

Bioconcentration de métaux lourds chez une annélide polychète estuarienne: *Nereis diversicolor*

Nereis diversicolor
Annélide polychète
Métaux lourds
Bioconcentration

Nereis diversicolor
Annelida polychaeta
Heavy metals
Bioconcentration

François SEPTIER ^a, Sylvain DEMUYNCK ^a, Patrick THOMAS ^b et Nicole DHAINAUT-COURTOIS ^{a*}

^a URA CNRS n°148 et Service d'Écotoxicologie, bâtiment SN 3, Université de Lille I, Cité Scientifique, 59655 Villeneuve d'Ascq Cedex, France.

^b Service des Eaux, Institut Pasteur de Lille, 1, rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

* auteur à qui adresser la correspondance.

RÉSUMÉ

Douze métaux lourds (Al, Cd, Cr, Cu, Hg, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, V et Zn) ont été dosés dans les sédiments et dans des néréis femelles prélevés dans l'estuaire de l'Aa et le petit port de Boulogne.

Des variations de concentration parfois importantes ont été enregistrées en fonction du site, de l'époque de la récolte, de l'âge des animaux et des cations envisagés. D'un autre côté, de nombreuses corrélations intermétaux ont été mises en évidence dans les néréis. Les études cytochimiques et radioautographiques ont montré que le tégument et l'intestin constituent deux voies de pénétration et de stockage. L'intestin pourrait en outre constituer un site de détoxification et d'élimination. Ces résultats encore préliminaires sont discutés.

Oceanologica Acta, 1991. Actes du Colloque international sur l'environnement des mers épicontinentales, Lille, 20-22 mars 1990, vol. sp. n° 11, 263-274.

ABSTRACT

Bioconcentration of heavy metals in an estuarine annelida polychaeta: *Nereis diversicolor*

The concentrations of twelve heavy metals (aluminium, cadmium, chromium, copper, mercury, iron, manganese, nickel, lead, titanium, vanadium and zinc) in sediments and in female nereis collected in the estuary of the river Aa and in the little harbour of Boulogne were investigated.

Concentration variations which were sometimes considerable, were found according to the site, the period of the year, the age of the animals and the cations studied. In addition, numerous intermetal correlations were detected in the nereis. Cytochemical and radioautographic studies revealed that the tegument and the gut were two routes of penetration and storage. Moreover, the gut could be a detoxification and excretory site. These preliminary results are discussed.

Oceanologica Acta, 1991. Proceedings of the International Congress on the environment of epicontinental seas, Lille, 20-22 March, 1990, vol. sp. n° 11, 263-274.

Tableau 1

Concentrations ($\mu\text{g/g}^{-1}$ poids sec) des douze métaux lourds dans les sédiments et dans les trois classes d'âge de néréis femelles distinguées selon le diamètre ovocytaire (1, < 80 μm ; 2, 80-130 μm ; 3 > 130 μm), a : estuaire de l'Aa; b: petit port de Boulogne.

Tableau 1 a :

	Avril 1988	Juillet 1988	Octobre 1988	Février 1989	Avril 1989
			ALUMINIUM		
Sédiment	5200	4300	/	1750	6200
Néréis 1	2967	600	183	4	240
Néréis 2	2433	700	333	90	427
Néréis 3	2767	600	33	52	67
			CADMIUM		
Sédiment	0,80	0,20	/	0,80	0,70
Néréis 1	0,23	0,27	0,07	0,10	0,07
Néréis 2	0,23	0,27	0,07	0,05	0,07
Néréis 3	0,23	0,10	0,05	0,05	0,03
			CHROME		
Sédiment	8,30	20,00	/	3,00	33,00
Néréis 1	23,00	16,00	5,50	0,60	0,33
Néréis 2	40,00	10,00	7,00	0,75	0,60
Néréis 3	22,00	11,00	3,00	1,20	0,53
			CUIVRE		
Sédiment	17	14	/	12	17
Néréis 1	55	110	50	21	10
Néréis 2	43	62	21	26	11
Néréis 3	60	80	16	15	9
			FER		
Sédiment	10500	10000	/	3900	14400
Néréis 1	1967	400	453	245	280
Néréis 2	1600	433	493	330	453
Néréis 3	1867	400	243	320	233
			MERCURE		
Sédiment	0,260	0,270	/	0,120	0,190
Néréis 1	0,087	0,085	0,095	0,085	0,070
Néréis 2	0,080	0,120	0,090	0,045	0,100
Néréis 3	0,070	0,080	0,090	0,050	0,065
			MANGANESE		
Sédiment	280,0	220,0	/	425,0	280,0
Néréis 1	85,0	23,0	18,0	5,5	13,0
Néréis 2	78,0	26,0	27,0	9,5	17,0
Néréis 3	78,0	28,0	11,0	11,0	17,0
			NICKEL		
Sédiment	0,1	0,5	/	16,0	10,0
Néréis 1	13,0	9,0	6,0	2,0	0,6
Néréis 2	23,0	6,3	6,0	3,0	0,6
Néréis 3	12,0	5,3	3,3	3,0	1,3
			PLOMB		
Sédiment	50,0	42,0	/	55,0	50,0
Néréis 1	9,30	3,30	1,00	1,50	0,67
Néréis 2	7,00	4,00	1,80	1,80	1,00
Néréis 3	9,30	5,30	1,20	1,80	0,67
			TITANE		
Sédiment	55,0	73,0	/	9,0	170,0
Néréis 1	170,0	47,0	12,3	3,0	25,0
Néréis 2	140,0	63,0	19,7	8,3	45,0
Néréis 3	163,0	43,0	2,7	6,0	6,3
			VANADIUM		
Sédiment	28,00	21,00	/	5,00	32,00
Néréis 1	8,80	3,20	1,70	1,20	3,00
Néréis 2	7,90	3,80	2,00	1,30	4,00
Néréis 3	8,00	3,60	0,97	1,20	1,70
			ZINC		
Sédiment	120	95	/	200	110
Néréis 1	197	154	160	180	143
Néréis 2	180	137	135	158	133
Néréis 3	188	138	124	168	133

Tableau 1 b

Concentrations ($\mu\text{g/g}^{-1}$ dry weight) of twelve heavy metals in the sediment and the three classes based on their oocyte diameter (1, $< 80 \mu\text{m}$; 2, 80-130 μm ; 3 $> 130 \mu\text{m}$).

a: estuary of the river Aa; b: little harbour of Boulogne.

Tableau 1 b:

	Avril 1988	Juillet 1988	Octobre 1988	Février 1988	Avril 1989
			ALUMINIUM		
Sédiment	15000	4300	4000	5200	7100
Néréis 1	1067	1667	487	248	40
Néréis 2	1250	1067	317	82	30
Néréis 3	800	533	197	95	20
			CADMIUM		
Sédiment	25,00	8,00	6,20	0,70	10,00
Néréis 1	0,83	3,00	1,07	0,15	0,30
Néréis 2	1,30	1,33	0,67	0,17	0,20
Néréis 3	0,85	0,57	0,40	0,20	0,10
			CHROME		
Sédiment	3,30	12,00	6,40	26,00	17,00
Néréis 1	13,00	19,00	14,60	13,00	0,50
Néréis 2	11,00	18,00	11,80	13,00	0,25
Néréis 3	21,00	20,00	12,20	7,50	0,25
			CUIVRE		
Sédiment	29	30	21	15	95
Néréis 1	40	87	44	315	96
Néréis 2	43	167	19	228	55
Néréis 3	25	220	12	24	32
			FER		
Sédiment	5800	10200	6900	10000	14000
Néréis 1	413	333	260	320	130
Néréis 2	340	300	293	189	125
Néréis 3	297	270	183	225	100
			MERCURE		
Sédiment	1,75	2,20	1,70	0,37	1,30
Néréis 1	0,183	/	0,320	/	0,120
Néréis 2	0,180	0,200	0,140	/	/
Néréis 3	0,127	0,130	0,095	0,057	0,230
			MANGANESE		
Sédiment	240	4200	3280	175	770
Néréis 1	1330	5000	633	29	54
Néréis 2	1550	2730	310	34	48
Néréis 3	1165	1267	260	62	24
			NICKEL		
Sédiment	18,0	75,0	54,0	11,0	29,0
Néréis 1	10,0	11,0	9,3	14,0	2,0
Néréis 2	12,0	10,0	9,3	18,0	2,0
Néréis 3	16,0	12,0	8,7	10,0	1,7
			PLOMB		
Sédiment	300,0	240,0	110,0	34,0	310,0
Néréis 1	12,3	6,7	19,0	15,0	13,0
Néréis 2	17,0	6,7	14,0	13,0	7,0
Néréis 3	16,7	6,7	11,0	8,8	6,0
			TITANE		
Sédiment	87,0	32,0	23,0	95,0	64,0
Néréis 1	29,0	31,0	15,0	19,0	1,5
Néréis 2	32,0	20,0	10,0	5,6	1,5
Néréis 3	23,0	11,0	7,0	6,3	0,7
			VANADIUM		
Sédiment	19,00	11,00	11,30	24,00	26,00
Néréis 1	1,80	3,60	1,67	0,70	0,50
Néréis 2	2,10	1,80	0,93	0,11	0,30
Néréis 3	1,60	0,80	0,77	0,10	0,30
			ZINC		
Sédiment	2280	770	750	115	1040
Néréis 1	347	550	220	178	170
Néréis 2	373	312	163	194	160
Néréis 3	343	257	155	188	153

INTRODUCTION

Situé à l'interface continent-océan, l'estuaire est un site privilégié pour l'évaluation des flux de contaminants chimiques et organiques d'origine anthropique. A ce niveau, beaucoup de polluants se déposent dans la vase où vivent

quelques espèces d'invertébrés très représentatives du milieu. Les animaux endobenthiques estuariens constituent donc l'un des meilleurs modèles pour l'étude approfondie des effets biologiques des contaminants et du transfert de ces derniers du monde minéral aux organismes vivants. Dans un certain nombre d'estuaires, en particulier dans

Tableau 2

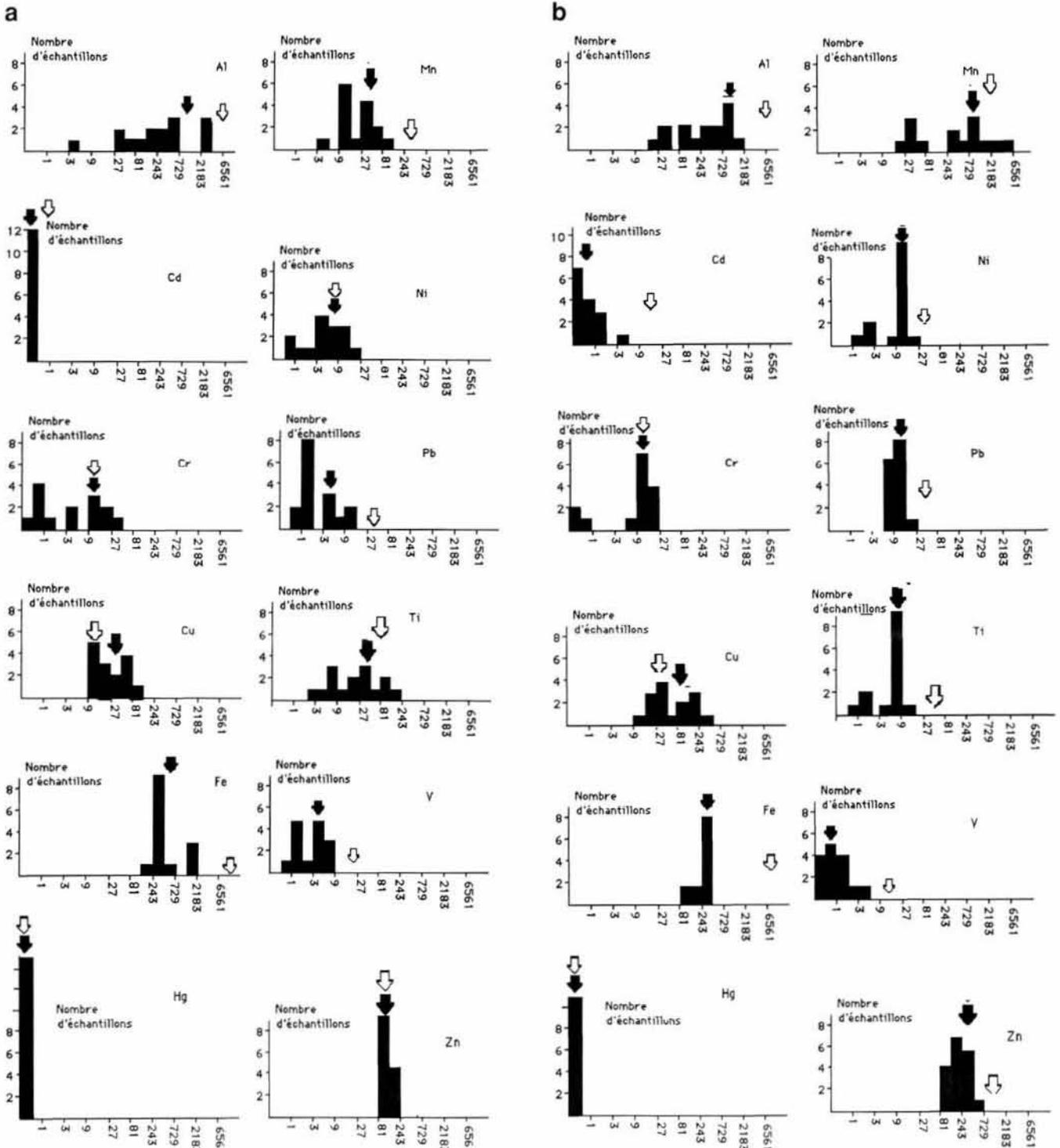
Répartition des échantillons d'animaux (quinze échantillons répartis sur cinq campagnes) en fonction de leurs concentrations en métaux.

Moyenne pour les vers [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (p. s.):ppm] ; moyenne pour les sédiments [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (p. s.):ppm].

a : estuaire de l'Aa b : petit port de Boulogne.

Distribution of the animal samples (fifteen samples for five collectings) according to their metal concentrations.

Average for worms [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (d.w.):ppm] ; average for sediments [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (d.w.):ppm]. a: estuary of the river Aa; b: little harbour of Boulogne.



celui de l'Aa, l'espèce de loin la mieux représentée est l'annélide polychète *Nereis diversicolor*. Ce ver euryhalin, qui forme l'un des premiers maillons de la chaîne alimentaire, présente les caractères taxonomiques, biogéographiques, écologiques, physiologiques et écotoxicologiques définis par divers auteurs (revue in Butler *et al.*, 1971 ; Philipps, 1977 ; 1980) d'un excellent bioindicateur de pollution.

En vue d'étudier les modalités de transfert des métaux traces dans des organismes marins, nous avons donc choisi la néréide, modèle par ailleurs très étudié dans notre laboratoire sur le plan fondamental et écotoxicologique.

Des études antérieures ont en effet permis de détecter quelques effets pathologiques dus à certains ions métalliques. En bref, lors de contaminations expérimentales, le chrome (Cr) et le plomb (Pb) ont provoqué respectivement des nécroses tégumentaires et une abondante sécrétion de mucus (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1988 ; 1989), tandis que le mercure (Hg) entraînait des contractions musculaires importantes dans le tiers antérieur du ver (Dennai *et al.*, 1986). Ces observations ont été confirmées par des examens au microscope électronique, lesquels ont également révélé d'autres effets cytologiques se situant essentiellement au niveau : a) du système nerveux central [Hg (Dennai *et al.*, 1986), Pb (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1988)] ; b) de l'intestin, avec formation de sphérocristaux provoquée par tous les métaux étudiés [cadmium (Cd), Cr, Hg, nickel (Ni) et Pb] (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1988) ; c) des granulocytes I. Ces derniers, caractérisés par la présence de granules cytoplasmiques et de microfilaments (Dhainaut, 1984 ; Dhainaut et Porchet-Henneré, 1988) sont libres dans le liquide coelomique du ver. Ils présentent des analogies structurales avec les neutrophiles des mammifères. Lors d'un stress - pollution métallique ou bactériologique, par exemple - les granules des granulocytes I sont rejetés dans le milieu intérieur (Porchet-Henneré *et al.*, 1987 ; M'Béri, 1988). Un phénomène de dégranulation a été observé après contamination par les cinq métaux traces étudiés (Cd, Cr, Hg, Ni et Pb).

Il a également été trouvé dans notre laboratoire que deux catégories de molécules de nature protéique (masses moléculaires supérieure à 79 kDa et voisine de 10 kDa) sont capables de lier certains métaux lourds tels que le Cd, le Zn et le Fe. En raison de leur apparition respective dans les pics I et II obtenus par chromatographie de gel filtration sur Sephadex G 75, ces molécules ont été appelées métalloprotéines I (MP I) et II (MP II) (Dennai, 1984 ; Dennai *et al.*, 1986 ; Nejmeddine, 1987 ; Nedmeddine *et al.*, 1988). Eu égard à sa masse moléculaire analogue à celle des métallothionéines, c'est la MP II qui a été étudiée en priorité. Celle-ci a été isolée, purifiée et caractérisée (Nejmeddine, 1987 ; Nejmeddine *et al.*, 1988). Sa composition en acides aminés (très peu de cystéine, présence d'acides aminés aromatiques) et son spectre d'absorption en ultraviolet montrent clairement que la MP II n'est pas une métallothionéine. De plus, grâce à un anticorps polyclonal (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1987) et à des anticorps monoclonaux (Porchet-Henneré *et al.*, 1987) fabriqués contre la MP II, il a pu être montré que les granulocytes I décrits ci-dessus constituent au moins partiellement le site de synthèse de

cette molécule. Un début de séquençage du côté N-terminal a été réalisé. La recherche d'homologie avec d'autres molécules connues permet déjà un rapprochement intéressant avec des métalloprotéines (myohémérythrine et hémérythrine présentes dans un autre groupe d'invertébrés: les sipunculien (Demuyne *et al.*, 1991). Il convient d'ajouter que la MP II des néréides possède vraisemblablement un pouvoir bactériostatique (Dhainaut *et al.*, 1989).

Compte tenu de cet ensemble de résultats, il nous a paru intéressant d'entreprendre l'étude du transfert des micropolluants du monde minéral aux néréides, et de caractériser les voies de pénétration, les sites de stockage et, éventuellement de détoxication.

LIEUX DE RÉCOLTE, MATÉRIELS ET MÉTHODES

L'estuaire de l'Aa et, pour comparaison avec un autre lieu pollué différemment, le petit port de Boulogne (L'Hôpital et Delattre, 1983) ont été choisis comme sites de récolte.

Les campagnes de prélèvement ont eu lieu en avril, juillet et octobre 1988, février et avril 1989.

Matériel biologique

Des *Nereis diversicolor* O.F. Müller femelles (les mâles sont trop peu nombreux) ont été recueillies et réparties en trois classes d'âge. Ces dernières sont établies en fonction du diamètre ovocytaire: inférieur à 80 µm, compris entre 80 et 130 µm, supérieur à 130 µm. Rappelons que les vers vivent deux ans et meurent après la période de reproduction.

Dosages

Douze métaux lourds ont été recherchés: l'aluminium (Al), le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le mercure (Hg), le fer (Fe), le manganèse (Mn), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le titane (Ti), le vanadium (V) et le zinc (Zn). Chaque dosage a été effectué à partir d'une fraction sédimentaire (< 1 mm) ou d'un broyat de soixante vers récoltés dans une zone déterminée d'une superficie d'une centaine de mètres carrés.

La minéralisation des vers est conduite à partir d'un lyophilisat réduit dans un mortier à une poudre fine de taille inférieure à 1 mm. Une prise d'essai de 1,5 g subit une pré-digestion à froid dans 10 ml d'acide nitrique suprapur. On chauffe ensuite jusqu'à disparition des vapeurs nitreuses. Après addition à froid d'un mélange HNO₃ + H₂SO₄ + HClO₄, dans les proportions 10/2/3, le chauffage est repris jusqu'à l'apparition de fumées blanches (Haig *et al.*, 1980).

Un gramme de sédiment est minéralisé dans 4 ml d'acide chlorhydrique concentré suprapur et 10 ml d'acide nitrique concentré suprapur pendant une nuit à froid dans un bécher en téflon recouvert d'un verre de montre. Après deux heures de chauffage à reflux, le résidu est amené à sec puis repris par 15 ml d'acide chlorhydrique 1 N, filtré sur papier whatman 2V et complété avec de l'eau distillée qsp 50 ml.

Tableau 3

Variation d'avril à octobre 1988 de la concentration [exprimée en $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (p. s.)] de quelques métaux lourds dans le sédiment du petit port de Boulogne.

Variations from April to October of the concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (d. w.)] of some heavy metals in the sediment of the little harbour of Boulogne.

	Avril	Octobre
Cadmium	25	0,4
Plomb	300	40
Zinc	2280	345
Titane	87	12
Aluminium	15000	4000

Tableau 4

Teneurs métalliques [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (p. s.)] dans différentes couches du sédiment (zone A : 0 à -10 cm ; zone b : -10 à -20 cm ; zone c : -20 à -30 cm).

Metal concentrations [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (d. w.)] at different levels in the sediment (zone A: 0 to -10 cm; zone b: -10 to -20 cm; zone c: -20 to -30 cm).

Niveau	Cuivre	Zinc	Chrome	Nickel	Fer
0, - 10 cm	9,5	117	34	11	12400
- 10, - 20	9,5	154	36	13	13700
- 20, - 30	12,5	193	45	16	20200

Tableau 5

Étude granulométrique du sédiment.

Granulometric study of the sediment.

Pourcentage de fraction fine < 63 μm			
Niveau de prélèvement	Essai 1	Essai 2	Essai 3
0-10 cm	74,6 %	86,87 %	79,6 %
10-20 cm	77,16 %	89,99 %	84,24 %
20-30 cm	89,0 %	95,97 %	89,93 %

Les métaux sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique en flamme (Varian AA 1475 correction par lampe D2) pour la plupart, ou en four (Varian AA6, four CRA 90 correction par lampe H2) pour le plomb et le cadmium; l'aluminium, le nickel, le chrome, le vanadium et le titane sont dosés par spectrométrie d'émission atomique (Plasma II, Perkin Elmer). Les teneurs en métaux des sédiments ont également été étudiées en fonction de la profondeur. Tous les résultats des dosages sont exprimés en μg par gramme de poids sec [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (p.s.)].

Intoxication expérimentale

Les animaux sont maintenus dans de l'eau de mer contenant $22\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ de cadmium apporté sous forme de CdCl_2 (Dennaï *et al.*, 1986). L'intoxication est réalisée dans des récipients de verre avec 300 ml de solution et cinq vers/pot. Toutes les expériences ont été refaites trois fois.

Tableau 6

Répartition verticale des néréis en fonction de leur taille (< 3 cm ; 3-5 cm ; > 5 cm).

Vertical distribution of the nereis according to size (< 3 cm; 3-5 cm; > 5 cm).

	Total	> 5 cm	3-5 cm	< 3 cm
Essai I				
A	6	0	0	6
B	8	2	3	3
C	9	5	4	0
Essai II				
A	8	0	0	8
B	16	10	6	0
C	10	10	0	0
Essai III				
A	1	0	0	1
B	10	7	0	3
C	10	8	0	2

Corrélations entre métaux

Les corrélations entre les teneurs métalliques du sédiment et de *N. diversicolor* sont calculées selon la technique classique décrite dans *Méthode Statistique* (Frontier, 1981) suivant la formule:

$$r = \frac{\Sigma (XY) - N.\bar{X}\bar{Y}}{\sqrt{[\Sigma (X^2 - N.\bar{X}^2)] [\Sigma (Y^2 - N.\bar{Y}^2)]}}$$

Cytochimie

La méthode utilisée est celle de Timm (1958) modifiée par Hacker *et al.* (1988). Cette technique est basée sur la conversion des cations métalliques disponibles par un traitement au sulfure de sodium et le dépôt ultérieur d'argent métallique formé par la réduction d'acétate d'argent par de l'hydroquinone.

Radioautographie

La technique classique utilisée en vue d'une étude cytologique a été réalisée selon le protocole décrit par Dhainaut-Courtois et Dhainaut (1976) après injection dans le coelome de Cd^{109} ($2\text{ mCi}\cdot\text{ml}^{-1}$) et une durée d'incorporation de trois heures.

RÉSULTATS

Concentration des douze métaux lourds dans les sédiments et transfert dans les néréis

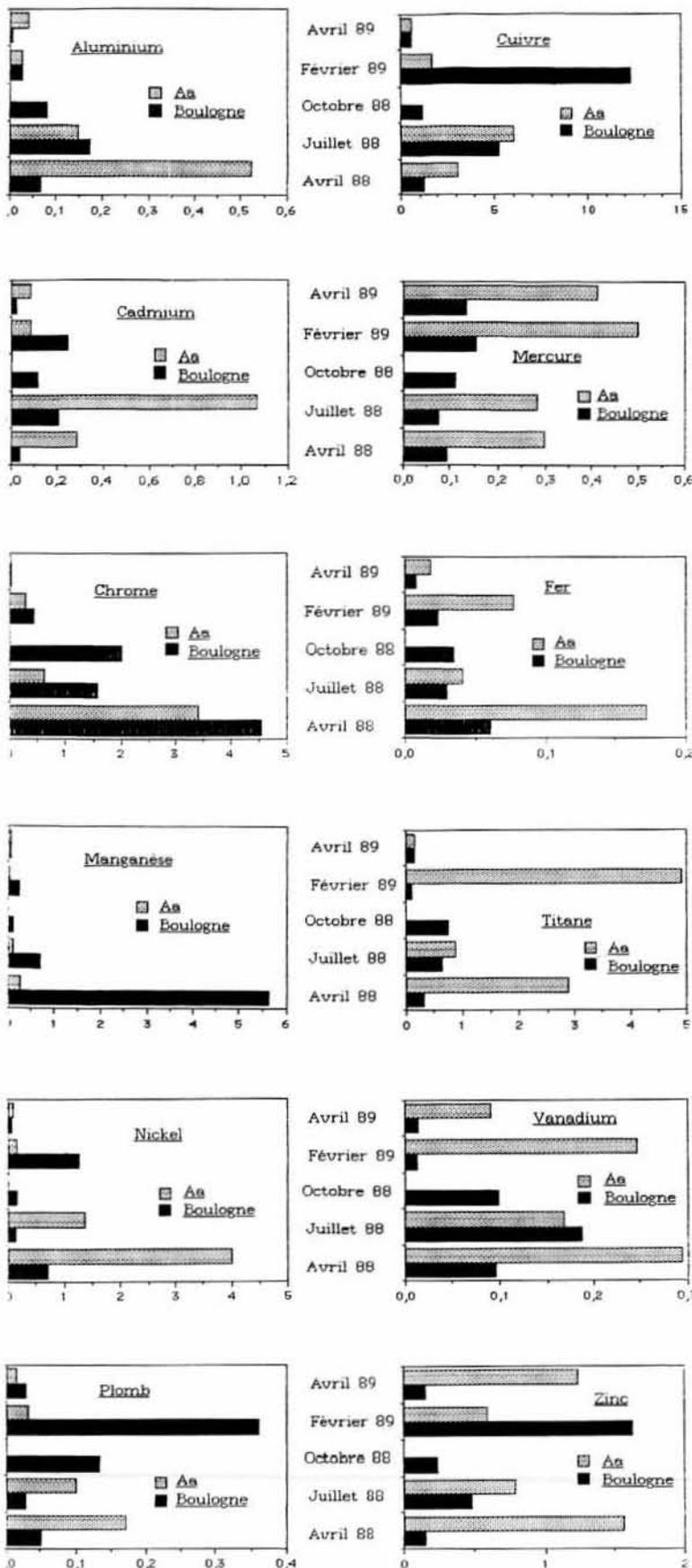
Sédiments

Les métaux précédemment cités sont présents dans les sédiments à des concentrations variant fortement avec le

Tableau 7

Facteurs de concentration (concentration dans les néréis/concentration dans les sédiments) pour les vers recueillis sur une profondeur de 30 cm.

Factors of concentration (concentration in nereis/concentration in sediments) for worms collected throughout a depth of 30 cm.



métal envisagé: inférieures à $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec (1 ppm ps) pour les plus toxiques tels que le Cd et le Hg ou, au contraire, nettement supérieures à 1 000, voire 5 000, pour les éléments constitutifs des sédiments tels que l'Al et le Fe.

L'examen des données recueillies lors des cinq campagnes et rassemblées dans les tableaux 1 et 2 fait apparaître des variations de concentration entre les deux sites et entre les cinq campagnes. A titre d'exemple, le tableau 3 présente les différences de concentration observées à Boulogne pour quelques métaux (Cd, Pb, Zn, Ti et Al) en avril et octobre 1988. On notera que la diminution d'avril à octobre est plus sensible pour les quatre premiers métaux que pour l'Al qui, étant un élément constitutif du sédiment, peut servir de métal de référence.

Par ailleurs, dans une étude réalisée dans l'estuaire de l'Aa, une différence de concentration en fonction de la profondeur a pu être démontrée (tab. 4). En effet, les dosages de Cu, Zn, Cr, Ni et Fe effectués à trois niveaux dans le sédiment montrent dans tous les cas un accroissement de la teneur métallique de la surface aux couches inférieures. On notera que l'étude granulométrique (tab. 5) donne régulièrement un pourcentage de particules fines ($< 0,063 \text{ mm}$) plus élevé en profondeur qu'en surface.

Les néréis

Les douze métaux ont également été détectés chez les animaux. Les principaux résultats relatifs aux concentrations sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Ces tableaux font apparaître des variations de concentration en fonction du site, de la période de la récolte et de l'âge des animaux. D'une manière générale, ce sont les vers jeunes (classe d'âge 1 : diamètre ovocytaire inférieur à $80 \mu\text{m}$ et classe d'âge 2 : diamètre ovocytaire compris entre 80 et $130 \mu\text{m}$) qui présentent les concentrations les plus élevées. Il convient d'ajouter qu'une étude de la répartition verticale des vers en fonction de leur taille ($< 3 \text{ cm}$, $3-5 \text{ cm}$, $> 5 \text{ cm}$) a révélé que les vers les plus jeunes se trouvent dans la partie la plus superficielle du sédiment, c'est-à-dire dans la zone où la concentration en métaux lourds est la moins élevée (tab. 6).

L'examen du tableau 7 relatif aux facteurs de concentration (concentration dans les vers, toutes classes d'âge confondues, / concentration dans les sédiments) révèle de grandes variations en fonction du métal, de la campagne et du site envisagé.

Ces facteurs sont toujours inférieurs ou, au maximum, voisins de 1 pour l'Al, le Cd, le Fe, le Hg, le Pb, le V. Ils peuvent être égaux ou supérieurs à 1 pour le Cr, le Cu, le Mn, le Ni, le Ti et le Zn. A titre d'exemple, on remarquera que les facteurs de concentration sont plus élevés pour le Hg, le Ti et le V dans l'estuaire de l'Aa tandis que les échantillons de Boulogne présentent un facteur de concentration plus fort pour le Mn.

Une étude réalisée au laboratoire a par ailleurs mis en évidence que des vers maintenus dans une eau de mer contenant 22 mg de Cd.l⁻¹ (concentration sublétalement déterminée par plusieurs méthodes expérimentales et ultrastructurales par Dennai *et al.*, 1986) peuvent accumuler d'énormes quantités de ce micropolluant (égales ou supérieures à 300 µg.g⁻¹ de poids sec), les vers jeunes ayant une cinétique d'accumulation supérieure.

Les pentes des courbes (intégrées sur 18 jours) sont les suivantes :

- Classe 1 (diamètre ovocytaire < 80 µm) : 18,5 µg.g⁻¹.j⁻¹
- Classe 2 (diamètre ovocytaire 80-130 µm) : 17,9 µg.g⁻¹.j⁻¹
- Classe 3 (diamètre ovocytaire > 130 µm) : 16,1 µg.g⁻¹.j⁻¹

Corrélations intermétaux dans les sédiments et les néreïs

Les matrices ont été effectuées pour chaque classe d'âge d'animaux ainsi que pour l'ensemble des classes réunies et pour les sédiments des deux sites (Aa et Boulogne). La valeur significative du coefficient de corrélation est donnée à 5 %. Les résultats des calculs montrent que dans le sédiment du petit port de Boulogne, on observe des corrélations positives pour les couples Cd-Zn, Cd-Al, Ni-Mn, Zn-Al, V-Ti et des corrélations négatives pour les couples Ni-Ti, Mn-V et Mn-Ti. On ne retrouve aucune de ces corrélations dans le sédiment de l'estuaire de l'Aa où les corrélations positives apparaissent pour les couples Cu-V, Cr-Ti, Zn-Mn, Fe-V, Fe-Al et V-Al.

Tableau 8

Coefficients de corrélation entre les teneurs métalliques du sédiment et des néreïs, R (valeur absolue) significatif pour une valeur supérieure à 0,576 dans l'estuaire de l'Aa et supérieure à 0,514 dans le petit port de Boulogne. n = 12 (Aa) ; n = 15 (Boulogne).

Coefficients of correlation between the concentrations of metals in the sediment and the nereis. R (absolute value) significant for a value superior to 0.576 in the mouth of the river Aa and superior to 0.514 in the little harbour of Boulogne. n (number of samples) = 12 (Aa); n = 15 (Boulogne).

	Aa	Boulogne
Al	0,361	0,349
Cd	- 0,381	0,250
Cr	- 0,312	- 0,370
Cu	- 0,079	- 0,219
Fe	- 0,140	- 0,728
Mn	- 0,367	0,529
Ni	- 0,780	- 0,121
Pb	- 0,238	- 0,233
Ti	- 0,117	- 0,078
V	0,566	- 0,586
Zn	0,390	0,449

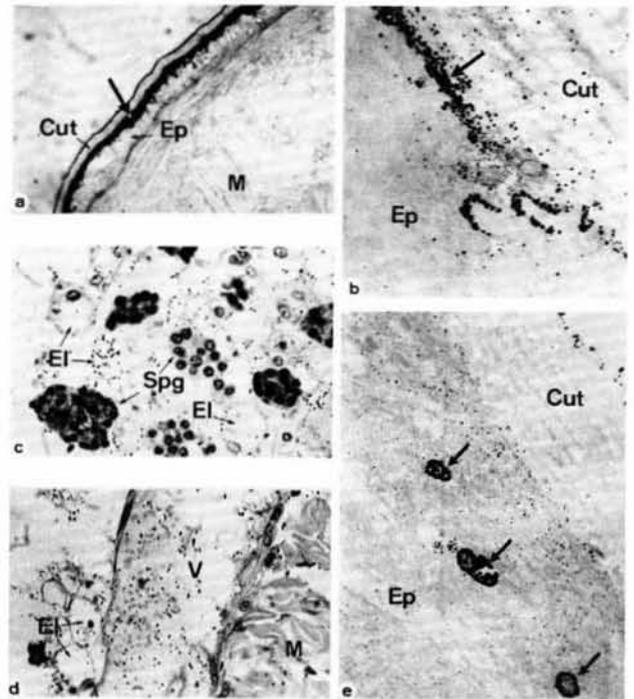


Figure 1

Voies de pénétration et de stockage du métal. Technique de Timm (1958) modifiée par Hacker *et al.* (1988). Détection du cadmium au niveau du tégument (contamination 22 mg.l⁻¹/21 j). Cut, cuticule; ÉL, éléocyte; Ep, épiderme; M, muscle; Spg, spermatogonie.

a : coupe semi-fine. L'accumulation est située dans la région apicale de l'épiderme, sous la cuticule (flèche). X 350.

b et e : microscopie électronique. L'accumulation est visible, comme sur la fig. a, sous la cuticule (fig. b) ou dans de gros granules (flèches ; fig. e), fig. b X 58.000; fig. e X 11.600.

c et d : radioautographie. Le Cd¹⁰⁹ a été injecté dans le coelome. Durée d'incorporation : trois heures. Un marquage est visible sur les éléocytes (El ; fig. c et d) et sur le vaisseau sanguin (V ; fig. d) mais non sur les spermatogonies (Spg ; fig. c). X 880.

Routes of penetration and storage of the metal. a, b, and e: Timm's technique (1958) modified by Hacker et al. (1988). Detection of cadmium in tegument (contamination by 22 mg.l⁻¹/21 days). Cut, cuticle; El, eleocytes; Ep, epidermis; M, muscles; Spg, spermatogonia.

a: semi-thin section. The accumulation is located in the apical area of the epidermis, under the cuticle (arrow). X 350.

b and e: electron microscopy. The accumulation is visible, as on the Fig. a, under the cuticle (Fig. b) or in large granules (arrows; Fig. e). Fig. b X 58,000; Fig. e X 11,600.

c and d: radioautography. Cd¹⁰⁹ was injected in the coelom. Duration of incorporation: three hours. A labelling is visible on eleocytes (El; Fig. c and d) and on the blood vessel (V; Fig. d) but not on spermatogonia (Spg; Fig. c). X 880.

Dans les animaux, beaucoup de métaux sont corrélés entre eux, des différences existant toutefois selon la classe d'âge étudiée.

Le tableau 8 présente les coefficients de corrélation entre les teneurs métalliques du sédiment et de *Nereis diversicolor*.

Recherche expérimentale et cytologique des voies de pénétration, sites de stockage et, éventuellement, de détoxification

Voies de pénétration

L'étude cytochimique réalisée selon la méthode de Timm (1958) modifiée par Hacker *et al.* (1988) après contamina-

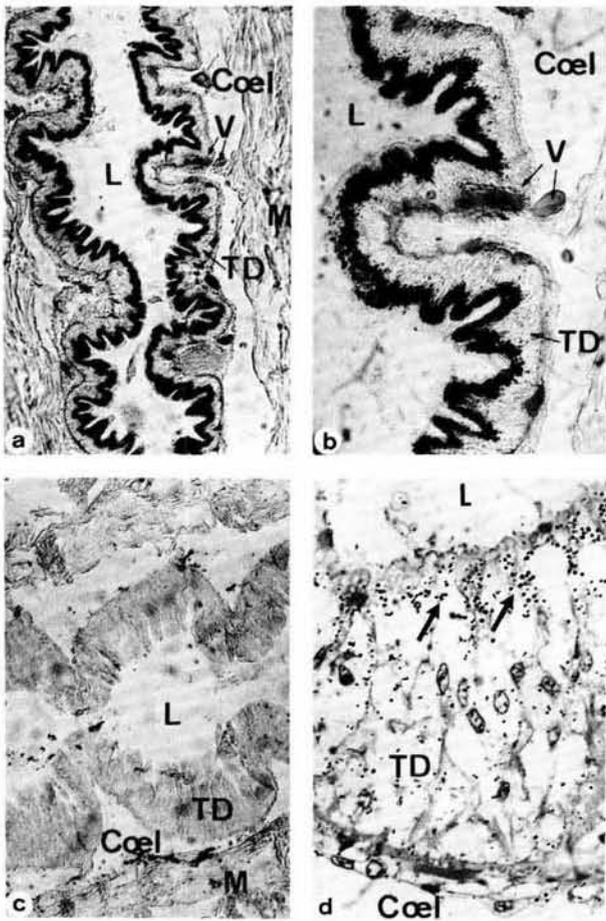


Figure 2

Voies de pénétration et de stockage du métal. Tube digestif de *Nereis diversicolor*. Coel, coelome; L, lumière du tube digestif; M, muscles; TD, épithélium digestif; V, vaisseau situé à la base de l'intestin.

a-c : technique de Timm (1958) modifiée par Hacker *et al.* (1988). Détection du zinc. On notera que l'accumulation est située dans la région subapicale des entérocytes (fig. a et b). Le dépôt noir d'argent n'apparaît pas si l'injection de sulfure de sodium a été omise (fig. c). Fig. a X 88; fig. b et c X 175.

d: radioautographie après injection dans le coelome de Cd^{109} . Durée d'incorporation : trois heures. Le marquage le plus intense est situé à l'apex des entérocytes (flèches). X 880.

Routes of penetration and storage of the metal. Gut of Nereis diversicolor. Coel, coelom; L, lumen of the gut; M, muscles; TD, digestive epithelium; V, vessel located at the basis of the gut.

a-c: Timm's technique (1958) modified by Hacker *et al.* (1988). Detection of zinc. It will be noted that the accumulation is localized in the subapical area of the enterocytes (Fig. a and b). The black deposit of silver is not visible if the injection of sodium sulphide has been omitted (Fig. c). Figure a X 88; Figures b and c X 175.

d: radioautography after injection in the coelom of Cd^{109} . Duration of incorporation: three hours. The most intense labelling is located on the apical area of the enterocytes (arrows). X 880.

tion des vers par le Cd, le Mn ou le Zn n'a, jusqu'à présent, donné de résultats intéressants qu'avec le Cd et le Zn. Les figures 1 (a-c) montrent une probable accumulation de Cd dans le tiers apical des cellules épidermiques. D'un autre côté, un dépôt important, attribuable à la présence de Zn, est visible sur les figures 2 (a-c), dans la zone subapicale des entérocytes.

Sites de stockage

Les figures 1 (a-c) et 2 (a-c) obtenues pour le Cd et le Zn permettent d'envisager que ces cations sont, au moins partiellement, arrêtés dans la région apicale des cellules épidermiques et subapicales des entérocytes.

L'étude autoradiographique utilisant du Cd^{109} a apporté des compléments d'information à ces travaux cytochimiques et ultrastructuraux. En effet, si jusqu'à présent les expériences de contamination des vers par l'eau rendue radioactive ont été décevantes, les injections de Cd^{109} dans la cavité coelomique ont permis un marquage très net au niveau : a) des éléocytes (cellules libres dans le coelome ayant, en plus d'un rôle dans la synthèse de la vitellogénine, une fonction de macrophages ; bibliographie in Dhainaut et Porchet-Henneré, 1988 : fig. 1 c) ; b) des vaisseaux sanguins (fig. 1 d) ; c) de la région subapicale des entérocytes (fig. 2 d).

DISCUSSION

Comme nous l'avons rappelé ci-dessus, d'autres travaux réalisés dans notre laboratoire ont eu pour objectifs principaux d'étudier les réponses physiologiques, cytologiques et moléculaires des *Nereis diversicolor* lors de contaminations expérimentales par les métaux lourds. Dans cette présente étude, nous nous sommes attachés à rechercher les mécanismes de transfert qui peuvent intervenir *in situ*, dans des conditions que l'on peut qualifier de naturelles.

Les douze métaux étudiés (Al, Cd, Cr, Cu, Hg, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, V et Zn) ont été trouvés dans les sédiments avec des concentrations variant à la fois avec le site (estuaire de l'Aa ou petit port de Boulogne), la période et la profondeur du prélèvement. Ces résultats sont en accord avec les données recueillies par Wartel (1985) sur les variations possibles avec les saisons. Ils rappellent aussi ceux qui ont été obtenus pour la répartition du Zn par Reinhard *et al.* (1976). Ces derniers auteurs ont en effet décelé une augmentation de la teneur en Zn sur les trente premiers centimètres du sédiment étudié.

Notre étude granulométrique ayant permis de détecter un pourcentage de particules fines (< 0,063 mm) plus élevé en profondeur qu'en surface, les résultats des dosages pourraient au moins partiellement être expliqués par les données de Welte *et al.* (1983). Ces auteurs ont en effet trouvé que les métaux sont préférentiellement fixés sur les particules les plus fines.

Nos dosages réalisés sur les animaux ont par ailleurs montré que les néréis renfermaient elles aussi les douze métaux. Des différences significatives dans les facteurs de concentration ont été trouvées en fonction du site, de la période de la récolte, et des cations étudiés. Ces derniers peuvent être répartis en quatre catégories.

La première regroupe des métaux traces très toxiques ainsi que des métaux constitutifs du milieu, présents en abondance dans les sédiments. Pour ces métaux (Fe, Al, V, Pb et Hg), les facteurs de concentration sont toujours très inférieurs à 1.

Dans une deuxième catégorie, on trouve des métaux toxiques qui présentent des variations de concentration très importantes dans le milieu, probablement en raison de leur utilisation dans l'industrie. Les facteurs de concentration pour le Cd, le Mn, le Ni et le Ti sont généralement inférieurs à 1, avec parfois des dépassements ponctuels de cette valeur.

Le Zn constitue à lui seul la troisième catégorie. Élément essentiel, indispensable au bon fonctionnement de nombreux systèmes enzymatiques, sa teneur dans les animaux, comparativement aux autres métaux, est d'une bonne stabilité. Le facteur de concentration pour le zinc reste proche de la valeur 1.

La dernière catégorie rassemble deux métaux très dissimilaires. Le Cr, trivalent ou hexavalent, élément du groupe VIA à caractère lithophile et le Cu, élément le plus souvent monovalent, appartenant au groupe IB à caractère lithophile et sidérophile (Goldsmith, 1954). Pour ces deux métaux, on observe très souvent des facteurs de concentration supérieurs à 1.

Des différences de concentration ont aussi été détectées en fonction de l'âge des néréis. Les résultats des dosages effectués sur des échantillons issus du milieu naturel, ainsi que ceux qui ont pu être établis expérimentalement au laboratoire, démontrent en effet une cinétique d'accumulation supérieure chez les vers jeunes. Sans éliminer totalement l'idée d'un mécanisme d'élimination développé chez les vers âgés, il paraît vraisemblable que le facteur de concentration plus important chez les jeunes relève en fait d'un métabolisme plus élevé. Cette hypothèse est aussi étayée par les résultats d'autres auteurs. Ray *et al.* (1980) ont en effet démontré que chez des *Nereis virens* exposées à du sédiment contenant 4 ppm de Cd, la cinétique d'accumulation en ions métalliques est plus grande chez l'animal jeune que chez l'animal âgé. Snow et Marsden (1974) ont également prouvé que *N. virens* pouvait accumuler dans ses tissus de très grandes quantités de Cd durant la première année de sa vie.

Cette grande capacité de concentration de certains métaux lourds tels que le Cd plaide en faveur d'une très grande résistance des néréis et, en particulier, des *Nereis diversicolor*. Ces résultats sont conformes à ceux qui ont été obtenus par divers auteurs lors de la recherche de la CL 50 chez les annélides polychètes (tab. 9). L'absence de bioaccumulation de certains métaux tels que le Cd, par exemple, dans des néréis issues du milieu naturel s'explique peut-être par une biodisponibilité sans doute beaucoup plus faible dans le sédiment. Elle implique aussi l'intervention d'autres facteurs tels que les corrélations intermétaux que nous avons pu mettre en évidence et dont certaines avaient déjà été mentionnées par Luomé et Bryan (1982) pour des *Nereis diversicolor* récoltées dans des estuaires du sud et de l'ouest de l'Angleterre. Il convient de mentionner ici que l'effet d'une augmentation de Zn dans l'eau d'élevage sur une diminution de la concentration en Cd a pu être établie chez *Nereis diversicolor* (Bryan et Hummerstone, 1973) et *Nereis virens* (Ray *et al.*, 1967 ; Hill et Matrone, 1970 ; Magos et Webb, 1978) selon lesquelles le Zn et le Cd seraient biologiquement antagonistes en raison de leurs propriétés physico-chimiques similaires.

Tableau 9

Toxicité aiguë du cadmium chez les annélides. D'après Philipps (1980).
Acute toxicity of cadmium in some annelids. After Philipps (1980).

Espèces étudiées	CL 50 (mg.l ⁻¹)	Durée (heures)	Auteurs
<i>Nereis diversicolor</i>	100	192	Bryan (1976)
<i>Nereis diversicolor</i>	10	816	Bryan (1976)
<i>Nereis virens</i>	25	24	Eisler (1971)
<i>Nereis virens</i>	11	96	Eisler (1971)
<i>Neanthes waali</i>	6,4	168	Ahsanullah (1976)
<i>Ophryotrocha labronica</i>	8	96	Brown et Ahsanullah (1971)
<i>Ophryotrocha labronica</i>	1	410	Brown et Ahsanullah (1971)
<i>Ophryotrocha diadema</i>	2,5-5	96	Reish et Carr (1978)
<i>Ctenodrilus serratus</i>	2,5-5	96	Reish et Carr (1978)

Dans la seconde partie de notre étude, nous nous sommes intéressés aux voies de pénétration des ions métalliques. En utilisant une méthode cytochimique, il a été démontré qu'il existe deux voies principales : le tégument et l'intestin. Ces observations sont en accord avec celles de Cosson-Mannevy *et al.* (1986) qui ont montré que la présence de Cu ou de Zn dans l'épiderme dorsal et les parapodes de l'annélide polychète *Alvinella pompejana* peut être reliée à l'existence de lysosomes ou de concrétions granulaires. Rice et Chien (1979), à l'aide de Cd¹⁰⁹, ont observé que la pénétration se fait par ces deux tissus chez une autre annélide polychète: *Glycera dibranchiata*. Ces derniers auteurs ont de plus trouvé qu'après pénétration le produit radioactif se lie à l'hémoglobine et à des protéines coelomiques. Rappelons que, chez les *Nereidae*, l'utilisation du Cd¹⁰⁹ entraîne un marquage sur le sang. Il est vraisemblable que la métalloprotéine MP I, capable de complexer des quantités importantes de Cd (Nejmeddine *et al.*, 1988), correspond à l'hémoglobine des *Nereidae* (Demuyneck *et al.*, non publié), et qu'elle est donc responsable du marquage observé sur les vaisseaux sanguins. D'un autre côté, on peut penser que l'une des protéines coelomiques liant le Cd chez *Glycera dibranchiata* est analogue à la MP II des néréis dont nous avons aussi démontré une homologie de séquence du fragment N-terminal avec ceux des hémérythrine et myohémérythrine des sipunculien. Ces derniers résultats, en plus de leur intérêt de biologie moléculaire et d'écotoxicologie, sont intéressants du point de vue phylogénique.

L'utilisation du Cd¹⁰⁹ a aussi provoqué des marquages sur les éléocytes qui, en plus d'un rôle important dans la synthèse de la vitellogénine, ont une fonction de macrophages (revue in Dhainaut et Porchet-Henneré, 1988).

Un autre point, qui mérite d'être souligné, est que le Cd¹⁰⁹ injecté dans le coelome du ver a été retrouvé au bout de trois heures d'exposition à l'apex des entérocytes. Le problème de son transport reste posé : a-t-il été véhiculé jusqu'à ce site de stockage grâce à la métalloprotéine MP II libérée par les granulocytes I lors de la contamination ? L'étude immu-

nocytocchimique utilisant des anticorps anti-MP II ne nous a pas, jusqu'à présent, apporté d'élément de réponse. Ce qui, par contre, semble bien établi, c'est que l'apex de l'intestin joue un rôle important dans les processus de défense contre les micropolluants. En effet, il a été démontré lors de l'étude cytochimique que le Zn, par exemple, demeure dans les conditions expérimentales utilisées dans le tiers supérieur des entérocytes lors d'une contamination par voie buccale. L'étude avec le Cd¹⁰⁹ injecté dans le coelome montre également un stockage à ce niveau. Nous rappellerons aussi que lors de contaminations expérimentales, par le Cd par exemple, l'apex des entérocytes présente de nombreux sphérocristaux et lysosomes (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1988), pour lesquels divers auteurs ont pu montrer, chez d'autres animaux, la richesse en ions métalliques (Martoja et Martoja, 1982). Il ne paraît donc pas impossible de penser que c'est à ce niveau que se situe la majeure partie du stockage, de la détoxification et, peut-être, de l'élimination lors du renouvellement cellulaire.

En conclusion, cette étude constitue une nouvelle étape dans nos recherches écotoxicologiques entreprises sur ce bioindicateur marin endobenthique qu'est *Nereis diversicolor*.

Nous nous attachons actuellement à analyser les divers paramètres, non seulement physico-chimiques (biodisponibilité, interactions métalliques, facteurs abiotiques...), mais aussi physiologiques, qui peuvent expliquer certaines différences de comportement relevées *in situ* ou au laboratoire vis-à-vis des micropolluants métalliques. Ces études devraient nous permettre de mieux cerner la signification des résultats de dosages effectués sur des animaux prélevés dans leur milieu naturel.

Remerciements

Ces travaux de recherche n'auraient pu être réalisés s'ils n'avaient bénéficié du soutien d'un contrat IFREMER/Région Nord-Pas-de-Calais et d'un contrat PIREN/CNRS. Nous tenons à remercier les divers organismes et toutes les personnes qui nous ont aidés à la réalisation de ces études et dans la préparation du manuscrit, F. Bonet en particulier. Nous remercions également vivement Mme Grimmelpont pour la révision du texte anglais.

RÉFÉRENCES

- Ahsanullah M. (1976). Acute toxicity of cadmium and zinc to 7 invertebrate species from Western Port, Victoria. *Aust. J. mar. Freshwat. Res.*, **25**, 187-196.
- Brown B. et M. Ashanullah (1971). Effects of heavy metals on mortality and growth. *Mar. Pollut. Bull.*, **2**, 182-187.
- Bryan G.W. (1976). Heavy metal contamination in the sea. in : *Marine Pollution*, R. Johnston, éditeur, Academic Press, N.Y., 185-302.
- Bryan G.W. et L.G. Hummerstone (1973). Adaptation of the polychaete *Nereis diversicolor* to estuarine sediments containing high concentrations of zinc and cadmium. *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **53**, 834-857.
- Butler P.A., L. Andren, G.J. Bonde, A. Jernelov et D.S. Reisch (1971). Monitoring organism. in : *F.A.O., technical conference on marine pollution and its effects on living resources and fishing, Rome 1976. Methods of detection measurement and monitoring of pollutants in the marine environment*. M. Rusco, éditeur, Fishing News Ltd, London, 101-112.
- Cosson-Mannevy M.-A., R. Cosson et F. Gaill (1986). Mise en évidence de protéines de type métallothionéine chez deux invertébrés des sources hydrothermales, le pogonophore vestimentifère *Riftia pachyptila* et l'annélide polychète *Alvinella pompejana*. *C. r. Acad. Sci., Paris, sér. III*, **302**, 347-352.
- Demuyneck S., P. Sautière, J. van Beeumen et N. Dhainaut-Courtois (1991). Homologies entre les hémérythrine des sipunculien et une métalloprotéine complexant le cadmium (MP II) d'une annélide polychète, *Nereis diversicolor*. *C. r. Acad. Sci., Paris, Sér III*, **312**, 317-322.
- Dennaï N. (1984). Effets histophysiologicals et biochimiques de l'intoxication d'un ver marin (*Nereis diversicolor*) par deux métaux lourds (le cadmium et le mercure). *Thèse 3^{ème} Cycle, Université de Lille*, 57 pp.
- Dennaï N., N. Dhainaut-Courtois, J.-M. Bouquegneau et A. Nejmeddine (1986). Effets du cadmium et du mercure sur un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). Mécanismes de détoxification. *C. r. Acad. Sci., Paris*, **302**, 489-494.
- Dhainaut A. (1984). Aspects cytophysiologiques des coelomocytes de Néréidiens (Annélides Polychètes). *Archs anat. microsc. Morph. expl.*, **73**, 133-150.
- Dhainaut A. et E. Porchet-Henneré (1988). Haemocytes and coelomocytes. in : *Ultrastructure of Polychaeta*. W. Westheide et C.O. Hermans, éditeurs, *Microfauna marina*, **4**, 215-230.
- Dhainaut A., B. Raveillon, M. M'Béri, E. Porchet-Henneré et S. Demuyneck (1989). Purification of an antibacterial protein in the coelomic fluid of *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). Similitude with a cadmium-binding protein. *Comp. Biochem. Physiol.*, **94C**, 555-560.
- Dhainaut-Courtois N., F.-Z. Arrouijal et S. Demuyneck (1988). Effets biologiques de trois métaux lourds (chrome, nickel et plomb) sur *Nereis diversicolor* (Annélide Polychète). *Oceanis*, **14**, 423-433.
- Dhainaut-Courtois N., S. Demuyneck, A. Nejmeddine, B. Raveillon, F. Septier, D.-E. Benouareth et A. Dhainaut (1989). Effets de la pollution minérale et organique sur des invertébrés endobenthiques estuariens. *Médecine, Biologie, Environnement*, **17**, 59-65.
- Dhainaut-Courtois N., A. Nejmeddine, J.-L. Baert et A. Dhainaut (1987). Localisation immuno-cytochimique en microscopie électronique d'une protéine complexant le cadmium chez un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). *C. r. Acad. Sci., Paris*, **305**, 237-241.
- Eisler L. (1971). Cadmium poisoning in *Fundulus heteroclitus* and other marine organisms. *J. Fish. Res. Bd Can.*, **28**, 1225-1234.
- Frontier S. (1981). *Méthode statistique. Applications à la Biologie, la Médecine et l'Ecologie*. Masson Éd., 244 pp.

- Goldsmith V.M.** (1954). *Geochemistry*, Clarendon Press, Oxford.
- Hacker G.W., L. Gromelius, G. Danscher, G. Vernatzky, W. Muss, H. Adam et J. Thurner** (1988). Silver Acetate Autometallography: An Alternative Enhancement Technique for Immunogold-Silver Staining (IGSS) and Silver Amplification of Gold, Silver, Mercury and Zinc in Tissues. *J. Histotechnol.*, **11**, 213-221.
- Haig A., D.P. Sturtevant et K.D. Austen** (1980). Simultaneous acid extraction of six trace metals from fish tissue by hot-black digestive and determination by Atomic abs. spectrometry. *Analyst*, **105**, 125-130.
- Hill C.J. et G. Matrone** (1970). Chemical parameters in the study of in vivo and in vitro interactions of transition elements. *Fed. Proc., FASEB*, **29**, 1474.
- L'Hôpital J.-C. et J.-M. Delattre** (1983). Pollution chimique des sédiments du littoral du Nord de la France. Institut Pasteur de Lille, *Hydrobios II*, 15 p.
- Luoma S.N. et G.W. Bryan** (1982). A statistical study of environmental factors controlling concentrations of heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* and the polychaete *Nereis diversicolor*. *Estuar. coastal Shelf Sci.*, **15**, 95-108.
- Magos L. et M. Webb** (1978). Theoretical and practical considerations on the problem of metal-metal interaction. *Environ. Hlth Perspect.*, **25**, 151.
- Martoja M. et R. Martoja** (1982). La bioaccumulation des métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. *Le Courrier du CNRS*, **54**, 337.
- M'Béri M.** (1988). Dégranulation des coelomocytes au cours des réactions immunitaires d'un invertébré marin : *Nereis diversicolor* (annélide polychète). Caractérisation des coelomocytes d'après leurs récepteurs membranaires ; identification et rôle biologique des produits extrudés. *Thèse, Université Lille I*, 105 pp.
- Nejmeddine A.** (1987). Effets biologiques du cadmium sur un invertébré marin (*Nereis diversicolor*). Isolement et caractérisation d'une métalloprotéine intervenant dans les processus de détoxication. *Thèse, Université Lille I*, 111 pp.
- Nejmeddine A., N. Dhainaut-Courtois, J.-L. Baert, P. Sautière, B. Fournet et P.L. Boulenguer** (1988). Purification and characterization of a cadmium-binding protein from *Nereis diversicolor* (Annelida Polychaeta). *Comp. Biochem. Physiol.*, **89C**, 321-326.
- Philipps D.J.W.** (1977). The use of biological indicator organisms to monitor trace elements pollution in marine and estuarine environment. *Environ. Pollut.*, **13**, 281-317.
- Philipps D.J.W.** (1980). Toxicity and accumulation of cadmium in marine and estuarine biota. in : *Cadmium in the environment. I : Ecological cycling*. J.O. Nriagu, éditeur, Pergamon Press, N.Y., 568 pp.
- Porchet-Henneré E., A. Nejmeddine, J.L. Baert et N. Dhainaut-Courtois** (1987). Selective immuno-staining of type I granulocytes of the Polychaeta Annelid *Nereis diversicolor* by a monoclonal antibody against a cadmium-binding protein (MP II). *Biol. Cell*, **60**, 259-261.
- Ray S., D. McLeese et D. Pezzack** (1980). Accumulation of cadmium by *Nereis virens*. *Archs environm. Contamin. Toxicol.*, **9**, 1-8.
- Reinhard et al.** (1976). *Metal pollution in aquatic environment. Second revised edition, 1981*. U. Forstner et G. Whittmann, éditeurs, Berlin, Heidelberg, New York, 450 pp.
- Reish D.J. et R.S. Carr** (1978). The effect of heavy metals on the survival, reproduction development and life cycle for two species of Polychaetous annelids. *Mar Pollut. Bull.*, **9**, 24-27.
- Rice M.A. et P.K. Chien** (1979). Uptake, Binding and Clearance of Divalent Cadmium in *Glycera dibranchiata* (Annelida: Polychaeta). *Mar. Biol.*, **53**, 33-39.
- Schroeder M.A., A.P. Nason, C.H. Tipton et J.J. Ballassa** (1967). Essential trace metals in man : zinc. Relation to environmental cadmium. *J. Chronic. Dis.*, **20**, 179-210.
- Snow D.R. et J. Marsden** (1974). Life cycle, weight, and possible age distribution in a population of *Nereis virens* from New Brunswick. *J. nat. Hist.*, **8**, 513.
- Timm F.** (1958). Zur Histochemie der Schwermetalle, das Sulfid-Silber-Verfahren. *Dt. Z. Ges. Gerichtl. Med.*, **46**, 706-711.
- Wartel M.** (1985). Qualité des eaux portuaires, rôle des particules en suspension dans le transport des contaminants. Laboratoire de Chimie analytique marine, Université Lille I, Rapport Convention Région Nord-Pas-de-Calais/IFREMER, 43 pp.
- Welte B., N. Dies et A. Montliel** (1983). Étude des différentes méthodes de spécialisation des métaux lourds dans les sédiments. *Environ. Tech. Letts*, **4**, 78-88.