

LA DETECTION DES EFFETS SUBLETAUX DES POLLUTIONS : UTILISATION *IN SITU*
D'UN INDICE BIOCHIMIQUE, LA CHARGE ENERGETIQUE.

SYLVESTRE C. *, BATREL Y. *, LE GAL Y. *.

1. INTRODUCTION .

En dehors de quelques cas dramatiques concernant des rejets accidentels, la préoccupation principale en matière de protection et de gestion du milieu marin est donc de savoir si les niveaux de polluants réellement présents dans le milieu sont susceptibles d'entraîner des effets négatifs sur les individus, les populations ou les écosystèmes (Warren, 1971).

Très schématiquement, on peut considérer qu'il existe deux grandes méthodes d'évaluation des effets toxiques des polluants. La première recouvre des expérimentations en laboratoire et conduit à la détermination des doses létales (toxicité aigüe). Les essais sont réalisés sur 96 heures et leurs résultats ne préjugent pas des effets différés qui, même pour des doses faibles, pourraient entraîner une mortalité au terme de plusieurs semaines.

Une seconde approche consiste à observer, *in situ*, les populations animales ou végétales et à distinguer les modifications pouvant intervenir dans leur abondance et leur distribution.

La surveillance et, surtout, la gestion des eaux marines côtières suppose, cependant, que l'on soit capable, non plus de constater, mais de prévoir l'évolution d'un milieu. Ceci peut être réalisé si l'on dispose de tests suffisamment sensibles et précis renseignant en particulier sur l'état général des organismes vivants en un point donné.

De nombreux tests biochimiques ont été décrits. Ils portent en général sur la mesure d'activités enzymatiques (Lee et coll., 1980 ; Livingstone, 1982) et renseignent sur des réponses particulières comme par exemple celles qui sont liées à la présence de matériel biodégradable (Payne, 1977 ; Blackstock 1980 ; Batrel et Le Gal 1982). Deux inconvénients majeurs sont cependant attachés à ces mesures. D'une part, les activités enzymatiques testées correspondent souvent plus à des systèmes choisis en raison des facilités de mesure que pour leur intérêt métabolique. D'autre part, l'extrême diversité des modes d'action des différents polluants conduit à une infinité de solutions en ce qui concerne le choix des enzymes susceptibles d'être utilisées dans le cadre d'un test. Pour résoudre cette difficulté, on a recherché des indices indépendants du niveau

* Laboratoire de Biologie Marine - Collège de France - 29110 Concarneau.

évolutif ou écologique des organismes et susceptibles de refléter un statut métabolique général quels que soient les agents extérieurs mis en jeu.

Depuis plusieurs années (Atkinson, 1977 ; Ivanovici, 1980), l'attention s'est portée sur la charge énergétique adénylique (AEC) dont la valeur est déterminée par :

$$AEC = \frac{ATP + 1/2 ADP}{ATP + ADP + AMP}$$

D'une manière générale, quel que soit l'organisme ou le tissu étudié, la valeur de la charge énergétique se situe aux alentours de 0.7 - 0.85 en conditions physiologiques optimales. Des valeurs inférieures, en revanche, illustrent des problèmes globaux ou des effets de stress pouvant affecter la capacité de survie d'un organisme.

Nous avons réalisé, dans le cadre des campagnes "Baie de Seine" des mesures de charge énergétique sur des organismes présents dans une zone globalement perturbée.

Nos données indiquent, qu'en Baie de Seine, un effet de stress est ressenti par plusieurs types d'organismes (Crustacés, Mollusques) et correspond à une diminution de la charge énergétique moyenne.

2. METHODOLOGIE ET ECHANTILLONNAGE

Ce point revêt, en ce qui concerne les mesures de nucléotides, une importance extrême et une attention toute particulière y a été portée. A la suite de plusieurs séries d'échantillonnages, la procédure suivante a été adoptée.

Dès capture, les organismes prélevés sont plongés dans l'azote liquide et transportés au laboratoire où ils sont conservés à - 80°C. Les organismes sont ensuite broyés (Broyeur Danguomeau) à la température de l'azote liquide. Le broyat est extrait à l'acide perchlorique à 6 % (10 ml par individu) ajusté à pH 6.5 (K₂ CO₃ 0,5 M) et centrifugé. Cette procédure comportant le maintien de très basses températures, dès les premières secondes du prélèvement et pendant toute la durée de l'extraction, s'est avérée absolument indispensable pour le succès des expérimentations, en raison notamment de l'importance des activités ATPasiques parasites.

Les déterminations de nucléotides sont réalisées par voie enzymatique selon Pradet (1967). L'AMP est transformé en ADP en présence de myokinase ; l'ADP est transformé en ATP en présence de pyruvate kinase. Enfin, l'ATP est dosé en présence d'un système luciférine-luciférase. La quantité de photons produite est mesurée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide après 40 sec d'incubation. Dans ces conditions, la réponse est linéaire de 10⁻⁸M à 2 x 10⁻⁶M d'ATP. Il convient, dans cet ensemble, d'accorder toute son importance à la rigueur de manipulation : respect des temps et température d'extraction, d'incubation et de mesure de la production de photons.

Les standards (AMP, ADP, ATP) sont des produits Serva. Les enzymes (myokinase, pyruvate kinase) et la préparation de luciférine-luciférase sont des produits Sigma.

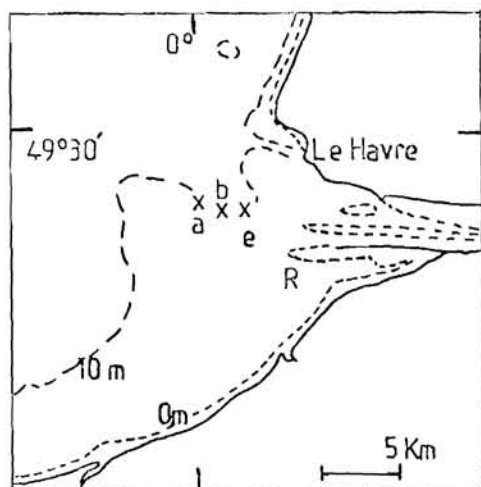


Fig. 1.- Localisation des prélèvements en Baie de Seine.

Les points de prélèvement (Fig. 1) pour les tests de charge énergétique ont été choisis de manière à pouvoir apprécier les effets de frontière : le point E constitue pour certains organismes une limite extrême de présence dans l'estuaire de la Seine. Les points A et B constituent une référence relative située plus au large. Le problème principal en ce qui concerne le point E provient d'une part du très petit nombre d'organismes présents et d'autre part de la mobilité du bouchon vaseux qui rend, dans certains cas, tout prélèvement impossible.

En ce qui concerne la faune vagile (*Crangon crangon*), les prélèvements sont réalisés au sud du Banc du Ratier (R).

3. RESULTATS

Le tableau présente un exemple des résultats obtenus *in situ* pour *Nassarius reticulatus*. L'étude effectuée sur une radiale ABE indique très nettement une modification progressive du classement. Au point E, aucun organisme ne peut être classé en I. Les autres espèces testées (*Abra alba*, *Owenia fusiformis*, *Pectinaria koreni*) ne peuvent donner lieu à comparaison statistiquement valable en raison du trop petit nombre d'individus récoltés au point E.

Tableau 1.- Répartition des valeurs de charge énergétique de *Nassarius reticulatus* prélevés en différents points de la baie de Seine.

Groupe	Point A	Point B	Point E
(I)	26,7 %	14,3 %	0 %
(II)	20,0 %	28,6 %	44,5 %
(III)	53,3 %	57,1 %	55,5 %

Les valeurs obtenues individuellement pour la charge énergétique sont classées en 3 groupes selon Atkinson (1977) : I : conditions normales ($AEC \geq 0.70$); II: conditions limitantes ($0.70 > AEC \geq 0.50$); III: conditions létales ($AEC < 0.50$).

La comparaison des valeurs.

Pour ce qui est de *Crangon crangon* (Fig. 2a), les prélèvements réalisés à deux saisons différentes se révèlent significativement différents quant à la charge énergétique moyenne, tout au moins dans les valeurs les plus élevées. Les valeurs moyennes sont significativement plus faibles et plus dispersées que celles que l'on obtient chez des animaux prélevés en baie de Concarneau (Référence).

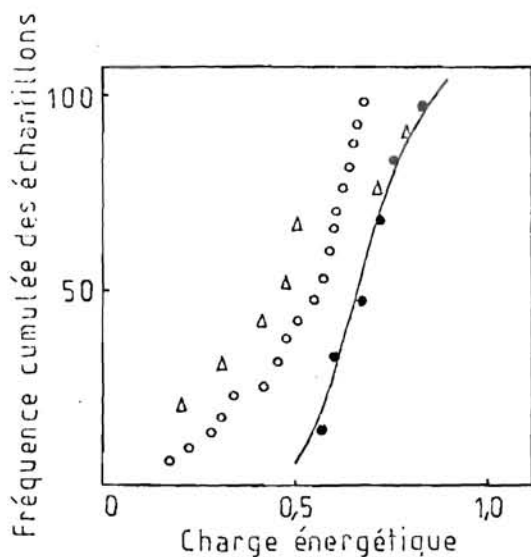


Fig. 2a.- La charge énergétique de *Crangon crangon*.

a) Répartition des valeurs au niveau du banc du Ratier.
(o: mai 83; Δ : septembre 83).

Les pourcentages cumulés des échantillons ont été exprimés en fonction de leur charge énergétique préalablement classée. La courbe de référence (●) est obtenue à l'aide de dosages réalisés sur des organismes récoltés en eaux saines (Baie de Concarneau) et maintenus à l'abri de tout stress ou pollution.

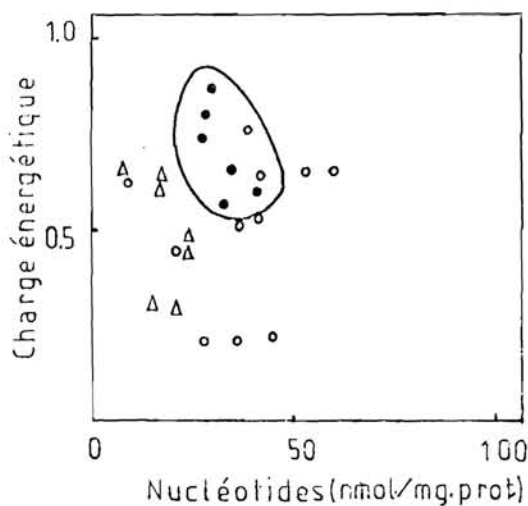


Fig. 2b.- Relation entre la charge énergétique et la concentration intracellulaire en nucléotides.

4. DISCUSSION

Cet ensemble de résultats indique qu'en Baie de Seine, pour deux populations au moins, les valeurs de charge énergétique sont significativement inférieures à celles que l'on détermine sur des populations vivant dans un système de référence peu pollué. La comparaison des valeurs mesurées pour une même espèce en différents points de la baie montre que les différences sont mineures sauf en ce qui concerne les valeurs élevées de charge énergétique (Groupe I du Tableau I). Les tests statistiques réalisés confirment cette interprétation. Il ressort de ceci que la proportion d'animaux susceptibles de maintenir une charge énergétique optimale est plus faible en milieu pollué qu'en milieu sain. Il convient toutefois de noter qu'une valeur élevée de charge énergétique peut être obtenue de plusieurs manières différentes. Nous avons antérieurement montré qu'en cas de stress lié à une contamination expérimentale, une charge énergétique élevée pouvait être maintenue temporairement grâce à l'intervention d'une enzyme spécifique, l'AMP désaminase, catalysant l'élimination de l'AMP.

Les données de la figure 2a ont été reproduites en fonction de la concentration intracellulaire en nucléotides adényliques (ATP + ADP + AMP) (Fig. 2b). On constate effectivement que selon les individus, une charge énergétique élevée (0.7 - 0.8) correspond soit à une perte, soit à un gain en nucléotides.

En pratique, il semble donc que l'évolution du rapport de la charge énergétique aux nucléotides totaux représente un signal de déséquilibre encore plus sensible que la charge énergétique elle-même. Ces résultats permettent donc d'envisager favorablement la réalisation d'une surveillance régulière de zones sensibles, basés sur la mesure des nucléotides adényliques et la détermination de la charge énergétique. Il conviendra toutefois de préciser la localisation du point de référence le mieux adapté à l'établissement d'une comparaison de site à site.

ATKINSON D.E. (1977). - Cellular energy metabolism and its regulation, Acad. Press New York, 293 p.

BLACKSTOCK J. (1980). - The Loch Eil project. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., t. 46, 197-217.

BATREL Y. et LE GAL Y. (1982). - La glutamate déshydrogénase d'Arenicole, un indicateur du niveau d'eutrophisation du milieu et de sa pollution, C.R. Soc. Biol., t. 176, 619-623.

IVANOVICI A. (1980). - Adenylate energy charge. An evaluation of applicability to assessment of pollution. Rapp. P.V. Reun. Cons. Int. Explor. Mer, t. 179, 23-28.

LEE R., DAVIES J.M., FREEMAN H.C., IVANOVICI A., MOORE M.N., STEGEMAN J. et UTHE J.F. (1980). - Biochemical techniques for monitoring biological effects of pollution in the sea. Rapp. P.V. Reun. Cons. int. Explor. Mer., t. 179, 48-55.

- LIVINGSTONE D.R. (1982). General biochemical indices of sublethal stress. Marine Poll. Bulletin , t. 13, 261-263.
- PAYNE J.F. (1977). - Mixed-function oxidases in marine organisms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection. Mar. Poll. Bull. , t. 8, 112-116.
- PRADET A. (1967). - Etude des AMP, ADP, ATP dans les tissus végétaux. 1. Dosage enzymatique. Physiol. Végét. , t. 5, 209-221.
- RAFFIN J.P. (1984). - J. Comp. Physiol. Biochem. 154 , 55-63.
- SYLVESTRE C., BEAUPOIL C., BATREL Y., et LE GAL Y. (1984). - Evolution de la charge énergétique adénylique sous l'effet d'une pollution expérimentale. C.R. Sc. Soc. Biol. , t. 178, 512-517.
- WARREN C.E. (1971). - Biology and water pollution control. W.B. Saunders C^o , Philadelphia, 434 p.