

Modèle de détection rapide des effets sublétaux des polluants. II. Un exemple *in situ*: anomalie métabolique du copépode hyponeustonique *Anomalocera patersoni* en coïncidence avec une marée noire

J.F. Samain, J. Moal, A.M. Alayse-Danet, J.Y. Daniel et J.R. Le Coz

Centre National pour l'Exploitation des Océans, Centre Océanologique de Bretagne; Boîte Postale 337,
F-29273 Brest-Cédex, France

Abstract

— *Model for Rapid Detection of Sublethal Effects of Pollutants. II. An in situ Example: Anomalous Metabolism of the Hyponeustonic Copepod Anomalocera patersoni Coinciding with an Oil Spill*

An unusual correlation has been observed between the amylase and trypsin content of a natural zooplankton population and of the hyponeustonic copepod *Anomalocera patersoni* and the oil spill of the "Amoco Cadiz" in 1978. This anomaly has also been observed in *Artemia* sp. cultures (San Francisco Bay strain) poisoned by copper. This phenomenon could originate from a general physiological perturbation. Such a non-specific perturbation could explain the anomalous correlation between parameters which are usually independent and specifically regulated. The determination of such anomalous regulation could lead to detection of the sublethal effect of pollutants in the field. The method requires no prior knowledge of the area and can be applied for detection of a new perturbation; in fact, if organisms adapt to the new conditions, the anomaly disappears. The method has enabled physiological perturbations of zooplankton to be recorded 1 yr after the "Amoco Cadiz" oil spill. The hyponeustonic copepod *Anomalocera patersoni* was particularly perturbed, even at residual hydrocarbon concentrations usually considered by chemists as approaching normal values. —

Introduction

La détection des perturbations physiologiques des organismes planctoniques marins sous l'effet des polluants a été abordée soit par la définition de tests de toxicité, létaux ou sublétaux réalisés expérimentalement, soit par de longs suivis écologiques du milieu

à partir desquels les perturbations anormales sont à distinguer des fluctuations naturelles.

La voie expérimentale reproduit des conditions généralement très lointaines de la réalité car elle ne reconstitue pas l'ensemble des phénomènes pouvant conduire à une pollution ou en modifier les effets (synergie par exemple). Les suivis écologiques ne permettent de faire qu'un constat *a posteriori* et après avoir engagé de lourds efforts. Plusieurs auteurs ont tenté de résoudre la question en mesurant les perturbations physiologiques au niveau du métabolisme (Hunter, 1949; Kerkut et Munday, 1962; Hubschman, 1967; Brown et Newell, 1972; Bilinski et Jonas, 1973; Lorz et McPherson, 1976; Alayse-Danet *et al.*, 1979). Ces travaux présentent l'intérêt de montrer généralement un degré de sensibilité supérieure et donc une détection plus précoce de la perturbation, mais ils nécessitent la connaissance des taux métaboliques normaux, soit par l'existence de mesures préalables sur l'écosystème non pollué, soit par la réalisation d'un témoin et donc d'une expérimentation. Dans les deux cas, les remarques précédentes restent entières. A la définition de taux normaux, difficiles à établir, nous proposons celle de lois de régulations normales. En effet, autant il est difficile de porter un jugement sur une valeur absolue d'un paramètre métabolique, autant il est possible de connaître les lois de variation ou de régulation cellulaires naturelles qui ont l'avantage d'être assez générales. Ce caractère permet de les appliquer à des populations de composition variée en organismes.

Nous avons étudié particulièrement la régulation de la synthèse des enzymes digestives par la fonction de nutrition chez *Artemia* sp. (Samain *et al.*, 1975, 1980b) et chez les organismes du zooplancton (Boucher et Samain, 1974, 1975; Boucher *et al.*, 1976). Des mécanismes d'adaptation de la nutrition à la nourriture, se traduisent au niveau de la synthèse des enzymes digestives. Celle-ci est réalisée en relation avec les besoins de l'animal et la composition du milieu nutritif disponible. Ainsi, l'amylase et la trypsine varient indépendamment l'une de

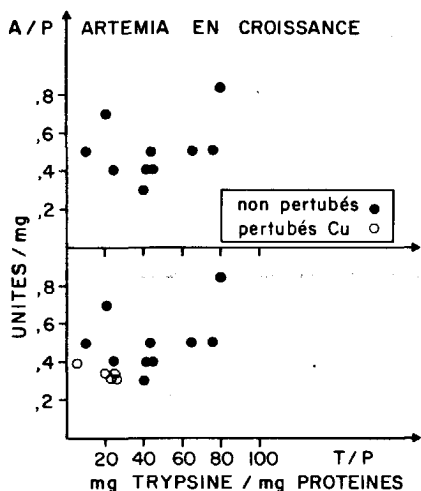


Fig. 1. *Artemia* sp. en croissance. Activité spécifique de l'amylase (A/P) et de la trypsine (T/P). Pour les individus témoins, $r = 0.53$ et $n = 9$ (non significatif); pour l'ensemble des individus témoins et des individus intoxiqués, $r = 0.62$ et $n = 14$ (significatif à $p > 0.05$)

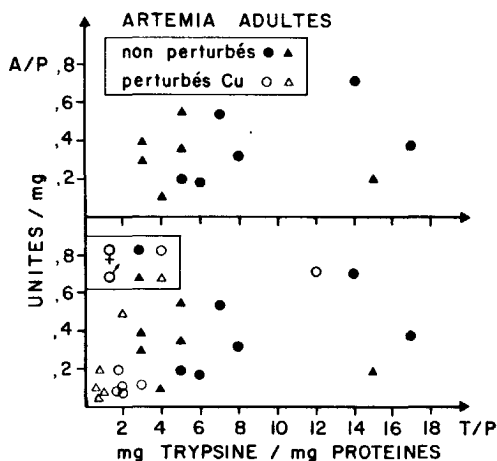


Fig. 2. *Artemia* sp. adultes. Activité spécifique de l'amylase et de la trypsine. Pour les individus témoins, $r = 0.27$ et $n = 12$ (non significatif); pour l'ensemble des individus témoins et des individus intoxiqués, $r = 0.58$ et $n = 23$ (significatif à $p > 0.01$)

l'autre pour s'adapter aux variations du milieu en source de carbohydrates et de protéines. L'indépendance de la synthèse de chacune de ces enzymes digestives a été démontrée précédemment par des observations au laboratoire sur *Artemia* sp. (Samain *et al.*, 1980b) mais aussi sur le terrain pour divers genres de copépodes (Samain *et al.*, 1980a). Cependant, nous rapporterons ici quelques cas particuliers pour lesquels une corrélation

entre l'amylase et la trypsine a été observée aussi bien au laboratoire que sur le terrain en opposition avec la loi d'indépendance précédemment mise en évidence.

Matériel et méthodes

Cet article développe un nouveau point de vue et un nouveau traitement de données précédemment publiées. Pour les expérimentations au laboratoire sur *Artemia* sp. (Souche San Francisco), on se référera aux protocoles déjà décrits par Alayse-Danet *et al.* (1979, 1980) et pour les expérimentations dans le milieu naturel, aux protocoles décrits par Samain *et al.* (1980a). Les dosages de l'amylase, de la trypsine et des protéines ont été effectués selon la méthode de Samain *et al.* (1977).

Résultats

Expérimentation au laboratoire

Des données précédemment publiées sur la modification des taux de l'amylase et de la trypsine d'*Artemia* sp. contaminées par le cuivre (Alayse-Danet *et al.*, 1979, 1980) ont été traitées pour tester l'indépendance entre les deux enzymes. Deux expériences ont été réalisées: l'une sur des *Artemia* sp., adultes mâles et femelles traitées par du cuivre à la concentration de 2 ppm (concentration sublétale), et l'autre sur des *Artemia* sp. en croissance de l'oeuf à l'adulte traitées dans les mêmes conditions. Les relations entre l'activité spécifique de l'amylase et de la trypsine sont étudiées chez les animaux témoins et chez les animaux traités au cuivre.

Chez les témoins on n'observe aucune corrélation entre les deux paramètres. De même, pour les individus traités au cuivre, les données se trouvent très groupées et à des valeurs d'activité spécifique très faibles sans définir un axe de corrélation. Par contre, l'ensemble des données des animaux traités et non traités au cuivre procure une distribution qui définit une corrélation significative au seuil de 1% (Figs. 1 et 2).

Expérimentation dans le milieu naturel

Après le naufrage du pétrolier "Amoco Cadiz", les populations de zooplancton et quelques genres triés ont été suivis régulièrement en fonction de l'état de la pollution du milieu. Les premiers résultats (Samain *et al.*, 1978) permettaient de mettre en évidence une période pendant laquelle l'ensemble de la population de zooplancton présentait des valeurs d'activité spécifique de l'amylase et de la trypsine corrélées (Fig. 3). Il s'agissait des 15 premiers jours succédant à la marée noire pour le secteur du large (mars), et du premier mois, à la côte (mars-avril). Cette corrélation a disparu ensuite totalement et n'a pas été observée l'année suivante (Fig. 4).

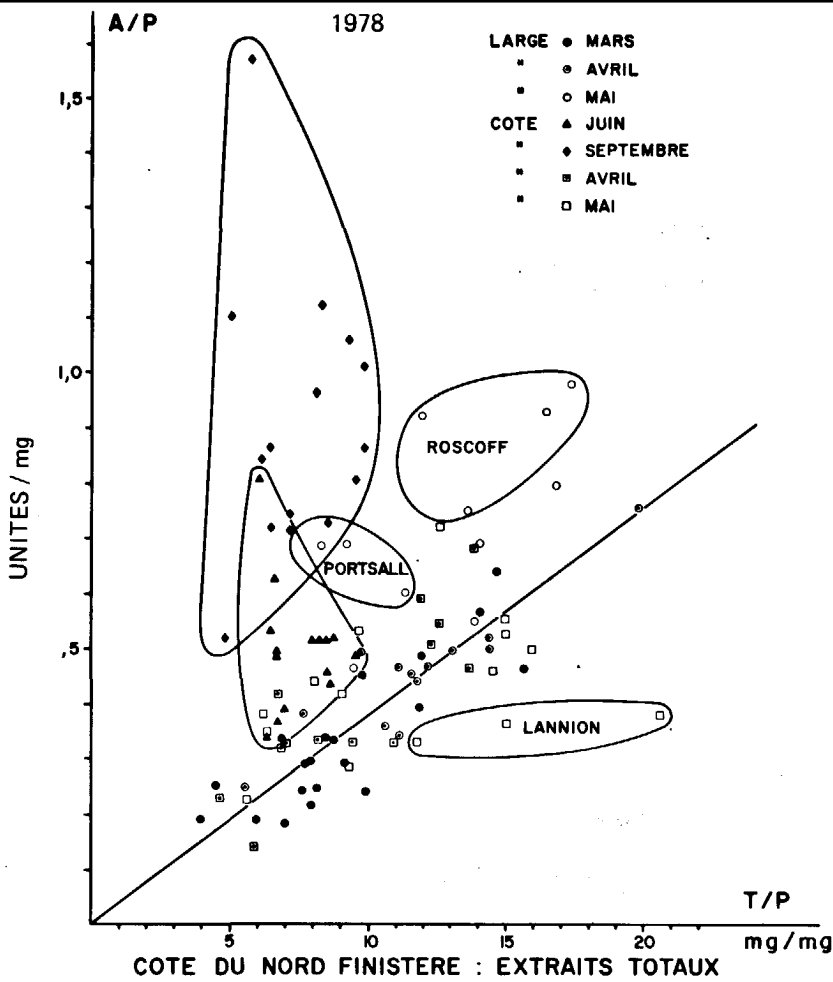


Fig. 3. Activité spécifique de l'amylase et de la trypsine d'un échantillon de population de zooplancton dans les premiers mois succédant à la marée noire de l' "Amoco Cadiz" (mars 1978) (Samain *et al.*, 1978)

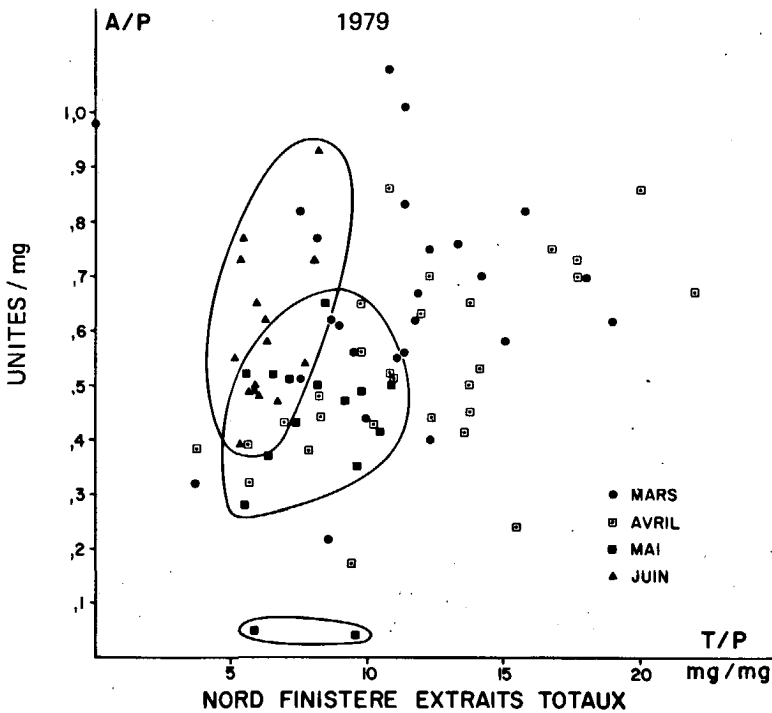


Fig. 4. Activité spécifique de l'amylase et de la trypsine d'un échantillon de population de zooplancton 1 an (1979) après la marée noire de l' "Amoco Cadiz" (Samain *et al.*, 1980a).

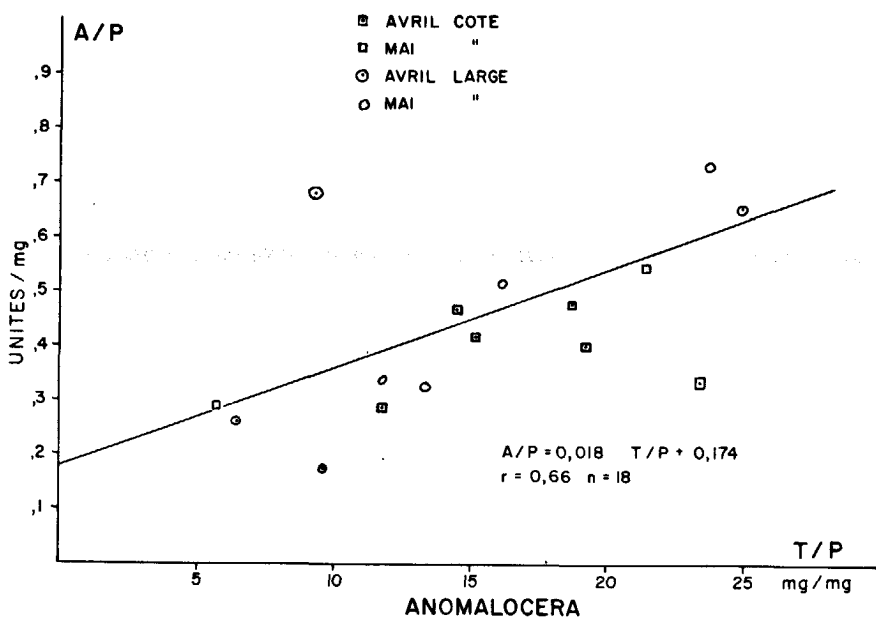


Fig. 5. *Anomalocera patersoni*. Activité spécifique de l'amylase et de la trypsin du copépode au cours du printemps 1978 succédant à la marée noire de l'"Amoco Cadiz" (Samain *et al.*, 1980a)

Après le premier mois succédant à la catastrophe, des genres triés de copépodes *Temora*, *Acartia*, *Centropages*, *Calanus*, présentent des données qui ne sont pas corrélées (Samain *et al.*, 1980a). Par contre, seule une espèce de l'hyponeuston: *Anomalocera patersoni*, présente des données corrélées significativement pendant les 3 premiers mois (Fig. 5). Enfin, 1 an après, *A. patersoni* présente une distribution de données non corrélées sauf pour quelques points se situant sous le vent de zones fortement contaminées et dont les valeurs sont basses et proches de l'axe de l'année précédente (Fig. 6). Concentration d'hydrocarbures en surface: 2, 6 $\mu\text{g l}^{-1}$ (Abers), 2, 0 $\mu\text{g l}^{-1}$ (baie de Lannion) (Marchand et Caprais, 1981).

Discussion

Chez *Artemia* sp. les doses sublétales de cuivre ont provoqué un arrêt de croissance des organismes et ont déprimé les taux d'amylase et de trypsin. Cet ensemble de points, ajouté à l'ensemble des points des animaux non traités fait apparaître une corrélation essentiellement par l'existence de deux groupes de points. Des étapes intermédiaires n'ont pas été observées sauf pour les femelles traitées au cuivre pour lesquelles on observe une valeur élevée correspondant à l'adaptation d'*Artemia* sp. au milieu pollué. Cette valeur d'activité spécifique élevée est proche de l'axe de corrélation et pourrait être considérée comme une étape intermédiaire. Pour des

organismes de la même espèce, le mélange des données d'animaux sains et perturbés peut donc faire apparaître une distribution des données apparemment corrélées.

Chez les copépodes du milieu naturel, l'observation de données corrélées coïncide dans tous les cas à une pollution par hydrocarbures. La disparition de la pollution entraîne la disparition de la corrélation. Chez le zooplancton observé immédiatement après la marée noire, une importante mortalité a été enregistrée (Rojat, 1979) en relation avec les concentrations élevées en hydrocarbures (Marchand, 1978) (122 $\mu\text{g l}^{-1}$ en moyenne en surface en mars 1978). La destruction rapide des enzymes digestives dans les cadavres pourrait expliquer l'existence d'activités spécifiques basses compte tenu que les protéines des cadavres sont encore prises en compte à l'analyse. Cependant, après 15 jours, bien que le nombre de cadavres ait notablement diminué, les taux d'activités spécifiques sont restés faibles à la côte pour l'ensemble de la population ou pour des genres triés vivants (*Temora*) issus de secteurs très pollués (Samain *et al.*, 1978). Le pétrole, comme le cuivre, a donc probablement un effet de dépression sur la synthèse des enzymes digestives. La corrélation observée résulterait de l'ensemble des points issus d'animaux dont la physiologie est perturbée à des degrés divers.

Cette hypothèse se confirme avec l'observation de données corrélées chez *Anomalocera patersoni* pendant les 3 premiers mois succédant à la catastrophe, et 1 an après pour des prélèvements effectués sous le vent des secteurs très pollués et qui relarguent régulièrement des

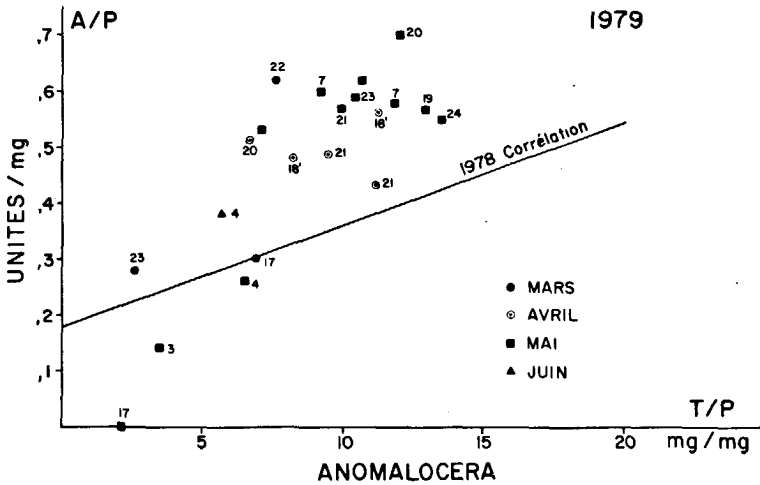
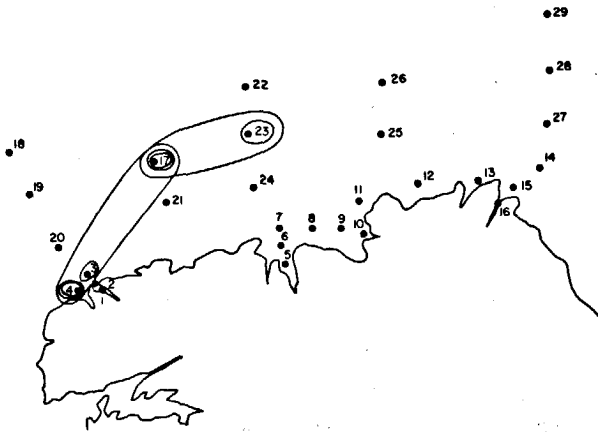


Fig. 6. *Anomalocera patersoni*. Activité spécifique de l'amylase et de la trypsine du copéode au cours du printemps 1979, 1 an après la marée noire de l' "Amoco Cadiz" (Samain et al., 1980a)

hydrocarbures. Après le premier mois, les nappes importantes de la marée noire ont disparu, seule la couche superficielle reste encore polluée (surface: de 39 à 22 $\mu\text{g l}^{-1}$ selon les zones, du 2ème au 4ème mois: Marchand et Caprais, 1981). *A. patersoni* est la seule espèce hyponeustonique parmi les genres de copépodes qui ont été triés. Elle vit essentiellement dans les 10 premiers centimètres de la colonne d'eau, près de la surface. *A. patersoni* subit ainsi plus fortement que d'autres espèces les pollutions par hydrocarbures. Le fait qu'ils ont été pêchés vivants montre bien qu'il s'agit d'une dépression corrélée des enzymes digestives par la pollution et non de leur destruction rapide dans des cadavres.

La corrélation entre l'activité spécifique de l'amylase et de la trypsine apparaît au laboratoire pour un mélange d'*Artemia* sp. sains et perturbés par un polluant métallique. Le même type d'observation est fait dans le

milieu naturel en présence de concentrations notoires d'hydrocarbures, mais aussi de concentrations plus faibles pour des organismes de l'hyponeuston. La présence de polluants semble donc associée à l'apparition de corrélations entre les enzymes digestives amylase et trypsine. L'existence de valeurs corrélées de l'activité spécifique de l'amylase et de la trypsine du zooplancton est une anomalie de la loi normale de régulation de ces enzymes digestives. Cette anomalie paraît associée à celle d'une perturbation physiologique résultant de l'action de polluants.

La dépression des enzymes digestives par les métaux lourds ou par le pétrole n'est probablement pas spécifique de ces enzymes. Compte tenu de l'existence d'une étroite liaison entre fonctions d'un même organisme, la perturbation de l'une d'entre-elles peut se transmettre et affecter par effet secondaire l'ensemble de l'organisme. Dans l'exemple présent, quelque soit le site d'action de

l'un des polluants, la fonction de nutrition serait affectée globalement par effet secondaire. Le caractère global de cette perturbation pourrait expliquer la dépression simultanée de paramètres cellulaires habituellement régulés spécifiquement et indépendants telles que les enzymes digestives. Le même mécanisme est à prévoir pour tout paramètre cellulaire habituellement indépendant. Selon ce principe, le choix des indices peut être très varié, seule la loi d'indépendance nécessite d'être contrôlée.

D'un point de vue général, on peut s'attendre aussi à ce qu'un activateur du métabolisme de l'une des fonctions physiologiques ait des effets secondaires globaux et non spécifiques sur l'ensemble des autres fonctions de l'organisme. Cet effet peut être positif et se traduire par l'augmentation du métabolisme d'autres fonctions. Cette activation métabolique à caractère global devrait se traduire par l'augmentation corrélée des taux de paramètres cellulaires habituellement indépendants. On observe une telle tendance à corrélation entre l'activité spécifique de l'amylase et de la trypsine pour des *Artemia* sp. suivies du stade nauplius au stade adulte. Bien que ces corrélations ne soient jamais significatives, la tendance observée pourrait correspondre aux divers états métaboliques se succédant au cours de la croissance d'un organisme.

La corrélation observée chez *Anomalocera patersoni* dans les 3 mois après la pollution par hydrocarbures, n'a pas été retrouvée l'année suivante, sauf pour quelques individus capturés dans les secteurs sous le vent des zones très polluées. Il s'agirait donc bien d'un effet spécifique des hydrocarbures sur *A. patersoni* plus que d'une variation naturelle d'état métabolique liée à la croissance. En surface, les concentrations en hydrocarbures sont faibles comparativement aux premiers temps de la pollution. Considérées par les chimistes comme proches de la normale (Marchand et Caprais, 1981) elles seraient cependant perturbantes pour la physiologie des organismes tels qu'*A. patersoni* et probablement d'autres organismes de l'hyponéuston.

L'apparition d'une anomalie dans la régulation des enzymes digestives, en relation avec l'évolution de la physiologie du zooplancton, est un exemple de possibilité de détection des effets sublétaux des polluants *in situ*. Dans la mesure où ces observations préliminaires se confirment, un tel principe a l'avantage de s'appliquer sur un écosystème planctonique quelconque, sans nécessité d'établir au préalable un état de référence, ou de connaître particulièrement la physiologie des organismes en place. Cependant si cette méthode permet de détecter une perturbation physiologique, elle ne reste opérante qu'au moment où s'établit la perturbation. Ensuite, les organismes perturbés s'adaptent ou disparaissent. Dans le cas d'une adaptation, les lois naturelles de régulation redeviennent fonctionnelles et l'anomalie disparaît: dans le cas où certaines espèces disparaissent, l'équilibre faunistique et les relations trophiques de l'ensemble du peuplement sont modifiés, phénomènes que nous détectons par l'analyse des variations naturelles nouvelles de l'équipement digestif

de l'ensemble du peuplement ou d'espèces triées (Samain *et al.*, 1980a).

Littérature citée

- Alayse-Danet, A.M., J.L. Charlou, M. Jézéquel et J.F. Samain: Modèle de détection rapide des effets sublétaux des polluants: modification des taux d'amylase et de trypsine d'*Artemia salina* contaminées par le cuivre ou le zinc. *Mar. Biol.* 51, 41-46 (1979)
- Alayse-Danet, A.M., J.L. Charlou, M. Jézéquel et J.F. Samain: Effet du cuivre et du zinc sur les larves et les adultes d'*Artemia salina*. In: Actualités de biochimie marine, Vol. 2. pp 61-74. Paris: Editions du Centre National de la Recherche Scientifique 1980
- Bilinski, E. and R.E.E. Jonas: Effects of cadmium and copper on the oxidation of lactate by rainbow trout (*Salmo gairdneri*) gills. *J. Fish. Res. Bd Can.* 30, 1553-1558 (1973)
- Boucher, J., J. Laurec, J.F. Samain et S.L. Smith: Etude de la nutrition du régime et du rythme alimentaire du zooplancton dans les conditions naturelles, par la mesure des activités enzymatiques digestives. *Proc. 10th Eur. mar. Biol. Symp.* 2, 85-110 (1976). (Ed. by G. Persoone and E. Jaspers. Wetteren, Belgium: Universa Press)
- Boucher, J. et J.F. Samain: L'activité amylasique, indice de la nutrition du zooplancton: mise en évidence d'un rythme quotidien en zone d'upwelling. *Téthys* 6, 179-188 (1974)
- Boucher, J. et J.F. Samain: Etude de la nutrition du zooplancton en zone d'upwelling par la mesure des activités enzymatiques digestives. *Proc. 9th Eur. mar. Biol. Symp.* 1, 329-341 (1975). (Ed. by H. Barnes. Aberdeen: Aberdeen University Press)
- Brown, B.E. and R.C. Newell: The effect of copper and zinc on the metabolism of the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 16, 108-118 (1972)
- Hubschman, J.H.: Effects of copper on the crayfish *Orconectes rusticus* (Girard). II. Mode of toxication. *Crustaceana* 12, 141-150 (1967)
- Hunter, W.R.: The poisoning of *Marinogammarus marinus* by cupric sulfate and mercuric chloride. *J. exp. Biol.* 26, 113-124 (1949)
- Kerkut, G.A. and K.A. Munday: The effect of copper on the tissue respiration of the crab *Carcinus maenas*. *Cah. Biol. mar.* 3, 27-35 (1962)
- Lorz, H.W. and B.P. McPherson: Effects of copper on downstream migration, gill ATPase, and adaptation to sea water of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kistush*). *J. Fish. Res. Bd Can.* 33, 2023-2030 (1976)
- Marchand, M.: Estimation par spectrofluorométrie des concentrations d'hydrocarbures dans l'eau de mer en Manche Occidentale à la suite du naufrage de l'Amoco Cadiz du 30 mars au 18 avril 1978. *Publs Cent. natn. Exploit. Océans (Sér. Act. Colloques)* 6, 27-37 (1978)
- Marchand, M. et J.C. Caprais: Suivi chimique de la pollution de l'Amoco Cadiz dans l'eau de mer des sédiments marins. *Publs Cent. natn. Exploit. Océans (Sér. Act. Colloques)*. (Sous presse). (1981)
- Rojat, D.: Contribution à l'étude de l'impact de la pollution par le pétrole de l'Amoco Cadiz sur le zooplancton, 31 pp. Mémoire de Diplôme d'Etudes Approfondies d'Océanographie Biologique, Université de Bretagne Occidentale, BP 337, F-29273 Brest, France 1979
- Samain, J.F., J. Boucher et D. Buestel: Signification biologique des teneurs protéiques et des activités de l'amylase et des protéases chez *Artemia salina* L. Aspects d'application à l'étude de la nutrition. *Proc. 10th Eur. mar. Biol. Symp.* 1, 391-417 (1975). (Ed. by G. Persoone and E. Jaspers. Wetteren, Belgium: Universa Press)
- Samain, J.F., J.Y. Daniel et J.R. Le Coz: Trypsine, amylase et protéines du zooplancton: dosage automatique et manuel. *J. exp. mar. Biol. Ecol.* 29, 279-289 (1977)

Samain, J.F., J. Le Fèvre, J. Moal, J.Y. Daniel et J. Boucher: Evolution de la biomasse et de la physiologie du zooplancton sur la côte Nord de Bretagne en relation avec l'échouage de l'Amoco Cadiz: résultats préliminaires pour la période du 16 mars au 20 mai 1978. *Publ. Cent. natn. Exploit. Océans (Sér. Act. Colloques) 6*, 193-208 (1978)

Samain, J.F., J. Moal, A. Coum, J.R. Le Coz and J.Y. Daniel: Effects of the "Amoco Cadiz" oil spill on zooplankton - a new possibility of ecophysiological survey. *Helgoländer wiss. Meeresunters. 33*, 225-235 (1980a)

Samain, J.F., J. Moal, J.Y. Daniel, J.R. Le Coz and M. Jézéquel: The digestive enzymes amylase and trypsin in relation to

development in culturing *Artemia salina*: effect of food conditions. *In: The brine shrimp Artemia. Vol. 2. Physiology, biochemistry, molecular biology*, pp 239-255. Ed. by G. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels and E. Jaspers. Wetteren, Belgium: Universa Press 1980b

Date of final manuscript acceptance: March 26, 1981.
Communicated by J.M. Pérès, Marseille