,03	67,48

Cu_F : $\frac{\text{Cuivre dosé dans les fractions protéiques et dans le précipité}}{\text{cuivre protéique total}}$ (%)

Cu_{p.tot.} : Cuivre protéique total (µg/ml plasma).

Les résultats du dosage du cuivre font apparaître trois conclusions majeures :

- la teneur en cuivre des protéines de la bande 1 n'est pas modifiée par le contact des animaux avec le milieu contaminé en fer ;
- la bande 3, nouvellement apparue, n'est pas constituée par des cuproprotéines contrairement aux bandes 1 et 2 initiales ;
- les protéines constituant le précipité proviennent de la fraction 2 d'origine dont une partie a précipité à la suite du contact des animaux avec le milieu contaminé en fer.

2.2. CONCLUSION.

Cet essai a montré que lorsque les crabes sont mis en contact avec une eau de mer contaminée à 0,7 mg/l en fer, la teneur en fer dans le plasma augmente de 50 % au bout de deux jours et se maintient à cette valeur si les animaux restent dans le milieu contaminé. 85 % du fer enrichi par le plasma sont retrouvés au niveau des protéines plasmatiques qui peuvent fixer une teneur au moins égale à 25 % de leur teneur initiale en fer.

Les quantités fixées sont localisées au niveau de la fraction protéique 2 dont une partie précipite dès le premier jour de contamination, ainsi que sur une nouvelle fraction 3 qui peut être mise en évidence dans le plasma dès le premier jour également.

Le transfert des animaux, dès le deuxième ou le quatrième jour, dans une eau non contaminée, permet de prolonger d'une quinzaine de jours la durée de vie des animaux. Au niveau du plasma, les effets de cette décontamination se traduisent par l'élimination des quantités de fer fixé sur la fraction 2 initiale ainsi que la dégradation de la fraction 3 apparue après contamination ; par contre, une partie des protéines précipitées persiste dans le plasma.

Les teneurs en cuivre constitutif de la fraction 2 ne subissent pas de variation significative consécutivement à la fixation du fer sur cette fraction protéique.

CHAPITRE III

DISCUSSION.

CHAPITRE III

DISCUSSION.

1. TENEURS EN PLOMB, FER, CUIVRE, DOSÉES DANS L'EAU DE MER ET DANS L'HÉMOLYPHE AVANT CONTAMINATION.

1.1. DANS L'EAU DE MER.

Les eaux sont au contact avec les autres milieux de l'environnement de l'homme ; on conçoit aisément qu'elles puissent contenir un grand nombre d'éléments métalliques à des teneurs très variées. Il n'est pas facile de définir des teneurs "normales" moyennes des eaux océaniques en métaux car le milieu marin se révèle être assez hétérogène et, par suite, les teneurs locales peuvent varier assez largement sous l'influence de facteurs tels que la salinité, les vents, les marées et les courants qui favorisent la diffusion des apports continentaux.

La littérature fournit de nombreuses données relatives à ces teneurs dans les océans (tableau 37).

A part le molybdène dont la teneur est directement liée à celle du chlorure de sodium, les éléments métalliques ont une teneur peu dépendante de la salinité.

Une explication est que ces éléments sont, pour une grande part, d'origine exogènes, liés à la pollution.

Certains auteurs ont montré que ces teneurs sur les côtes atlantiques

TABLEAU 37 - Teneurs des eaux océaniques en métaux lourds en ppb (BITTEL, 1973).

Eléments	Teneurs	Eléments	Teneurs	Eléments	Teneurs
Ag	0,3	Cu	3	Mn	2
Cd	0,1	Fe	3	Ni	7
Co	0,4	Hg	0,2	Pb	0,03
Cr	0,5	Mo	10	Zn	10

sont actuellement en forte augmentation, notamment en ce qui concerne des éléments tels le plomb, le cuivre, le fer (AUBERT, 1972 ; AUBERT et al., 1973 ; MERLINI, 1983).

Les teneurs en plomb et en fer dosées dans les échantillons :

- d'eau de mer prélevée dans le milieu où évoluent habituellement les crustacés étudiés,
 - d'eau de mer artificielle qui sert de milieu d'expérimentation,
- sont proches des valeurs "normales" indiquées par la bibliographie et, par conséquent, n'indiquent pas de traces de contamination des animaux antérieures à nos essais.

Il faut cependant remarquer que les eaux qui risquent d'être le plus polluées, sont celles qui sont situées près des zones de forte pollution où l'activité humaine est grande et le trafic maritime dense : zones littorales, estuaires, baies.

Ce risque est donc potentiel pour les zones côtières de la Manche et de l'Atlantique où vit l'espèce étudiée.

1.2. DANS LE PLASMA ET AU NIVEAU DES PROTEINES PLASMATIQUES.

Il est difficile de définir des teneurs "normales" en oligo-éléments métalliques des organismes aquatiques, c'est-à-dire des teneurs "hors pollution". En effet, la composition des organismes aquatiques dépend de nombreux paramètres : composition de l'eau, température, quantité

de la nourriture, taille, âge, sexe, espèce (BITTEL, 1973 ; LOCKWOOD, 1976).

1.2.1. Le plomb.

Les valeurs les plus nombreuses fournies par la littérature portent sur des éléments physiologiquement importants pour les organismes marins et peu de valeurs concernent des métaux tels que le plomb pour lequel aucune expérience, jusqu'ici, n'a pu mettre en évidence ou même faire soupçonner un rôle biologique déterminant. Etant présent dans l'environnement, il se peut que ce métal ne soit qu'une impureté fixée par ces animaux (BITTEL, 1973).

La présence du plomb a été détectée chez de nombreux organismes marins (BRYAN, 1976) présentant un intérêt en tant qu'indicateur écologique ou en tant qu'espèce comestible par l'homme, sans que des symptômes apparents de toxicité n'aient été observés chez ces organismes.

Chez les crustacés, et particulièrement chez les crabes, peu de résultats quantitatifs ont été rapportés jusqu'ici concernant cet élément ; cette lacune peut être, en majeure partie, imputée aux nombreux problèmes posés par le dosage de ce métal à l'état de traces dans les milieux biologiques (PINTA et al., 1983).

Chez l'espèce *Macropipus puber*, l'analyse du plasma a révélé la présence constante de cet élément dans l'hémolymphe des animaux : les teneurs dosées au cours de cette étude, avant contamination, varient de 0,003 à 0,020 µg/ml. Ceci a également été constaté par PINTA et al. (1978) qui ont signalé des teneurs de cet ordre dans le sérum de la même espèce.

La présence de ces traces de plomb dans le plasma peut s'expliquer :

- soit par un prélèvement direct à partir du milieu ambiant,
- soit par l'ingestion d'aliments contenant déjà cet élément.

Il est donc possible que dans l'hémolymphe du crabe à l'état normal, il existe déjà un phénomène de concentration qui est à l'origine de ces teneurs, 300 à 3000 fois plus élevées que celles dosées dans l'eau de mer.

La deuxième éventualité est plausible dans la mesure où la nutrition des crabes est constituée essentiellement de phyto et zooplancton

(CECCALDI, 1976), capables eux-mêmes d'accumuler un élément comme le plomb (GEORGE, 1980 ; TURNER, 1980).

1.2.2. Le fer.

Le fer est largement distribué dans la nature ; sa présence chez les animaux est bien établie (COURTOIS et al., 1964 ; UNDERWOOD, 1977) bien que son rôle chez les organismes marins n'a pas encore été déterminé de façon précise.

Chez les crabes, les teneurs en métaux de l'hémolymphe aux différents stades d'intermue ne sont connues que par des valeurs disparates rencontrées, çà et là, dans la littérature. Aussi, les comparaisons ne peuvent-elles se faire que pour des résultats concernant la même espèce, pour des spécimens vivant dans les mêmes lieux et parvenus aux mêmes stades d'intermue. Les concentrations dosées dans le plasma de *Macropipus puber*, en moyenne 2,5 µg/ml, confirment les résultats de PINTA et al. (1978) qui ont détecté des teneurs variant de 2 à 5 µg/ml dans le sérum de cette espèce. Ces auteurs attribuent ces variations aux variations globales accusées par les constituants sériques aux différents stades d'intermue de ces animaux.

Les essais entrepris par les mêmes auteurs pour localiser le fer sur les fractions protéiques isolées par électrophorèse sur acétate à pH 7,4, ont mis en évidence la présence de ce métal uniquement au niveau de la fraction 1 correspondant à l'hémocyanine, alors que nos analyses (essai 5) ont situé 90 % de cet élément au niveau de cette fraction et le reste sur la fraction 2. Dans l'état actuel des connaissances, il n'est pas exclu que l'importante fraction antérieure soit constituée par le groupement de plusieurs fractions de mobilité identique, dans des conditions électrophorétiques déterminées (MARTIN et al., 1977). La séparation sur acétate s'effectuant en fonction de la charge électrique des protéines, le patron électrophorétique varie suivant les conditions expérimentales (pH, voltage, temps de migration).

1.2.3. Le cuivre.

La détection du cuivre dans le plasma des crabes et sa localisation au niveau des protéines plasmatiques, d'après nos analyses, ont permis

d'apporter certaines précisions aux résultats de nombreux travaux sur la mise en évidence et le dosage de cet élément dans une protéine spécifique de l'hémolymphe des crustacés : l'hémocyanine (GHIDALIA, 1969 ; GHIDALIA et al., 1971 ; MARTIN et al., 1979 ; OVERNELL et al., 1979). Chez certains ordres de mollusques et d'arthropodes, c'est cette protéine qui assure la fonction respiratoire en se combinant réversiblement à l'oxygène.

Les connaissances actuelles sur cette molécule ne sont que partielles du fait de la très grande diversité des hémocyanines chez les arthropodes (BOWEN, 1966 ; TALBOT et WATERMAN, 1960 ; WILLIAMS, 1971).

Notre étude sur la teneur en cuivre des protéines du plasma nous a amené à nous intéresser à l'hémocyanine essentiellement en tant que métalloprotéine.

Les résultats de nos dosages qui indiquent une teneur en cuivre plasmatique qui varie de 59 à 81 $\mu\text{g/ml}$, concordent avec ceux de PINTA et al. (1978) qui avaient trouvé, chez la même espèce, une concentration variant de 30 à 100 $\mu\text{g/ml}$ en fonction de l'âge de l'individu. Chez le crabe *Carcinus maenas*, MARTIN et al. (1977) signalent une teneur plasmatique totale de 45 $\mu\text{g/ml}$ chez des spécimens au stade C_4 (repos physiologique). Quelle que soit l'espèce étudiée, ces auteurs s'accordent pour indiquer que plus de 98 % du cuivre plasmatique est situé au niveau des fractions protéiques.

L'étude de la distribution du cuivre sur ces fractions a mené plusieurs auteurs à conclure que tout le cuivre est situé au niveau des fractions correspondant à l'hémocyanine (GHIDALIA et al., 1971 ; MARTIN et al., 1977).

BUSSELEN (1970) a également utilisé la technique d'électrophorèse sur support d'acétate pour isoler les protéines de l'hémolymphe de *Carcinus maenas* ; après localisation du cuivre par l'acide rubéanique et caractérisation de l'hémocyanine par son activité peroxydasique, cet auteur a conclu que sur les trois fractions isolées, une seule contient du cuivre (la plus antérieure) et correspond à l'hémocyanine. Cet auteur précise qu'en acétate Cellogel, l'hémocyanine de *Carcinus maenas* ne migre qu'en une seule zone lorsque le pH varie de 5,4 à 8.

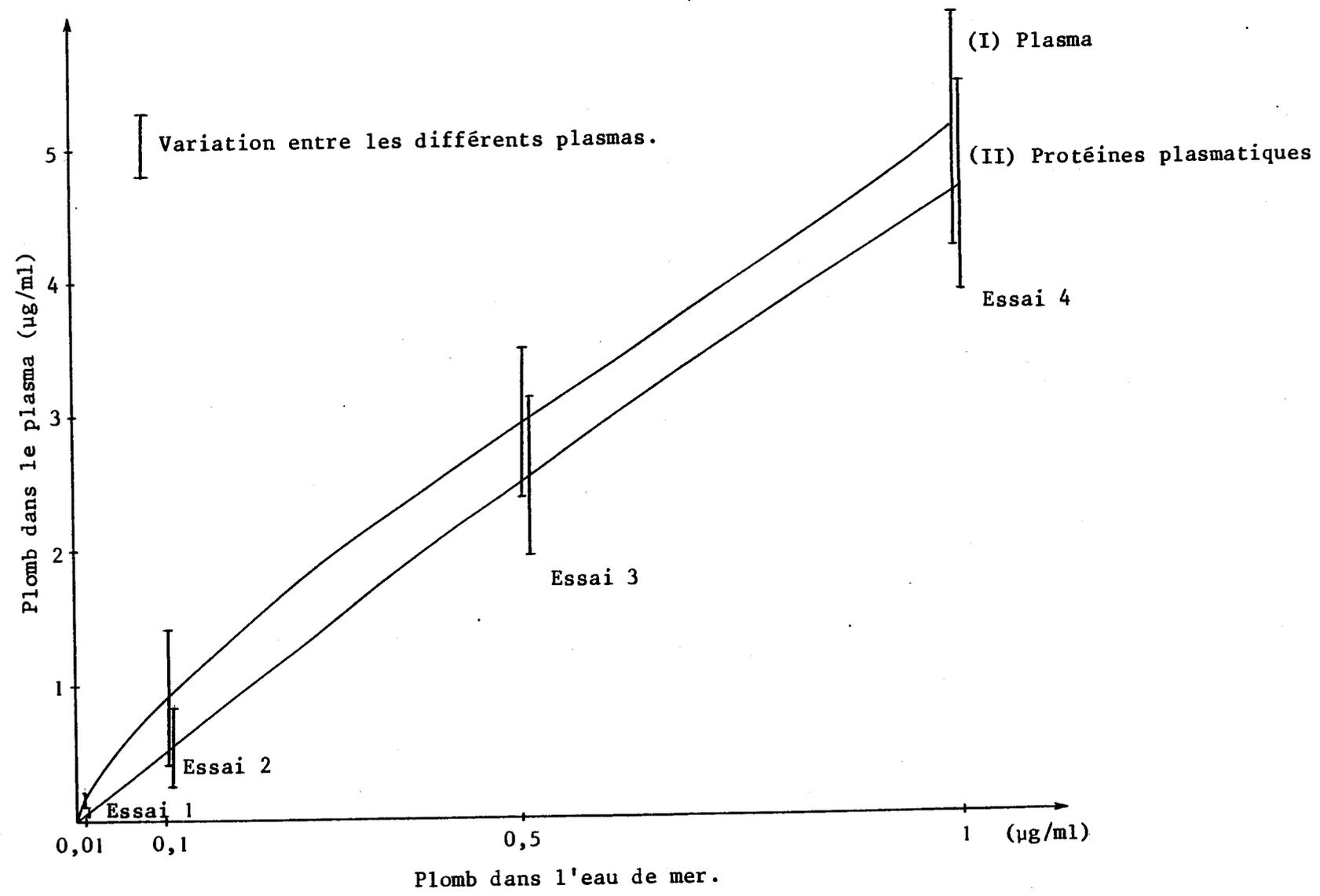


FIGURE 21 - Teneurs en plomb dans le plasma et au niveau des protéines plasmatiques en fonction de la teneur en plomb dans l'eau contaminée.

Il apparaît donc que, dans ces conditions électrophorétiques identiques, les hémocyanines d'espèces très proches peuvent présenter une migration différente. Dans notre cas, si la nature hémocyanique de la fraction 1 n'est pas mise en doute, par contre la détection du cuivre dans la fraction 2 nous conduit à émettre l'hypothèse que cette dernière peut correspondre :

- soit à un produit de dégradation de l'hémocyanine (molécule en voie de catabolisme),
- soit à une variété de chaîne polypeptidique correspondant à une sous-unité de l'hémocyanine,
- soit à une protéine autre que l'hémocyanine : la céruloplasmine en est un exemple (MANWELL et al., 1963).

La caractérisation biochimique de cette fraction est donc importante puisqu'elle permettra de savoir si dans l'hémolymphe de *Macropipus puber* il existe ou non une cuproprotéine autre que l'hémocyanine.

2. ACCUMULATION DU PLOMB ET DU FER DANS LE PLASMA.

Les essais de contamination des crabes par une eau de mer expérimentalement polluée ont mis en évidence, pour les deux éléments étudiés, une accumulation du métal dans le plasma.

En ce qui concerne le plomb, les teneurs accumulées dans le plasma sont directement proportionnelles aux teneurs dans l'eau de mer (figure 21, courbe I). Ces résultats sont analogues à ceux de PEDEN et al. (1974) qui ont observé une relation linéaire entre les concentrations en sulfate de cadmium dosées dans le sérum du crabe *Cancer irroratus* contaminé avec une eau contenant 0,05 à 0,5 mg/l de ce métal. BRYAN (1976) signale le même type de relation concernant le crabe *Maia squinado* expérimentalement contaminé par du chlorure de mercure ou de l'arseniate.

Cet auteur attribue ce type de relation à une diffusion passive de ces métaux à travers les branchies de ces crustacés, lorsque ces éléments se trouvent sous forme ionique soluble dans l'eau de mer. Il apparaît donc que chez différentes espèces de crabes l'absorption de certains métaux lourds connus pour leur toxicité (plomb, cadmium, mercure, arse-

nic) se fait de façon identique.

Les facteurs de concentration (tableau 38) indiquent que nos spécimens peuvent accumuler jusqu'à 570 fois leur teneur initiale en plomb, avant qu'une toxicité aigue ne se manifeste (mortalité au bout de trois jours de contamination).

TABLEAU 38 - Facteurs de concentration du plomb et du fer dans le plasma des animaux contaminés.

	Teneur dans l'eau contaminée ($\mu\text{g/ml}$)	Teneur dans le plasma ($\mu\text{g/ml}$)		Facteur de concentration
		Avant Contamination	Après Contamination	
PLOMB	1	0,009	5,15	572
	0,7	0,004	3,61	400
	0,1	0,005	1,02	204
	0,01	0,009	0,185	41
FER	0,7	2,6	3,9	0,5

La comparaison des facteurs de concentration pour les deux éléments à une même concentration dans l'eau de mer (0,7 mg/l) montre qu'il existe une différence d'absorption entre ces métaux.

Le plomb qui existe à une teneur de l'ordre d'une dizaine de ng/ml dans le plasma, peut être enrichi jusqu'à 400 fois, alors que le fer présent à une teneur moyenne de 2 à 3 $\mu\text{g/ml}$, ne l'est que de 0,5 fois.

Ces résultats peuvent être comparés avec ceux de GEORGE (1980) qui a observé chez la moule *Mytilus* un facteur de concentration de 300 pour le plomb et de 0,7 pour le fer lorsque ces animaux sont contaminés par une eau contenant 0,5 mg/l de plomb ou de fer, pendant vingt jours.

De manière générale, les facteurs de concentration signalés dans la littérature, pour des éléments tels que le plomb, sont largement supérieurs à ceux d'éléments indispensables comme le fer (AUBERT et al., 1973 ; BITTEL, 1973 ; BOYDEN, 1981).

Au niveau de l'hémolymphe, cette différence de facteur de concentration peut s'expliquer par plusieurs raisons :

- L'hémolymphe correspond au milieu intérieur de l'organisme des crustacés. Ce milieu est en relation avec l'environnement, principalement par l'intermédiaire des branchies qui assurent, outre la fonction respiratoire, le renouvellement de ce milieu intérieur.

BRYAN (1976) a mis en évidence un taux de concentration du plomb et de l'argent beaucoup plus faible que celui du fer et du cuivre au niveau des tissus branchiaux du crabe *Maia squinado* contaminé par ces métaux. Ces résultats nous permettent de supposer que les tissus branchiaux constituent une barrière sélective vis-à-vis des ions métalliques lorsque la teneur de ces derniers augmente dans le milieu. Ce processus doit être mis en relation avec le rôle des branchies dans les mécanismes d'ionorégulation et d'osmorégulation (CHARMANTIER, 1979 ; SIEBERS et al., 1972 ; THUET, 1975). BRYAN (1976) a montré que les branchies de *Carcinus maenas* étaient capables d'excréter très activement du zinc et du fer préalablement absorbé par le crustacé alors qu'aucune excrétion par cette voie n'a été observée pour le cadmium. Il est donc probable que les branchies interviennent dans la régulation de l'absorption de ces ions métalliques, cette régulation étant moins efficace pour un élément non physiologique comme le plomb, ce qui expliquerait un taux d'accumulation beaucoup plus élevé pour cet élément que pour le fer.

- Chez les crustacés décapodes, BRYAN (1976) a montré que la régulation de certains métaux absorbés peut être assurée par le système rénal. Ces auteurs ont noté, au niveau de cet organe, un taux d'excrétion proportionnel au taux d'absorption pour des éléments tels que le zinc, le cuivre, le magnésium, alors que la concentration en cadmium et en plomb urinaire est très faible. Ces résultats permettent de penser que le système rénal, chez le crabe, est capable d'excréter plus activement un élément essentiel comme le fer dès son ab-

sorption par l'animal, ce qui pourrait expliquer un facteur de concentration 800 fois plus élevé en plomb qu'en fer dans le plasma (tableau 38).

Le pouvoir de concentration d'un élément étant dépendant de son métabolisme dans l'organisme, ceci pose le problème de l'accumulation de ces métaux dans d'autres parties de l'animal. La détermination du plomb et du fer, non seulement au niveau des branchies et des cellules rénales mais également au niveau de différents tissus et organes tels que l'exosquelette, l'hépatopancréas et les muscles, permettra d'évaluer le taux de contamination global du crabe et d'estimer le pouvoir de concentration des protéines plasmatiques par rapport à l'organisme entier.

Les travaux de MARTIN et al. (1976), sur la contamination du crabe *Carcinus maenas* par le fer 59, ont montré que si la cinétique de contamination des tissus suivants : exosquelette, hypoderme, hépatopancréas, branchies, hémolymphe, muscles, était identique et reflétait celle du crabe entier, par contre, l'accumulation de l'élément est prédominante au niveau des branchies et de l'exosquelette.

Il est donc probable que les facteurs de concentration déterminés pour les deux éléments étudiés au niveau du plasma, ne reflètent qu'une faible part de la contamination globale des animaux.

D'autre part, la recherche des effets de ces métaux sur d'autres tissus ou organes du crabe permettra sans doute d'expliquer la toxicité aigue qui a été observée chez les animaux contaminés avec du fer. Cette toxicité est surprenante dans la mesure où la mortalité se manifeste beaucoup plus rapidement que chez les crabes contaminés avec une même teneur en plomb.

Dans la littérature peu de renseignements existent sur les conséquences d'un excès d'absorption en fer. Ceci est dû au fait que chez l'homme et chez les animaux, la pathologie associée à ce métal découle essentiellement d'une carence nutritionnelle. De plus, jusqu'à présent, il est reconnu que chez les vertébrés, le fer est un élément bien régulé ; les quantités absorbées en excès sont excrétées par les reins (BRYAN, 1976).

Cependant, des intoxications accidentelles sont possibles : l'absorption massive par voie digestive de fer sous forme de sulfate ferreux

(produits ménagers) chez les enfants provoque, à partir d'une dose de un gramme, des troubles graves qui apparaissent dans un temps de latence variant de 30 minutes à 8 heures, et se manifestent par un collapsus et un oedème pulmonaire aigu (GOYER et al., 1972). Ceci montre qu'un oligo-élément indispensable peut se révéler toxique à partir d'une dose donnée et sous une certaine forme chimique.

3. FIXATION SUR LES PROTÉINES PLASMATIQUES.

Nos résultats ont montré que 95 % du plomb et 85 % du fer accumulés dans le plasma se fixent au niveau des protéines plasmatiques. La figure 21 (courbe II) illustre la relation étroite entre le plomb fixé par les protéines et le plomb dosé dans le plasma. Ceci rend compte de la capacité de fixation des métaux par les composés tels que les protéines, les acides aminés, les polysaccharides, qui possèdent des groupements fonctionnels (carboxyles, alcool, phénol, carbonyle, amine primaire, secondaire ou tertiaire, sulfudryle, thioéther ...) pouvant réagir avec ces métaux (SCHUBERT, 1954 ; WILLIAMS, 1971).

Dans le sang, cette capacité de fixation constitue une forme de protection temporaire contre l'élévation du taux plasmatique des éléments métalliques pouvant se révéler toxiques sous forme libre.

Chez les crustacés, BRYAN (1976) a montré que si l'on injecte du zinc à une teneur 30 fois plus élevée que la normale dans le sang de l'écrevisse (*Austropotamobius pallipes*), ce métal est entièrement retrouvé au niveau des protéines sériques dans les vingt heures qui suivent son introduction, puis est éliminé dans l'hépatopancréas par la suite.

Nos résultats indiquent que les phénomènes sont différents chez le crabe étudié : l'étude cinétique montre que les teneurs fixées par les protéines plasmatiques restent constantes dans le temps, sauf dans le cas de l'essai 1 (contamination par une eau de mer à 0,01 mg/l en plomb) où nous avons observé une diminution des teneurs dans le plasma et dans les protéines, après deux jours de contamination. Ceci pourrait signifier qu'il existe une régulation de cet élément mais que ce processus n'a lieu qu'à certaines teneurs en plomb dans l'eau (moins de 0,1 mg/l).

3.1. LOCALISATION SUR LES FRACTIONS ISOLEES PAR ELECTROPHORESE.

L'étude des électrophorégrammes, en fonction du temps de contamination des animaux, a mis en évidence des modifications dans le fractionnement des protéines plasmatiques, aussi bien pour le plomb que pour le fer.

Ces modifications se traduisent par la formation d'un précipité dans les deux cas, ainsi que l'apparition de nouvelles fractions 3 possédant une mobilité inférieure à celle des fractions initiales.

La localisation du plomb et du fer dans chaque fraction et dans le précipité permet de comparer les modalités de fixation de ces éléments et d'apporter certaines précisions sur la présence du précipité et des fractions 3.

En ce qui concerne le plomb, nos résultats ont montré que cet élément se fixe sur les deux fractions initiales mais à des pourcentages différents : 11 % sur la fraction 1, 88 % sur la fraction 2. Or, seule cette dernière subit une altération de sa structure biochimique aboutissant à sa précipitation complète au bout de quinze jours de contamination.

Pour le cas du fer, aucune fixation n'a été observée sur la fraction 1. C'est au niveau de la fraction 3 que 75 % du fer plasmatique ont été retrouvés, le reste étant fixé par la fraction 2 qui précipite partiellement.

Deux points principaux doivent être soulignés :

- Le fait que seule la fraction 2 précipite alors que les deux autres fractions fixent également soit du plomb, soit du fer, permet de penser que les modes de liaisons impliqués dans la fixation du plomb par les protéines des fractions 1 et 2 sont différents ; la même hypothèse peut être formulée pour la fixation du fer par les protéines des fractions 2 et 3'.

Cette hypothèse est d'autant plus plausible que les essais de décontamination ont montré que le transfert des animaux dans l'eau non contaminée permet :

- une élimination totale du plomb au niveau de la fraction 2 alors que cet élément reste fixé sur la fraction 1,

- . une élimination du fer fixé au niveau de la fraction 2 sans que celle-ci ne soit dégradée, alors que les protéines de la fraction 3 sont éliminées du plasma avec le fer qu'elles avaient fixé.

Ces résultats montrent qu'au niveau de la fraction hémocyannique, le plomb est fixé de façon irréversible alors que le plomb et le fer fixés sur la fraction 2 peuvent être déplacés lorsque la concentration de ces éléments revient à leur valeur normale dans l'eau. Ceci nous permet de conclure que les modes de liaison de ces métaux sont différents suivant leur site de fixation.

- L'apparition de la fraction protéique 3, chez les animaux contaminés par du fer, montre qu'il existe une différence de réponse de ces animaux lorsque ceux-ci sont intoxiqués par du plomb ou du fer.

Dans le cas d'une contamination par du fer, le fait que cette protéine apparaisse dans le plasma dès le premier jour, qu'elle fixe 75 % du fer absorbé, qu'elle soit éliminée du plasma lorsque l'exposition cesse, est la preuve d'une réponse spécifique de l'organisme du crabe à l'augmentation de la teneur en fer dans son environnement. Des travaux récents ont montré, chez certains mollusques et crustacés, l'existence d'une protéine de faible poids moléculaire (10000), fixatrice de métaux lourds dont la présence est liée à la teneur de ces métaux dans le milieu (D'AMELIO et al., 1974 ; NOEL-LAMBOT et al., 1978 ; OLAFSON, 1978 ; OVERNELL et al., 1971). Cette protéine, appelée métallothionéine du fait de sa grande richesse en cystéine, est spécifique du transport et du stockage du cadmium, du zinc et du cuivre, et, de ce fait, considérée comme un agent protecteur vis-à-vis de la toxicité de ces métaux lourds.

FISHER (1980) a mis en évidence l'existence d'une telle protéine dans l'hépatopancréas des crabes *Cancer pagurus*, *Cancer magister* et *Scylla serrata* ; cet auteur a montré que la synthèse de cette protéine pouvait être induite par contamination de ces animaux avec du mercure, du cuivre, du zinc, du cobalt et du fer.

NOEL-LAMBOT et al. (1978) ont montré chez trois espèces de mollusques que la concentration de cette protéine augmente en réponse à une intoxication expérimentale par du zinc et du fer, et qu'elle décroît lorsque la contamination cesse. Cet auteur a également constaté que chez les espèces vivant en milieu déjà pollué par ces métaux, ces derniers

sont localisés en grande partie au niveau de ces métallothionéines.

Par analogie avec ces résultats, nous pouvons expliquer l'apparition de la fraction 3 en émettant l'hypothèse que la contamination des crabes par le fer induit la synthèse d'une protéine plasmatique chargée de la fixation de cet élément. Cette prise en charge du fer correspondrait, dans ce cas, à un mécanisme de transport de ce métal dans le plasma vers des organes de stockage ou de détoxification.

3.2. CONSEQUENCES.

3.2.1. Précipitation des protéines de la fraction 2.

La précipitation des protéines sériques de *Macropipus puber* par plusieurs métaux (Pb, Zn, Cu, Fe) avait été observée par PINTA et al. (1978), lors de leurs essais chimiques, en ajoutant, in vitro, des quantités variables de ces éléments sur du sérum prélevé.

Or, nous avons constaté que ce phénomène se produit également, in vivo, dans le plasma des animaux contaminé, bien que la cinétique de précipitation soit différente à celle observée in vitro.

La précipitation des protéines par les sels de métaux lourds est une propriété chimique connue de ces molécules. En effet, les protéines en solution et surtout les plus complexes d'entre elles (globulines, albumines), chez l'homme, sont des substances très instables qui peuvent être modifiées par des influences diverses. Leur combinaison avec certains sels métalliques entraîne leur précipitation sous forme de sels insolubles, dans certaines conditions de pH et de concentration. Ainsi, les ions Cd, Hg et Pb réagissent avec les carboxyles des protéines pour donner des carboxylates insolubles.

In vitro, ces sels de métaux lourds sont utilisés comme déprotéinisants car leur action s'accompagne d'une dénaturation irréversible des protéines, c'est-à-dire d'une désorganisation de leur conformation tridimensionnelle, sans que soit rompue la moindre liaison peptidique.

La précipitation de la fraction 2, dans nos essais, peut être attribuée

à cette action précipitante des sels de plomb et de fer. De la même façon peut s'expliquer l'apparition des fractions 3 pour le cas de la contamination par le plomb. Nous avons prouvé, par le dosage du plomb et du cuivre au niveau de ces fractions, que ces dernières provenaient de la fraction 2. MARTIN et al. (1977) ont montré dans leur étude électrophorétique des protéines de l'hémolymphe de *Carcinus maenas* qu'en supports sélectifs, les fractions de nature cuproprotéique migrent sous forme de plusieurs bandes de mobilité distincte. Il est donc vraisemblable que chez *Macropipus puber* la fraction 2 soit constituée par la coalescence de plusieurs protéines ayant des mobilités voisines dans nos conditions électrophorétiques.

La fixation du plomb, au niveau des carboxyles des protéines de cette fraction, a pour effet de diminuer la charge négative globale de ces protéines et, par conséquent, de diminuer leur mobilité. Sur un support tel que l'acétate de cellulose où la séparation ne s'effectue qu'en fonction de la charge électrique, ceci explique l'apparition progressive des bandes 3 de mobilité inférieure à celle de la bande 2 d'origine.

En ce qui concerne le plomb, la précipitation a lieu quelle que soit la concentration en métal dans le milieu contaminé. D'après la cinétique de précipitation des protéines, les quantités de protéines précipitées, à un temps donné, ne dépendent pas de la teneur en plomb fixé. Cela signifierait que la précipitation a lieu dès qu'une certaine teneur est atteinte dans le plasma : nos résultats montrent que la teneur en plomb fixée dans l'essai 1 (contamination par 0,01 mg/l en plomb) est suffisante pour provoquer une précipitation de la fraction 2. Cette teneur étant de 0,025 µg/ml, confirme les résultats de PINTA et al. (1978) qui avaient constaté "in vitro" une précipitation dès 0,01 µg/ml en plomb fixé.

Pour le cas du fer, la teneur maximale en protéines précipitées est atteinte dès le premier jour et se maintient par la suite ; la précipitation observée pour une teneur en fer fixé égale à 0,05 µg/ml a également été constatée lors des essais chimiques par ces mêmes auteurs.

3.2.2. Teneur en cuivre des fractions protéiques.

Le dosage du cuivre, au niveau des différentes fractions protéiques, n'indique pas de variation significative de la teneur de cet élément.

Ces résultats montrent que l'effet toxique des métaux étudiés, plomb et fer, ne résultent pas d'une compétition entre ces éléments et le cuivre, soit au niveau du site de fixation de ce dernier, soit au niveau de son incorporation dans l'hémocyanine.

Ainsi, la fraction 1 correspondant uniquement à l'hémocyanine est capable de fixer du plomb mais cet élément ne déplace pas le cuivre, ce qui met en évidence la spécificité de la liaison cuivre-hémocyanine.

Ces résultats peuvent être comparés à ceux de MARTINI et al. (1971) qui avaient constaté que de faibles concentrations de cadmium et de mercure ne changent pas la concentration en zinc des protéines plasmatiques du crabe *Carcinus maenas* mais perturbent l'absorption de cet élément.

La recherche de l'effet toxique du plomb et du fer doit donc se poursuivre en envisageant d'autres aspects de l'action de ces métaux (intervention de l'ion ferreux dans des processus d'oxydo-réduction par exemple).

4. EFFETS DE LA DÉCONTAMINATION.

Les essais de transfert des animaux dans une eau non contaminée, après un certain temps de contact avec le plomb et le fer, ont mis en évidence des mécanismes de détoxification au niveau du plasma.

En ce qui concerne le plomb, nos résultats ont montré que la décontamination se traduit par l'élimination complète des protéines précipitées et du plomb fixé sur ces protéines (figure 22). Ceci peut être dû à la dégradation de ces composés dans le plasma ; au cours du renouvellement ou "turn-over" des protéines, la synthèse de nouvelles molécules expliquerait la présence, sur les électrophorégrammes, d'une fraction 2, d'aspect et de mobilité identique à la fraction 2 initiale. Il est peu probable que cette dernière provienne de la dissolution des protéines

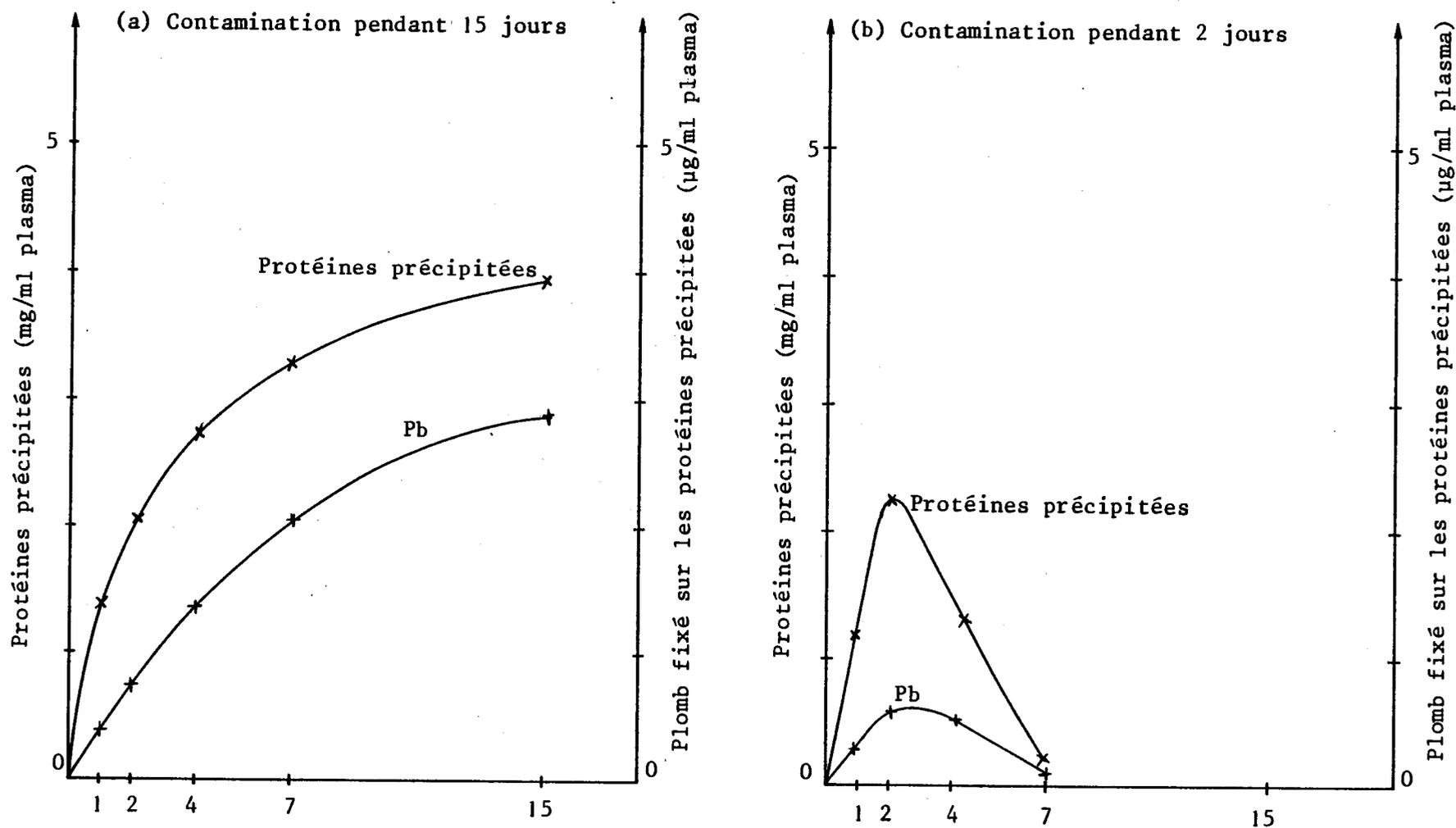


FIGURE 22 - Eau de mer à 0,7 mg/l en plomb.
 Evolution des teneurs en protéines précipitées et en plomb fixé sur ces protéines en fonction du temps de contamination.

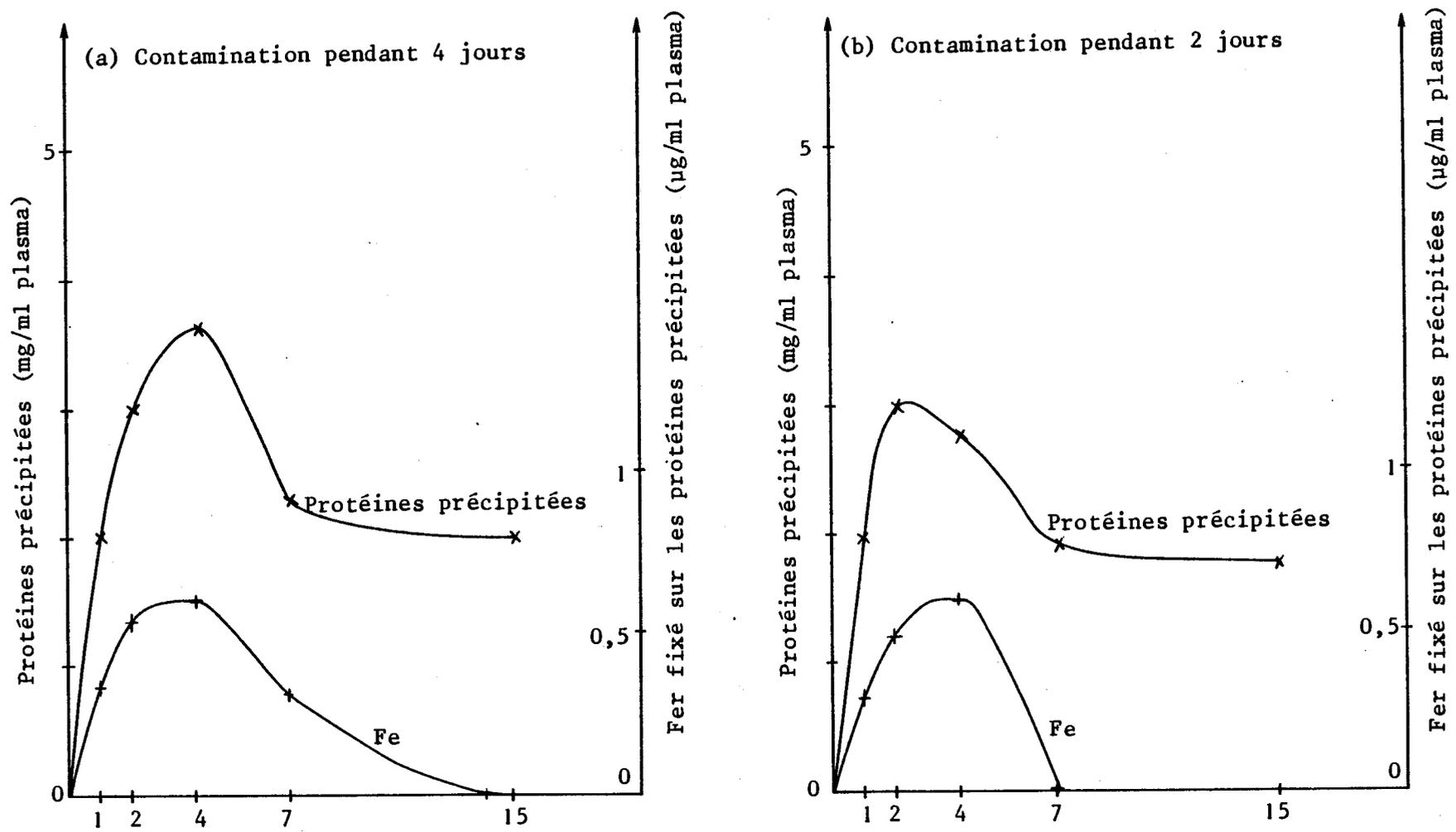


FIGURE 23 - Eau de mer à 0,7 mg/l en fer.
 Evolution des teneurs en protéines précipitées et en fer fixé sur ces protéines en fonction du temps de contamination.

qui avaient précipité, car la précipitation par les métaux lourds a pour conséquence une dénaturation irréversible des protéines.

Le fait que le plomb fixé sur la fraction 1 reste toujours détectable après décontamination des animaux, pourrait résulter d'une différence de la vitesse de renouvellement des protéines des deux fractions, celle de la fraction 1 étant plus lente.

Pour le cas du fer, la teneur en fer plasmatique revient à sa valeur initiale ; il y a également élimination du fer fixé mais une partie du précipité reste dans le plasma.

La figure 23 montre que les protéines précipitées sont éliminées du plasma suivant la même cinétique que pour le cas d'une contamination par le plomb (figure 22). La différence se situe donc au niveau des teneurs qui sont éliminées ; or, le dosage du cuivre indique que les protéines précipitées qui restent dans le plasma, contiennent toutes du cuivre.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que l'action du fer se situe au niveau de la synthèse de ces cuproprotéines en bloquant cette synthèse, ce qui empêche le renouvellement de ces molécules, même lorsque les animaux sont replacés dans une eau non contaminée en fer.

CONCLUSION GENERALE.

Nos essais de contamination, en milieu expérimental, ont permis de mettre en évidence les effets d'une pollution par des sels de plomb et de fer au niveau du plasma d'un crabe comestible, l'Etrille.

Nous avons montré que le plasma qui contient normalement quelques ng/ml de plomb, peut en accumuler, en deux jours, des quantités considérables : ainsi, la contamination de ces animaux par une eau polluée à 10 ng/ml entraîne une augmentation de la teneur en plomb plasmatique par un facteur de 40. Cette accumulation est proportionnelle à la concentration du métal dans le milieu.

Le fer qui existe à une teneur de plusieurs $\mu\text{g/ml}$, n'augmente que de 50 % lorsque les animaux sont contaminés dans une eau contenant de l'ordre de 1 $\mu\text{g/ml}$ de cet élément.

Le mise au point d'une méthode fiable et sensible, par association de l'électrophorèse à l'absorption atomique, a permis de montrer que 95 % du plomb et 83 % du fer sont retrouvés au niveau des protéines plasmatiques.

Nous avons étudié la cinétique de fixation de ces éléments sur ces protéines, localisé ces métaux sur les deux fractions protéiques isolées dans nos conditions électrophorétiques (fraction 1 correspondant à l'hémocyanine et fraction 2 non encore identifiée) et mis en évidence les conséquences de cette fixation sur les protéines de ces fractions.

D'après nos résultats nous pouvons conclure que :

- le plomb et le fer se fixent aux protéines plasmatiques suivant une même cinétique, en fonction du temps de contamination ;
- le plomb est fixé aux protéines des deux fractions, sa fixation sur la fraction hémocyannique est irréversible ;
- le fer est fixé principalement à une protéine dont la synthèse est consécutive à la contamination des crabes par cet élément ;
- ces deux métaux ont une action commune qui se traduit par une altération de la structure biochimique des protéines de la fraction 2, conduisant à leur précipitation dans le plasma. Cet effet peut être considéré comme caractéristique d'une intoxication des crabes par des métaux lourds ;
- si les animaux contaminés sont replacés dans une eau saine, les modalités de décontamination au niveau du plasma sont les suivantes :
 - . la teneur en fer plasmatique revient à sa valeur normale alors que celle en plomb reste à un niveau correspondant à 10 % des quantités accumulées,
 - . les protéines précipitées sont entièrement dégradées dans le plasma des animaux contaminés auparavant par le plomb ; elles ne le sont que partiellement dans le cas du fer ;
- la recherche d'une interaction entre la fixation de ces métaux et la teneur en cuivre des protéines semble exclure l'hypothèse d'une compétition entre l'un ou l'autre de ces éléments et le cuivre protéique.

Un prolongement immédiat à ce travail consisterait à approfondir l'action du fer afin de déterminer si des teneurs contaminantes, inférieures à celle étudiée, entraîneraient également la synthèse d'une protéine ferrofixatrice. La caractérisation biochimique et immunochimique de cette protéine contribuerait à l'étude du mécanisme d'action de cet élément.

En ce qui concerne l'action du plomb, il serait nécessaire de compléter l'analyse électrophorétique par l'utilisation d'un support sélectif pouvant séparer la fraction hémocyannique en différents types de sous-unités, ce qui permettrait de localiser de façon plus précise le plomb fixé sur cette fraction.

Des perspectives plus générales peuvent également être envisagées :

- la méthode analytique que nous avons mise au point pourrait être appliquée au dosage des deux métaux étudiés dans les protéines des autres parties du crabe : dans les organes susceptibles de stocker ou de concentrer les métaux lourds (foie, reins, rate ...) et dans les parties comestibles de l'animal (chair) ;
- les essais de contamination pourraient être réalisés, d'une part avec d'autres métaux contaminants (mercure, cadmium, cuivre, zinc ...), d'autre part avec plusieurs métaux simultanément présents, ce qui rapprocherait ces essais des conditions de pollutions réelles ;
- enfin, cette étude pourrait être étendue à d'autres espèces de crustacés comestibles afin d'établir si les phénomènes observés sont généraux ou propres à certaines d'entre elles.

BIBLIOGRAPHIE.

- AUBERT, M., - 1972 - Pollutions chimiques et chaînes trophodynamiques marines. *Rev.Intern.Océanogr.Méd.*, XXVIII, 9-19.
- AUBERT, M., PETIT, U., DONNIER, B., BARELLI, M., - 1973 - Transfert de polluants métalliques au consommateur terrestre à partir du milieu marin. *Rev.Intern.Océanogr.Méd.*, XXX, 39-59.
- AUFFRET, J., - 1979 - Enquête sur l'évolution de la pêche aux crustacés au Croisic : 1939-1978. *Bull.Soc.Sc.Nat.Ouest de la France*, nouvelle série, 1, 82-90.
- BAILEY, P., KILROE-SMITH, T.A., - 1975 - Effect of sample preparation on blood lead values. *Anal.Chim.Acta*, 77, 29-36.
- BARBIER, M., - 1976 - Actions de l'homme sur le milieu océanique dans "Introduction à l'Ecologie Chimique". Masson, Paris, 82-87.
- BAYER, E., - 1956 - Biologische and chemische wege zur anreicherung von spurenelementen (Marqueurs biologiques et chimiques pour l'enrichissement des éléments traces). *Experientia*, XII, 10, 365-404.
- BAYER, E., - 1964 - Structure and specificity of organic chelating agents. *Angewandte chemie*, 3, 5, 325-332.
- BELCHER, C.B., - 1972 - The determination of iron in iron alloys by atomic absorption spectrophotometry. *Anal.Chim.Acta*, 62, 87-93.
- BELLINGER, E.G., BENHAM, B.R., - 1978 - The levels of metals in dock-yard sediments with particular reference to the contributions from ship-bottom paints. *Environ.Pollut.*, 15, 71-81.

- BERNHARD, A., SCHER, Y., - 1951 - Bovin albumin standard for serum protein determinations. *Science*, 123, 674-676.
- BERTINE, K., - 1972 - Analytical techniques for selected inorganic species. In : "Marine pollution program. Strategies for a National Program". Ed. Goldberg, Univ. Southern California—Allan Hancock foundation, 41-52.
- BITTEL, R., - 1973 - Etude du comportement des métaux lourds en milieu marin en vue de l'évaluation de la capacité limite d'acceptation des écosystèmes océaniques pour la pollution chimique. *Rev. Intern. Océanogr. Méd.*, 30, 3-57.
- BOITEAU, H.L., METAYER, C., - 1978 - Microdosage du plomb, du cadmium, du zinc et de l'étain dans les milieux biologiques par spectrométrie d'absorption atomique après minéralisation et extraction. *Analisis*, 6, 8, 350-358.
- BOWEN, H.J.M., - 1966 - Trace elements in biochemistry. Acad. Press., New-York and London, 241 p.
- BOYDEN, C.R., - 1974 - Trace element content and body size in molluscs. *Nature*, 251, 311-314.
- BRYAN, G.W., - 1976 - Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms. In : "Effects of pollutants on aquatic organisms". Ed. Lockwood, Cambridge Univ. Press, 7-27.
- BUSSELEN, P., - 1970 - Effects of moulting cycle and nutritional conditions on haemolymph proteins in *Carcinus maenas*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 37, 73-83.
- CECCALDI, H.J., - 1976 - La biologie des crustacés et les substances dissoutes dans la mer. *Actualités de Bioch. Marine. Colloque GABIM-CNRS*, 233-260.
- CECCALDI, H.J., ARMENICO, M., - 1976 - Electrophorèse de l'hémolymph des crustacés. *J. Rech. Océanogr.*, 1, 1, 19-23.
- CECCALDI, H.J., - 1978 - La nutrition des crustacés. *Océanis*, 4, 1, 55-62.
- CERBOM - 1973 - Etude des facteurs de transfert de métaux lourds. Rapport d'activités 1972-1973, 25-31.
- CHAUVIN, J., - 1963 - Le plomb dans la protection contre la corrosion. Centre d'enseignement de la lutte contre la corrosion. Cours post-universitaires de Formation Professionnelle., 29 p.
- CHARMANTIER, G., - 1979 - L'ionorégulation et l'osmorégulation chez les crustacés ; influences écologiques et physiologiques. *Océanis*, 5, 5, 753-768.

- CHIN, H.P., - 1970 - Procedure for protein electrophoresis, in : "Cellulose acetate electrophoresis : Technics and applications". Ed. Ann Arbor Humprey, Sci. Publisher, London, 45-54.
- COONLEY, L.S., BAKER, E.B., HOLLAND, H.D., - 1971 - Iron in the Mullica river and in Great Bay, New-Jersey. Chem.Geol., 7, 51-63.
- CZOBIK, E.J., MATOUSEK, J.P., - 1974 - Interference effects in furnace atomic absorption spectrometry. Anal.Chem., 50, 1, 2-10.
- D'AMELIO, V., RUSSO, G., FERRARO, D., - 1974 - The effect of heavy metal on protein synthesis in crustaceans and fish. Rev.Intern. Océanogr.Méd., XXIII, 111-117.
- DESILOUS-PAOLI, J.M., - 1981 - Toxicité des éléments métalliques dissous pour les larves d'organismes marins : données bibliographiques. Rev.Trav.Inst.Pêches Marit., 45, 1, 73-83.
- DONNIER, B., - 1972 - Etude de la toxicité d'effluents de papeterie en milieu marin. Rev.Intern.Océanogr.Méd., XXVIII, 53-91.
- DRACH, P., TCHERNIGOVITZEFF, C., - 1967 - Sur la méthode de détermination des stades d'intermue et son application générale aux crustacés. Vie et Milieu, 18, 595-610.
- FISCHER, A.B., - 1980 - Occurrence and function of the metallo-thioneins, a class of metal-binding proteins. Thalassia Jugoslavica, 16, 2-4, 425-434.
- FINE, J.M., MARNEUX, M., LAMBIN, P., BARON, J.C., ROCHU, D., GHIDALIA, W., - 1971 - Structure immunochimique de l'hémocyanine. Etude chez dix espèces de crustacés décapodes. Extrait des Cahiers de Biol.Mar., XVI, 245-253.
- FREEDMAN, M.L., CUNNINGHAM, P.M., SHINDLER, J.E., ZIMMERMAN, M.J., - 1980 - Effect of lead speciation on toxicity. Bull.Environn. Contam.Toxicol., 25, 389-393.
- FUKAI, R., OREGIONI, B., - 1978 - Interlaboratory comparability of measurements of trace elements in marine organisms ; results of intercalibration exercise on oyster homogenate. Oceanologica Acta, 1, 3, 391-396.
- FUKAI, R., et al., - 1980 - Tripartite interlaboratory calibration of trace metal measurements on sea-water. Thalassia Jugoslavica, 16, 2, 171-176.
- FULLER, C.W., - 1977 - Electrothermal atomization for atomic absorption spectrometry. Anal.Sci.Monogr., 4. The Chemical Soc., London, 127 p.

- GARDINER, P.E., OTTAWAY, J.M., - 1981 - The application of gel filtration and electrothermal atomic absorption spectrometry to the speciation of protein-bound zinc and copper in human blood serum. *Anal.Chim.Acta*, 124, 281-294.
- GEORGE, S.G., - 1980 - Correlation of metal accumulation in mussels with the mechanisms of uptake, metabolism and detoxification. *Thalassia Jugoslavica*, 16, 2-4, 347-365.
- GHIDALIA, W., - 1969 - Etude électrophorétique et immunochimique du sérum d'un crustacé décapode *Macropipus puber*. Application à l'immunochimie systématique des crustacés. *Cahiers de Biol.Marine*, X, 109-128.
- GHIDALIA, W., VENDRELY, R., MONTI DE REZE, M., - 1971 - Electrophoretic analysis of *Macropipus puber* crustacea male serum : the copper fractions. *Comp.Biochem.Physiol.*, 40 A, 479-485.
- GHIDALIA, W., FINE, J.M., MARNEUX, M., - 1975 - On the presence of an iron-binding protein in the serum of a decapod crustacean (*Macropipus puber*). *Comp. Biochem.Physiol.*, 41 B, 349-354.
- GLENN, M., SAVORY, J., - 1971 - Determination of copper in serum with a graphite rod atomizer for atomic absorption spectrophotometry. *Anal.Chim.Acta*, 57, 2, 263-269.
- GOLDBERG, E.D., - 1957 - Biogeochemistry of trace metals. *Mem.Geol. Soc.Amer.*, 67, 345-357.
- GOLDBERG, E.D., - 1965 - Minor elements in sea water. In : "Chemical oceanography". *Acad.Press.*, New-York, 163-194.
- GORNALL, A.G., BARDAWILL, C.I., DAVID, M., - 1949 - Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction. *J.Biol.Chem.*, 177, 751-766.
- GOULD, E., KAROLUS, J.J., - 1975 - A new stain for copper-protein complexes : its uses with crustacean hemocyanins. *Anal.Biochem.*, 65, 515-519.
- GOYER, R.A., CHISOLM, J.J., - 1972 - Lead, in : "Metallic contaminants and human health". Ed.Douglas H.K. Lee. *Acad.Press*, New-York and London, 57-95.
- GRASSE, P.P., POISSON, R.A., TUZET, O., - 1969 - Zoologie I : Invertébrés. *Précis de sciences biologiques*. Masson et Cie, Paris, 935 p.
- GUTTIERREZ-GALINDO, E.A., BREITT-MAYER, J.P., - 1981 - Effet du zinc sur l'accumulation du mercure par la moule *Mytilus edulis*. *Rev. Intern.Océanogr.Méd.*, LXIII-LXIV, 97-101.

- HENRY, R.J., SOBEL, C., BERKMAN, S., - 1957 - Interferences with Biuret methods for serum proteins. *Anal.Chem.*, 29, 10, 1491-1495.
- JOHNSON, C.A., - 1975 - The determination of some toxic metals in human liver as a guide to normal levels in New Zealand. Part 1 : Determination of Bi, Cd, Cr, Co, Cu, Pb, Mn, Ni, Ag, Tl and Zn. *Anal.Chim.Acta*, 81, 69-74.
- JOHNSON, M.W., GENTILE, J.H., - 1979 - Acute toxicity of cadmium, copper and mercury to larval american lobster *Homarus americanus*. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.*, 22, 258-264.
- JORGENSEN, S.E., - 1979 - Modelling the distribution and effect of heavy metals in an aquatic ecosystem. *Ecol.Medelling*, 6, 199-222.
- KESTER, D.R., PAULSON, A.J., ZUEHLKE, R.W., BYRNE, R.H., - 1980 - Inorganic complexes of copper (II) in sea water. *Thalassia Jugoslavica*, 16, 2, 181-183.
- KINGSLEY, G.R., - 1939 - Total protein, albumin and globulin. *J.Biol. Chem.*, 131, 197-206.
- KLOTZ, I.M., KLOTZ, T.A., - 1955 - Oxygen-carrying proteins : a comparison of the oxygenation reaction in hemocyanin and hemerythrin with that in hemoglobin. *Science*, 121, 477-480.
- LEGGETT BAILEY, J., - 1962 - Techniques in protein chemistry. Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London, New-York, 310 p.
- LOCKWOOD, A.P.M., - 1976 - Effects of pollutants on aquatic organisms. Ed. Lockwood, Cambridge Univ. Press, Southampton, 217 p.
- LONG, D.T., ANGINO, E.E., - 1977 - Chemical speciation of Cd, Cu, Pb and Zn in mixed freshwater, seawater and brine solutions. *Geochim. Cosmochim.Acta*, 41, 1183-1191.
- LUNDGREN, G., LUNDMARK, L., JOHANSSON, G., - 1974 - Temperature controlled heating of a graphite tube atomizer in flameless atomic absorption spectrometry. *Anal.Chem.*, 46, 8, 1028-1031.
- MAC CORD, J.M., - 1979 - The cuprozinc enzymes, the iron enzymes. In "Isozymes", Alan R.Liss, Inc., New-York, 3, 7-12.
- MACHIROUX, R., DUPONT, J.C., - 1976 - Dosage des métaux lourds dans le plancton par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme. *Anal.Chim.Acta*, 85, 231-239.

- MANWELL, C., BAKER, C.M., - 1963 - Starch gel electrophoresis of sera from some marine arthropods : studies on the heterogeneity of hemocyanin and on a "ceruloplasmin-like protein". *Comp.Biochem.Physiol.*, 8, 193-208.
- MARKL, J., HOFER, A., BAUER, G., MARKL, A., KEMPTER, B., BREZINGER, M., LINDZEN, B., - 1979 - Subunit heterogeneity in arthropod hemocyanins : II. Crustacea. *J.Comp.Physiol.*, 133, 167-175.
- MARKL, J., KEMPTER, B., - 1980 - Subunit heterogeneity in crustacean hemocyanins as deduced by two-dimensional immunoelectrophoresis. *J.Comp.Physiol.*, 141, 495-502.
- MARTIN, J.L.M., CECCALDI, H.J., - 1969 - Evolution des protéines de l'hémolymphe chez *Carcinus maenas* mâle et femelle durant le cycle d'intermue. *C.R.Soc.Biol.*, 11, 163, 2362-2365.
- MARTIN, J.L.M., - 1974 - Metals in *Cancer irroratus* (crustacea : decapoda) : concentrations, concentration factors, discrimination factors, correlations. *Marine Biology*, 28, 245-251.
- MARTIN, J.L.M., MEYBECK, M., SALVADORI, F., THOMAS, A., - 1976 - Pollution chimique des estuaires. Etat actuel des connaissances. *Rap.Sci.Tech.*, CNEXO, 22, 283 p.
- MARTIN, J.L.M., - 1977 - Le métabolisme du magnésium chez *Cancer irroratus* (crustacé décapode). *Ann.Inst.Océanogr.*, Paris, 53, 1, 591-602.
- MARTIN, J.L.M., - 1977 - Métabolisme de Fe, Cu, Zn, Mg, Mn et Co dans les oeufs de *Cancer irroratus* (crustacé décapode). *Publ.CNEXO*, 5, 295, 507-512.
- MARTIN, J.L.M., - 1978 - Le métabolisme hydrique chez *Cancer irroratus* (crustacé décapode). *Téthys*, 8, 2, 193-196.
- MARTIN, J.L.M., - 1979 - Schema of lethal action of copper on mussels. *Bull.Environm.Contam.Toxicol.*, 21, 808-814.
- MARTIN, J.L.M., VAN WORMHOUDT, A., CECCALDI, H.J., - 1979 - Zinc-hemocyanin binding in the haemolymph of *Carcinus maenas* (crustacea decapoda). *Publ.CNEXO*, 5, 363, 355-357.
- MARTINEIE, D., NURNBERG, H.W., STOEPLER, M., BRANICA, M., - 1980 - Toxic metal levels in bivalves and their ambient water from the Lim Channel. *Thalassia Jugoslavica*, 16 (2-4), 297-315.
- MAURER, H.R., - 1971 - Detection reagents and color reactions. In : "Disc electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis". Ed. De Gruyter. Berlin, New-York, 72-82.

- MERICAM, P., ASTRUC, M., - 1979 - Mise au point sur l'état chimique des métaux lourds dans les eaux douces naturelles et l'eau de mer. Techn.Sci.Mun., L'eau, 74ème année, 1, 33-40.
- METAYER, C., AMIARD, J.C., AMIARD-TRIQUET, C., - 1982 - Accumulation de quelques éléments traces métalliques (Cd, Pb, Cu et Zn) chez la sole et le flet. Variations en fonction de l'âge et organotropisme. Rev.Intern.Océanogr.Méd., LXVI-LXVII, 33-46.
- MOODY, G.J., THOMAS, J.D.R., - 1975 - Cellulose acetate electrophoresis. In : "Practical electrophoresis". Merrow Techn.Library, Merrow, 17-28.
- MOSS, D.W., - 1979 - Separation of multiple forms of enzymes. In : "Isoenzymes analysis". Anal.Sci.Monographs 6, The Chem.Soc., London, 39-71.
- NOEL-LAMBOT, F., BOUQUEQNEAU, J.M., FRANQUENNE, F., DISTECHE, A., - 1978 - Le rôle des métallothionéines dans le stockage des métaux lourds chez les animaux marins. Rev.Intern.Océanogr.Méd., XLIX, 3, 13-19.
- NORVAL, E., BUTLER, L.R.P., - 1972 - The determination of lead in blood by atomic absorption with the high-temperature graphite tube. Anal.Chim.Acta, 58, 1, 47-56.
- OLAFSON, R.W., SIM, R.G., BOTO, K.G., - 1978 - Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. Comp.Biochem.Phys., 62 B, 407-416.
- OVERNELL, J., TREWHELLA, E., - 1979 - Evidence for the natural occurrence of (cadmium, copper)-metallothionein in the crab *Cancer pagurus*. Comp.Biochem.Phys., 64 C, 69-76.
- PASSANO, L.M., - 1960 - Molting and its control. In : "The physiology of crustacea". Acad.Press, London, 1, 473-536.
- PASTEWKA, J.V., NESS, A.T., PEACOCK, A.C., - 1966 - Electrophoretic patterns of normal human serums by disc electrophoresis in polyacrylamide gel. Clin.Chim.Acta, 14, 219-226.
- PEDEN, J.D., CROTHERS, J.H., WATERFALL, C.E., BEASLEY, J., - 1973 - Heavy metals in somerset marine organisms. Marine Poll.Bull., 4, 7-9.
- PETERS, T.Jr., - 1968 - Proposal for standardisation of total protein assays. Clin.Chem., 14, 12, 1147-1159.

- PINTA, M., - 1962 - Recherche et dosage des éléments traces par spectrophotométrie d'absorption, spectrographie d'émission, polarographie. Dunod, Paris, 726 p.
- PINTA, M., RIANDEY, C., - 1975 - Etude physico-chimique du mécanisme de l'atomisation thermo-électrique et de ses perturbations. *Analisis*, 3, 2, 86-93.
- PINTA, M., BARON, D., RIANDEY, C., GHIDALIA, W., - 1978 - Non-flame atomic absorption analysis of trace metal element fixation by seric proteins of crustacean decapods. *Spectrochim.Acta*, 33 B, 489-494.
- PINTA, M., et al., - 1979 - Spectrométrie d'absorption atomique. Tome II : Applications à l'analyse chimique (2ème éd.). Masson, Paris, 263-696.
- PINTA, M., TRAN, R., GHIDALIA, W., - 1983 - Fixation des métaux lourds : fer, zinc, cuivre, plomb, par certaines protéines sériques des animaux marins. *Rap.Conv.Rech.Ministère de l'Environnement-ORSTOM Bondy*, 27 p.
- QURESHI, S.A., SAKSENA, A.B., SINGH, V.P., - 1980 - Acute toxicity of some metals to fish food organisms. *Intern.J.Environm.Studies*, 14, 325-327.
- RAMADE, F., - 1977 - Ecotoxicologie. Masson, Paris, 205 p.
- RAPIN, F., FERNEX, F., - 1981 - Teneurs des métaux lourds dans les sédiments des baies de nice et de Villefranche-sur-Mer (Méditerranée France) : origine des contaminations. *Rev.Intern.Océanogr.Méd.*, LXIII-LXIV, 85-95.
- RIANDEY, C., - 1971 - Interactions dans "Spectrométrie d'absorption atomique". Tome I, par M.PINTA et al., Masson, Paris, 129-199.
- RIANDEY, C., LINHARES, P., PINTA, M., - 1975 - Application de l'absorption atomique "sans flamme" au dosage d'éléments traces dans les minéraux naturels silicatés. *Analisis*. 3, 6, 303-311.
- RIANDEY, C., GAVINELLI, R., PINTA, M., - 1980 - Influence de la vitesse de chauffage sur l'atomisation électrothermique en spectrométrie d'absorption atomique. Applications aux éléments volatils, cadmium et plomb. *Spectrochim.Acta*, 35 B, 765-773.
- RILEY, J.P., SHIRROW, G., - 1965 - Minor elements in sea water : concentration by organisms. In : "Chemical oceanography". Ed. by Riley J.P. and Shirrow G. Acad.Press, London and New-York, 163-164.
- ROBERTSON, D.E., PERKINS, R.W., - 1972 - Base line studies of pollutants in the marine environment and research recommendations ; International decade of ocean exploration (I.O.D.E.). Baseline Conf. May 24-26, New-York.

- ROBINSON, J.W., WOLCOTT, D.K., RHODES, L., - 1974 - Direct analysis of blood, urine, sea water, filter paper and polyethylene by atomic absorption spectrometry with the "hollow-T" atomizer. *Anal.Chim. Acta*, 78, 2, 285-292.
- ROCHE, J., JEAN, G., - 1934 - Recherches sur la composition en acides aminés des pigments respiratoires des invertébrés (hémocyanines, hémérythrine, chlorocruorines, érythrocrucorines). *Bull.Soc.Chim. Biol.*, 16, 1, 769-778.
- ROCHU, D., FINE, J.M., - 1979 - *Cancer pagurus* hemocyanin : electrophoretic and antigenic heterogeneity of the monomeric subunits. *Comp.Biochem.Physiol.*, 66 B, 273-278.
- ROUSSELET, F., - 1968 - Spectrophotométrie par absorption atomique appliquée à la biologie. Méthodes d'analyses. S.E.D.E.S., Paris, 160 p.
- SEBIA, - 1979 - Instructions pour l'électrophorèse sur Cellogel. Protéines sériques. SEBIA, Brochure d'utilisation, 30 p.
- SIEBERS, D., LUCU, C., SPERLING, K.R., EBERLEIN, K., - 1972 - Kinetics of osmoregulation in the crab *Carcinus maenas*. *Marine Biol.*, 17, 291-303.
- SCHUBERT, J., - 1954 - Interactions of metals with small molecules in relation to metal-protein complexes. In : "Trace metals and proteins". Ed. R.N.Gurd, Acad.Press, New-York, 114-163.
- SCHRAMMEL, P., - 1973 - Determination of eight metals in the international biological standard by flameless atomic-absorption spectrometry. *Anal.Chim.Acta*, 67, 69-77.
- SEGAR, D.A., COLLINS, J.D., RILEY, J.P., - 1971 - The distribution of the major and some minor elements in marine animals. Part. II : Molluscs. *J.Mar.Biol.*, 51, 131-136.
- SEGAR, D.A., GONZALEZ, J.G., - 1971 - Evaluation of atomic absorption with a heated graphite atomizer for the direct determination of trace transition metals in sea water. *Anal.Chim.Acta*, 58, 7-14.
- TALBOT WATERMAN, H., - 1960 - The physiology of crustacea. Vol. I : Metabolism and growth. Acad.Press, New-York, 540 p.
- THUET, P., - 1975 - L'ionorégulation et l'osmorégulation : aspects physiologiques. *Océanis*, 5, 5, 769-797.
- TRAN, R., PINTA, M., - 1983 - Microdosage du plomb et du fer au niveau protéines plasmatiques de crustacés contaminés. Comm. 35ème Congrès GAMS-3ème Congrès Chim.Anal., Paris, 9 p.

- TUCKER, R.K., MATTE, A., - 1980 - In vitro effects of cadmium and lead on ATPases in the gill of the rock crab *Cancer irroratus*. Bull. Environm.Contam.Toxicol., 24, 847-852.
- TURNER, D.R., WHITFIELD, M., - 1980 - Chemical definition of the biologically available fraction of trace metals in natural waters. Thalassia Jugoslavica, 16, 2-4, 231-241.
- UNDERWOOD, E.J., - 1971 - Trace elements in human and animal nutrition. Acad.press, New-York and London, 3rd.Ed., 543 p.
- VERNBERG, F.J., VERNBERG, N.B., - 1974 - Pollution and physiology of marine organisms. Acad.Press, New-York and London, 560 p.
- VICENTE, N., CHABERT, D., ESCOUBET, P., - 1976 - Contamination de mollusques méditerranéens par un métal lourd : le plomb. Tethys, 8, 4, 345-355.
- WALDICHUKK, M., - 1977 - Pollution marine mondiale. Aperçu général. Com.Océanogr.Intergouvernementale, sér.Tech. 18, 83 p.
- WILKINSON, J.H., - 1970 - Cellulose acetate electrophoresis. In : "Isoenzymes". Sci. paperbacks, Chapman and Hall, London, 2nd éd., 16-18.
- WILLIAMS, D.R., - 1971 - The metals of life. The solution chemistry of metal ions in biological systems. Ed. Van Nostrand Reinhold Company. The Camelot Press Ltd., London, 172 p.
- ZUCKERKANDL, E., - 1959 - La non-réactivité du cuivre dans l'hémocyanine intacte. Bull.Soc.Chim.Biol., 41, 12, 1629-1648.