Institutional Repository - Research Portal
Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche
researchportal.unamur.be
University of Namur

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

La détoxification du chrome chez deux crustacés marins: Carcinus maenas et Palaemon elegans

Agnetti, Isabelle

Award date:
1994

Awarding institution:
Universite de Namur

Link to publication

General rights
Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy
If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Download date: 02. May. 2026

160894

La détoxification du chrome chez deux Crustacés marins : *Carcinus maenas* et *Palaemon elegans*.

AGNETTI Isabelle

1994

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTÉ DES SCIENCES
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Tél. 081/72.41.11 - Telex 59222 Facnam-b - Telefax 081/72.44.20

La détoxification du chrome chez deux Crustacés marins : *Carcinus maenas* et *Palaemon elegans*

AGNETTI Isabelle

Résumé

Le chrome (VI) est le forme du chrome toxique pour les invertébrés marins. En effet, il est absorbé préférentiellement à toute autre forme du chrome. Comme beaucoup de métaux lourds, il est soumis chez les invertébrés marins à une transformation qui leur permet de survivre à des concentrations métalliques internes toxiques. Il existe différentes voies de détoxification des métaux lourds chez les invertébrés marins. La détoxification du chrome (VI) chez le crabe *Carcinus maenas* et chez la crevette *Palaemon elegans* correspond à sa réduction en un composé moins toxique, le chrome (III). L'utilisation de l'imagerie de résonance magnétique nucléaire, de l'absorption atomique, et de l'ESR permet de dire que ce mécanisme se déroule dans l'hépatopancréas où le chrome (VI) est transporté après son absorption au niveau des surfaces externes perméables des organismes marins. La réduction du chrome (VI) implique deux types de molécules réductrices cytoplasmiques : l'ascorbate, et les molécules possédant un groupe thiol. L'hépatopancréas constitue également l'organe de stockage du produit de la réduction du chrome (VI).

Mémoire de licence en Sciences Biologiques (Zoologiques)
Septembre 1994
Promoteur : J.-C. Micha
Co-promoteur : P.-S. Rainbow

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mon promoteur de mémoire, le professeur J.C. Micha des Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix à Namur (FUNDP) pour son encadrement. Je dois des remerciements spéciaux à Monsieur Descy, Professeur aux FUNDP, et à Madame Loret des FUNDP qui malgré un emploi du temps bien naturellement chargé ont réussis à m'aider efficacement à interpréter mes résultats, à améliorer le texte de mon mémoire et pour leurs encouragements. Je remercie également Monsieur Trausch des FUNDP pour ses conseils précieux aux moments de prendre d'importantes décisions dans la suite de mon travail.

Je remercie aussi toutes les personnes du Laboratoire de Pollution Marine du Queen Mary & Westfield College à Londres pour leur accueil chaleureux, les facilités et les conseils qu'ils m'ont fournis dans ma recherche de documentation et dans mon travail en laboratoire. Ces personnes sont trop nombreuses pour que je puisse les remercier individuellement, cependant je tiens à remercier particulièrement mon co-promoteur de mémoire, Monsieur Rainbow pour m'avoir encadré et dirigé et le professeur P. O'Brien qui m'a aidé à avancer dans la partie "Chimie" de mon travail.

Enfin, je remercie Jean-Louis Ponente pour son soutien et son aide logistique.

TABLE DES MATIÈRES

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE 1

2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE 2

2.1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DU CHROME 2
2.1.1. Caractéristiques physico-chimiques du chrome 2
2.1.2. Le chrome : élément essentiel 3
2.1.3. Le chrome : élément toxique 4
2.1.3.1. Introduction 4
2.1.3.2. Paramètres influençant la toxicité du chrome 4
2.1.3.2.1. La forme chimique 4
2.1.3.2.2. Les paramètres physico-chimiques du milieu 5
2.1.3.2.3. L'espèce et le stade de développement 5
2.1.3.2.4. La présence d'autres métaux 6
2.1.3.3. Effets toxiques du chrome 6

2.2. LE CHROME DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN 7
2.2.1. Origine du chrome dans l'environnement marin 7
2.2.1.1. Introduction 7
2.2.1.2. Origine naturelle 8
2.2.1.3. Origine industrielle 8
2.2.2. Cycle du chrome dans l'environnement marin 9
2.2.2.1. Dans les estuaires 9
2.2.2.2. Profil vertical 9
2.2.3. Paramètres influençant la biodisponibilité 10
2.2.3.1. La forme chimique 10
2.2.3.2. Les agents complexants 11
2.2.3.3. Le pH 11

2.3. LES INVERTÉBRÉS MARINS FACE AUX MÉTAUX LOURDS 11
2.3.1. Stratégies adoptées face aux métaux lourds 11
2.3.1.1. La stratégie de régulation 11
2.3.1.2. La stratégie d'accumulation 12
2.3.1.2.1. Introduction 12
2.3.1.2.2. Paramètres influençant le taux d'accumulation 12
2.3.2. Voies d'absorption des métaux par les invertébrés marins 13
2.3.2.1. A partir de solution 13
2.3.2.2. A partir de nourriture et de particules 14
2.3.3. Les voies d'excrétion 14
2.3.4. Les voies de détoxification 15
2.3.4.1. Introduction 15
2.3.4.2. Exemples de détoxification 15

2.4. LES INVERTÉBRÉS MARINS FACE AU CHROME 16
2.4.1. "Uptake" du chrome et excrétion 16

2.4.2. Bioaccumulation le long de la chaîne alimentaire 17

2.5. LA DÉTOXIFICATION DU CHROME 17
2.5.1. Sites intracellulaires de la réduction du chrome (VI) 17
2.5.2. Réduction du chrome (VI) par les microsomes 18
2.5.3. Réduction du chrome (VI) par les mitochondries 18
2.5.4. Réduction du chrome (VI) dans le cytosol 18
2.5.4.1. Molécules intervenant comme donneurs d'électrons 19
2.5.4.2. Intermédiaires de la réduction du chrome (VI) 19
2.5.4.2.1. Les thioesters de chrome (VI) 20
2.5.4.2.2. Les complexes de chrome (V) 20
2.5.4.2.3. Les intermédiaires de chrome (IV) 20
2.5.4.3. Mécanismes de réduction 21

2.6. CONCLUSION 21

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES 23

3.1. MATÉRIEL ANIMAL 23

3.2. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX 23
3.2.1. Résonance magnétique nucléaire (imagerie RMN) 23
3.2.1.1. Technique 23
3.2.1.2. Protocole expérimental 24
3.2.2. Absorbance atomique 25
3.2.2.1. Préparation des tissus 25
3.2.2.2. Paramètres de spectrophotométrie AAS 25
3.2.3. Protocole expérimental pour l'étude des conditions de conservation des organes 26
3.2.3.1. Crabes utilisés 26
3.2.3.2. Préparation des extraits de tissu 26
3.2.3.3. Spectrophotométrie 26
3.2.3.4. Le droite d'étalonnage 27
3.2.4. Protocole expérimental pour la détermination des dilutions adéquates de l'hépatopancréas 27
3.2.4.1. Préparation des tissus 27
3.2.4.2. Spectrophotométrie 28
3.2.5. Protocole expérimental pour la mesure des activités réductrices d'extraits d'hépatopancréas 28
3.2.5.1. Pour *Palaemon elegans* 28
3.2.5.2. Pour *Carcinus maenas* 29
3.2.6. Protocole expérimental pour la vérification des réducteurs impliqués 29
3.2.6.1. Préparation des tissus 30
3.2.6.2. Spectrophotométrie 30
3.2.7. "Electron Spin Resonance" (ESR) 31
3.2.7.1. Technique 31

3.2.7.2. Préparation des extraits de tissu 31
3.2.7.3. Paramètres ESR 32
3.2.7.4. Identification du signal 33

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION 34

4.1. INTRODUCTION

4.2. EXPÉRIENCES POUR L'IDENTIFICATION DE(S) ORGANE(S) DE RÉDUCTION DU CHROME (VI) ET DE(S) ORGANE(S) DE STOCKAGE DES PRODUITS DE LA DÉSINTOXIFICATION CHEZ *PALAEMON ELEGANS* ET *CARCINUS MAENAS* 35
4.2.1. Examen par RMN d'animaux contaminés 35
4.2.2. Résultats des mesures de chrome par absorption atomique 36

4.3. RÉSULTATS DES MESURES D'ACTIVITÉ RÉDUCTRICE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE DU CHROME (VI) 38
4.3.1. Choix des conditions de conservation des organes 38
4.3.2. Choix des dilutions adéquates des extraits 39
4.3.3. Mesures des activités réductrices sur les organes d'animaux contaminés 39
4.3.3.1. *Palaemon elegans* 39
4.3.3.2. *Carcinus maenas* 40
4.3.4. Vérification de la nature des réducteurs impliqués par addition d'inhibiteurs 40
4.3.5. Détermination par ESR du produit final de la réduction du chrome(VI) 41

5. DISCUSSION GÉNÉRALE 43

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 46

INTRODUCTION

1. INTRODUCTION GÉNÉRALE

Le phénomène de détoxification par les invertébrés marins de certains métaux lourds rejetés dans les mers, tels le plomb, le cuivre, le zinc, le fer, le cadmium a été étudié en profondeur. Ce n'est pas le cas pour le chrome. Parmi toutes les espèces de chrome, c'est le chrome (VI) qui est toxique pour les invertébrés marins. Sa détoxification correspondrait à sa réduction en un composé moins toxique. Cette réaction a été étudiée dans des cultures cellulaires ou dans des solutions enzymatiques mais jamais sur les invertébrés marins. Les organes impliqués dans ce phénomène, même si l'on pense que ce sont les mêmes que ceux impliqués dans la détoxification des autres métaux n'ont jamais été clairement identifiés. De même, quoiqu'il ait été prouvé que la réduction du chrome (VI) a bien lieu dans des solutions enzymatiques, il n'a jamais été prouvé qu'elle se produisait chez les invertébrés marins. Une polémique existe quant au produit final de la réduction. *In vitro*, le composé final est le chrome (III), mais il est possible que le produit final soit stocké sous d'autres formes dans les organismes marins. Il nous a donc paru intéressant de tenter d'éclaircir tous ces points. Le sujet nous a paru intéressant car il mêle une approche physiologique sur la mise en place par les invertébrés marins de mécanismes de défense face aux agressions des polluants, et une approche chimique. De plus, cette étude allait nous permettre d'utiliser des techniques nouvelles et sophistiquées tel l'imagerie de résonnance magnétique radionucléaire (RMN) et des techniques plus courantes mais jusque là jamais appliquées à l'étude de la contamination par les métaux lourds, telle l'ESR (electron spin résonance).

Le premier but de cette étude sera donc d'identifier par RMN le ou les organes impliqués dans la réduction du chrome (VI) et le ou les organes de stockage du produit final chez deux espèces d'invertébrés marins : *Palaemon elegans* et *Carcinus maenas*.

Le second but sera de suivre la réduction du chromate dans des extraits de l'organe identifié, comparé à la réduction dans des extraits d'autres tissus non spécialisés dans lé détoxification. Nous avons choisi le muscle.

Enfin, le dernier but sera d'identifier par ESR le produit final de la réduction dans des extraits de l'organe concerné par la détoxification.

Une première partie du mémoire comportera une synthèse bibliographique où l'on tentera de regrouper toutes les informations et les découvertes en rapport avec notre sujet. Une seconde présentera la liste des matériels et des méthodes utilisés pour finaliser l'étude. Les résultats obtenus seront discutés dans une troisième partie. La quatrième et dernière partie comportera la discussion générale.

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

2. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1. PRÉSENTATION GÉNÉRALE DU CHROME

2.1.1. CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DU CHROME

Le chrome fait partie des métaux lourds de transition. Les métaux lourds se différentient des autres métaux par une densité supérieure à $5g/cm^3$ et les métaux de transition sont caractérisés par un nombre possible d'états d'oxydation élevé. Ainsi, le chrome existe à tous les niveaux d'oxydation entre -2 et +6, les plus fréquents étant les états 0 (le métal), +3, et +6 (Mertz, 1975).

Le chrome (III) est un acide de Lewis donc un accepteur d'électrons, susceptible de se lier à des bases de Lewis. Il réagit préférentiellement avec des substances azotées, ainsi qu'avec OH^- , F^- , Cl^- , SO_4^{2-}, CO_3^{2-}, et O^{2-} (Luckey *et al.*, 1971). Dans les systèmes biologiques, le chrome (III) forme des complexes de coordination très stables. Le chrome (III) est d'ailleurs la forme du chrome la plus stable. Il peut également se rencontrer lié à l'eau [$Cr(H_2O)_6$]$^{3+}$ et dans les sels $[Cr(H_2O)_6]Cl_3$. A pH neutre, ces espèces forment des ponts entre groupes hydroxyles et précipitent. Cependant, dans les tissus, la présence de ligands organiques ou inorganiques empêchent cette réaction. Ces ligands (pyrophosphate, méthionine, sérine, glycine, leucine, lysine...) maintiennent le chrome (III) soluble en se liant à lui (Borel *et al*, 1984).

Le chrome (VI), quant à lui, existe lié à l'oxygène sous forme de chromate CrO_4^{2-}, ou de bichromate $Cr_2O_7^{2-}$ selon le pH du milieu :

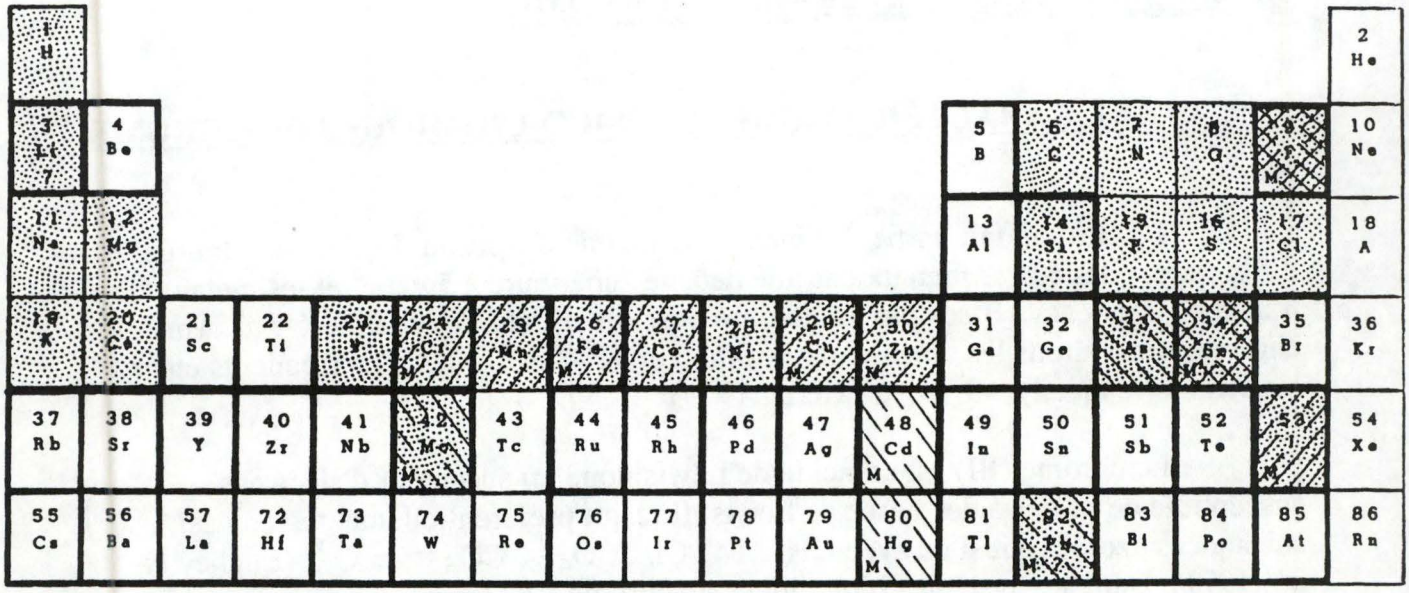
$$H_2Cr_2O_7 \leftrightarrow Cr_2O_7^{2-} + H_2O \leftrightarrow 2\ CrO_4^{2-} \qquad \text{(Phipps, 1976)}$$

Les anions bichromates en solution acide montrent un fort pouvoir oxydant, et réagissent avec le matériel organique et inorganique présent pour former des complexes. Par contre, en solution alcaline, ils possèdent un faible pouvoir oxydant (Phipps, 1976).

Les espèces à l'état d'oxydation 0,+4, et +5, même si elles sont peu fréquentes, existent dans les systèmes biologiques, sous forme de complexes très stables susceptibles de se lier aux acides nucléiques (Borel *et al,* 1984).

Enfin, le chrome (II) n'est pas présent dans les systèmes biologiques car il réagit au contact de l'air, et est oxydé en chrome (III) (Luckey *et al*, 1971).

Tableau 1 : tableau périodique spécifiant les éléments essentiels (Underwood et Mertz, 1975).



- Eléments à l'état de trace
- Eléments essentiels
- Eléments liés à un problème de déficience
- Eléments liés à un problème d'excès
- M Eléments entraînant des problèmes chez l'homme

2.1.2. LE CHROME : ÉLÉMENT ESSENTIEL

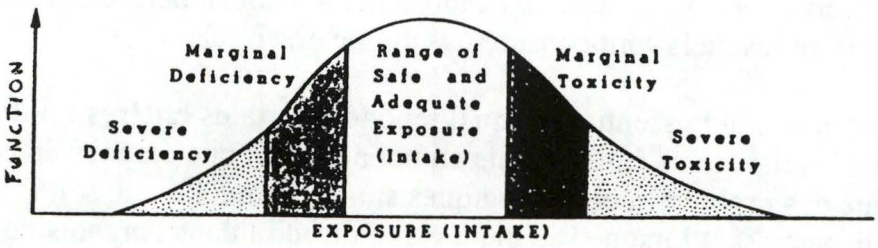
Le rôle des métaux dans de fonctionnement physiologique de l'homme et des animaux est connu depuis longtemps : le fer de l'hémoglobine, le cuivre de l'hémocyanine, le zinc comme co-enzyme... Cependant, ce n'est qu'en 1959 que le chrome, élément découvert en 1798, est reconnu comme essentiel pour l'être humain et pour les vertébrés supérieurs. Bien que les preuves manquent, beaucoup d'auteurs le considèrent essentiel pour les vertébrés inférieurs et pour les invertébrés (Underwood et Mertz, 1971). Le tableau 1 représente le tableau périodique des éléments en précisant lesquels sont considérés comme essentiels.

Un élément est dit essentiel lorsqu'il répond à certains critères : il doit être présent dans tous les tissus des êtres vivants en bonne santé; une carence en cet élément provoque des problèmes physiologiques similaires quelle que soit l'espèce, ces problèmes disparaissant lorsque l'élément est réintroduit dans l'organisme (Lotzias cité par Underwood et Mertz, 1971).

En 1984, Borel et Anderson résumèrent les expériences ayant permis d'établir le caractère essentiel du chrome : des animaux dont le régime alimentaire est déficient en chrome montrent une intolérance au glucose, une hyperglycémie, une mauvaise croissance, un taux de cholestérol élevé, et des problèmes cardio-vasculaires; chez les hommes, la carence en chrome provoque des symptômes similaires à ceux du diabète, et qui disparaissent lorsque du chrome (II) leur est fourni. Le chrome aurait la capacité de potentialiser l'action de l'insuline sur le métabolisme glucidique, protéique, et lipidique. Il a été montré que le chrome (III) fait parti de la structure du GTF, facteur de tolérance au glucose. D'autres expériences sur des tissus graisseux de rats au régime alimentaire carencé en chrome montrèrent une augmentation de l'oxydation du glucose en CO_2 dans les cellules, et de l'incorporation du glucose dans les cellules, ainsi que la formation de glycogène à partir de glucose, et la formation d'acides aminés. Selon Phipps (1976), le chrome agirait sur l'insuline soit par l'intermédiaire du GTF dont il fait partie, soit en stabilisant l'insuline par complexation, ou indirectement en inhibant l'insulinase.

Le chrome pourrait intervenir comme activateur d'enzymes et les complexes de chrome (III) pourraient avoir un rôle de stabilisation des protéines et des acides nucléiques (Phipps, 1980).

Figure 1 : courbe dose-réponse d'un élément essentiel représentant son action biologique en fonction de son absorption par un organisme (Underwood et Mertz, 1975).



2.1.3. LE CHROME : ÉLÉMENT TOXIQUE

2.1.3.1. INTRODUCTION

Bien qu'essentiel, le chrome, comme chaque élément lorsqu'il se trouve à de trop fortes concentrations dans l'organisme, devient toxique (figure 1). Dans un environnement naturel non pollué, le chrome se trouve à l'état de trace, c'est-à-dire en faible quantité, et il ne représente pas un danger : 0.2 ppm en mer (Waldichuk, 1974). Mais sous forme de déchets industriels, il se concentre dans les fleuves jusqu'aux estuaires et aux côtes maritimes où la capacité de certains invertébrés à accumuler les métaux le rend toxique (Atkins *et al.*, 1976).

2.1.3.2. PARAMÈTRES INFLUENÇANT LA TOXICITÉ DU CHROME

2.1.3.2.1. La forme chimique

Il est admis que la forme des métaux lourds la mieux assimilée, donc la plus toxique pour les invertébrés marins, est la forme ionique libre, même si sa concentration dans l'environnement marin est faible (Furness et Rainbow, 1986).

Des études sur la toxicité comparée du chromate, du bichromate, et du chrome (III) sur divers organismes marins montre que l'espèce du chrome la plus dangereuse est le chromate (chrome (VI) sous forme de CrO_4^{2-}. Les valeurs de LC 50 décroissent pour le chrome (III), le bichromate, et le chromate dans l'étude de *Eisenia foetida* (Annélide, Oligochaeta) (Molnar *et al.*, 1989). Les mêmes conclusions ont été tirées après l'étude sur des cultures d'*Escherichia Coli* (Gaur et Bhattacherjee, 1991).

Cela serait expliqué par le fait que le chrome (VI) est la forme la plus disponible dans l'environnement marin. En effet, le chrome (III) est soumis à de nombreuses réactions de précipitation, complexation, adsorption... qui le rendent peu disponible pour les organismes marins.

De plus, de nombreux travaux montrent que le chrome (VI) est plus facilement absorbé par les organismes que le chrome (III). L'absorption a été étudiée chez l'homme et le rat en suivant le passage de chrome radioactif trivalent ($CrCl_3$) ou hexavalent ($Na_2Cr_2O_4$) de l'intestin au sang. Le taux de chrome retrouvé dans le sang est jusqu'à cinq fois plus élevé après ingestion de chrome (VI) qu'après ingestion de chrome (III). De plus, le chrome (VI) du sang traverse la membrane plasmique des globules rouges et se lie à la globine alors que le chrome (III) qui est passé dans le

Tableau 2 : LC50 du chromate Na_2CrO_4 sur différentes espèces de crustacés à des stades adultes ou larvaires. Sal.= salinité (pour mille). a : adulte. l : larve. (Van der Meer *et al.*, 1983).

Salinité (Pour mille)	Espèces	Estimation des LC50 (mol/L) 4 jours	10 jours
33	P.Var.a	1.10E-03	6.90E-04
	P.Var.l	6.20E-04	3.90E-04
	P.el.l	2.60E-04	1.40E-04
	P.flex.a	1.30E-04	5.50E-05
23	P.Var.a	1.60E-03	6.30E-04
	P.Var.l	6.20E-04	3.90E-04
	P.flex.a	1.10E-04	3.90E-05
3.3	P.Var.a	2.60E-04	8.90E-05
	P.Var.l	7.40E-05	3.60E-05

P.var: Palaemonetes varians, P.el: Palaemon elegans, P.flex: Praunus flexuosus N.int: Neomysis integer, D.mag: Daphnia magna. a: adults,

sang reste dans le sérum (Anderson, 1975). Selon Van Weerelt (1984) la membrane cellulaire constituerait une barrière pour le chrome (III).

2.1.3.2.2. Les paramètres physico-chimiques du milieu

Les paramètres physico-chimiques de l'environnement marin se révèlent être d'une grande importance pour l'explication de la toxicité des métaux lourds. Tout d'abord, leurs variations constituent des facteurs de stress fragilisants pour les organismes. Pour la crevette *Palaemon elegans* par exemple, le chromate se montre trois plus toxique à des salinités de 3.3 pour mille par rapport à des salinités de 33 et 23 pour mille (Van Der Mer *et al.*, 1988). De même, la toxicité du chrome sur le nématode *Monhysteria disjuncta* est influencée par des variations de température.

De plus, certains paramètres physico-chimiques, en modifiant et en contrôlant les formes chimiques des métaux lourds, influencent leur biodisponibilité. Par exemple, le chromate sous des conditions acides présente un fort pouvoir oxydant et réagit avec un grands nombre de donneurs d'électrons pour produire la forme réduite, le chrome (III), peu assimilable. Sous conditions alcalines par contre, son pouvoir oxydant est fortement diminué, le chrome (VI) est donc susceptible d'être absorbé par les organismes marins.

L'ion chrome (III) se trouve hydraté dans les milieux aqueux : $Cr(H_2O)_6^{3+}$. A pH neutre ou sous condition alcaline, cette espèce est précipitée après formation de ponts entre les groupes hydroxyles (phénomène d'olation). La concentration en agents complexants peut influencer la toxicité en se liant à ces espèces hydratées et en les maintenant à l'état soluble, ainsi qu'en modifiant l'état de valence des métaux auxquels ils se lient.

2.1.3.2.3. L'espèce et le stade de développement

La toxicité des métaux lourds varie d'une espèce à l'autre, et selon le stade de développement comme le montre l'étude de Van Der Meer *et al.* (1988) consacrée à la mesure des LC 50 du chromate sur différentes espèces à différents stades de développement (tableau 2). Le stade larvaire est le plus sensible.

Des différences de LC 50 peuvent être observées au sein d'une même espèce; les organismes provenant de zones polluées développent une tolérance accrue face aux métaux. Ce phénomène de tolérance a été observé chez le nématode *Nereis diversicolor* provenant d'une zone fortement polluée. La concentration de cuivre nécessaire pour provoquer la mort de 50 % de ces organismes est deux fois plus grande que celle nécessaire pour obtenir 50 % de mortalité parmi une population provenant d'une zone propre. L'étude a été poursuivie sur la truite *Oncorhynchus mykiss,* et sur la crevette *Artemia salina* et montre que leur exposition à des doses

sublétales de zinc leur permet ensuite de résister à des doses normalement létales de zinc (Bryan, 1988).

2.1.3.2.4. La présence d'autres métaux

La présence d'autres métaux peut influencer la toxicité du chrome en inhibant ou en augmentant son absorption par les organismes. Ce phénomène a été étudié chez le rat pour le chrome, mais est susceptible de se produire chez les organismes marins. Chez le rat, le passage de chrome radioactif est diminué lorsque du zinc, du fer ou du vanadium est ingéré par des organismes dont le régime alimentaire est déficient en ces métaux. Il est probable que le chrome partage le même mécanisme de transport que le zinc, le fer, et le vanadium (Borel et Anderson, 1984).

De même, chez les organismes marins, les cas de synergisme et d'antagonisme entre métaux sont nombreux. Par exemple, la toxicité du cadmium sur le jeune saumon est accrue par la présence de cuivre ou de zinc. D'autre part, les effets toxiques du zinc et du cuivre s'additionnent chez le jeune poisson. Par contre, la présence de sélénium diminue la toxicité du mercure chez les mammifères marins (Aubert *et al.*, 1976).

2.1.3.3. EFFETS TOXIQUES DU CHROME (VI)

Les effets sublétaux dus au chromate ont été peu étudiés chez les organismes marins. On sait seulement que le chromate provoque une altération de la croissance et de la reproduction. D'autre part, il provoque une diminution de la résistance aux infections (Association européenne océanique, 1977; Kabayashi, 1984 cité par Rainbow et Furness, 1986).

En revanche, l'étude des effets du chromate sur l'homme a été approfondie. Cet élément se révèle dangereux pour les hommes qui travaillent quotidiennement à son contact. De nombreuses études en France et en Angleterre dans des industries de production de chromate montrent un excès significatif des cancers des poumons et du nez (Davis *et al.*, 1991; Moulin *et al.*, 1990), des dermatites, des allergies à la peau, et des asthmes bronchiaux (Langard, 1980). Dans les cas d'empoisonnements accidentels par du chromate ou par des sels chromiques, des anomalies histologiques des reins, du foie, du système nerveux, et des cellules du sang sont observées (Borel et Anderson, 1984). Selon Waldichuk (1974), le chrome (VI) entraînerait également des altérations de l'activité enzymatique, et déclencherait de nombreux autres effets sur l'endocrinologie, la biologie cellulaire, l'hématologie, l'histiopathologie, et sur divers fonctions physiologiques telles la respiration, la circulation sanguine, et l'osmorégulation.

Les mécanismes biochimiques intervenant sont inconnus hormis pour l'explication de l'effet cancérigène. Martell en 1988 éclaircit les mécanismes causant les cancers en résumant les expériences effectuées sur des cultures cellulaires et des cultures bactériologiques. Les cancers dus aux métaux seraient liés à des problèmes dans les processus de transcription. La fréquence des mutations dans des cultures bactériennes après inoculation de chromate est trois fois plus élevée que dans les cultures contrôles. Les ions chromates se lient aux paires de nucléotides G-C de l'ADN. Les paires G-C sont alors transcrites en A-C lors de la réplication au lieu d'être transcrites en C-G.

Cependant d'autres auteurs émettent des doutes quant à cette conclusion. En effet, la présence de chrome (VI) dans le milieu cellulaire est peu probable car sa réactivité avec les molécules oxydables présentes en grands nombre dans ce milieu est importante. Certains auteurs pensent qu'il est plus vraisemblable que ce soient les produits de la réduction intracellulaire du chrome (VI), tels le chrome (V) ou le chrome (III), qui forment des complexes avec l'ADN (Chen *et al.*, 1991; Sugiyama *et al.*, 1991; Ozolins, 1989). Pour d'autres, l'effet mutagénique serait du à la formation de radicaux lors de cette réduction (Xiangli Shi et Dalal, 1989).

2.2. LE CHROME DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

2.2.1. ORIGINE DU CHROME DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

2.2.1.1. INTRODUCTION

En 1977, l'Association européenne océanique publiait un article intitulé "Metallic effluent of industrial origin in the marine environment" qui soulevait le problème des déchets industriels dans l'environnement marin et tirait la sonnette d'alarme : "l'hydrosphère, à cause de sa grandeur et de son volume (1.370 millions de km^3) pourrait être considérée comme le site idéal pour le rejet des déchets produits par l'homme. Ce concept longtemps accepté et particulièrement par les pays industrialisés a amené aujourd'hui un état d'empoisonnement écologique aggravé par la persistance à long terme dans l'environnement marin de certains polluants et par la bioconcentration de nombreux produits chimiques toxiques."

Selon Pérès (1976), la pollution par les métaux lourds n'est pas généralisée dans l'environnement marin. Elle est présente dans les estuaires et les zones côtières. La concentration moyenne du chrome dans les sédiments des estuaires anglais est de 30 à 200 µg/g (Bryan et Langstom, 1992). La pleine mer contient de faibles quantités de métaux lourds car ceux-ci sont dilués et dispersés par les courants. Le problème lié à la pollution par les métaux est leur persistance dans la mer. En effet, même si des processus biogéochimiques permettent de modifier la forme chimique initialement

Tableau 3 : quelques sources industrielles d'effluents contenant du chrome (VI) aux Etats-Unis (Association européenne océanique, 1977).

Source des effluents	Concentration de Cr(VI) dans les effluents (mg/L)	
	Moyenne	Extrèmes limites
Tannage du cuir	40	
Traitement du bois		0.2 -1.5
Eaux provenant des systèmes de réfrégération industriels	30	8 - 60
Bain de polissage		200 - 75000
Eaux de rinçage des opérations de polissage		1 - 6
Electro-placage	40	15 - 70

introduite dans le milieu, la quantité totale en métal reste inchangée, et ne fait qu'augmenter au cours du temps.

2.2.1.2. ORIGINE NATURELLE

Certes, le chrome est un constituant naturel des mers, produit d'érosion des roches, d'introduction de poussières, de retombées volcaniques... mais depuis quelques décennies, sa concentration augmente dangereusement, notamment dans les estuaires et les côtes, suite aux rejets industriels. En pleine mer, la concentration totale de chrome varie entre 0.2 et 0.5 ppm (Waldichuk, 1974).

2.2.1.3. ORIGINE INDUSTRIELLE

En 1977, l'Association européenne océanique publiait un bilan complet de la production du chrome, de son utilisation industrielle, des pertes engendrées, et des traitements possibles afin de diminuer sa concentration dans les effluents.

La production de chrome et de ses différents dérivés s'effectue à partir d'un minerais, la chromite. La chromite contient 31% de chrome. Cette production engendre des pertes de l'ordre de 10% sous forme de poussières et de terrils. Le chrome et ses dérivés sont utilisés dans les industries chimiques (tanneries, procédés d'électro-placage...) et dans les industries métallurgiques pour la fabrication d'aciers spéciaux et d'alliages. L'utilisation du chrome dans ces industries provoquent des pertes de 20 à 50%. Selon l'association européenne océanique, les pertes de neufs pays de la CEE pour l'année 1969 seraient de 25 000 à 50 000 tonnes de chrome pour l'industrie métallurgique, de 4 500 tonnes pour la production de matériels réfractaires, et de 9 000 à 15 000 tonnes pour l'industrie chimique.

Le chrome hexavalent présent dans les effluents provient surtout des déchets des industries automobiles pratiquant l'électro-placage, et des déchets des industries de tannage du cuir. Les déchets des industries de traitement et de polissage des surfaces, des industries de production de pigments, et les déchets des circuits de réfrigération constituent également, mais à moindre échelle, des sources de chrome (VI) dans les effluents. Le tableau 3 précise les concentrations de chrome (VI) dans les effluents américains.

Les déchets en chrome (III) dans les effluents proviennent des industries de production de céramique, de l'industrie de la photographie, et des usines de coloration textile.

Aujourd'hui cependant la majorité des effluents sont traités. Le chrome (VI) peut être réduit en chrome (III) à un pH de trois et en présence d'agents réducteurs. Le chrome (III) peut être précipité sous forme d'hydroxyde de chrome $Cr(OH)_3$ après

Figure 2 : distribution spatiale du chrome dans les sédiments de surface de la baie de Mex (Alexandrie) (µg/g de poids sec) (Dahab, 1991).

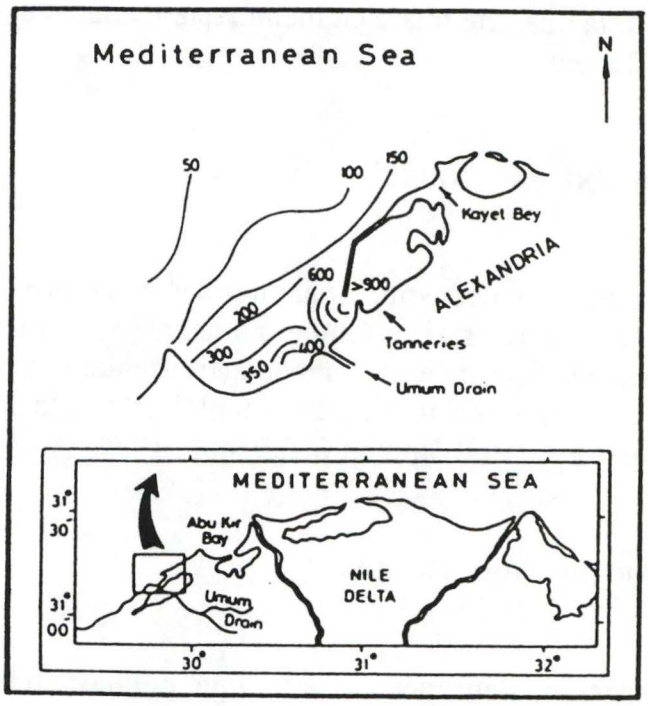


Tableau 4A : radioactivité du chrome 51 dans l'eau de mer et état physique du radio-isotope après son addition sous la forme de solution de chromate de sodium (Chipman, 1965).

Nombre de jours après l'addition du Cr radioactif	Pourcentage du Cr original dans l'eau de mer	Pourcentage de Cr sous forme de particules	Pourcentage de Cr sous forme non particulaire (par différence)
0	100	1.3	98.7
1	100.5	1.2	98.8
3	99.1	1.8	98.2
6	98.9	1.9	98.1
8	99.8	1.8	98.2

Tableau 4B : variations de la radioactivité du Cr^{51} dans l'eau de mer et formation de particules filtrables après l'addition du radio-isotope sous la forme de chloride chromique (Chipman, 1965).

Temps d'observation (hr)	Poucentage de Cr original restant dans l'eau de mer	Pourcentage de Cr sous forme de particule
0.5	92	33
4	87	49
7	74	54
24	66	63
48	56	76
72	58	79
96	56	82

réaction avec du CaO. D'autres techniques comme les résines échangeuses d'ions sont pratiquées et permettent de retirer en partie le chrome (VI) et le chrome (III) des effluents.

2.2.2. CYCLE DU CHROME DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN

2.2.2.1. DANS LES ESTUAIRES

Peu d'informations sont disponibles quant au comportement du chrome dans les estuaires et dans les eaux des côtes maritimes, et il n'en existe aucunes sur le comportement du chrome en pleine mer. A l'arrivée dans les estuaires, la majorité du chrome apporté par les effluents est dispersée et diluée en pleine mer. La figure 2 présente la distribution des concentrations en chrome dans les sédiments superficiels de la baie de Max en Egypte. Cette baie est polluée par le drainage agricole, par les rejets d'une implantation industrielle, et par les eaux résiduelles du port. 60% du chrome apporté quotidiennement dans la baie est exporté en pleine mer (Dahab, 1990).

Une autre partie du chrome arrivant dans les estuaires est sujette à la sédimentation. Différents processus interviennent dans ce phénomène. A pH neutre ou alcalin, les complexes de chrome hydroxylés $Cr(OH)_3$ s'agrègent entre eux par des ponts hydroxyles et précipitent sous forme d'hydroxyles de chrome (Borel *et al.*, 1984). Les ions de chrome peuvent être adsorbés sur des boues échangeuses d'ions comme par exemple les kaolinites $Al_2(OH)_4Si_2O_5$ ou les micas hydratés $KAl_2(OH)_2(AlSi_3)O_{10}$ où les ions Si (VI) et Al (III) peuvent être remplacés par d'autres ions métalliques de même taille (Manahan, 1979). Les ions de chrome peuvent aussi se complexer avec les acides humiques en formant des liaisons avec les groupements carboxyles et hydroxyles. Ces acides sont insolubles et se trouvent en grandes quantités dans les estuaires (Wiegand *et al.*, 1987).

Chipman en 1965 a étudié le comportement des ions de Cr(VI) et Cr(III) radioactifs dans l'eau de mer à un pH de 8. Il a trouvé que 96 heures après l'ajout de chrome trivalent sous forme de $CrCl_3$, 82% du chrome (III) se retrouvait sous forme d'hydroxyles pouvant précipiter ou pouvant s'adsorber sur les parois du bêcher. Par contre, l'addition de chromate à l'eau de mer n'entraînait aucun changement de l'état du métal (tableaux 4A et 4B).

2.2.2.2. PROFIL VERTICAL

Une étude sur les profils verticaux du chrome, du plomb et du cadmium dans la mer Méditerranée montre une homogénéité de ces profils. Le comportement

de ces métaux ne correspond pas à celui des nutriments du fait de nombreux inputs et d'une absorption insuffisante par les organismes marins (Pino, 1990).

2.2.3. PARAMÈTRES INFLUENÇANT LA BIODISPONIBILITÉ

Il est important de noter que puisque la toxicité du chrome est due à sa bioaccumulation, les paramètres influençant la bioaccumulation du métal joue un rôle fondamental dans l'explication des effets des métaux sur les organismes marins.

Dans l'environnement marin, la disponibilité du chrome pour les organismes dépend de sa forme chimique, du degré de sédimentation, de la présence d'autres métaux compétiteurs pour les sites d'absorption des organismes, de la température, de la salinité et du pH.

2.2.3.1. LA FORME CHIMIQUE

La forme métallique la mieux assimilée par les organismes marins est la forme ioniqe libre (Zn^{++}, Cu^{++}...) bien que cette forme ne se trouve qu'en faible quantité dans le milieu marin. Cela explique l'influence des conditions physico-chimiques du milieu sur la toxicité des métaux. Par exemple, l'ajout de substances complexantes solubles dans le milieu réduit l'absorption des métaux, en diminuant la concentration en ions libres. Par contre, l'ajout de complexants liposolubles facilite l'absorption par les organismes (Furness et Rainbow, 1990; Waldichuk, 1974).

Le chrome hexavalent est la forme préférentiellement absorbée. Il peut être concentré dans les tissus de *Balanus* sp. jusqu'à 380 fois la concentration externe. Le chrome trivalent, bien que pouvant être ingéré par les filtreurs sous forme de sédiments, n'est toutefois pas accumulé mais est rapidement excrété (Van Weerelt, 1983). Le chrome (III) peut s'adsorber sur les surfaces externes des invertébré marins. Cependant, dans ce cas, il n'intervient pas dans le métabolisme (Peternac et Lezovic, 1986).

2.2.3.2. LES AGENTS COMPLEXANTS

Le nombre et la nature des agents complexants influencent la biodisponibilité des métaux, généralement en la diminuant (Manahan, 1979). Les agents complexants sont nombreux dans les estuaires. Ils sont soit d'origine naturelle, soit d'origine artificielle (les détergents). La complexation peut engendrer différents effets. Elle peut entraîner des réactions d'oxydoréduction qui modifient l'état de valence du métal complexé; elle peut provoquer la solubilisation d'un métal provenant d'un composé insoluble; enfin, la formation de complexes insolubles permet de retirer les métaux de la solution.

2.2.3.3. LE PH

Le pH du milieu détermine la forme du chrome. Sous des conditions acides, les ions chromates et bichromates sont facilement réduits en chrome (III), alors que sous des conditions alcalines, le chrome trivalent est oxydé en chrome (VI). De plus, les protons entrant en compétition avec les ions métalliques pour les sites de liaison des complexants, le pH influencera le taux de complexation avec les métaux.

2.3. LES INVERTÉBRÉS MARINS FACE AUX MÉTAUX LOURDS

2.3.1. STRATÉGIES ADOPTÉES FACE AUX MÉTAUX LOURDS

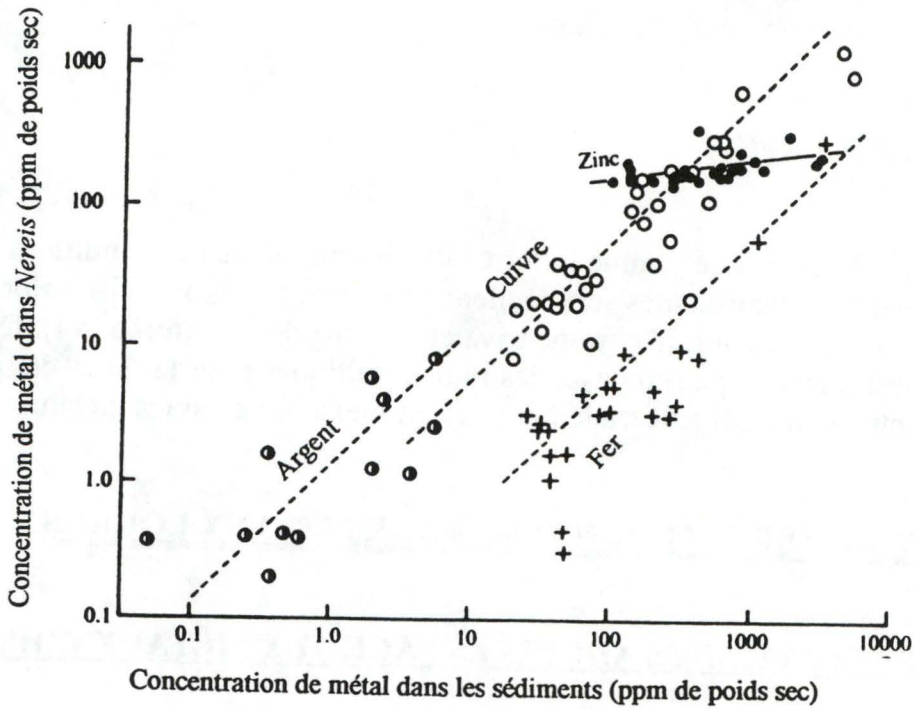
Chez les invertébrés marins, il existe une grande variété de stratégies vis-à-vis des métaux lourds. Ces stratégies varient selon l'espèce et le métal étudiés. Deux grands types de comportements sont observés : le comportement régulateur et le comportement accumulateur.

2.3.1.1. LA STRATÉGIE DE RÉGULATION

Il y a phénomène de régulation lorsque le taux d'absorption du métal par un organisme est égal à son taux d'excrétion. L'organisme stabilise sa concentration interne en métal à un niveau relativement faible et non toxique.

Les Crustacés Décapodes par exemple, régulent leur concentration interne en zinc et en cuivre à un niveau de 100 µg/g de poids sec en adaptant leur taux d'excrétion (Bryan, 1964, cité par Rainbow, 1990). Plus précisément, *Palaemon elegans* régule son taux interne en zinc lorsque la concentration externe en zinc est comprise entre 80 et 100 µg/l. Si la concentration externe dépasse ce seuil, l'équilibre

Figure 3 : relation entre la concentration de métaux dans *Nereis diversicolor* et la concentration des sédiments de plus de vingt estuaires dans le Devon et le Cornwall. Chaque point est la valeur moyenne pour un estuaire ou une partie d'un estuaire. Les lignes en pointillé montrent une proportionnalité directe (Bryan, 1976).



est rompu et la crevette accumule le zinc (Furness et Rainbow, 1990). Comme le montre la figure 3, le zinc est également régulé par le polychaete *Nereis diversicolor.* Par contre, le polychaete ne régule pas l'argent, le cuivre et le plomb.

2.3.1.2. LA STRATÉGIE D'ACCUMULATION

2.3.1.2.1. Introduction

Le taux d'accumulation correspond à l'équilibre qui s'établit entre l'absorption et l'excrétion d'un métal par un organisme. En général, les invertébrés marins ne possèdent pas les mécanismes de régulation nécessaires et ils accumulent les métaux même lorsque leur concentration dans le milieu extérieur est faible (Dallinger et Rainbow, 1987).

Chez certaines espèces, le taux d'accumulation est proportionnel à la biodisponibilité du métal dans l'environnement. Les balanes par exemple, sont des accumulateurs de zinc qu'ils stockent sous forme de granules. Ils sont donc utilisés comme bioindicateurs de la biodisponibilité du zinc. Chan *et al.* (1986) ont prouvé que les balanes sont aussi de bons indicateurs pour le cuivre, le cadmium, le plomb, le nickel, l'argent et le chrome.

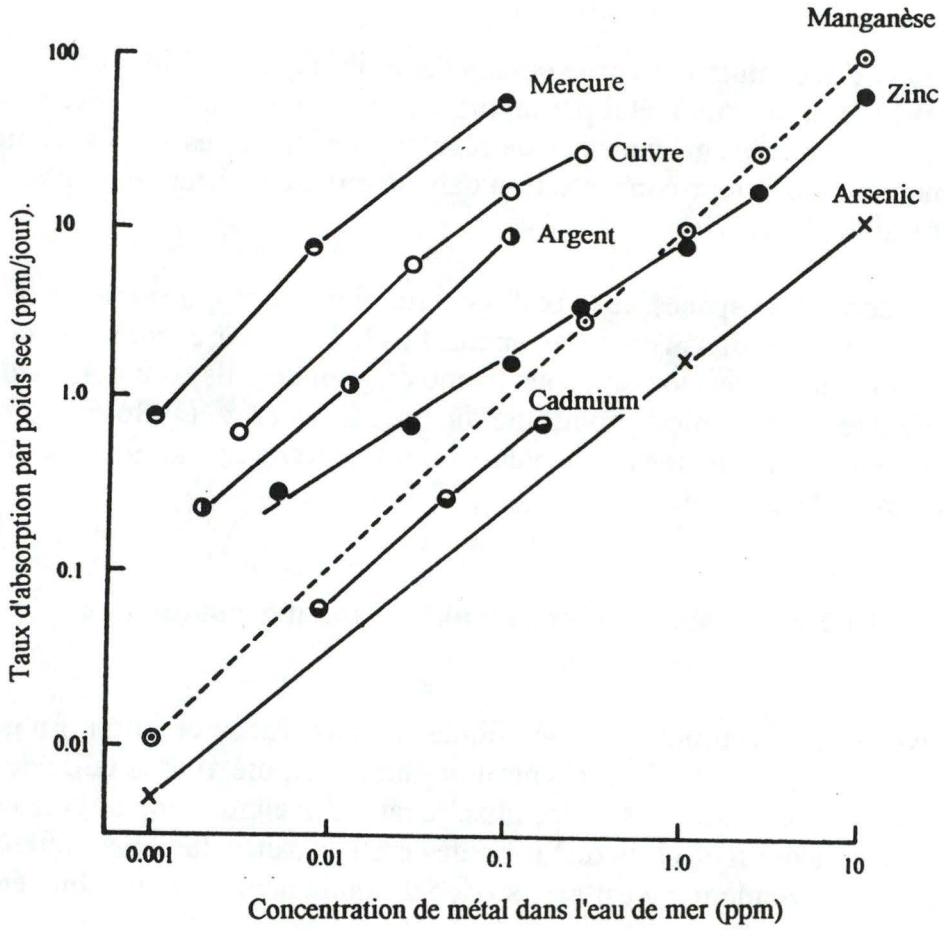
2.3.1.2.2. Paramètres influençant le taux d'accumulation

Il existe des variations intraspécifiques du taux d'accumulation. En général, il y a une relation inverse entre la concentration interne en métal et la taille de l'individu (White et Rainbow, 1982). De plus, le taux d'accumulation augmente après la mue des Décapodes. En effet, la diffusion des métaux s'effectue plus facilement à travers la nouvelle cuticule qui n'est pas, au début, totalement imperméabilisée (White et Rainbow, 1986).

Les concentrations internes de métal varient de façon saisonnière comme cela a été montré pour la balane *Semibalanus balanoïdes* pour les zinc, le cuivre et le manganèse (Walter et Foster, 1984, cité par Rainbow, 1987).

De plus, la salinité a une influence sur le taux d'accumulation. En effet, des différences de taux d'accumulation de zinc et de cadmium par deux populations de crabes *Carcinus maenas* vivant dans des milieux de salinité différentes ont été observées. La diminution de salinité entraînerait une diminution de la perméabilité de la surface de l'organisme à l'eau de mer et aux électrolytes (Hing Man Chan, 1992).

Figure 4 : taux d'absorption de métaux de différentes concentrations dans de l'eau de mer par *Nereis diversicolor* provenant de l'estuaire de Avon (Devon). Chaque point est la valeur moyenne pour cinq vers et les mesures ont été effectuées en utilisant des radio-isotopes à 13°C. Le mercure est ajouté sous forme de chloride, l'argent sous forme de nitrate, l'arsenic sous forme d'arsenate, et les autres sous forme de sulphates (Bryan, 1976).



2.3.2. VOIES D'ABSORPTION DES MÉTAUX PAR LES INVERTÉBRÉS MARINS

Les informations contenues dans ce chapitre ainsi que dans les deux suivants sont tirées d'un livre intitulé "Ecotoxicology of metals in invertebrates" de Dallinger et Rainbow (1987). L'entrée des métaux dans les organismes marins peut s'effectuer soit à partir de solution, soit à partir de nourriture.

2.3.2.1. A PARTIR DE SOLUTION

L'absorption à partir de l'eau de mer s'effectue par diffusion passive à travers les surfaces externes perméables des organismes, comme les branchies. En effet, l'absorption est proportionnelle à la concentration externe en métal, comme le montre la figure 4 pour *Nereis diversicolor*. Les organismes les plus perméables sont donc les plus touchés par la pollution métallique : la plus grande résistance au mercure des larves d'*Artemia salina* par rapport aux larves de balanes *Elminius modestus* serait due à la plus grande imperméabilité des surfaces externes des premières. L'absorption à partir de solution peut prendre place dans le tractus digestif après ingestion d'eau. Chez les gastéropodes *Bysicon carica* et *Hemifusus tuba*, une voie importante d'absorption prend place par le pied.

Selon Dallinger et Rainbow (1987), le mécanisme d'entrée à partir de solution impliquerait des protéines transporteuses membranaires véhiculant les ions métalliques. Une fois dans la cellule, grâce à leur capacité de former des complexes, les ions métalliques se lieraient à des ligands intracellulaires selon une cascade d'affinité et de stabilité croissante. La concentration interne en métal libre restant faible, la diffusion passive continue, et le métal est concentré dans l'organisme à des niveaux beaucoup plus élevés que les concentrations du milieu extérieur. Cette hypothèse expliquerait le phénomène d'accumulation.

Les ions métalliques adsorbés sur les surfaces externes imperméables des organismes tels les carapaces ou les cuticules, n'entreraient pas dans le métabolisme, mais resteraient stockés à l'extérieur (Dalliger et Rainbow, 1987).

Tableau 5 : importance relative de la contamination métallique par la nourriture et par les solutions (Bryan, 1976).

Species	Metals	Result	Reference
Fish			
Paralichthys sp. (flounder)	Zn	Food more important than water	Hoss (1964)
Pleuronectes platessa (plaice)	Zn, Mn, Co, Fe	Water unimportant, therefore food	Pentreath (1973*a*,*b*)
Gobius sp. (goby)	Zn	Food more important than water	Renfro *et al.* (1974*a*)
Ascidians			
Ciona intestinalis (sea squirt)	V	Water most important	Kustin *et al.* (1975)
Crustaceans			
Austropotamobius pallipes (freshwater crayfish)	Zn	Food very important	Bryan (1967)
Homarus vulgaris (lobster)	Mn	Water unimportant, therefore food	Bryan & Ward (1965)
Carcinus maenas (crab)	Zn	Both sources important	Renfro *et al.* (1974*a*)
Lysmata seticaudata (shrimp)	Zn	Water more important	Renfro *et al.* (1974*a*)
Marine and intertidal isopods	Cu	Water more important	Wieser (1967)
Balanus balanoides (barnacle)	Zn, Fe	Food for Fe and mainly for Zn	Young (1974)
Molluscs			
Nucella lapillus (dogwhelk)	Zn, Fe	Nearly all from food (barnacles)	Young (1974)
Mytilus edulis (mussel)	Zn, Mn, Co, Fe	Water fairly unimportant	Pentreath (1973*c*)
Oysters	Zn, Co, Fe	Mainly food and particles	Preston & Jefferies (1969)
Octopus vulgaris (octopus)	Cu	Mainly from food (crabs)	Ghiretti & Violante (1964)

2.3.2.2. A partir de nourriture et de particules

La nourriture peut constituer une voie d'entrée majeure des métaux pour certaines espèces alors qu'elle ne constitue qu'une voie secondaire pour d'autres. Le tableau 5 montre l'importance relative des deux sources de métaux, par la solution ou par la nourriture, chez certains organismes marins. Les résultats ont été obtenus grâce à l'utilisation de traceurs radioactifs.

L'absorption des métaux contenus dans la nourriture dépend de la forme du métal. Les métaux formant des complexes très stables ne peuvent pas être dégradés par la digestion et ne seront pas disponibles pour les organismes. L'absorption dépend également du type de nourriture et de la physiologie digestive de l'espèce considérée.

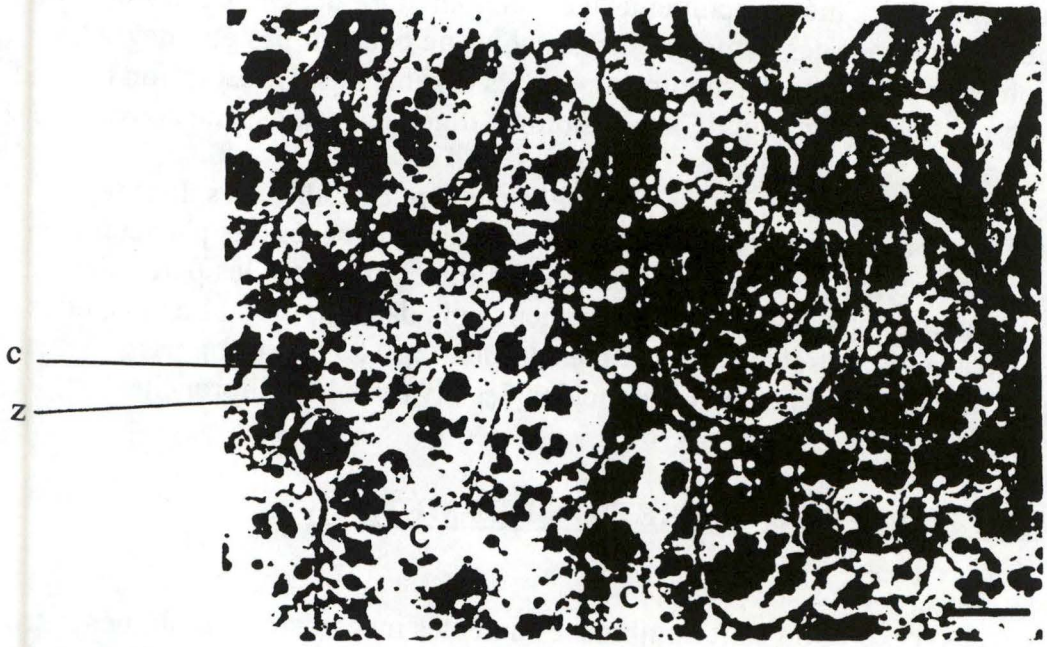
Les métaux contenus dans les particules peuvent être absorbés dans le tractus digestif après ingestion et digestion. Chez certaines espèces, les particules peuvent être absorbées par pinocytose : chez les tuniquée ascidiens, les particules sont dans un premier temps adsorbées sur le mucus puis dans un second temps, elles sont absorbées par pinocytose dans les cellules du pharynx. L'absorption par pinocytose peut prendre place dans les branchies des bivalves lamellibranches.

2.3.3. LES VOIES D'EXCRÉTION DES MÉTAUX

Les voies d'excrétion sont nombreuses mais les mécanismes impliqués restent inconnus. Chez les crustacés, l'excrétion des métaux peut s'effectuer lors de la mue. Les métaux internes sont alors transportés dans la cuticule qui est ensuite éliminée. L'excrétion des métaux peut prendre place à travers les surfaces perméables : la crevette *Palaemon elegans* et le crabe *Carcinus maenas* régulent leur taux interne en zinc en le rejetant par leurs branchies. Chez l'huître *Homarus gammarus*, le zinc est éliminé dans l'urine par les glandes antennaires. Un autre type d'excrétion très courante consiste en la formation de granules riches en métaux qui sont ensuite rejetés par certains organes telles l'hépatopancréas des crustacés malacostracés. Chez les invertébrés, ce mécanisme est observé dans les cellules bordant le tractus digestif et les granules sont rejetés dans la lumière du tube. Des rejets de cristaux de ferritine riches en fer ont été observés chez les crustacés amphipodes. La moule *Mutylus edulis* excrète le fer par son byssus.

I

Figure 5 : *Semibalanus balanoides*. Section de 1µm dans les cellules du parenchyme du prosoma de spécimens provenant de la baie de Dulas (Anglesey), coloré par de la Toluidine. Les granules non colorés (z) sont des granules riches en phosphate; les granules colorés en noir (c) sont riches en cuivre. Barre de l'échelle : 10 µm (Walker, 1977).



2.3.4. LES VOIES DE DÉTOXIFICATION

2.3.4.1. INTRODUCTION

Les invertébrés marins accumulateurs concentrent les métaux à des taux supérieurs au seuil de toxicité. Leur survie est rendue possible grâce à des mécanismes de détoxification. Des processus physiologiques et biochimiques leur permettent de stoker les métaux sous une forme non disponible pour la métabolisme, donc sous une forme non toxique. Cependant, les métaux essentiels doivent pouvoir êtref rendus disponibles afin de répondre aux exigences physiologiques de l'organisme.

2.3.4.2. EXEMPLES DE DÉTOXIFICATION

Parmi la grande variété des mécanismes de détoxification, deux sont particulièrement bien connus : l'un consiste en la formation de granules insolubles riches en métaux. Ce processus permet de stoker les métaux sous une forme non utilisable par le métabolisme, de façon permanente ou de façon temporaire. Par exemple, les granules de zinc et de phosphate sont stockés de façon permanente dans les couches sous-épithéliales de l'intestin moyen des balanes. Par contre, les bivalves peuvent éliminer dans l'urine les granules riches en métaux fabriqués par les reins.

Différents types de granules ont été découverts. La majorité contient du calcium comme composant principal. Dans certains granules, le calcium est lié principalement à des carbonates. Ces granules peuvent contenir du manganèse. Dans d'autres, les granules de calcium peuvent stoker des ions métalliques tels Ag, Al, B, Ba, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Pb, Sn et Zn. Ces métaux forment des sels insolubles avec des anions pyrophosphates et orthophosphates surtout, mais aussi avec des anions carbonates, urates, oxalates...(figure 5).

Chez les balanes, le zinc n'est pas excrété mais est stocké dans des granules contenant des anions pyrophosphates ainsi que d'autres métaux comme la magnésium, le potassium, le fer, le manganèse et le plomb. Le cuivre peut être concentré sous forme d'agrégats et excrété par les conduits efférents des glandes maxillaires des balanes par sécrétion apocrine ou par sécrétion holocrine. Ce type de granules a également été observé dans les cellules de l'intestin moyen et sont excrétés dans la lumière par sécrétion holocrine. Le cuivre de ces granules se trouve associé avec les groupements sulfydryles de matériel organique. L' hépatopancréas est impliqué dans la formation et le stockage de granules de cuivre chez *Procambarus clarkii*.

Le deuxième mécanisme de détoxification consiste en la liaison des métaux avec des ligands comme des protéines, des polysaccharides, ou des acides aminés,

Tableau 6 : Les différents sites pour le stockage des métaux (Bryan, 1976).

Species	Metals	Tissue	Comment	Reference
Mammals				
Zalophus californianus (sea lion)	Pb	Bone	Probably similar to man	Braham (1973)
Phoca vitulina (seal)	Cd	Kidney	Probably Cd-metallothionein	Heppleston & French (1973)
Halichoerus grypus (seal)	Cd	Liver	Cd-metallothionein	Olafson & Thompson (1974)
Halichoerus grypus (seal)	Hg	Liver, fur, claws	Low proportion methylmercury-demethylation?	Freeman & Horne (1973)
Delphinus delphis (dolphin)	Hg, Se	Liver	Two metals linearly correlated; not methylmercury	Koeman *et al.* (1973)
Fish				
Makaira ampla (Pacific blue marlin)	Hg	Liver, muscle	Low proportion methylmercury-demethylation?	Rivers *et al.* (1972)
Sebastodes caurinus (rock fish)	Cd	Liver	Induced Cd-metallothionein	Olafson & Thompson (1974)
Crustaceans				
Procambarus clarkii (freshwater crayfish)	Cu, Fe	Hepatopancreas	Large granules in Fe and Cu cells	Ogura (1959)
Homarus vulgaris (lobster)	Mn	Exoskeleton		Bryan & Ward (1965)
Crangon vulgaris (shrimp)	Cu	Hepatopancreas	Excess Cu stored as granules	Djangmah (1970)
Lysmata seticaudata (shrimp)	Cd	Exoskeleton	50 % total body Cd lost at moult	Fowler & Benayoun (1974)
Molluscs				
Biomphalaria glabrata (freshwater pulmonate)	Cu	Leucocytes	Phagocytosis of excess Cu	Cheng & Sullivan (1974)
Oncomelania formosana (freshwater prosobranch)	Cu	Connective tissue	Crystals of carbonate deposited by wandering cells	Winkler & Chi (1967)
Ostrea edulis (oyster)	Cu, Zn	Leucocytes	Phago- or pinocytosis of excess metals	e.g. Boyce & Herdman (1898)
Pecten maximus (scallop)	Zn, Mn, Pb, Ag, Cd, Cu	Kidney Digestive gland	Large (5 μm) granules inside cells May occur in granules	Bryan (1973) Bryan (1973)
Octopus vulgaris (octopus)	Hg	Digestive gland	Especially in contaminated conditions	Renzoni *et al.* (1973)
Polychaete				
Nereis diversicolor (ragworm)	Cu, Pb	Epidermis	Fine granules in high-metal worms	Bryan (1974)

avec pour effet de retirer les métaux du métabolisme de façon temporaire au moins. Après traitement avec du cadmium, une induction de métallothionine est observée dans le foie du poisson *Sebastodes caurinus*, ainsi que la formation de complexes de cadmium avec cette protéine. Chez *Austropotomobius pallipes*, après injection de zinc, une grande partie du métal se retrouve liée aux protéines du sang, puis après deux jours incorporée dans l'hépatopancréas. De même, 40 % du zinc contenu dans les huîtres *Ostrea edulis* est lié avec des composés de faible poids moléculaire tels la lysine, la taurine ou l'ATP, alors que le reste du zinc est lié de façon plus ou moins forte avec des débris cellulaires.

Les leucocytes semblent particulièrement importants dans la détoxification chez les mollusques. Le cuivre dans les huîtres, par exemple, est accumulé dans les leucocytes. Le tableau 6 montre les différents sites d'accumulation des métaux ainsi que leur forme de stockage pour quelques espèces.

2.4. LES INVERTÉBRÉS MARINS FACE AU CHROME

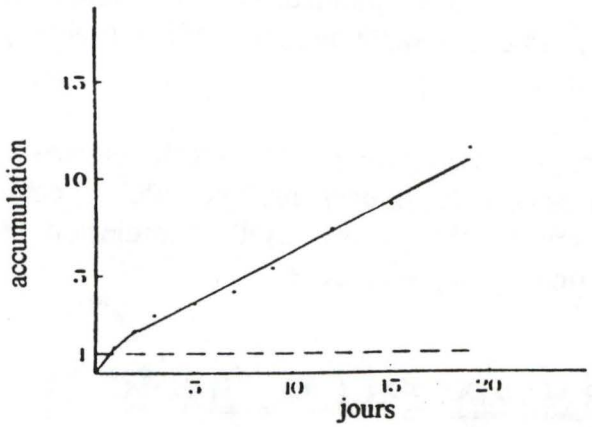
2.4.1. "UPTAKE" DU CHROME ET EXCRÉTION

Comme nous l'avons dit plus haut, la forme du chrome préférentiellement absorbée par les organismes marins est la forme hexavalente (chromate ou bichromate). En 1965, Chipman étudia "l'uptake" du chrome par le polychète marin *Hermione hystrix* en utilisant du chrome radioactif. Le chrome trivalent 51 présent dans les sédiments est ingéré par le filtreur mais n'est pas accumulé dans les tissus. Le chrome (III) semble être présent dans le tube digestif et sur les surfaces externes du corps. Lorsque *Hermione hystrix* est exposé à de l'eau de mer contenant du chrome (VI), il y a "uptake" et accumulation dans les tissus (figure 6). Cependant, une étude de Bremer *et al.* (1986) révéla l'existence d'une relation directe entre la concentration corporelle du polychète *Nereis diversicolor* et la concentration totale de chrome dans les sédiments. Toutefois, l'étude ne détermine pas si la forme absorbée est la forme hexavalente pouvant se trouver en solution dans l'eau interstitielle ou la forme trivalente précipitée.

Les pertes de chrome accumulé sont faibles. La plus grande part du chrome accumulé serait liée à des composés ayant un faible "turn-over".

"L'uptake" s'effectuerait selon un processus passif car dépendant de la concentration externe en chrome (VI) (Chipman, 1965).

Figure 6 : accumulation de Cr^{51} par *Hermione hystrix* à partir d'eau de mer contenant le radio-isotope sous forme de chromate. L'accumulation après différents temps d'exposition est exprimée comme la proportion entre la radioactivité par gramme de vers vivant et la radioactivité d'un millilitre d'eau de mer (Chipman, 1965).



2.4.2. BIOACCUMULATION LE LONG DE LA CHAÎNE ALIMENTAIRE

Le chrome ne répond pas au phénomène d'accumulation le long de la chaîne alimentaire marine. En effet, sa concentration n'augmente pas avec le niveau trophique étudié. Les concentrations en chrome les plus élevées se rencontrent chez les algues et chez les crustacés (Aboul Dahab *et al.*, 1990).

2.5. LA DÉTOXIFICATION DU CHROME

Il est généralement admis que la réduction du chrome (VI) en chrome (III) est un mécanisme d'inactivation de la toxicité du chrome (VI). En effet, même s'il est prouvé que certains intermédiaires de cette réduction, comme les thioesters de chrome (VI) (O'Brien *et al.*, 1985), les complexes de chrome (V) (Xianglin Shi et Dalal, 1989), et les complexes de chrome (IV) (O'Brien *et al.*, 1992) interviennent dans la toxicité du chrome, et même si certains chercheurs pensent que le chrome (III) est la forme du chrome qui entraîne les dommages causés à l'ADN (Sugiyama *et al.*, 1991; Suzuki et Fukada, 1990), le chrome (III), produit final de la réduction du chromate reste l'espèce du chrome la moins susceptible d'intervenir dans le métabolisme, du fait de sa stabilité et de sa relative inactivité.

Le phénomène de réduction du chrome (VI) chez les organismes marins a été peu étudié; peu d'informations sont disponibles quant aux organes impliqués dans la détoxification, quant aux organes de stockage de la forme inactive et quant aux mécanismes mis en place. Par contre, de nombreuses études ont été effectuées sur les foies de rats et de lapins, ainsi que sur des cultures cellulaires. La cinétique de la réduction du chromate a également été beaucoup étudiée in vitro dans des préparations enzymatiques. En première analyse nous admettrons que les conclusions tirées de ces études sont valables pour les organismes marins.

2.5.1. SITES INTRACELLULAIRES DE RÉDUCTION DU CHROME (VI)

Le chrome (VI) peut être réduit au niveau de nombreux sites cellulaires. La réduction peut prendre place an niveau des microsomes (Mihahsen *et al.*, 1991) et au niveau des mitochondries (Arillio *et al.*, 1987). Mais le cytosol est le lieu privilégié de la réduction du chrome (VI) (Wiegand *et al.*, 1987; Das et Chandra, 1989), où de nombreuses molécules de faible poids moléculaire sont susceptibles d'intervenir comme donneurs d'électrons (Connett et Wetterhahn, 1984; Ishibashi *et al.*, 1990; Das et Chandra, 1989). Le processus de réduction de chacun de ces composants cellulaires est différent comme nous allons le voir.

2.5.2. RÉDUCTION DU CHROME (VI) PAR LES MICROSOMES

Michalsen *et al.* (1991) ont reconstitué des préparations purifiées de vésicules phospholipidiques contenant différentes formes de cytochromes P450 microsomaux provenant de foie de lapins et de rats. L'utilisation de chrome (VI) radioactif leur permit de mettre en évidence la liaison du chrome (VI) aux cytochromes, et l'utilisation d'EDTA, agent complexant du chrome (III) en retirant la radioactivité des microsomes, leur permit de prouver que la réduction s'est déroulée pour donner comme produit final du chrome (III) lié aux protéines.

L'intervention des microsomes est confirmée par Wiegand *et al.* qui, en 1987, après perfusion du foie de rat pendant une heure avec du chromate, retrouvèrent 9 % du chrome lié à la fraction microsomale. Cependant, vu que cette activité réductrice est inhibée en présence d'oxygène, il est difficile d'établir de façon exacte le rôle des microsomes dans la réduction du chrome (VI) par les systèmes biologiques.

2.5.3. RÉDUCTION DU CHROME (VI) PAR LES MITOCHONDRIES

Les mitochondries sont capables de réduire le chrome (VI) comme cela a été montré par Arillio *et al.* en 1987 et confirmé par Wiegand *et al.* (1987) pour les cellules de foie de rats. 14 % du chrome (VI) perfusé dans le foie de rat se retrouve en effet fixé à la fraction mitochondriale lorsque le succinate ou le glutamate sont utilisés comme donneurs d'électrons. La réduction atteint un taux maximal lorsque des inhibiteurs appropriés gardent la chaîne respiratoire à son état réduit. Selon cette étude, le chrome (VI) prendrait ses électrons au niveau du complexe 1 de la chaîne respiratoire.

2.5.4. RÉDUCTION DU CHROME (VI) DANS LE CYTOSOL

Il est généralement admis que le cytosol constitue le compartiment cellulaire le plus apte à réduire le chrome (VI) (Wiegand *et al.*, 1987; Ishibashi *et al.*, 1990). Pour certains, la réduction serait catalysée par des enzymes utilisant le NADH ou le NADPH comme cofacteur (Das et Chandra, 1989; Horitsu *et al.*, 1987), mais la majorité des chercheurs optent pour l'intervention de petites molécules de faible poids moléculaire comme donneurs d'électrons dans la réduction du chromate à cause de leur potentiel rédox (Connett et Wetterhahn, 1985).

Figure 7 : pourcentage de réduction du chrome (VI) par divers réducteurs après 1 minute dans 1M Tris-HCl, pH 7.4. Les réactions se passent à 25°C pour tous les réducteurs sauf la méthionine, le tryptophane, le glycolate et la xanthine pour lesquels la réaction es effectuée à 37°C. [Cr^{VI}] initial = 3.7 10^{-4} M. [réducteur] = 2.5 10^{-2} M sauf [xanthine] = 6.3 10^{-3} M. (Connett et Wetterhahn, 1985).

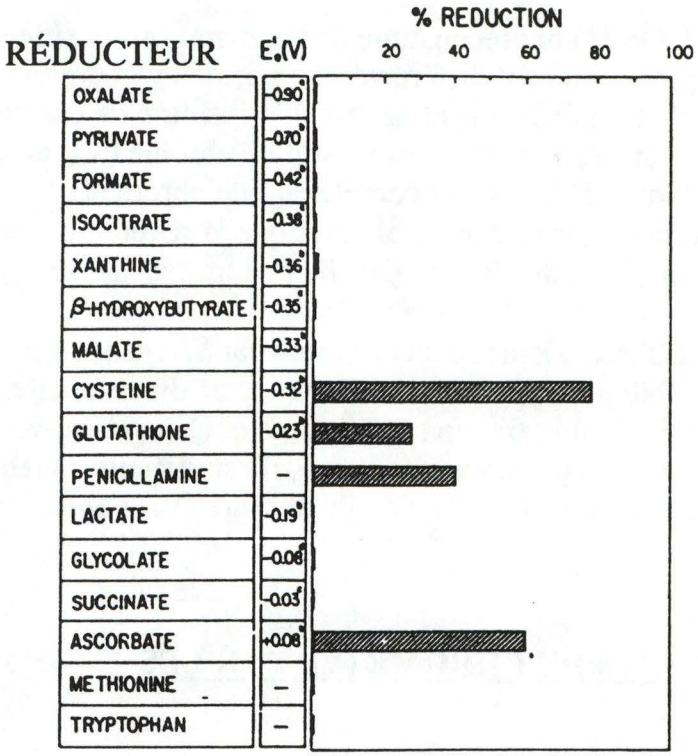
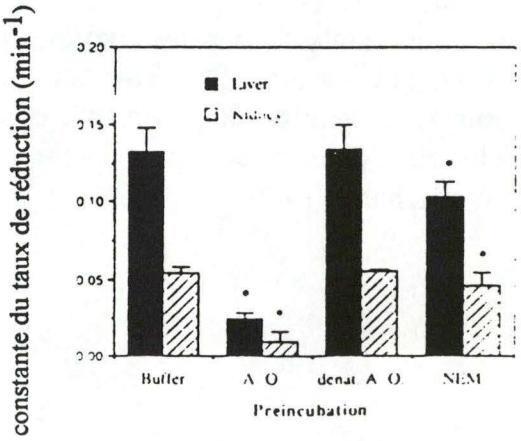


Figure 8 : effets de la destruction in vitro de l'ascorbate et des groupements thiols sur l'activité réductrice du chrome (VI) d'ultrafiltrats de foie et de rein de rats. 0.63 ml de l'ultrafiltrat (le tissu est dilué 13.3 fois dans une solution tampon de 100 mM Tris/1 mM DETAPAC de pH 7.0) sont mélangés à 0.035 ml de solution tampon, de L-ascorbate oxydase (AO) dilué dans la solution tampon (concentration finale = 5 U/ml), de L-ascorbate oxydase dénaturé par la chaleur (denat. AO) et dilué dans la solution tampon, ou de N-éthylmaléimide (NEM) de concentration 8 mM. Les mélanges sont incubés à 4°C pendant 4 minutes. Le chrome (VI) (de concentration finale 0.125 mM) est ajouté, et la diminution d'absorbance à 372 nm est utilisée pour calculer le taux de réduction. Les valeurs sont les moyennes ± SD de cinq rats. Les différences significatives des taux de réduction par rapport au contrôle (taux de réduction des ultrafiltrats en présence de solution tampon seulement) à $P < 0.05$ sont indiqués par •. (Standeven et Wetterhahn, 1991).



2.5.4.1. MOLÉCULES INTERVENANT COMME DONNEURS D'ÉLECTRONS

L'acétate, l'éthanol, le malate, le succinate, le glycérol peuvent intervenir comme donneurs d'électrons dans la réduction du chrome (VI), ainsi que le glucose, le citrate, le pyruvate et le lactate, ces derniers étant cependant moins effectifs (Komori *et al.*, 1989). Des études in vitro montrèrent que beaucoup d'autres molécules participent à la réaction sous un pH acide. Cependant, à pH physiologique, seuls l'ascorbate et les molécules contenant des groupements sulfydryles restent actifs (Connett et Wetterhahn, 1984, figure 7). Parmi les molécules contenant des groupements sulfydryles, le glutathion, du fait de son abondance intracellulaire, constitue le réactif le plus susceptible de jouer un rôle prépondérant dans la réduction du chrome (VI).

L'ascorbate serait le réducteur principal même si les autres molécules thiols participent également à la réaction. Standeven et Wetterhahn (1991) par exemple, utilisèrent des inhibiteurs spécifiques de l'un et de l'autre pour appuyer cette hypothèse. En effet, comme le montre la figure 8, la pré-incubation des ultrafiltrats de foie et de rein de rats avec d'une part du L-ascorbate oxydase, et avec d'autre part du N-éthylmaléimide bloquant de manière non spécifique les groupes sulfydryles dont ceux du glutathion, diminue la réduction du chromate respectivement de 80 et de 20%. De même, Suzuki et Fukuda, en 1989, en mesurant in vitro le temps de demi-vie du chromate en présence d'une part d'ascorbate, et d'autre part de glutathion, parvinrent à la conclusion que l'activité réductrice de l'ascorbate est de 10 à 300 fois plus élevée que celle du glutathion, ainsi que d'autres réducteurs intracellulaires.

2.5.4.2. INTERMÉDIAIRES DANS LA RÉDUCTION DU CHROME (VI)

Il est dans un premier temps nécessaire de préciser que le chrome (III) est bien le produit final de la réduction du chrome (VI) (Sugiyama, 1990; O'Brien *et al.*, 1985; Mickalsen *et al.*, 1987). En effet, le traitement de cellules V 79 d'hamster chinois avec des niveaux non toxiques d'acide ascorbique entraîne une diminution du niveau cellulaire de l'intermédiaire Cr (V), associée à une augmentation proportionnelle en Cr (III) (Sugiyama, 1990).

2.5.4.2.1. Les thioesters de chrome (VI)

Des thioesters de Cr (VI) ont été observés lors de la réduction du chromate en présence de glutathion (GSH) seul, et en présence de glutathion et de sucres (Branca *et al.*, 1990). Dans le dernier cas, le chrome (VI) forme des esters avec le GSH et avec les sucres. Les sucres les plus efficaces sont ceux possédant une paire de groupements hydroxyles en position cis. Ces thioesters sont également formés lors de la réduction du chrome (VI) par divers autres thiols tels la cystéine, la cystéine éthyl ester, la cystéamine, la coenzyme M, l'homocystéine, la N-acétylcystéine, la pénicillamine...(Connett et Wetterhahn, 1986, Bose *et al.*, 1991; Connett et Wetterhahn, 1985). Il est admis que cette formation constitue la première étape de la réduction du chrome (VI) par les thiols.

Ces complexes de chrome (VI) ont d'ailleurs été désignés comme l'une des formes toxiques du chrome (O'Brien *et al.*, 1985), susceptibles de par leur relative stabilité d'atteindre les différents compartiments cellulaires avant la suite de la réaction.

2.5.4.2.2. Les complexes de chrome (V)

Des complexes de chrome (V) à longue durée de vie sont détectés par ESR lors de la réduction in vitro par le glutathion (O'Brien *et al.*, 1985), par l'ascorbate (Lefebvre et Pezerat, 1992) dans des conditions physiologiques de pH et de température, ainsi que sous condition acides (Bose *et al.*, 1991), et par la glutathion réductase en présence de NADH (Xiangli Shi et Dalal, 1989). Ils seraient également toxiques car capables de réagir avec le péroxyde d'hydrogène présent dans les cellules et de produire des radicaux hydroxyles évidemment dangereux car pouvant réagir avec les macromolécules (Xiangli Shi et Dalal, 1989).

2.5.4.2.3. Les intermédiaires de chrome (IV)

Des intermédiaires de Cr (IV) ont été observés par ESR et par EPR (electron paramagnetic résonance) lors de la réduction du Cr (VI) par le glutathion à pH variant entre 1.8 et 3.5. Ces intermédiaires sont en concentration plus élevée que les intermédiaires de Cr (V) et présente une longue durée de vie (Bose *et al.*, 1992). La présence de Cr (IV) a également été détectée lors de la réduction du Cr (VI) à pH neutre par Connett et Wetterhahn (1986).

2.5.4.3. MÉCANISMES DE RÉDUCTION

Connett et Wetterhahn (1986) proposent un mécanisme de réduction du Cr (VI) par les molécules possédant un groupe thiol dans des conditions de pH physiologique. Ce mécanisme est en accord avec les données cinétiques, les mesures ESR et les mesures EPR.

La première étape serait la formation d'un thioester de Cr (VI) (équation 1) à longue durée de vie. Ce thioester subirait une réduction après réaction avec une seconde molécule thiol et produirait du Cr (IV) (équation 2). La formation du thioester de Cr (VI) peut être suivie d'une réduction intramoléculaire produisant du Cr (V) et un radical (équation 3). Si la molécule possède deux groupes thiols capables de former un pont disulfure, la réduction intramoléculaire produirait du Cr (IV).

$RSH + Cr^{VI} \leftrightarrow RSCr^{VI}$ équation 1

$RSCr^{VI} + RSH \leftrightarrow RSSR + Cr^{IV}$ équation 2

$RSCr^{VI} \rightarrow Cr^{V} + RS^{\bullet}$ équation 3

$RSCr^{VI} \rightarrow R\text{—}S + Cr^{IV}$ équation 4

$\quad\quad\quad

détoxification, les organes de stockage, la forme du chrome stockée et les mécanismes en jeu restent inconnus.

Différentes techniques (NMR imaging, ESR, AAS, spectrophotométrie) devront permettre d'éclaircir ces points.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

3. MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1. MATÉRIEL ANIMAL

Les deux espèces choisies pour les expériences sont des Crustacés Décapodes, de sous ordre différent. La première espèce est le crabe *Carcinus maenas* appartenant au sous-ordre des Reptantia et au groupe des Brachyoures. La seconde est une crevette, *Palaemon elegans*, appartenant au sous-ordre des Natiantia et au groupe des Caridea.

Ces deux espèces sont très courantes et vivent sur les rivages marins, y compris dans les estuaires. *Palaemon elegans* se nourrit de débris animaux et *Carcinus maenas* de vers et de mollusques qu'il saisit et tue grâce à ses pinces. *Carcinus maenas* peut également se nourrir d'animaux morts.

Les animaux proviennent de l'université "University Marine Biology station", Millport, Ecosse, et sont maintenus dans des aquariums contenant de l'eau de mer artificielle régulièrement oxygénée et de salinité 33.3 pour mille. Ces aquariums sont placés dans des chambres froides afin que la température de l'eau atteigne 6°C. Les crevettes sont nourries une fois par semaine avec des fragments de viande et les crabes sont nourris deux fois par semaine. L'eau de mer est régulièrement renouvelée.

3.2. PROTOCOLES EXPÉRIMENTAUX

3.2.1. RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE (IMAGERIE RMN)

3.2.1.1 TECHNIQUE

Cette technique permet de capter des signaux provenant de protons que l'on retrouve dans tous les tissus sous forme en grande majorité de molécules d'eau. Ces signaux varient avec les tissus selon leur contenu en eau, en macromolécules, en ions, et en espèces paramagnétiques.

Les contrastes des images RMN proviennent de deux sources : la concentration en eau et les temps de relaxation T1 et T2 des noyaux d'hydrogène. Chaque noyau d'hydrogène possède un moment magnétique caractérisé par un vecteur spin qui est orienté au hasard. Lors de l'application d'un champ magnétique extérieur, les spins des protons s'orientent suivant l'axe du champ, certains vers le

Figure 9 : relaxation longitudinale (T1) après que le système de spin ait reçu un pulse de radiofréquence de 180 °. M_Z est le moment magnétique du système. (Foster et Hutchison, 1985).

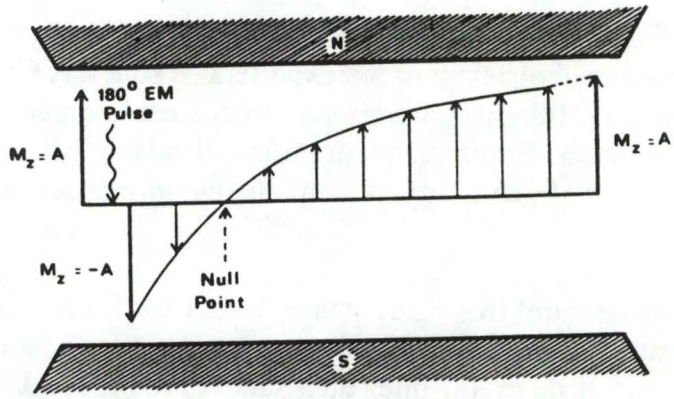


Tableau 7 : temps de relaxation T1 et T2 mesurés in vivo pour différents tissus humains. (Foster et Hutchison, 1985).

Tissue	Frequency (MHz)	T_1 (ms)	T_2 (ms)
Fat	8.5	240	60
Muscle	8.5	400	50
Liver	8.5	380	40
Bile	8.5	890	80
Spleen	8.5	420	20
Kidney	8.5	670	50
Cerebellum	12.8	585	90
Grey Brain	12.8	600	100
White Brain	12.8	380	80

bas, d'autres vers le haut, donnant au total un moment magnétique M au système. Si des pulses radiofréquence sont appliqués en plus du champ magnétique, une ouverture de l'angle du vecteur M s'opère. Des pulses d'une certaine force et d'une certaine durée appelés "pulses 90" ouvrent l'angle de 90°, alors que les "pulses 180" inversent le vecteur.

Le premier paramètre suivi est le temps de relaxation T1, c'est-à-dire le temps mis par le vecteur magnétique total pour retrouver sa position initiale suite à un pulse 180. Cela se produit par une perte d'énergie dissipée dans le milieu environnant (figure 9). Les pertes d'énergie sont causées par les noyaux et électrons des molécules environnantes qui produisent un petit champ magnétique local fluctuant. Le signal sera maximal lorsque la position initiale sera retrouvée.

Le second paramètre, T2, mesure le temps mis par le vecteur magnétique pour retrouver son équilibre après un pulse 90, soit par une perte d'énergie, soit par échange de spins avec les noyaux environnants.

Enfin, la densité en protons, c'est-à-dire en eau, est mesurée par la force du moment magnétique total.

Les deux paramètres T1 et T2 sont sensibles à l'environnement physico-chimique : protons présents dans des molécules d'eau libres ou liées, présence d'espèces paramagnétiques qui du fait de leur électron célibataire modifient le champ magnétique local (tableau 7)... Ces signaux sont reçus par un tube récepteur placé tout autour de l'échantillon, sous forme de signaux électriques et transformés en une image en deux dimensions (Foster et Hutchison, 1985; Brouwer *et al.*, 1992; Molin *et al.*, 1980).

3.2.1.2. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

Les deux espèces de Décapodes ont été soumises à l'imagerie RMN. Le champ magnétique appliqué est de 4.7 Tesla et les pulses radiofréquence de 200 MHz.

Deux crevettes *Palaemon elegans* sont utilisées. La crevette contrôle est placée dans un milieu d'eau distillée additionné de $MgCl_2$ 7 %. Le $MgCl_2$ constitue un anesthésiant et reproduit la salinité du milieu marin. La seconde crevette est placée dans une solution de 7 % $MgCl_2$ et de 10^{-4} M de $Cr_2O_7^{2-}$ (bichromate), pendant deux heures. Les deux individus anesthésiés sont ensuite retirés de leur solution et placés dans la machine RMN. Les images obtenues permettront de déterminer si la réduction du chrome (VI) a eu lieu pour donner l'un des intermédiaires paramagnétique chrome (V) ou chrome (III), et si oui, de localiser les organes où a lieu la réduction et les organes de stockage des produits finaux.

Pour *Carcinus maenas*, trois crabes sont utilisés. Un contrôle est immergé dans de l'eau de mer, un crabe est immergé pendant trois heures dans une solution d'eau de mer contenant du K_2CrO_4 pour avoir du chrome (VI) en concentration 10^{-4} M. Le troisième crabe est exposé pendant trois heures dans une solution d'eau de mer additionnée d'oxyde chromique Cr_2O_3 afin d'obtenir une concentration en Cr (III) de10^{-4} M. Ensuite, les trois crabes sont placés dans un congélateur dans l'attente de leur analyse par RMN. Avant l'analyse, les trois crabes sont placés séparément dans des solutions d'eau de mer afin de les saturer en eau de mer.

Le froid étant susceptible d'abîmer les tissus, l'expérience a été renouvelée avec trois autres crabes. Les crabes sont exposés de la même façon au chrome. Mais cette fois, après leur exposition, ils sont plongés séparément dans une solution anesthésiante de $MgCl_2$ 7%.

Les buts de ces expériences sont les même que pour les crevettes, mais elles permettent également d'étudier les différences de taux "d'uptake" respectifs du chrome (VI) et chrome (III) par les Décapodes.

3.2.2. ABSORPTION ATOMIQUE

3.2.2.1. PRÉPARATION DES TISSUS

Pour confirmer les résultats d'imagerie RMN, les six crabes, après leur analyse RMN, sont disséqués. Des fragments d'hépatopancréas et de muscles sont traités pour subir une analyse de leur concentration en chrome total par absorption atomique. Les fragments sont placés dans un four à une température de 100 °C pendant le temps nécessaire pour qu'ils atteignent un poids constant (3 à 4 jours). La concentration en chrome des échantillons sera donc exprimée en µg de chrome par gramme de poids sec. Ceci permet de comparer des tissus contenant des teneurs en eau différentes. Les échantillons sont ensuite digérés dans 500 µl ou 1 ml d'acide nitrique pendant le temps nécessaire à leur digestion complète (3 à 4 jours). Le volume des différents échantillons est ajusté à 2 ml en utilisant de l'eau doublement distillée.

3.2.2.2. PARAMÈTRES DU SPECTROPHOTOMÈTRE AAS

La flamme du spectrophotomètre (Instrumentation Laboratory spectrophotomètre 157) est composée d'oxyde nitreux, d'acétylène, et d'une quantité d'air comprimé tel que la partie rouge de la flamme soit haute de 20 mm. La longueur d'onde sélectionnée est de 357.9 nm. Le courant des lampes est de 6 mA. Des solutions standards de 10 µg/ml, 5 µg/ml, et de 1.5 µg/ml sont effectuées à partir d'une solution stock de 100 µg/ml. Ces solutions sont utilisées pour calibrer le

spectrophotomètre qui donnera directement la concentration de chrome total de l'échantillon en µg/ml d'extrait. Les mesures seront converties en µg de Cr/gr de poids sec.

3.2.3. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR L'ÉTUDE DES CONDITIONS DE CONSERVATION DES ORGANES

La réduction du chrome (VI) par des extraits d'hépatopancréas de crabes *Carcinus maenas* est mesurée en fonction du temps en suivant l'absorbance du chrome (VI) à 372 nm par spectrophotométrie dans des extraits de tissus (Bose *et al.*, 1991; Connett et Wetterhahn, 1984, 1985).

3.2.3.1. CRABES UTILISÉS

Les crabes utilisés ont été tués de différentes manières. Pour la première expérience, l'hépatopancréas provient d'un crabe congelé pendant quelques semaines. La seconde expérience utilise l'hépatopancréas d'un crabe tué par le froid pendant une nuit. Pour la troisième expérience, le crabe a été immergé pendant dix secondes dans de l'azote liquide. Le but de ces expériences est de déterminer la méthode qui conservera le mieux l'activité réductrice des hépatopancréas

3.2.3.2. PRÉPARATION DES EXTRAITS DE TISSUS

Pour chaque crabe, l' hépatopancréas est disséqué, pesé, puis homogénéisé dans une solution tampon Tris (0.02 M Tris; 0.01 M NaCl) amenée à pH 7.4. Le volume de la solution tampon est de 4 ml par gramme d'hépatopancréas. L'homogénat est centrifugé à 4°C à 10 000 g pendant deux heures. La partie soluble est récupérée et est diluée deux fois.

3.2.3.3. SPECTROPHOTOMÉTRIE

Dans les cuvette de 4 ml du spectrophotomètre, 3 ml de l'extrait sont mélangés à 1 ml de solution stock 0.5 mM de chrome (VI). On obtient une concentration finale de chrome (VI) dans la cuvette de 0.125 mM. La solution stock de chrome (VI) est constituée à partir de 0.0367 g de bichromate de potassium $K_2Cr_2O_7$ de poids moléculaire 294.18 g/mol, dilué dans 500 ml de solution tampon Tris. La solution stock est amenée à un pH 7.4 par addition de NaOH ou HCl.

Une cuvette contenant de l'eau distillée constitue la référence. La lecture de l'absorbance à 372 nm s'effectue toutes les 0.25 minutes pendant 1 à 3 minutes, 30 secondes après l'ajout du chrome (VI) dans la cuvette.

Le spectrophotomètre utilisé est de marque Gilford Response.

3.2.3.4. LA DROITE ÉTALONNAGE

La concentration en chrome (VI) dans la cuvette peut être obtenue grâce à l'utilisation d'une droite d'étalonnage. Deux essais ont été effectués. La droite d'étalonnage utilisée reprendra la moyenne des deux paramètres des deux droites de corrélation provenant des deux essais. Les différentes dilutions sont effectuées à partir de solution stock de 0.5 mM de chrome (VI) par ajout de la solution tampon Tris. Les absorbances des différents échantillons sont mesurées à 372 nm.

3.2.4. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR LA DÉTERMINATION DES DILUTIONS ADÉQUATES DE L'HÉPATOPANCRÉAS

Lors de ces expériences, nous allons mesuré la réduction maximale de chrome (VI) après trois minutes dans des extraits d'hépatopancréas qui auront préalablement été soumis à une série de dilutions. Ceci devra nous permettre de déterminer l'intervalle des dilutions des extraits que nous pourrons utiliser par la suite.

3.2.4.1. PRÉPARATION DES TISSUS

EXPÉRIENCE 1 : le crabe utilisé est congelé pendant une nuit. 2 g d'hépatopancréas sont disséqués, homogénéisés dans 8 ml de solution Tris, et centrifugés à 10 000 g à 4°C pendant deux heures. Le surnageant subit différentes dilutions avec la solution Tris : dilution 2 fois, 5 fois, 10 fois, 15 fois, 20 fois, 24 fois, 30 fois, 40 fois et 50 fois.

EXPÉRIENCE 2 : pour cette expérience, la même quantité de tissu est utilisée. Le même traitement est suivi. Le surnageant subit les dilutions 2 fois, 5 fois, 10 fois, 15 fois, 20 fois, 24 fois, 30 fois, 50 fois et 60 fois.

3.2.4.2. SPECTROPHOTOMÉTRIE

EXPÉRIENCE 1 : 3 ml d'extrait de chaque dilution sont mélangés à 1 ml de solution 0.5 mM de chrome (VI) pH 7.4 afin d'obtenir dans la cuvette spectrophotométrique de 4 ml, une concentration finale en Cr (VI) de 0.125 mM.

EXPÉRIENCE 2 : 1.35 ml de chaque dilution est mélangé à 0.15 ml de solution 0.5 mM de chromate afin d'obtenir dans la cuvette spectrophotométrique une concentration finale de 50 µM.

3.2.5. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR LA MESURE DES ACTIVITÉS RÉDUCTRICES D'EXTRAITS D'HÉPATOPANCRÉAS

3.2.5.1. POUR *PALAEMON ELEGANS*

EXPÉRIENCE 1 : les hépatopancréas proviennent de quatre crevettes tuées par le froid pendant 20 minutes. Les quatre hépatopancréas pesant au total 0.1 g sont homogénéisés dans 2 ml de la solution tampon Tris, et centrifugés à 10 000 g à 4 °C pendant deux heures. La partie soluble est récupérée. Elle sera utilisée pour deux essais du suivi de l'absorbance à 372 nm. Pour les deux essais, on mélange 900 μl d'extrait et 100 μl de solution stock 0.5 mM de chrome (VI) dans la cuvette spectrophotométrique de 1 ml. On obtient donc une concentration finale de chrome (VI) de 50 μM dans la cuvette.

EXPÉRIENCE 2 : Les hépatopancréas proviennent de six crevettes *Palaemon elegans* et pèsent 0.1 g. Les tissus sont homogénéisés dans 3 ml de la solution tampon Tris et l'homogénat est centrifugé à 10 000 g à 4°C pendant deux heures. La partie soluble est utilisée pour deux essais.

Pour le premier essai, on mélange 1.35 ml de l'extrait d'hépatopancréas avec 0.15 ml de solution stock 0.5 mM de chrome (VI) dans une cuvette spectrophotométrique de 1.5 ml (la concentration finale de Cr (VI) dans la cuvette sera donc de 50 μM). L'absorbance à 372 nm est suivie en fonction du temps.

Pour le second essai, on mélange 1.35 ml d'extrait d'hépatopancréas avec 0.10 ml de la solution tampon Tris, et avec 0.05 ml de solution stock 0.5 mM de chrome (VI) dans une cuvette spectrophotométrique de 1.5 ml. On obtient donc une concentration finale de chrome (VI) dans la cuvette de 20 μM. On mesure l'absorbance du chrome (VI) à 372 nm.

Pour pouvoir comparer les diminutions d'absorbance à 372 nm pour les deux extraits qui ont été dilués différemment, nous allons exprimer nos résultats en pourcentage d'absorbance initiale par gramme de tissu.

3.2.5.2. POUR *CARCINUS MAENAS*

Pour ces expériences, comme le taux de réduction du chrome (VI) des extraits d'hépatopancréas mesurés étaient relativement faibles par rapport à ceux trouvés dans la littérature, nous avons voulu les comparer avec ceux du muscle, qui est un tissu non spécialisé dans la détoxification.

EXPÉRIENCE 1 : 1.32 g d'hépatopancréas et 1.32 g de muscles sont disséqués et homogénéisés dans 4 ml de solution tampon Tris de pH 7.4. Les homogénats sont centrifugés à 10 000 g à 4°C pendant deux heures. La cuvette de 1.5 ml du spectrophotomètre est remplie avec 63 % de l'extrait (muscle ou hépatopancréas) soit 945 μl, de 3.5 % de solution tampon Tris soit 52.5 μl, et de 3.5 % de solution de chromate 2.5 mM soit 52.5 μl. La concentration finale de chrome (VI) dans la cuvette sera donc de 0.125 mM.

EXPÉRIENCE 2 : 1 g d'hépatopancréas et 1 g de muscle sont homogénéisés dans 4 ml de solution tampon Tris de pH 7.4 et sont traités de la même façon que plus haut. Dans la cuvette spectrophotométrique de 1.5 ml, 945 μl d'extrait (de muscle ou d'hépatopancréas) sont mélangés à 52.5 μl de solution Tris, et à 52.5 μl de solution 2.5 mM de chromate. On obtient donc une concentration finale de chromate de 0.125 mM.

L'expérience 3 est un réplicat de l'expérience 2.

Pour comparer les taux de réduction du chrome (VI) des trois expériences pour lesquelles les tissus ont été dilués différemment, nous avons exprimé les résultats par minute et par gramme de tissu. Le taux de réduction du chrome (VI) correspond à la pente de la diminution des absorbances à 372 nm en fonction du temps.

3.2.6. PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL POUR LA VÉRIFICATION DES RÉDUCTEURS IMPLIQUÉS

Des inhibiteurs des molécules susceptibles de jouer un rôle dans la réduction intracellulaire du chrome (VI) sont ajoutés aux extraits d'hépatopancréas, et la disparition du chrome (VI) est suivie et est comparée avec le taux de réduction normal (par des extraits d'hépatopancréas sans inhibiteurs). La littérature désigne le glutathion et l'ascorbate comme les deux molécules jouant un rôle prépondérant dans

la réduction cytoplasmique de chrome (VI). On utilisera donc du L-ascorbate oxydase qui oxyde l'ascorbate. Le N-éthylmaléimide constituera le second inhibiteur. Cette molécule bloque de façon non spécifique les groupements sulfydryles et inactive donc le glutathion.

3.2.6.1. PRÉPARATION DES TISSUS

Trois expériences sont effectuées. A chaque fois, 1 g d'hépatopancréas est disséqué, homogénéisé dans 4 ml de solution Tris, et centrifugé à 10 000 g à 4°C pendant deux heures. 2 ml sont ajoutés au surnageant.

3.2.6.2. SPECTROPHOTOMÉTRIE

Dans la cuvette de 1.5 ml du spectrophotomètre, on met 63 % de l'extrait d'hépatopancréas. On ajoute 3.5 % de solution tampon Tris. Puis on ajoute 3.5 % de solution chromate 2.5 mM. La disparition du chromate est suivie à 372 nm.

Dans un second temps, 63 % de la cuvette de 1.5 ml est remplie de l'extrait d'hépatopancréas (soit 945 µl). On ajoute 3.5 % de la solution L-ascorbate oxydase (100 U/ml, dilution effectuée avec la solution Tris). On laisse agir l'inhibiteur pendant trois minutes, après lesquelles 3.5 % de solution chromate 2.5 mM sont ajoutés et mélangés. L'absorbance à 372 nm est suivie.

Enfin, dans un dernier temps, la même opération est renouvelée. A la place de l'ascorbate oxydase, est ajouté du N-éthylmaléimide 60 mM.

Le même protocole expérimental est renouvelé pour les trois expériences. En suivant le taux de réduction du chromate avec ou sans inhibiteurs, et en comparant les taux de réduction selon l'inhibiteur présent, nous pourrons déterminer lesquelles des deux type de molécules, ascorbate ou molécules possédant un groupe thiol, jouent un rôle prépondérant dans cette réduction.

3.2.7. ELECTRON SPIN RÉSONANCE (ESR)

3.2.7.1. PRINCIPE

Les électrons appariés ne donnent pas de signal ESR car pour chaque électron sur une orbitale de nombre de spin M = -1/2, il y a un autre électron sur la même orbitale de M = +1/2. Par contre, les électrons impaires donnent un signal ESR.

Lorsqu'un électron se trouve dans un champ magnétique, son vecteur magnétique peut prendre deux directions correspondant aux deux orientations possibles de son vecteur spin. L'orientation antiparallèle au champ magnétique donne une énergie maximale (E_1). L'orientation parallèle donne une énergie minimale (E_2). La mesure de la différence d'énergie est la base de l'ESR. L'application de champ de radiofréquence oscillant perpendiculairement au champ magnétique induit une transition entre les deux états de l'électrons. La coïncidence entre l'énergie de pulsion et la différence d'énergie entre les deux états de l'électron s'appelle la résonance. Le signal ESR est obtenu en variant le champ magnétique et en mesurant la variation d'absorption correspondante.

Cette technique va permettre de déterminer si le chrome (III) est bien le produit de la réduction du chrome (VI) par les extraits d'hépatopancréas.

3.2.7.2. PRÉPARATION DES EXTRAITS DE TISSU

EXPÉRIENCE 1 : deux hépatopancréas de crevettes pesant 0.0410 g sont disséqués et homogénéisés dans 1 ml de solution tampon Tris de pH 7.4. Le volume est ajusté à 2 ml avec l'aide de solution Tris.

1 ml de cette solution est utilisé comme référence : le tube ESR est rempli de l'extrait d'hépatopancréas et le signal ESR est enregistré.

Dans un tube, 41.65 µl de solution de chromate 2.5 mM sont ajouté et mélangés à 1 ml de la solution d'extrait de tissu, ce qui nous donne une concentration finale en chromate de 10^{-4} M. Le tube ESR est aussitôt rempli du mélange et le signal est enregistré.

Les enregistrements sont effectués de façon régulière dans le temps afin de suivre l'évolution du signal dans le temps.

EXPÉRIENCE 2 : Pour cette expérience, le même protocole est suivi mais avec des extraits plus concentrés en hépatopancréas (0.05 g).

EXPÉRIENCE 3 : l'expérience 1 est renouvelée mais le tissu est traité avec une solution Ringer à la place de la solution tampon Tris.

EXPÉRIENCE 4 : L'expérience est renouvelée avec un hépatopancréas de crabe, ce qui nous permet d'avoir des extraits beaucoup plus concentré. 2.94 g d'hépatopancréas sont traités avec une solution Tris suivant le même protocole que plus haut.

EXPÉRIENCE 5 : L'expérience 4 est renouvelée mais l'extrait d'hépatopancréas et la solution de chrome (VI) est soumis à une gazéification par l'azote ce qui permet de retirer l'oxygène de la solution.

EXPÉRIENCE 6 : analyse du fond du tube de l'expérience 5 où un précipité s'est formé.

3.2.7.3. PARAMÈTRES ESR

Le spectrophotomètre ESR utilisé est un "Brusher ER/200/D instrument".

Paramètres constants pour toutes les expériences :
- centre de fréquence : 3490 G
- largeur de balayage : 200 G
- temps d'acquisition : 200 s
- atténuation : 8 dB

Paramètres pour l'expérience 1 :
- fréquence des rayons X : 9.7626198 GHz
- fréquence de modulation : 2.5 G/pp

Paramètres pour l'expérience 2 :
- fréquence des rayons X : 9.7626264 GHz
- fréquence de modulation : $5\ 10^{-5}$ G/pp

Paramètres pour l'expérience 3 :
- fréquence des rayons X : 9.7627626 GHz
- fréquence de modulation : $5\ 10^{-5}$ G/pp

Paramètres pour l'expérience 4 et 5 :
- fréquence des rayons X : 9.7627987 GHz
- fréquence de modulation : $5\ 10^{-5}$ G/pp

Paramètres pour l'expérience 6 :
- fréquence des rayons X : 9.7653535 GHz
- fréquence de modulation : $5\ 10^{-5}$ G/pp

Paramètres pour l'expérience 6 :
- fréquence des rayons X : 9.7653535 GHz
- fréquence de modulation : $5\ 10^{-5}$ G/pp

3.2.7.4. IDENTIFICATION DU SIGNAL

L'enregistrement ESR nous permet de calculer la valeur g caractéristique du signal :

$$g = \frac{1000\ \gamma}{1.3996\ H_0}$$

γ est la fréquence des rayons X. H_0 représente le champ magnétique pour lequel le signal est enregistré. L'enregistrement débute à un champ magnétique minimum et se termine à un champ magnétique maximum. Une échelle permettra de mesurer le champ magnétique H_0 à l'emplacement du signal.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

4. RÉSULTATS ET DISCUSSION

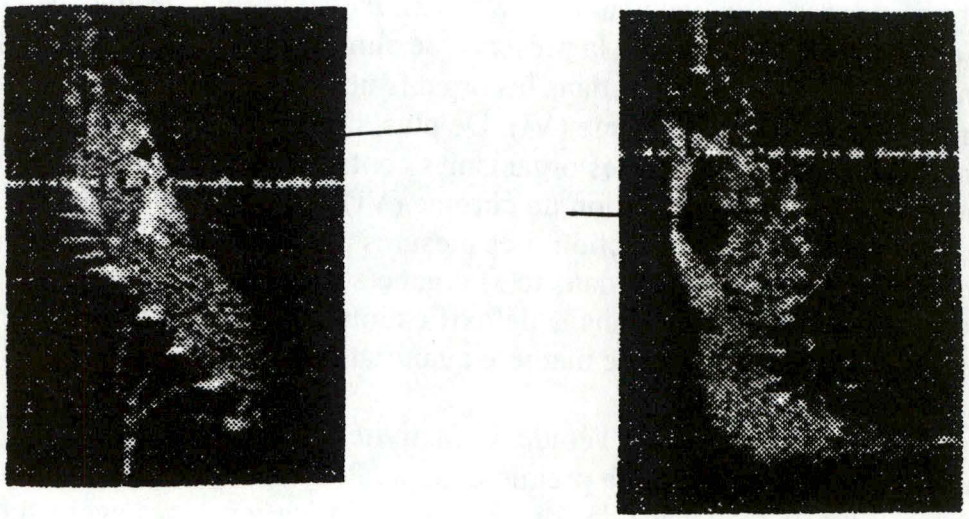
4.1. INTRODUCTION

Dans un premier temps, l'imagerie de résonance magnétique nucléaire (RMN) permettra de vérifier si la détoxification du chrome (VI), c'est-à-dire sa réduction se passe effectivement chez *Palaemon elegans* et *Carcinus maenas.* En effet, cette technique détectera la présence de chrome paramagnétique c'est-à-dire de chrome (V) ou de chrome (III) dans les organismes préalablement soumis à une contamination externe en chrome (VI). De plus, cette technique, en localisant le chrome paramagnétique dans les organismes contaminés, permettra de situer le(s) organe(s) où se passe la réduction du chrome (VI), et de situer le(s) organe(s) où sont stocker les produits de la réduction. Les mesures par absorption atomique de la concentration en chrome total dans le(s) organe(s) de détoxification et de stockage, et dans un tissu non spécialisé dans la détoxification (nous avons choisi le muscle), nous permettra de confirmer de manière quantitative les résultats de RMN.

La seconde étape est l'étude de l'activité réductrice du chrome (VI) dans l'organe identifié au cours de la première étape. Pour déterminer la meilleure façon de conserver l'activité réductrice de l'organe de détoxification, nous avons mesuré les taux de réduction de chrome (VI) par des extraits de tissu de *Carcinus maenas* en fonction de la manière de sacrifier les organismes. Une autre expérience permettra de déterminer les dilutions de l'extrait de tissu pour lesquelles les taux de réduction sont significatifs. Ces mises au points seront utiles pour la suite des expériences. Enfin, nous avons étudier le taux de réduction par des extraits de l'organe de détoxification de *Palaemon elegans* et de *Carcinus maenas*. Pour *Carcinus maenas*, nous avons comparé le taux de réduction par l'organe de détoxification au taux de réduction par un tissu non spécialisé dans la détoxification, le muscle.

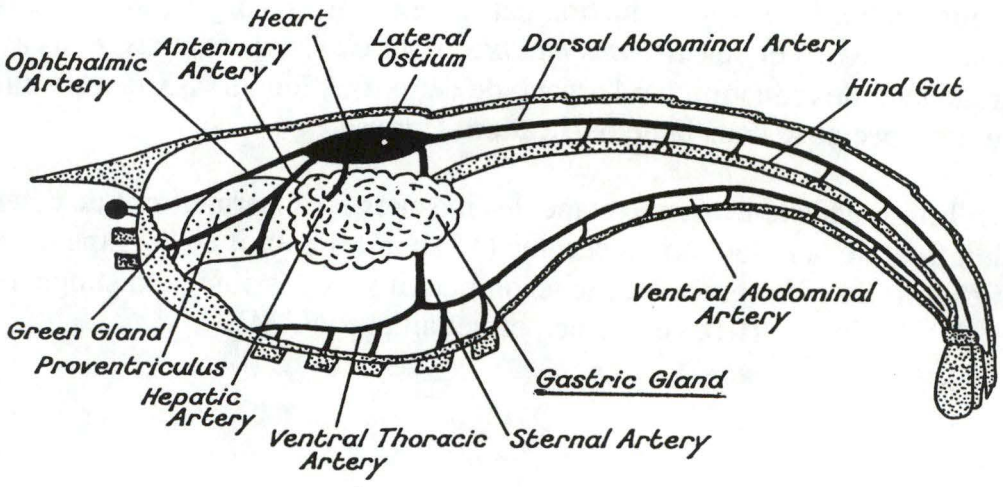
Enfin, dans la troisième étape, les mesures ESR permettront de déterminer le produit final de la réduction du chrome (VI) par des extrait de l'organe de détoxification. En effet, grâce à cette technique, il sera possible de distinguer le chrome (V) du chrome (III), ce que ne permettait pas le RMN.

Figure 10 : image RMN de deux spécimens *Palaemon elegans*. A) *Palaemon elegans* contrôle immergée pendant 2H30 dans une solution 7% $MgCl_2$. B) *Palaemon* elegans immergée pendant 2H30 dans une solution de chrome (VI) 10^{-4} M (sous forme de Cr_2O_7) et de $MgCl_2$ 7%. Les deux spécimens sont ensuite directement analysés par RMN. Les flèches désignent l'hépatopancréas. C) anatomie de *Palaemon elegans* permettant de situer l'hépatopancréas (dont la légende est soulignée).



A)

B)



C)

4.2. EXPÉRIENCES POUR L'IDENTIFICATION DE(S) ORGANE(S) DE RÉDUCTION DU CHROME (VI) ET DE(S) ORGANE(S) DE STOCKAGE DES PRODUITS DE LA DÉTOXIFICATION CHEZ *PALAEMON ELEGANS* ET *CARCINUS MAENAS*

4.2.1. EXAMEN PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE D'ANIMAUX CONTAMINÉS

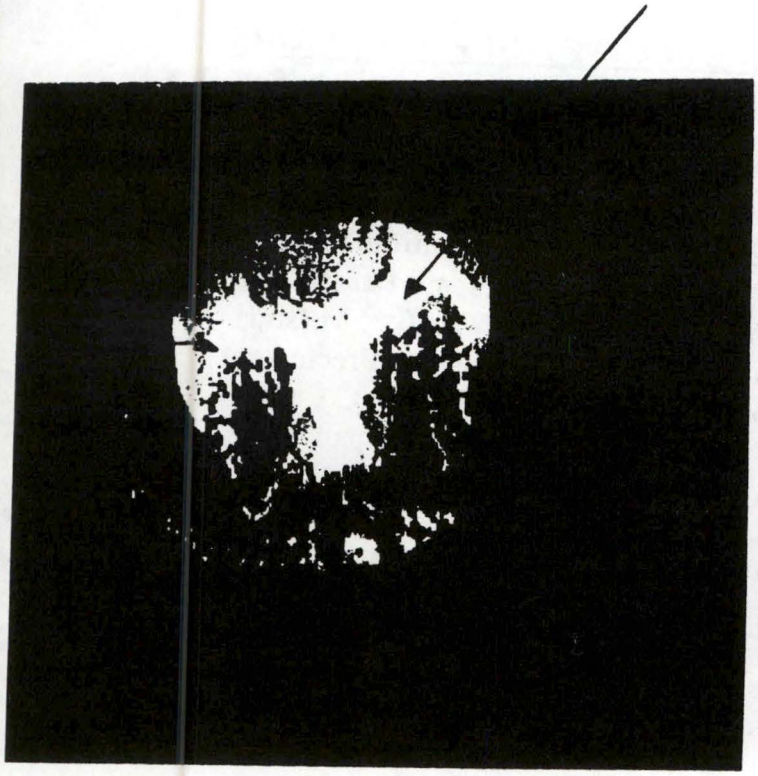
Pour les crevettes *Palaemon elegans*, nous avons obtenu deux images (figure 10A et 10B). L'image 10 A représente *Palaemon elegans* contrôle immergée pendant 2H30 dans une solution 7% $MgCl_2$. L'image 10 B représente *Palaemon elegans* immergée pendant 2H30 dans une solution de chrome (VI) 10^{-4} M (sous forme de $Cr_2O_7^{2-}$) et de $MgCl_2$ 7%. Les deux spécimens sont ensuite directement analysés par RMN. Les flèches désignent l'hépatopancréas. La figure 10 C est un schéma de l'anatomie de *Palaemon elegans* permettant de situer l'hépatopancréas (dont la légende est soulignée).

Les deux images 10 A et 10 B sont différentes. On ne note pas de contrastes sur l'image de la crevette contrôle. Sur l'image de la seconde crevette, on note un fort assombrissement au niveau de l'hépatopancréas. Cet assombrissement trahit la présence d'espèces paramagnétiques de chrome dans l'hépatopancréas. Ces espèces pourraient être du chrome (III) ou du chrome (V).

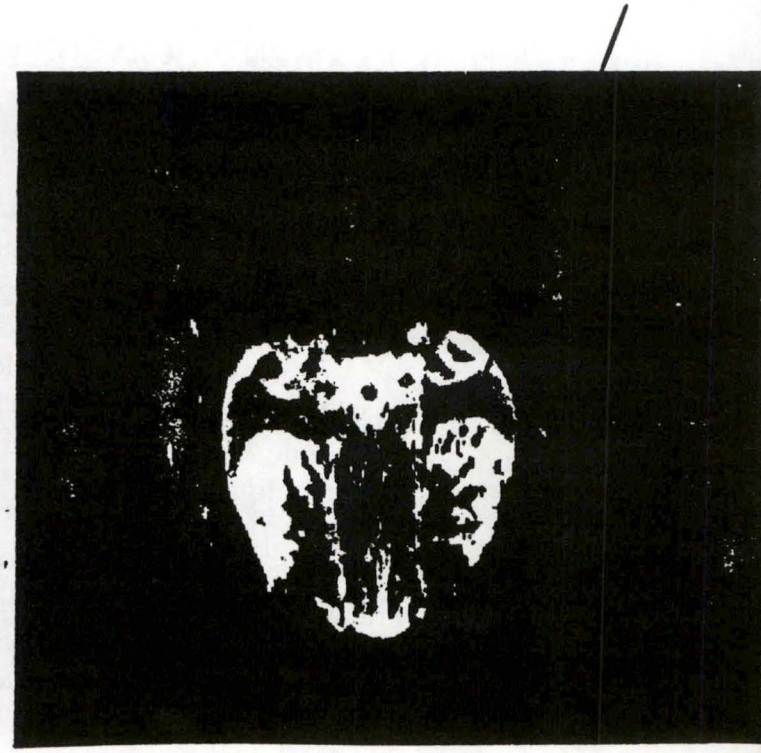
Pour les expériences d'imagerie RMN effectuées sur les crabes *Carcinus maenas*, des résultats similaires sont obtenus. Nous avons effectué trois expériences qui ont été répliquées. La figure 11 A représente le crabe *Carcinus maenas* contrôle immergé pendant trois heures dans de l'eau de mer puis conservé au congélateur. La figure 11 B représente *Carcinus maenas* immergé pendant trois heures dans de l'eau de mer contenant 10-4 M de chrome (VI) sous forme de Na_2CrO_4 puis congelé. La figure 11 C représente *Carcinus maenas* immergé pendant trois heures dans une solution d'eau de mer contenant 10-4 M de chrome (III) ajouté sous forme d'oxyde chromique (Cr_2O_3), puis congelé en attente de l'analyse RMN. Les flèches désignent l'hépatopancréas. La figure 11 D représente l'anatomie du crabe *Callinectes sapidus* qui est similaire à celle de *Carcinus maenas* et qui permet de situer l'hépatopancréas (qui est souligné dans la légende).

Sur l'image du crabe contrôle (figure 11 A), les tissus au niveau de l'hépatopancrés sont clairs. Par contre sur l'image du crabe immergé dans une solution de chrome (VI) pendant trois heures (figure 11 B), les tissus situés au niveau de l'hépatopancréas montrent une teinte foncée caractérisant la présence d'éléments paramagnétiques. Ces éléments pourraient être du chrome (III) ou du chrome (V). L'image du crabe immergé dans une solution de Cr (III) est similaire à l'image du crabe contrôle.

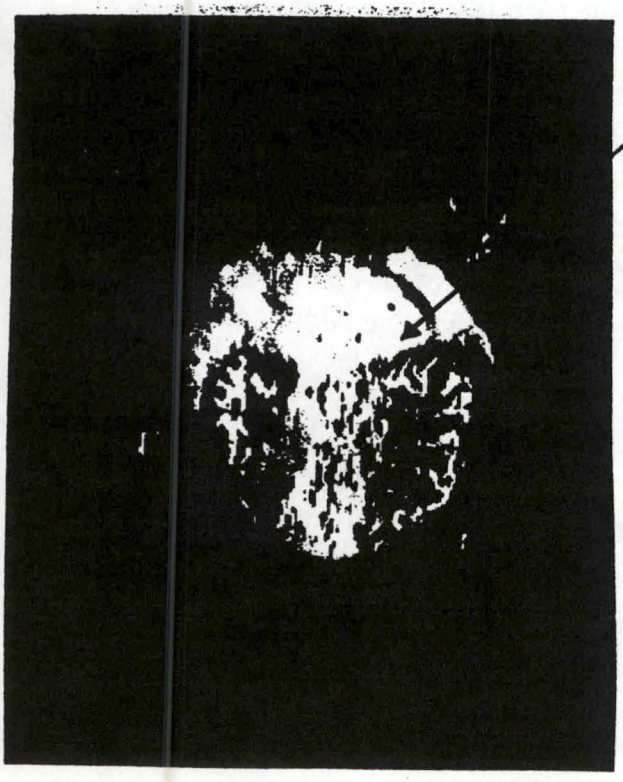
Figure 11 : A) *Carcinus maenas* contrôle immergé pendant trois heures dans de l'eau de mer puis conservé au congélateur. B) *Carcinus maenas* immergé pendant trois heures dans de l'eau de mer contenant 10-4 M de chrome (VI) sous forme de Na_2CrO_4 puis congelé. C) *Carcinus maenas* immergé pendant trois heures dans une solution d'eau de mer contenant 10-4 M de chrome (III) ajouté sous forme d'oxyde chromique (Cr_2O_3), puis congelé en attente de l'analyse RMN. Les flèches désignent l'hépatopancréas. D) anatomie de *Callinectes sapidus*



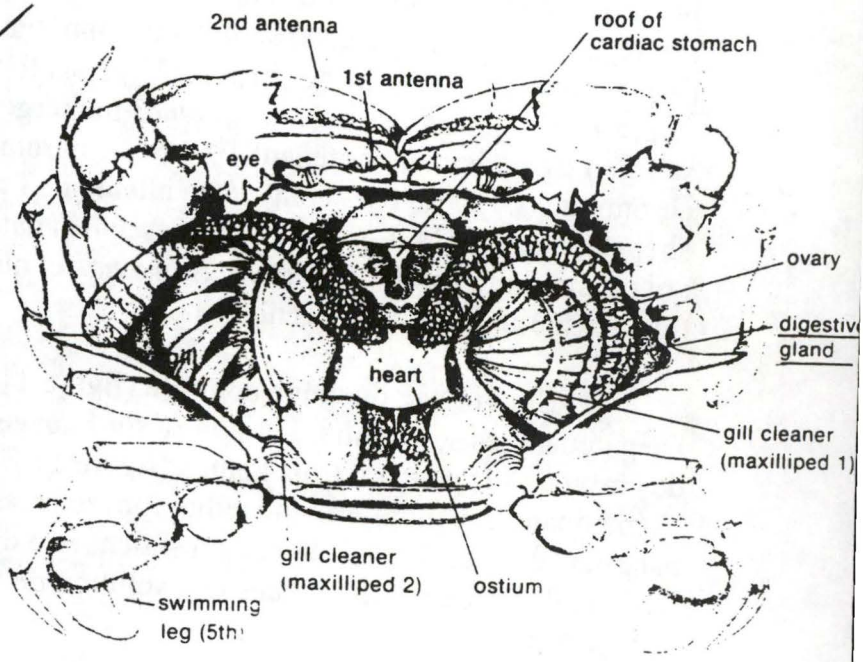
A)



B)



C)



D)

Les réplicats des trois expériences RMN donnent les mêmes résultats.

Les données de la littérature indiquent que la détoxification du chrome (VI) consiste en sa réduction pour donner des produits moins toxiques. D'après des expériences utilisant des mélanges d'enzymes réductrices, le produit final de la réduction du chrome (VI) serait le chrome (III) (Sugiyama, 1990, O'Brien et al., 1985; Mickalsen et al., 1987). Cependant, aucune étude in vivo n'avait été effectuée qui aurait pu confirmer que le mécanisme de réduction se passait effectivement chez les organismes contaminés par du chrome (VI). La technique RMN présente cet avantage.

Chez les deux espèces étudiées, la crevette *Palaemon elegans* et le crabe *Carcinus maenas*, on détecte par imagerie RMN du chrome paramagnétique (chrome (V) ou chrome (III)) au niveau de l'hépatopancréas des individus immergés dans une solution de chrome (VI). Cela voudrait dire que le Cr (VI) est vraisemblablement absorbé au niveau des surfaces externes perméables (Dallinger et Rainbow, 1987), qu'il est transporté dans l'hépatopancréas où il est réduit en Cr (V) ou en Cr (III). L'hépatopancréas serait donc l'organe où s'effectue la détoxification du chrome (VI). Plus tard, nous allons effectuer des expériences ESR qui permettront justement de spécifier lequel du chrome (III) ou du chrome (V) est stocké dans l'hépatopancréas.

Aucun autre tissus chez *Palaemon elegans* et *Carcinus maenas* ne présente la couleur sombre permettant de détecter la présence d'espèces paramagnétiques de chrome. Cela voudrait dire que l'hépatopancréas joue également le rôle d'organe de stockage des produits de la réduction du chrome (VI).

4.2.2. RÉSULTATS DES MESURES DE CHROME PAR ABSORPTION .ATOMIQUE.

La figure 12 A présente les résultats des analyses par absorption atomique des hépatopancréas et des muscles des six crabes *Carcinus maenas* utilisés dans les expériences imagerie RMN, ainsi que de trois autres crabes ayant subi le même traitement. La figure 12 B est un histogramme qui présente les moyennes des concentrations en chrome total pour les trois crabes utilisés pour chaque expérience.

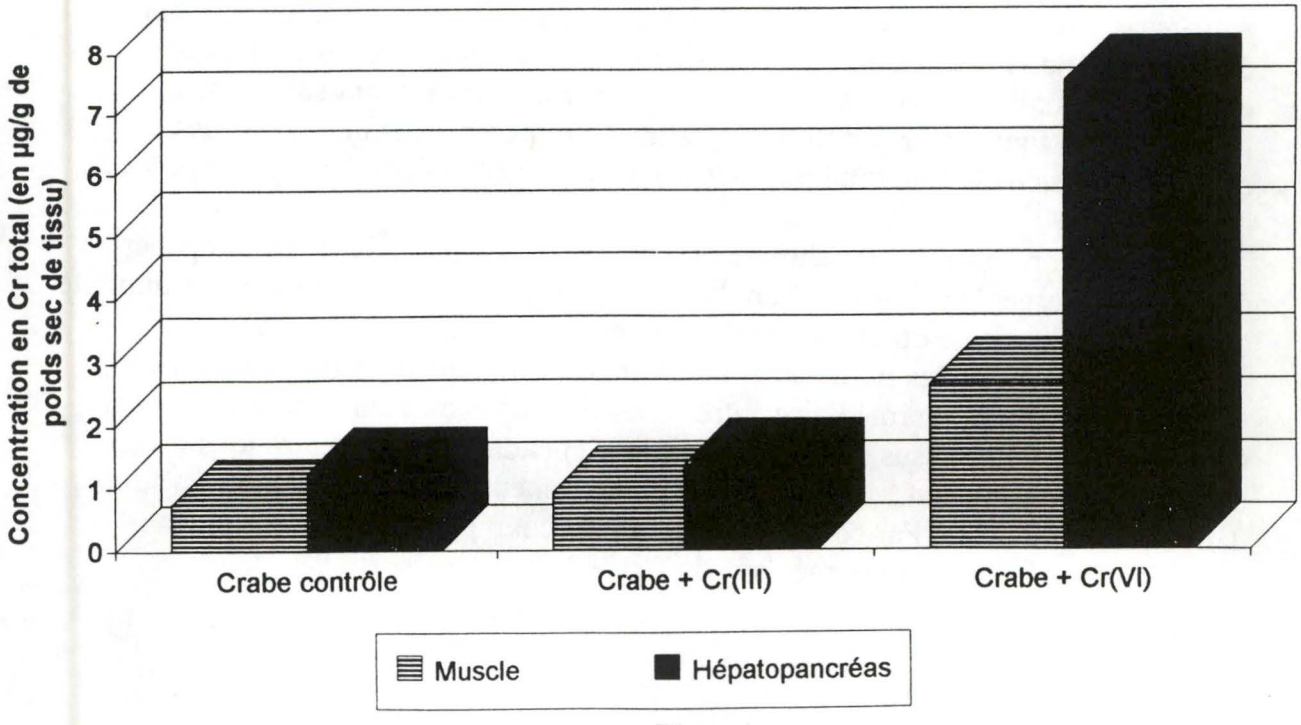
La concentration en chrome la plus élevée se trouve dans l'hépatopancréas du crabe immergé dans une solution de chrome (VI). La concentration en Cr diminue ensuite dans le muscle du crabe ayant été immergé dans du Cr (VI). Les concentrations en Cr des tissus du crabe ayant été immergé dans du Cr (III) se trouvent en position intermédiaire entre celles des tissus du crabe immergé dans du Cr (VI) et celles des tissus du crabe contrôle. Cependant les concentrations dans le crabe immergé dans du Cr (III) ne sont que légèrement supérieures à celles trouvées dans le crabe contrôle. Par contre, elles sont beaucoup plus faibles que celles mesurées dans le crabe immergé dans du Cr (VI).

Figure 12 : A)concentration en chrome total d'hépatopancréas et de muscles de *Carcinus maenas* ayant subi des traitements différents. Le crabe contrôle a été recueilli dans l'aquarium d'eau de mer et congelé. Le deuxième crabe à été immergé pendant trois heures dans une solution d'eau de mer contenant 10^{-4} M de chrome (III) ajouté sous forme d'oxyde chromique (Cr_2O_3) puis congelé. Le troisième crabe a été immergé pendant trois heures dans de l'eau de mer contenant 10^{-4} M de chrome (VI) ajouté sous forme de Na_2CrO_4 puis congelé en attente de son analyse. L'expérience à été renouvelée trois fois. B) Histogramme dont chaque colonne représente la moyenne des concentrations totales en chrome mesurées pour les trois *Carcinus maenas* ayant subi le même traitement.

Concentration en chrome total en µg/g de poids sec.

		Expérience 1	Expérience 2	Expérience 3	Moyenne
Hépatopancréas	Crabe contrôle	0.29	0.61	2.81	1.24
	Crabe immergé dans une solution de Cr(III)	2.00	0.50	1.58	1.36
	Crabe immergé dans une solution de Cr(VI)	7.00	8.38	7.25	7.54
Muscle	Crabe contrôle	0.25	0.50	1.47	0.74
	Crabe immergé dans une solution de Cr(III)	0.26	0.80	1.73	0.93
	Crabe immergé dans une solution de Cr(VI)	2.57	2.96	2.40	2.64

A)



B)

Pour chaque expérience, les concentration en chrome des hépatopancréas sont toujours supérieures à celles des muscles.

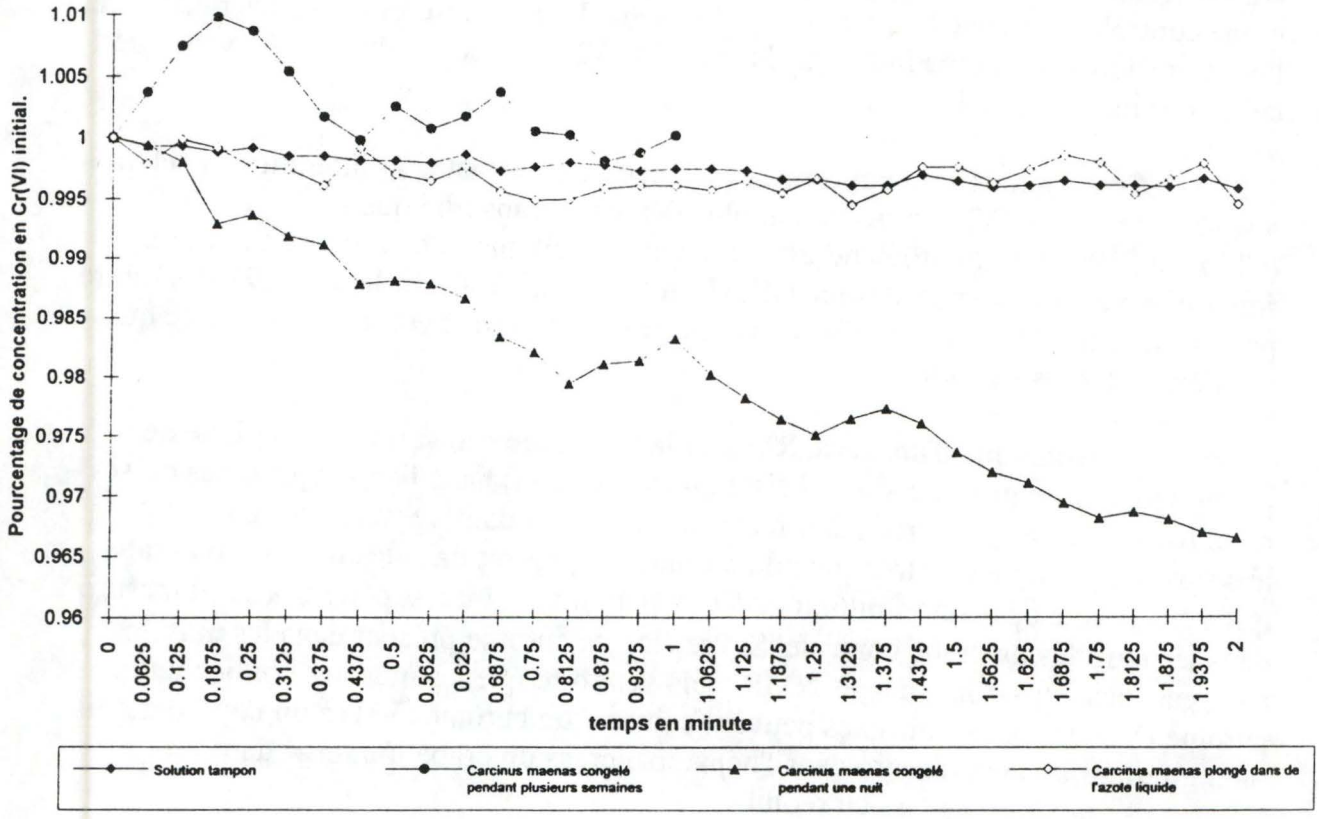
Les résultats par absorption atomique et par RMN permettent de dire dans un premier temps que le chrome (VI) est absorbé par les crabes *Carcinus maenas* alors que le chrome (III) n'est pas ou très faiblement absorbé. En effet, l'image du crabe ayant été immergé dans une solution de Cr (III) est semblable à l'image du crabe contrôle. Si du chrome (III) avait été présent dans les tissus du crabe, il aurait été détecté par imagerie RMN et l'image du crabe présenterait des tâches sombres. De plus les analyses par absorption atomique confirme que les concentrations en chrome dans les muscles et dans l'hépatopancréas de *Carcinus maenas* immergé dans du Cr (III) sont très proches bien que légèrement supérieures à celles mesurées dans le crabe contrôle. Par contre, les concentrations en chrome mesurées dans les muscles et l'hépatopancréas du crabe immergé dans du Cr (VI) sont beaucoup plus élevées que celles des tissus du crabe contrôle.

Ces résultats sont conformes avec ceux trouvés dans la littérature et selon lesquels le chrome (VI) est beaucoup plus facilement absorbé que le chrome (III) (Chipman, 1965). Cela proviendrait d'une part du fait que la membrane cellulaire serait une barrière pour le chrome (III) (Van Weerelt, 1984; Anderson, 1975). D'autre part, à pH neutre et dans un milieu aqueux, le chrome (III) hydraté précipite, ce qui diminue sa biodisponibilité.

La technique d'imagerie RMN et la technique d'absorption atomique ne permettent pas de préciser si il subsiste du chrome (VI) dans l'hépatopancréas ou si du chrome (VI) est présent dans d'autres tissus. Cependant, les analyses par absorption atomique montrent que du chrome est présent dans les muscles du crabe qui a été plongé dans une solution de Cr (VI) à un taux bien supérieur à celui mesuré dans les muscles du crabe contrôle. Si l'espèce de chrome présent dans les muscles n'est pas localisé sur les images NMR, cela veut dire que les muscles contiennent de chrome (VI). Donc, les muscles peuvent contenir du chrome (VI) (à un taux toutefois bien inférieur au taux mesuré dans l'hépatopancréas du crabe immergé dans du Cr (VI)) mais qui n'est pas ou peu réduit.

Enfin, les analyses par absorption atomique montrent que les crabes contrôles sont contaminés par la pollution au chrome. En effet, ils possèdent du chrome dans leurs muscles et dans leur hépatopancréas à des concentrations toutefois faibles. Sans doute ont-ils été soumis à une pollution au chrome dans leur milieu naturel. Ils auraient donc stocké la plus grande part du chrome dans leur hépatopancréas et une plus faible part dans leurs muscles. On peut émettre l'hypothèse que le chrome de l'hépatopancréas est présent sous forme réduite mais à une concentration telle qu'elle n'est pas détectée par le imagerie RMN.

Figure 13 : réduction du chrome (VI) par des extraits d'hépatopancréas de spécimens de *Carcinus maenas* sacrifiés de différentes manières. Extraits d'hépatopancréas : surnageant dilué 2 fois de 2 g de tissu homgénéisés dans 8 ml de solution tampon Tris pH 7.4 et centrifugé pendant 2 heures à 4°c à 10 000 g. Dans la cuvette spectrophotmétrique, on mélange 3 ml de l'extrait de tissu avec 1 ml de solution stock de chrome (VI) 0.5 mM (ajouté sous forme de $K_2Cr_2O_7$). On obtient dans la cuvette une concentration initiale de Cr(VI) de 0.125 mM. L'absorbance à 372 nm est suivie et les absorbances sont ensuite converties en concentrations en Cr (VI).



4.3. RÉSULTATS DES MESURES D'ACTIVITÉ RÉDUCTRICE PAR SPECTROPHOTOMÉTRIE DU CHROME (VI)

4.3.1. CHOIX DES CONDITIONS DE CONSERVATION DES ORGANES

La figure 13 présente la diminution de la concentration en chrome (VI) lorsqu'il est mis en présence avec des extraits d'hépatopancréas de trois crabes sacrifiés de différentes manières. Nous avons choisi de présenter les pourcentages de concentration initiale en chrome (VI) car les absorbances initiales sont différentes pour chaque expérience bien que la concentration en Cr (VI) initiale dans le tube spectrophotométrie, et la concentration de tissu soient les mêmes dans toutes les expériences. L'explication serait que les crabes utilisés aient déjà été soumis dans leur milieu naturel à une pollution de chrome qu'ils auraient accumulé dans leur hépatopancréas à des taux variables selon les individus.

Pour l'expérience 1, le crabe a été congelé pendant plusieurs semaines. Chaque point est la moyenne de deux essais. Les extraits d'hépatopancréas de ce crabe ne montre pas d'activité réductrice. Il semble donc qu'il y ait une perte d'activité réductrice avec la longueur de la période de congélation.

Pour l'expérience 2, le crabe a été congelé pendant une nuit. Nous avons effectué deux essais de mesures d'absorbance. Chaque point est le résultat de la moyenne des deux mesures. Les extraits d'hépatopancréas provenant de ce crabe montrent la plus forte activité réductrice. Cette observation nous permettra pour le suite des expérience de sacrifier les crabes de cette manière.

Lors de l'expérience 3, le crabe a été immergé pendant une dizaine de secondes dans de l'azote liquide. L'extrait d'hépatopancréas ne montre pas d'activité réductrice contrairement à ce que l'on pouvait attendre. En effet, en général, cette méthode est celle qui conserve mieux les activités enzymatiques. Une hypothèse serait qu'il y ait eu un problème lors de la décongélation. Peut-être que le crabe a décongelé pendant un temps trop long et qu'il a atteint la température ambiante, ce qui expliquerait la disparition d'activité réductrice.

Il faut noter toutefois que pour des raisons pratiques nous n'avons pu soustraire des absorbances du mélange réactionnel (extrait de tissu plus chrome (VI)) l'absorbance du blanc, c'est-à-dire, l'absorbance de l'extrait de tissu seul. Cela veut dire que les valeurs de concentration de chrome (VI) ne sont pas justes. Cependant dans le cas où les corrections avaient été effectuées, il est probable que les allures généralles des courbes restent les mêmes. Ces considérations sont valables pour toutes les études spectrophotométriques des activités réductrices.

Figure 14 : Réduction du chrome (VI) par un extrait d'hépatopancréas de *Carcinus maenas* dilué 2, 5, 10, 15, 20, 24, 30, 40, et 50 fois. Concentration de chrome (VI) initial = 0.125 mM.

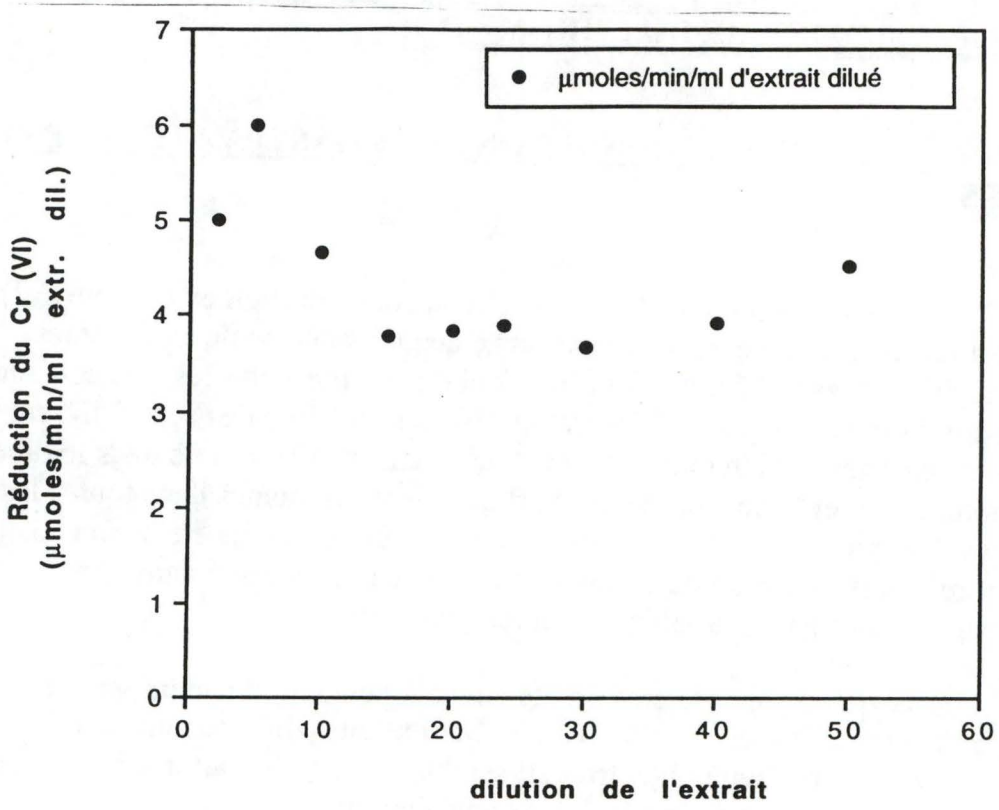
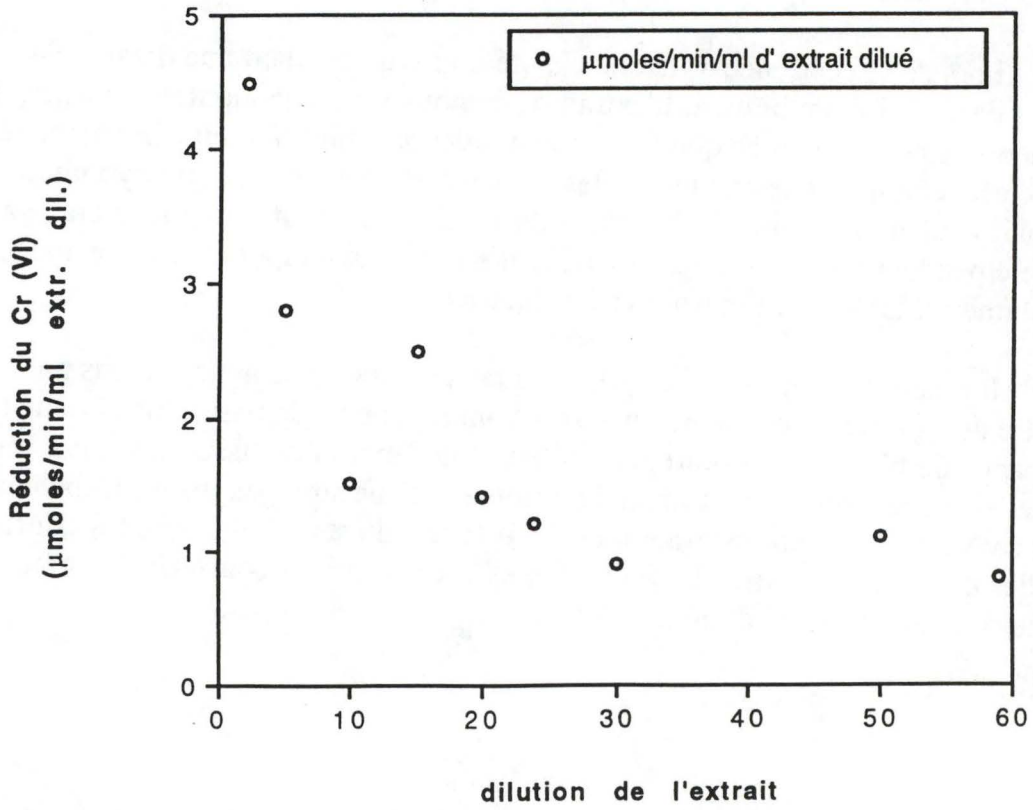


Figure 15 : Réduction de chrome (VI) par un extrait d'hépatopancréas de *Carcinus maenas* dilué 2, 5, 10, 15, 20, 24, 30, 50 et 60 fois. Concentration de chrome initial = 50 μM.



4.3.2. CHOIX DES DILUTIONS ADÉQUATES DES EXTRAITS

Les figures 14 et 15 représentent la réduction du chrome (VI) par des extraits d'hépatopancréas de deux crabes en fonction de la dilution des extraits. Les graphes se présentent en deux parties. Dans la première partie qui va jusqu'à la dilution 20 fois, la réduction du chrome (VI) diminue avec la dilution de l'extrait.. Dans la seconde partie, à partir de la dilution 20 fois, il y a un plateau où la réduction de chrome (VI) ne varie plus en fonction de la dilution. Ce plateau pourrait être expliqué par une autodestruction du chrome (VI) que se passerait par exemple dans la solution tampon Tris (voir figure 13).Il faut souligner que nous n'avons pas soustrait l'absorbance du surnageant. Si nous l'avions fait, il est probable que la pente des graphes aurait continuée jusqu'à des dilutions plus fortes. Nous pouvons conclure de cette expérience qu'il nous faudra travailler avec des dilutions des extraits qui ne dépassent pas la dilution 20 fois.

4.3.3 MESURE DES ACTIVITÉS RÉDUCTRICES SUR LES ORGANES D'ANIMAUX CONTAMINÉS

4.3.3.1. *PALAEMON ELEGANS*

La figure 16 présente la diminution de l'absorbance du chrome (VI) par gramme d'hépatopancréas de *Palaemon elegans*. La concentration en chrome (VI) introduit dans les extraits d'hépatopancréas diminue avec le temps.

Les extraits d'hépatopancréas de *Palaemon elegans* présentent une activité réductrice du chrome (VI) significative par rapport à l'activité réductrice de la solution tampon (référence). L'extrait d'hépatopancréas d'un individu a été mélangé d'une part avec 50 µM de chrome (VI) et d'autre part, avec 20 µM de chrome (VI). Dans le premier cas, on observe une diminution de l'absorbance à 372 nm de 0.0749/min/gr de tissu et dans le second cas, une diminution de 0.0470/min/gr de tissu. Nous n'avons donc pas une relation linéaire entre le taux de réduction du chrome (VI) et la concentration en substrat. Cela pourrait suggérer une relation enzyme-substrat dont nous allons parler dans la discussion générale.

Figure 16 : réduction du chrome (VI) par des extraits d'hépatopancréas de *Palaemon elegans*. 1.5 ml d'extrait de tissu est mélangé à 0.15 ml de solution 0.5 mM de chrome (VI) (ce qui nous donne une concentration initiale de chrome (VI) de 50 µM), ou à 0.10 ml de solution tampon plus 0.05 ml de solution 0.5 mM de chrome (VI) (ce qui nous donne une concentration initiale de chrome (VI) de 20 µM).

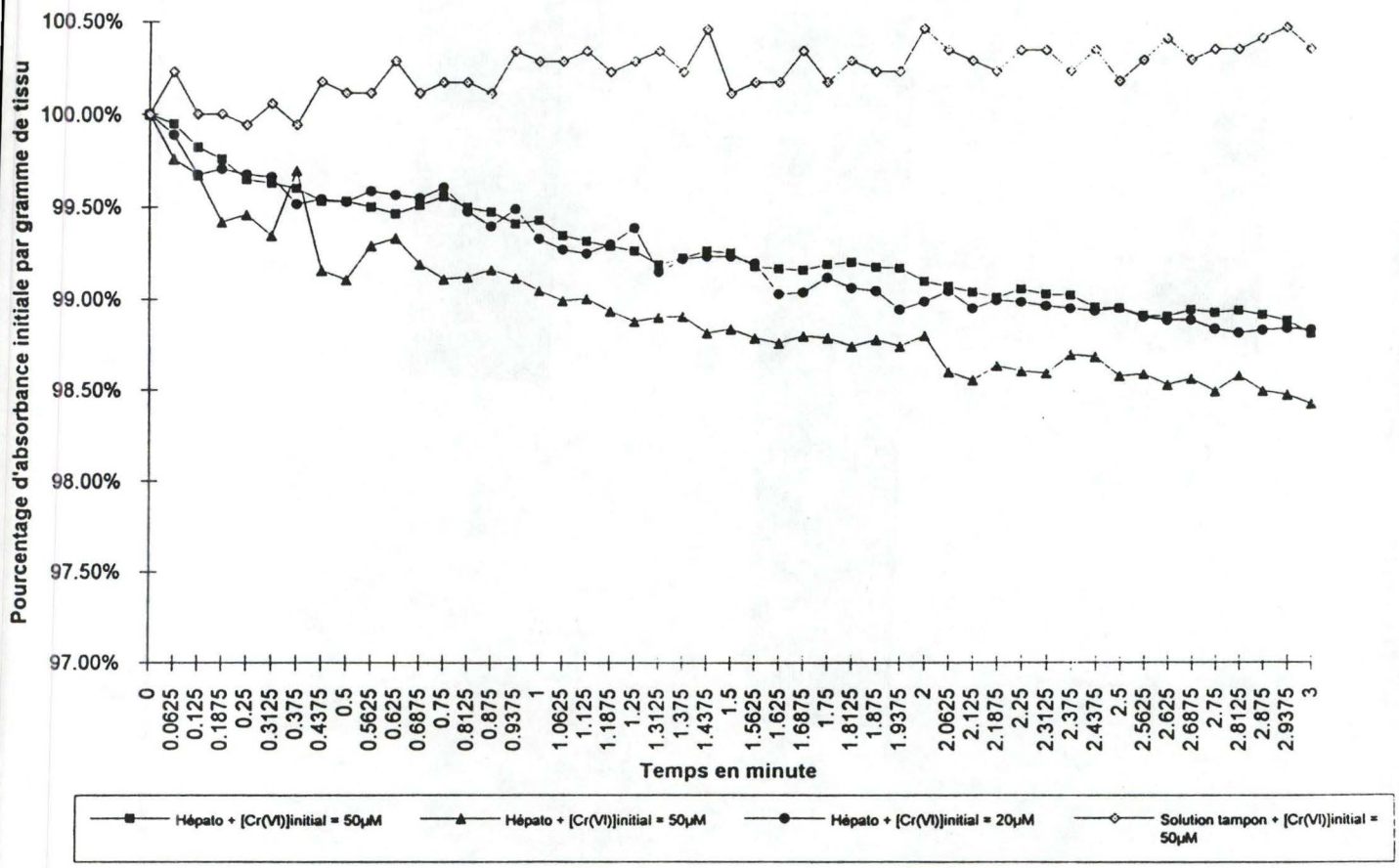
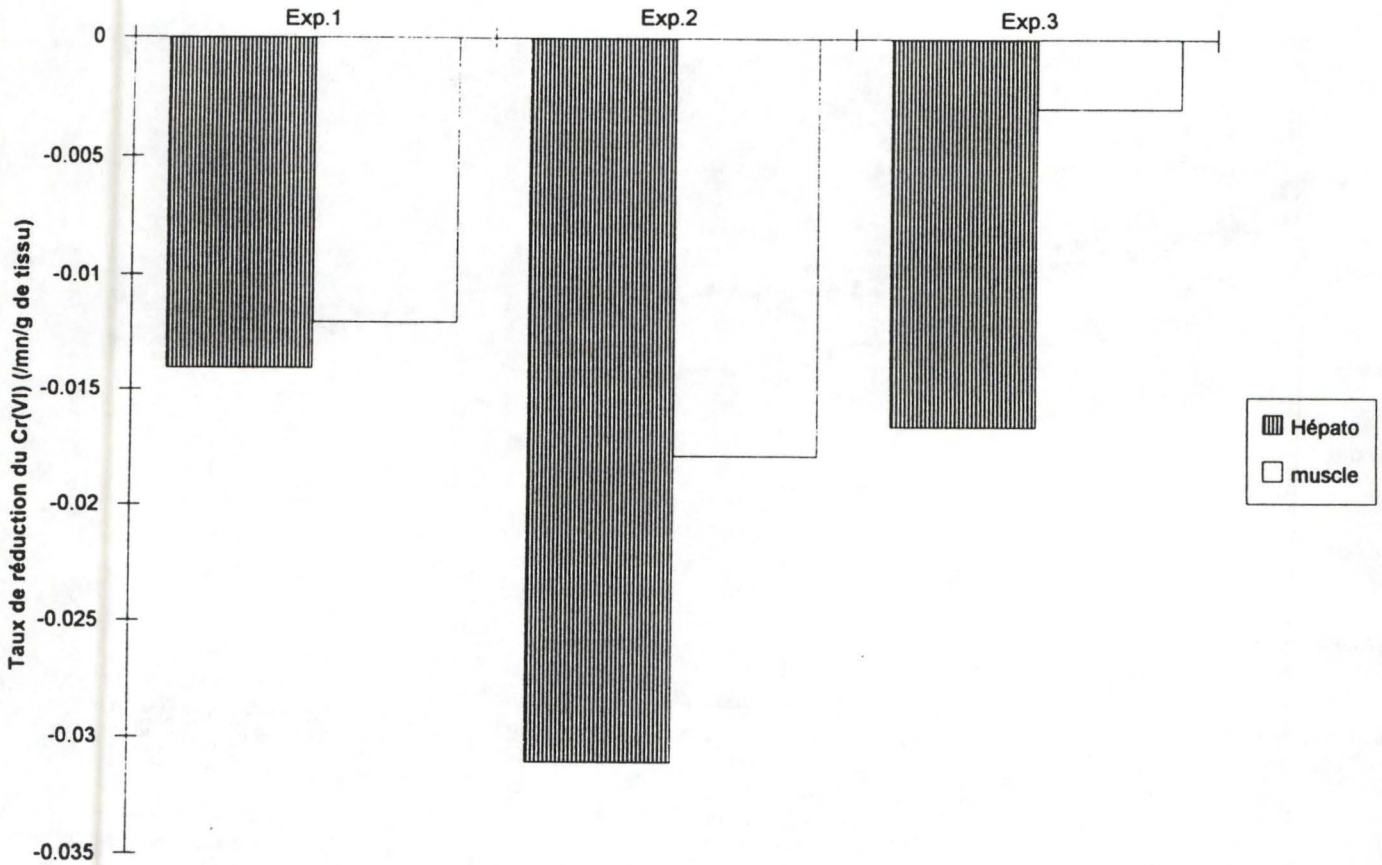


Figure 17 : taux de réduction d'extraits d'hépatopancréas et de muscle de *Carcinus maenas*. 945 µl d'extrait d'hépatopancréas est mélangé à 52.5 µl de solution tampon Tris pH 7.4, et à 52.5 µl de solution 2.5 mM de chrome (VI).



4.3.3.2. *CARCINUS MAENAS*

La figure 17 montre les taux de réduction du chrome (VI) par des extraits d'hépatopancréas et de muscle lors de trois expériences. Le taux de réduction correspond à la variation d'absorbance à 372 nm par minute et par gramme de tissu. L'activité réductrice du muscle sert de référence négative.

En effet, comme les activités réductrices de nos tissus étaient faibles par rapport aux activités réductrices trouvées dans la littérature, nous avons voulu vérifier si l'activité réductrice des extraits d'hépatopancréas étaient supérieures aux activités réductrices d'extrait d'un tissu non spécialisé dans la détoxification du chrome. Nous avons choisi d'utiliser le muscle. Pour chaque expérience, l'activité réductrice des extraits d'hépatopancréas est plus forte que l'activité réductrice des extraits de muscles. Il faut souligner toutefois l'importance de la variabilité individuelle.

4.3.4. VÉRIFICATION DE LA NATURE DES RÉDUCTEURS IMPLIQUÉS PAR ADDITION D'INHIBITEURS

Comme nous l'avons vu dans la bibliographie, les deux types de molécules qui sont susceptibles de jouer le rôle de donneurs d'électrons dans la réduction du chrome (VI) dans des conditions physiologiques de pH sont d'une part l'ascorbate et d'autre part, les molécules possédant un groupement sulfydryle. Parmi ces dernières, le glutathion est la molécule la plus abondante dans le milieu cellulaire donc la plus à même de jouer un rôle dans la réduction du chrome (VI) (Connett et Wetterhahn, 1984). Standeven et Wetterhahn en 1991 démontrèrent en incubant des ultrafiltrats de foie et de rein de rats avec d'une part du L-ascorbate oxydase et avec d'autre part du N-éthylmaléimide, que l'ascorbate était le réducteur intracellulaire principal de chrome (VI). Cependant d'autres auteurs pensent que l'ascorbate et les molécules possédant un groupement thiol, notamment le glutathion, agissent de façon complémentaire (O'Brien *et al.*, 1992)

Nous avons renouvelé l'expérience avec les extraits d'hépatopancréas de *Carcinus maenas*. Les résultats de la figure 18 représentent les moyennes de trois expériences de mesures d'absorbance de trois extraits d'hépatopancréas de *Carcinus maenas*. Nous avons choisi de prendre la pente de la droite de régression des variations d'absorbance à 372 nm en fonction du temps comme taux de réduction du chrome (VI). La première colonne de l'histogramme présente le taux de réduction du Cr (VI) par des extraits d'hépatopancréas. Dans les deux autres colonnes, nous trouvons les taux de réduction du Cr (VI) par des extraits d'hépatopancréas dans lesquels on a ajouté d'une part du L-ascorbate oxydase qui inhibe l'ascorbate, et d'autre part du N-éthylmaléimide qui bloque les groupements sulfydryles des molécules.

Figure 18 : Effets de l'ajout dans des extraits d'hépatopancrés de *Carcinus maenas* d'un inhibiteur de l'ascorbate et d'un inhibiteur des molécules possédant des groupements thiols sur l'activité réductrice des extraits d'hépatopancréas. 945 µl d'extraits d'hépatopancréas sont mélangés avec 52.5 µl de solution Tris, ou avec 52.5 µl du L-ascorbate oxydase (dilution dans la solution Tris pour obtenir 5 U/ml), ou avec du N-éthylmaléimide de concentration 8 mM. Les mélanges sont incubés pendant 4 mn, puis 52.5 µl de solution de chrome (VI) 2.5 mM est ajouté. l'absorbance à 372 nm est suivie.

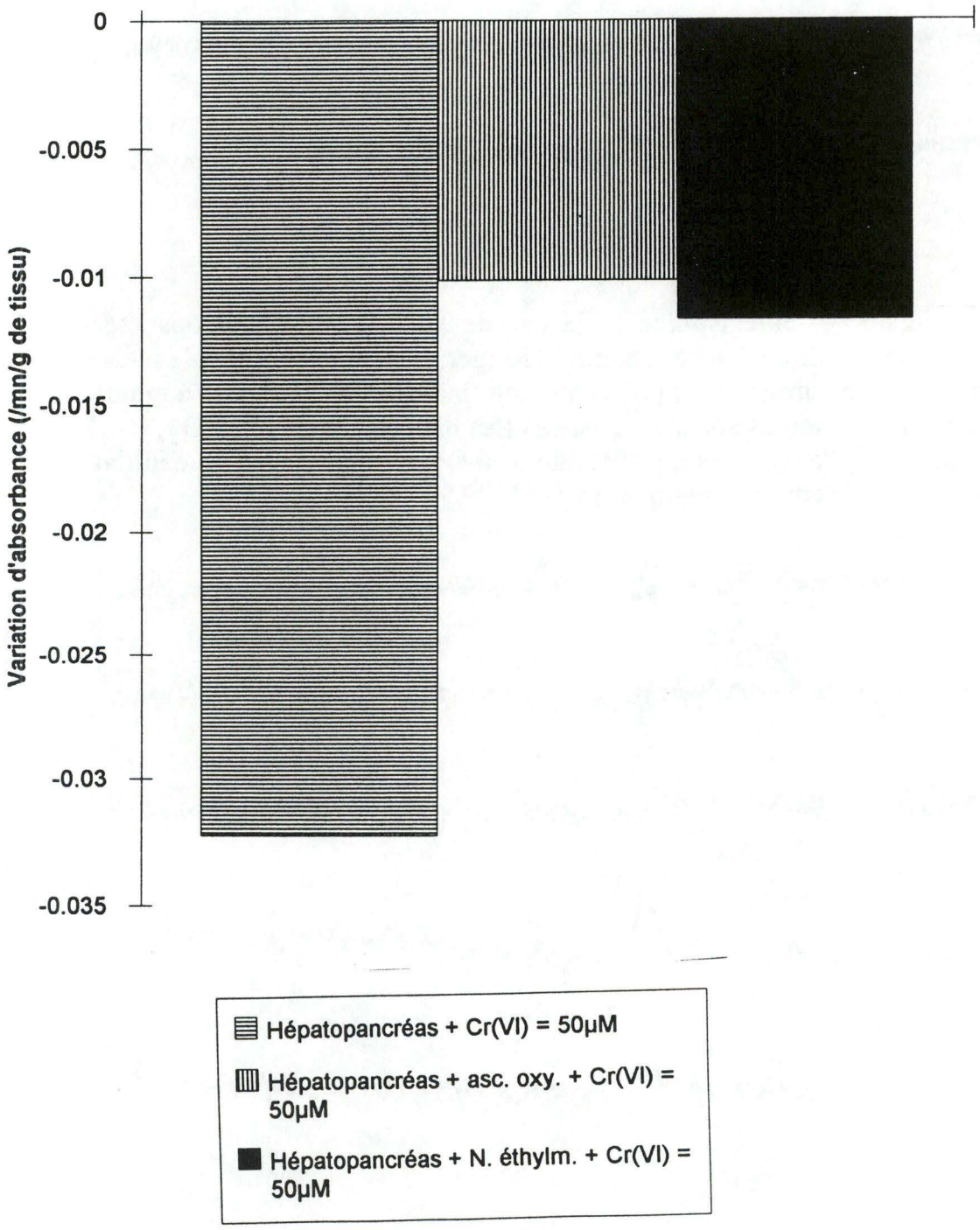


Figure 19 : enregistrements ESR A) de 0.0205 gr/ml d'hépatopancréas de *Palaemon elegans* dilué dans une solution Tris; B) 5 minutes après le mélange de l'extrait d'hépatopancréas avec du Cr (VI) afin d'obtenir une concentration dans le tube ESR est 10^{-4} M); C) 30 minutes après le mélange, D) 18 heures après le mélange. Champ magnétique initial = 3490.05 Gauss. Champ magnétique final = 3580.15 Gauss.

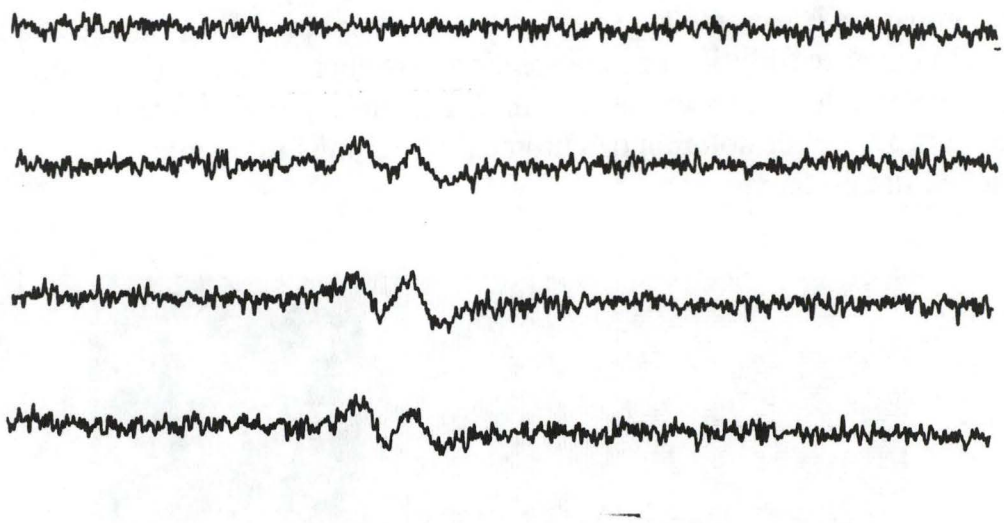
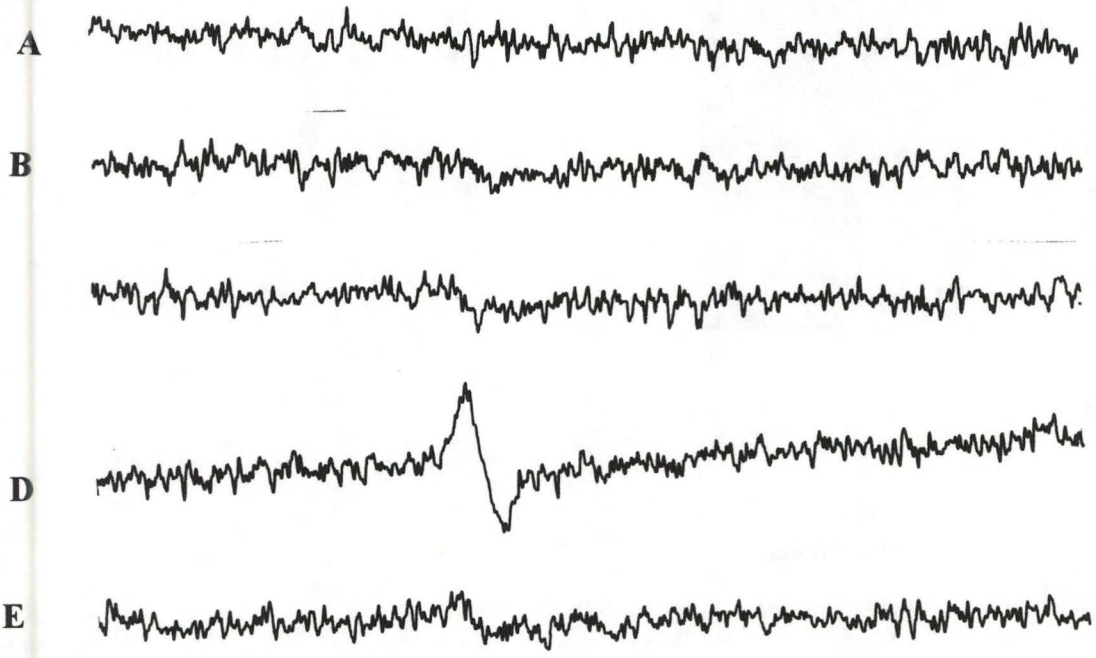


Figure 20 : enregistrements ESR A) de 0.0205 gr/ml d'hépatopancréas de *Palaemon elegans* dilué dans une solution Ringer; B) 6 minutes après le mélange de cet extrait avec du chrome (VI) (concentration finale de 10^{-4} M); C) 16 minutes après le mélange; D) 18 heures après le mélange alors qu'il est déficient en O_2; E) 18 heures après le mélange alors qu'il est saturé en O_2. Champ magnétique initial = 3489.49 Gauss. Champ magnétique final = 3579.99 Gauss.



Nous notons que la diminution du taux de réduction du chrome (VI) engendrée par les deux inhibiteurs est presque semblable. D'après nos résultats, l'ascorbate et les molécules possédant un groupe thiol interviendraient à part égale dans la réduction intracellulaire de chrome (VI).

4.3.5. DÉTERMINATION PAR ESR DU PRODUIT FINAL DE LA RÉDUCTION DU CHROME (VI)

Le but des expériences ESR est de mélanger des extraits d'hépatopancréas de *Palaemon elegans* et de *Carcinus maenas* avec du chrome (VI), de déterminer le produit de la réduction du chrome (VI), et de suivre l'évolution des signaux ESR en fonction du temps. Cela devra nous permettre d'identifier le chrome (V) et le chrome (III), et l'évolution de l'amplitude du signal au cours du temps devra permettre de déterminer lequel est le produit final de la réduction dans l'hépatopancréas.

Les figures 19, 20 et 21 sont les enregistrements ESR lorsque du chrome (VI) est mélangé à des extraits d'hépatopancréas de *Palaemon elegans*. Nous observons que lorsque les hépatopancréas sont homogénéisés et centrifugés dans une solution tampon Ringer, on n'enregistre pas de signal ESR sauf 18 heures après le mélange (figure 20). Par contre, lorsque l'on utilise la solution tampon Tris, on préserve l'activité réductrice du tissu. Pour les trois expériences, on calcule un $g = 1.97$ caractéristique du chrome (III). Pour l'expérience concernant la figure 21, l'extrait d'hépatopancréas est plus concentré que dans les expériences précédentes et on note, comme on pouvait s'y attendre, un signal de chrome (III) plus élevé. En effet, la hauteur du signal est proportionnel à la concentration du produit. Donc, pour cette expérience, l'extrait plus concentré réduit plus de chrome (VI) et produit plus de chrome (III). Il faut signaler que l'on ne note pas de signal du chrome (V) dont le g devait être de 1.98 ou de 1.99 (Bose *et al.*, 1992; Sugiyama *et al.*, 1990).

Lors de l'expérience de la figure 20, nous avons laissé la mixture dans le tube ESR pendant 18 heures et nous avons ensuite enregistré un signal de chrome (III) beaucoup plus ample que pour les autres expériences. Une explication serait que la présence d'oxygène pourrait diminuer l'intensité de la réaction de réduction en détruisant une parties des molécules intervenant dans la réduction. En effet, après 18 heures, l'oxygène serait devenu rare dans le tube ESR qui est très fin et tout à fait hermétique, et une forte réduction du chrome (VI) aurait pris place.

Les figures 22 et 23 sont les enregistrements ESR lorsque du chrome (VI) est mélangé à des extraits d'hépatopancréas de *Carcinus maenas*. Pour ces expériences, les extraits d'hépatopancréas sont beaucoup plus concentrés. En conséquence, les signaux ESR sont aussi beaucoup plus grands que ceux concernant *Palaemon elegans*. Dans ces cas-ci aussi les signaux sont caractéristiques du chrome (III), avec des $g = 1.97$.

Figure 21 : enregistrements ESR A) de 0.025 gr/ml d'hépatopancréas de *Palaemon elegans* dilué dans une solution Tris; B) d'une solution 10-4 M de chrome (VI); C) 10 minutes après le mélange de l'extrait avec du chrome (VI) afin d'obtenir une concentration finale de Cr (VI) de 10^{-4} M; D) 20 minutes après le mélange. Champ magnétique initial = 3496.45 Gauss. Champ magnétique final = 3579.66 Gauss.

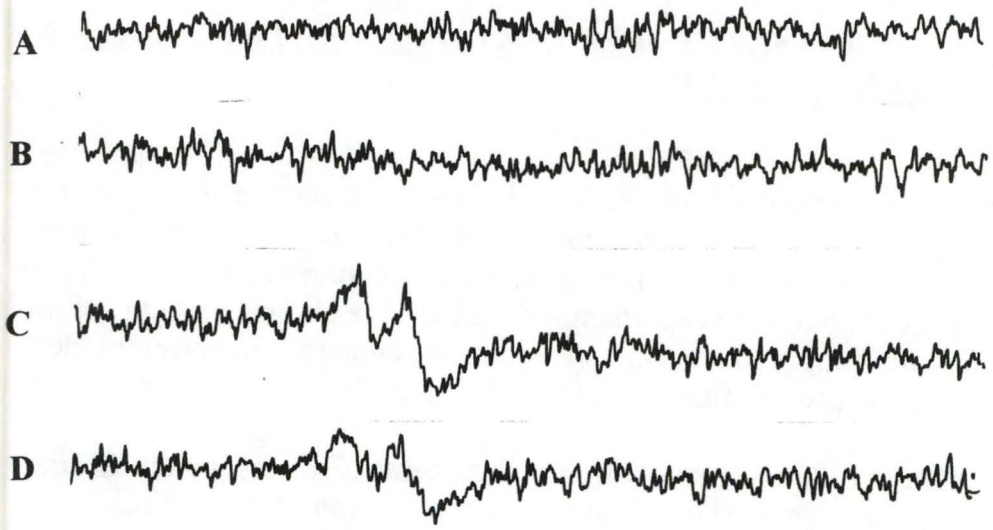
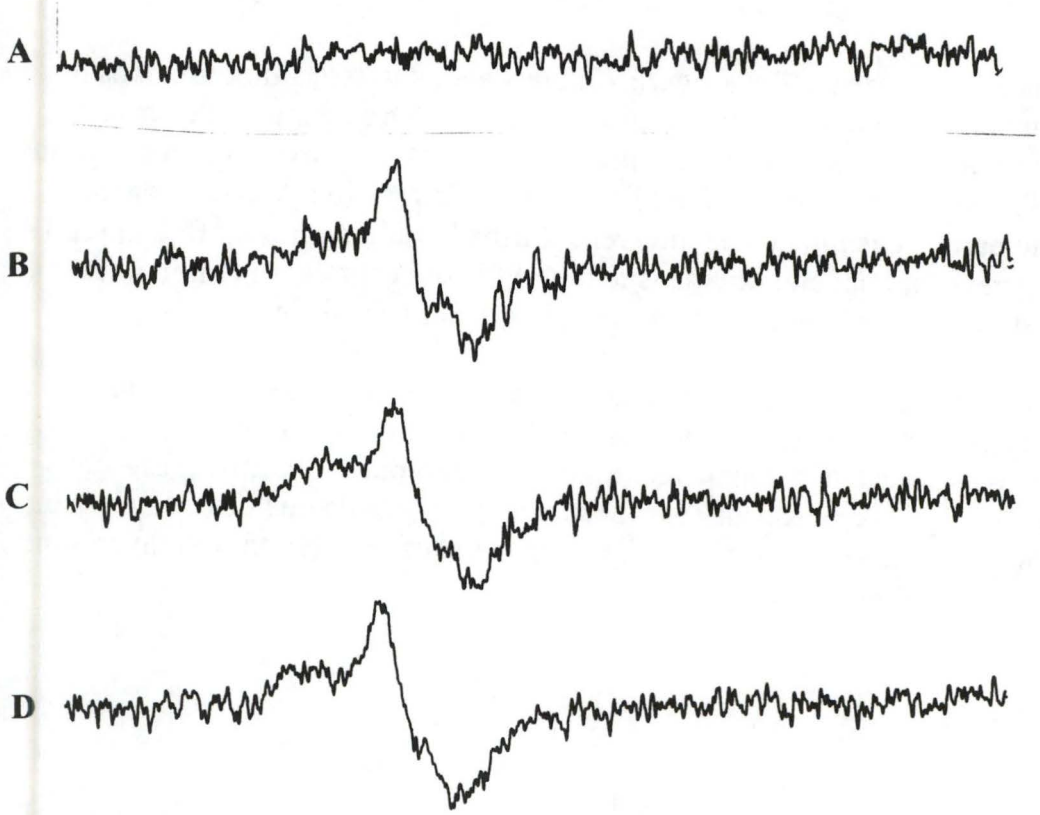


Figure 22 : enregistrements ESR A) de 1.47 gr/ml d'hépatopancréas de *Carcinus maenas* dilué dans une solution tampon Tris; B) 10 minutes après le mélange de l'extrait avec une solution de chrome (VI) (concentration finale 10^{-4} M); C) 30 minutes après le mélange; D) 60 minutes après le mélange. Champ magnétique initial = 3491.07 Gauss. Champ magnétique final = 3578.8 Gauss.



Nous avons voulu vérifier l'hypothèse émise plus haut sur l'intervention négative de l'oxygène. Pour cela, nous avons soumis l'extrait d'hépatopancréas de *Carcinus maenas* et la solution de chrome (VI) à une gazéification d'azote afin d'y retirer l'oxygène. La figure 23 représente les enregistrements ESR de cette expérience. 3 minutes après le mélange de l'extrait avec le chrome (VI) (figure 23 A), le signal du chrome (III) est très faible. Une demi-heure après le mélange (figure 23 B) le signal du chrome (III) s'est amplifié. Cependant, une heure après le mélange (figure 23C), un précipité s'est formé au fond du tube ESR. La figure 23 C montre l'enregistrement ESR du fond du tube et nous signale la présence de chrome (III) en grande concentration. Donc, l'oxygène diminuerait bien l'intensité de la réaction. A l'abri de l'oxygène, on voit que la réaction de réduction du chrome (VI) se fait de manière beaucoup plus intensive pour former du chrome (III) en grande quantité et qui précipite.

Bose et al. (1990) ont utiliser l'ESR pour déterminer les intermédiaires dans la réduction du chrome (VI) par le glutathion. Ils trouvèrent deux intermédiaires de chrome (V) dont les signaux augmentaient juste après l'addition du chrome (VI) dans la solution de glutathion, puis diminuaient. De même, Sugiyama et al. (1992) trouvèrent par ESR que des signaux de Cr (V) étaient présents lors de la réaction du chrome (VI) avec des cellules V-79 pré-traitées avec de l'acide ascorbique. Le signal du chrome (V) diminuait pour laisser place au signal du chrome (III) qui augmentait.

Lors de nos expériences, nous n'avons pas noter d'augmentation du signal du chrome (III) au cours du temps, c'est-à-dire pas d'augmentation de la concentration en chrome (III). Donc, une réduction faible se produirait très vite (dans les trois premières minutes du mélange) puis s'arrêterait. Par contre, lorsque la réaction se produit à l'abri de l'oxygène (figure 23) le signal du chrome (III) s'amplifierait au cours du temps. Dans ce cas, la réduction du chrome (VI) continue avec le temps pour donner des concentrations en chrome (III) toujours plus élevées.

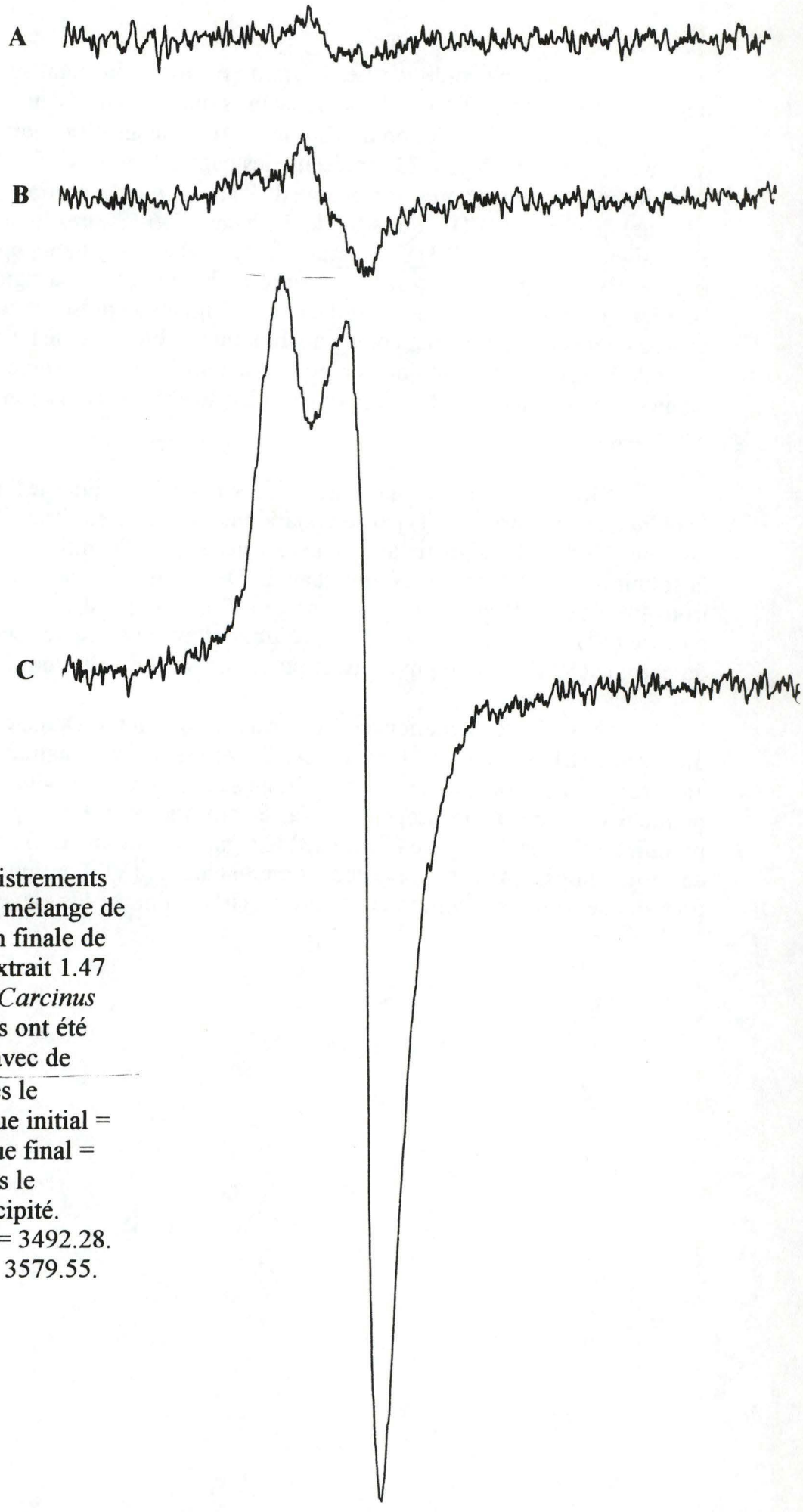


Figure 23 : enregistrements ESR A) 3 minutes après le mélange de chrome (VI) (concentration finale de Cr (VI) = 10^{-4} M) avec l'extrait 1.47 gr/ml d'hépatopancréas de *Carcinus maenas*. Les deux solutions ont été préalablement gazéifiées avec de l'azote; B) 30 minutes après le mélange; champ magnétique initial = 3491.07; champ magnétique final = 3578.8.C) 60 minutes après le mélange, au niveau du précipité. Champ magnétique initial = 3492.28. Champ magnétique final = 3579.55.

DISCUSSION GÉNÉRALE

5. DISCUSSION GÉNÉRALE

Chez les Crustacés, l'organe généralement impliqué dans le stockage des métaux lourds est l'hépatopancréas (Bryan, 1976, voir tableau 6). L'imagerie de résonance magnétique nucléaire et l'ESR nous ont permit de prouver que cet organe était aussi impliqué dans la détoxification et le stockage du chrome. En effet, le chrome (VI) qui est absorbé préférentiellement par les organismes marins y serait préalablement réduit en chrome (III).

Une hypothèse serait que le chrome (III) soit ensuite incorporé et stocké dans des granules de l'hépatopancréas. Cette hypothèse est confortée par le fait que le chrome (III) forme des complexes de coordination très stables dans les systèmes biologiques (Borel *et al.*, 1984). De plus, Guary et Négrel (1980) montrèrent que divers métaux lourds pouvaient se retrouver dans des granules de phosphate de calcium de l'hépatopancréas du crabe *Cancer pagurus*. Selon eux, ces granules de phosphate de calcium joueraient un rôle dans la détoxification des métaux lourds en étant excrétés dans la lumière du tube digestif. Loret et Devos (1992) confirmèrent cette théorie en prouvant que les cellules R (contenant les granules de phosphate de calcium) de l'hépatopancréas de *Carcinus maenas* sont excrétées de façon holocrine dans l'intestin. Ainsi, il est possible que le chrome (III) soit incorporé dans les granules de phosphate de calcium des cellules R de l'hépatopancréas des Crustacés. Le chrome (III) serait ensuite excrété dans l'intestin par sécrétion holocrine des cellules R et serait finalement rejeté dans le milieu extérieur.

D'autre part, nous avons confirmé les données de la littérature stipulant que le chrome (VI) est plus facilement absorbé que le chrome (III). Cependant, il n'existe aucunes données permettant d'expliquer ce phénomène. Il est fort probable que la membrane cellulaire ait une perméabilité différentielle pour le chrome (VI) et pour le chrome (III). Il serait intéressant d'étudier les systèmes de transport intermembranaire du chrome afin de mieux comprendre les mécanismes à la base de l'absorption sélective du chrome (VI).

Notre étude a permis de mettre en évidence le rôle de l'ascorbate et des molécules possédant un groupe thiol comme réducteurs cytoplasmiques du chrome (VI) (voir figure 18). Cependant, nous avons envisagé la possibilité de l'intervention d'enzymes réductrices (voir figure 16). En effet, nous avons pu émettre l'hypothèse d'une relation enzyme-substrat. Cela devra être vérifier par l'étude de la relation entre l'activité réductrice d'extraits d'hépatopancréas et la concentration en chrome (VI). Si la courbe trouvée est de type Michaelis-Menten, la réduction du chrome (VI) est enzymatique, et les constantes K_M et V_M pourront être mesurées.

Un autre point à discuter est l'absence de détection par spectrophotométrie du chrome (III) et des intermédiaires de la réduction du chrome (VI). En effet, bien que les extraits d'hépatopancréas de *Carcinus maenas* et de *Palaemon elegans* montrent la capacité de faire diminuer la concentration en chrome (VI) qu'on leur

Figure 24 : A) Spectre d'absorption du mélange réactionnel à pH 2.60 du glutathion (50 mM) avec du chrome (VI) (10 mM) à divers intervalles de temps : a) Cr (VI) seul; b) réaction immédiatement après le mélange; de c) à i) réaction enregistrée à des intervalles de 1 minute; j) deux heures après le mélange.

B) Spectre d'absorption de 250 à 550 nm d'un mélange de Cr (VI) (2 10^{-4} M) avec du glutathion (0.01 M). Les autres annotations et conditions sont similaires à celles de A). (Bose *et al.*, 1991)

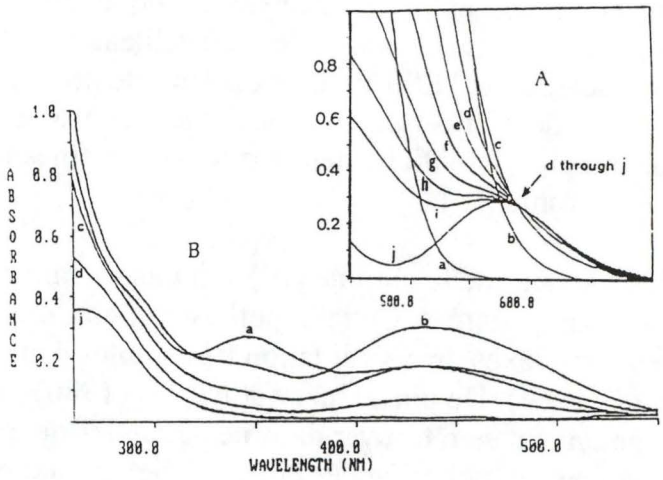
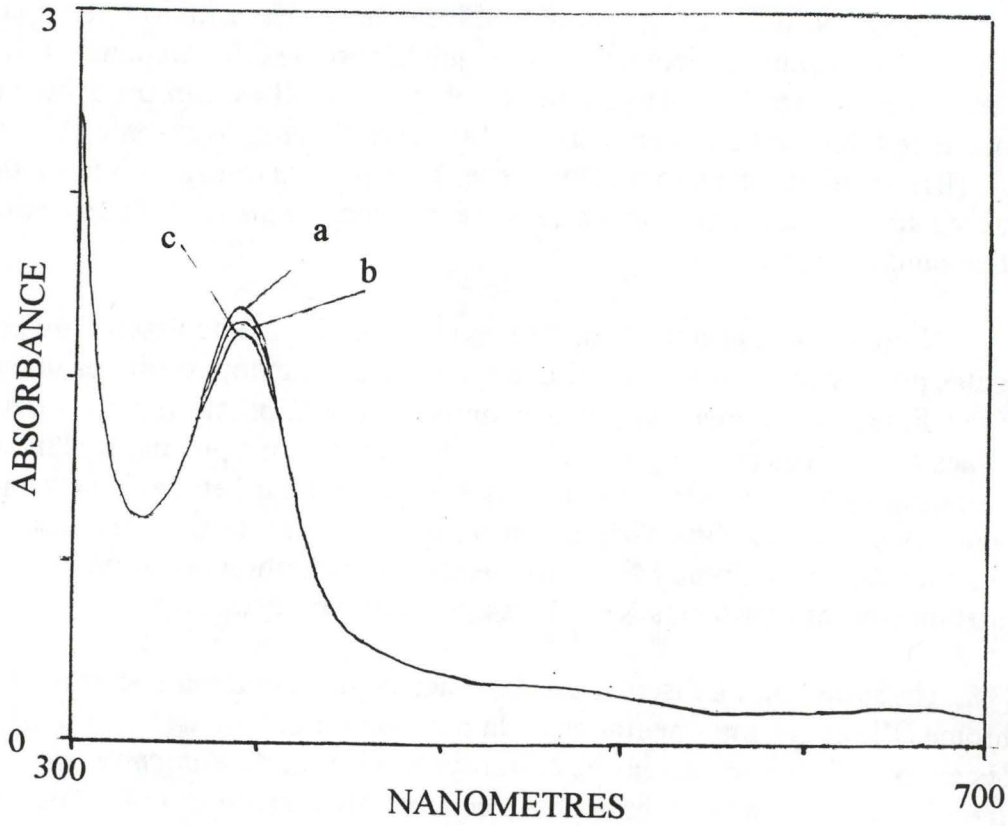


Figure 25 : Spectre d'absorption de 300 à 700 nm du mélange de 1.35 ml d'extrait d'hépatopancréas de *Palaemon elegans* (surnageant de 0.0355 gr d'hépatopancréas homogénéisé dans 2 ml de solution tampon Tris et centrifugé à 4°C à 10 000 g pendant 2 heures) avec 0.15 ml de solution de chrome (VI) 0.5 mM à divers intervalles de temps : a) 3 minutes après le mélange; b) 10 minutes après le mélange; c) 50 minutes après le mélange.



ajoute, donc de produire des intermédiaires de réduction et du chrome (III), on ne mesure aucun signaux spectrophotométriques de ces derniers. Dans la littérature, lors des études *in vitro* de la réaction du chrome (VI) avec divers molécules réductrices, les intermédiaires et le produit sont visibles par spectrophotométrie. Les complexes de thioesters de chrome (VI) par exemple absorbent à des longueurs d'onde entre 420 et 440 nm (Connett et Wetterhahn, 1985), et le chrome (III) absorbe entre 550 et 650 nm (Bose *et al.*, 1991) (figure 24).

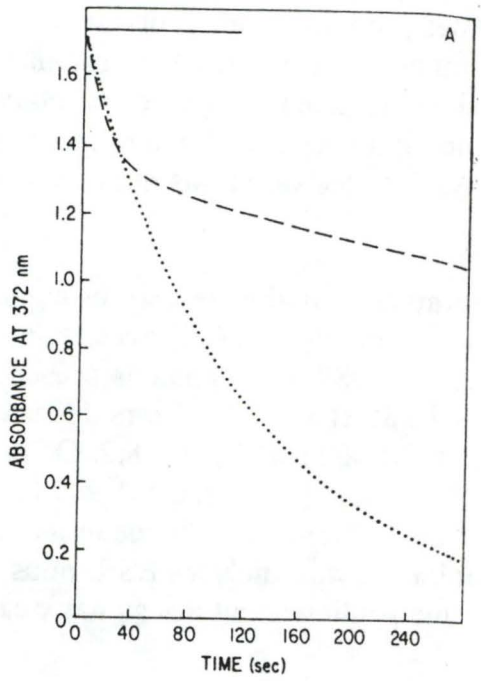
La figure 25 représente les résultats que nous avons obtenu en suivant les absorbances des intermédiaires et des produits. Nous avons suivi les variations d'absorbance de 300 à 700 nm, 3 minutes, 10 minutes et 50 minutes après le mélange du chrome (VI) avec un extrait d'hépatopancréas de *Palaemon elegans*. Si la diminution de l'absorbance à 372 nm, qui correspond à la diminution de la concentration en chrome (VI), est visible, les variations des autres longueurs d'onde sont très faibles et non visibles.

De même, par ESR, il aurait été possible de voir les signaux du chrome (V) à un g voisin de 1.99 lors de la réaction du chrome (VI) avec les extraits d'hépatopancréas. En effet, Bose *et al.* (1987) ont signalé la présence de deux intermédiaires de chrome (V) à g = 1.985 et à g = 1995 lors de la réaction du chrome (VI) avec une solution de glutathion (20-50 mM) à pH = 8.2. De même, Sugiyama *et al.* (1990) ont détecté la présence de chrome (V) à un g = 1.989 lors de l'analyse par ESR de cellules V-79 prétraitées avec de l'acide ascorbique et mélangées avec du chrome (VI) (200 µM). Cependant lors de nos analyses ESR, nous n'avons pas mesuré de signaux de chrome (V), mais uniquement des signaux caractéristiques du chrome (III).

Une première hypothèse serait que les extraits d'hépatopancréas possèdent une trop faible activité réductrice par rapport aux activités réductrices des solutions enzymatiques utilisées dans la littérature. Dans ce cas, la production d'intermédiaires et de chrome (III) serait trop faible pour être visible. En effet, lors des expériences *in vitro* relevées dans la littérature, les concentrations en molécules réductrices sont en général trois fois plus élevées que celle en chrome (VI). La figure 26 montre les diminutions d'absorbance à 372 nm du chrome (VI) ($3.7\ 10^{-4}$ M) mis en présence de molécules réductrices possédant un groupe thiol, le glutathion et la pénicillamine ($2.5\ 10^{-2}$ M). Précédemment, la figure 16 montrait nos résultats de diminution de l'absorbance à 372 nm avec des extraits d'hépatopancréas de *Palaemon elegans* mis en présence de chrome (VI) 50 ou 20 µM. Nos résultats montrent une diminution d'absorbance très faible. Lorsque nous utilisons des concentrations en chrome (VI) plus élevées, nous n'obtenons aucune diminution de l'absorbance. Cette faible activité réductrice des extraits d'hépatopancréas expliquerait une production d'intermédiaires et de chrome (III) trop faible pour être visibles par spectrophotométrie.

Une seconde hypothèse provient des expériences ESR. Ces expériences ont permis de signaler une différence lorsque les réactions sont menées à l'abri ou non de l'oxygène. En effet, lorsque la réaction du chrome (VI) avec les extraits d'hépatopancréas de *Carcinus maenas* se déroule en présence d'oxygène, l'amplitude

Figure 26 : Variation de l'absorbance à 372 nm en fonction du temps durant la réaction du chrome (VI) avec le glutathion (---) et avec la pénicillamine (···) à 25°C dans 1 M Tris-HCl, pH = 7.4. (____) avec la solution tampon. Concentration initiale en Cr (VI) = 3.7 10^{-4} M. Concentration en molécules à groupe thiol = 2.5 10^{-2} M. (Connett et Wetterhahn, 1985).



du signal du chrome (III) est constante en fonction du temps (figure 19, 21 et 22). Dans ce cas et contrairement à ce que l'on pouvait attendre, la concentration de chrome (III) n'augmente pas avec le temps. Après 3 minutes (figure 19), il semble que la réaction de réduction du chrome (VI) soit terminée. Par contre, si l'oxygène est retiré de l'extrait de tissu et de la solution de chrome (VI), la réaction produit un signal de chrome (III) qui augmente en fonction du temps. La réduction du chrome (VI) se poursuit toujours 60 minutes après le mélange du chrome (VI) avec l'extrait de tissu (figure 23), et continue probablement ensuite.

Donc, la seconde hypothèse serait qu'en présence d'oxygène, l'activité réductrice des extraits d'hépatopancréas soit détruite après quelques minutes de réaction. En effet, il est probable que lors de l'homogénéisation des tissus, les molécules réductrices cytoplasmiques tels l'ascorbate et le glutathion soient en partie oxydées par l'oxygène. Cela expliquerait d'une part les faibles taux d'activité réductrice des extraits d'hépatopancréas que nous avons mesuré tout au long de notre étude, et d'autre part l'absence de détection des intermédiaires qui seraient en concentration trop faible. Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse en gazéifiant les extraits d'hépatopancréas et les solutions de chrome (VI) avec de l'azote (ce qui permet d'y retirer l'oxygène) avant de suivre l'activité réductrice par spectrophotométrie. Il est fort probable que les taux de réduction du chrome (VI) soient plus conséquents. Une autre solution serait de traiter les hépatopancréas avec une solution Tris ajoutée d'acide diéthylenetriaminepentaacétique (DETAPAC), molécule qui selon Standeven et Wetterhahn (1991) permet de protéger les molécules réductrices sans interférer dans la réduction du chrome (VI).

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Ce travail effectué au département de pollution marine de "Queen Mary and Westfield College" avait pour but de débuter l'étude d'un mécanisme de défense bien précis : celui mis en place par les Crustacés marins face à la toxicité du chrome. Beaucoup de mécanismes de protection des invertébrés marins contre la toxicité de certains métaux sont connus. Pour certains métaux, le cycle complet dans les invertébrés marins, l'absorption, le transport, la transformation, le lieu et la forme de stockage, la durée de stockage, le taux d'excrétion sont parfaitement compris. Cependant, le phénomène de détoxification du chrome restait obscur. Ce travail est donc le début de l'étude qui permettra d'éclaircir les nombreux aspects du mécanisme de détoxification du chrome par les Crustacés marins.

Nous admettons que les conclusion tirées de l'étude de *Carcinus maenas* et de *Palaemon elegans* sont généralisables aux Crustacés Décapodes. La première conclusion que nous avons tiré de nos travaux est que conformément aux données de la littérature, le chrome (VI) est la forme du chrome qui est absorbée par les organismes marins. La seconde est que le site de détoxification du chrome chez *Palaemon elegans* et *Carcinus maenas* est l'hépatopancréas. C'est dans cet organe que le chrome (VI) est métabolisé en un produit moins toxique pour l'organisme, c'est-à-dire en un élément plus stable, donc moins susceptible d'interagir avec les molécules cytoplasmiques.. Nous avons déterminé par imagerie de résonance magnétique nucléaire et par ESR que cette transformation correspondait à la réduction du chrome (VI) toxique en chrome (III). Une troisième conclusion est que l'hépatopancréas joue également le rôle d'organe de stockage du chrome (III). Une hypothèse serait que le chrome (III) s'y trouve lié aux granules de phosphate de calcium que contiennent les cellules R de l'hépatopancréas. Dans ce cas, le chrome (III) serait excrété en même temps que les cellules R dans l'intestin puis dans le milieu extérieur.

Lorsque nous avons voulu étudier les taux de réduction du chrome (VI) par des extraits d'hépatopancréas, nous avons eu quelques problèmes. En effet, ces taux étaient très faibles et très instables. Les hypothèses que nous avons émises pour expliquer ces problèmes pourront permettre dans l'avenir de les contourner et d'approfondir cet aspect de l'étude de la détoxification du chrome. Pour cela, il serait intéressant que la réaction de réduction s'effectue à l'abri de l'oxygène qui est susceptible d'oxyder les molécules réductrices cytoplasmique. Une solution serait de gazéifier les extrait d'hépatopancréas et la solution de chrome (VI) avant de suivre le taux de réduction par spectrophotométrie. Cela devra permettre d'obtenir des taux de réduction beaucoup plus élevés. En conséquence, il sera peut-être possible de suivre par spectrophotométrie l'évolution dans le temps des concentrations des intermédiaires et du chrome (III).

De plus, afin d'approfondir l'étude de la réduction du chrome (VI), il sera nécessaire de faire une étude cinétique classique, en mesurant les taux de réduction

des extraits d'hépatopancréas en fonction de la concentration en chrome (VI). Cela devra permettre de confirmer ou d'infirmer l'hypothèse d'une participation enzymatique dans la réduction du chrome (VI).

Enfin, il serait intéressant de voir si les organismes marins développent une activité réductrice accrue lorsqu'ils sont soumis à une pollution en chrome croissante.

Bibliographie.

ANGEL H. (1981), "The Quinness Look of Seashore life", Quinness Superlatives Limited.

ARILLO A., MELODIA F. et FRACKE R. (1987), "Reduction of hexavalent Chromium by Mitochandria: Methodological Implications and Possible Mecanisms", in *Ecotoxicology and environnemental Safety*, 14, 164-177.

Association Européenne Océanique (1977), "Metallic Effluents of Industrial Ongin in the Marin Environment", Graham, Tratman Limited for the Commission of the European Communities.

ATKINS P.W., HOLTER J.S.E. et HOLLIDAY D.K. (1976), "Metals and Metabolism", D.A. Phipps.

AUBERT et al. (1976), "L'Ecologie contre les Nuisances pour la Conservation de la Nature", Guy Le Piat.

BENDER L., BERGERON R.J. et KOMIYAMA M. (1984), "The Bioaganic Chemistry of enzymatic Catalysis", Wiley J. & Sons Interscience Publication.

BIRNIE G.D. et RICKWOOD D. (1978), "Centrifugal Separation in Molecula and Cell Biology", Butterworths, Boston.

BOREL J.S. et ANDERSON R.A. (1984), "Biochemestry of the Essential Ultratrace Elements", E. Frieden.

BOSE A.N., MOGHADDAS S. et GELERINTHER E. (1992), "Lived Chromium (VI) and Chromium (V) Sutabolites in the Chromium (VI) - Glutathione Reaction: NMR, ESR, NPLC and Kinetic Characterisation", in *Inorganical Chemistry*, 31, 1987-1994.

BROUWER M., ENGEL D.W., BONAVENTURA J. et JOHNSON G.A. (1992), "In Vivo Magnetic Resonance Imaging of th Blue Crab, Callinectes Sapidus: Effect of Cadmium Accumulation in Tissues on Proton Relaxation Properties", in The *Jounal of experimental Zoology*, 263, 32-40.

BRYAN G.W. et LANGSTOM W.J. (1992), "Bioavailability Accumulation and Effects of Heavy Metals in Sediment with Special Reference to United Kingdom Estuaries: a Review", in *Environmental Pollution*, 76, 86-131.

BUYEN G.N. (1976), "Marine Pollution", Academic press, 185-290.

CHIPMAN W.A. (1965), "Some Aspects of the Accumulation of Cr^{51} by Marine Organisms", in International Symposium on Radioecology Concentration Processes, Pergamon, 931-941.

CHAN H.M., RAINBOW P.S., PHILLIPS D.J.H. (1986), "Barnacles and Mussels as Monitors of Trace Metal Bio-availability in Hong Kong Waters", in Proceedings of the Second International Marine Biological Workshop : The Marine Flora and Fauna of Hong Kong and Southern China, 1239-1268, Hong Kong University Press.

CONNETT P.H. et WATTERHAM K.E. (1986) "Reaction of Chromium (VI) with Thiols: pH Dependance of Chromium (VI) Thio Ester Formation", in *Journal of the Associate chemical society*, 107, 1842-1847.

CONNETT P.H. et WETTERHALM (1985), "InVitro Reaction of the Carcinogen Chermate with Cellular Thiols and Carboxylic Acides", in *Journal of the American Chemical Society*, 107, 4282-4288.

DAHAB D.A., KHALL A.N. et HALIM H. (1990), "Chromium Fluxes through Mes Bouy (Egypt) Inshore Waters", in *Marine Pollution Bulletin*, 21(2), 68-73.

DALLINGER R. et RAINBOW P.S. (1987), "Ecotoxicology of Metals in Invertabrates", Lewis Publisher.

DAS S. et CHADRA A.L. (1990), "Chromate in Streptomyces", in *Experientia*, 46(7), 731-733.

DAVIES J.M., EASTON D.F. et BIDSTRUP P.L. (1991) "Mortality from Respiratory Cancer and other Causes in UK Chromate Production Workers", in *British Journal of Industrial Medecine*, 48(5), 229-313.

FAN T.W.M., HIGASHI R.M., LANE A.N. et JARDETZKY O. (1986), "Combined Used of H.NMR and GC-MS for Metabolite Monitoring and in Vivo H-NMR Assignments", in *Biochimica et Biophysica Acta*, 882, 154-167.

FOSTER M.A. et HUTCHISON J.M.S. (1985), "NMR Imaging: Methods and Applications", in *Journal of Biomedical Engineering, Official Publication of the Biological Engineering Society*, Vol.7,N°3.

FUKAI R. et BOQUET D. (1965), "Distribution of Chromium in Marine Organisms", in *Bulletin Inst. Oceanogr.*, 65, n°1336, 19-25.

FURNESS R.W. et RAINBOW P.S. (1990), "Heavy Metals in the Marine Environnement", CRL Press.

GHOSH I.D. (1987), "Effect of Chromium on Free Amino Acids and Glutamate Deshydrogenase in the Fish Channa Punctutus", in *Environnement and Ecology*, Vol.3, 560-582.

GREEN J. (1961), "A Biology of Crustacea", H.F. et G. Witherby Ltd.

GUARY J.C. et NEGREL R. (1981), "Calcium Phosphate Opanules: A Trap for Transuranies and Icon in Crab Hepatopancreas", in *Comp. Biochemical Physiology*, 68A, 423-427.

HORITSU H., FUTO S., MIYAZAMA Y., OGAI S. et KAWAI K. (1987), "Enzymatic Reduction of Hexavalent Chromium by Hexavalent Chromium Tolerant Pseudomanas Ambigua G.1", in *Agricultural Biological Chemistry*, 51(9), 2417-2420.

KAMORI K., WANG P.C., TODA K. et OTHAKA H. (1989), "Factors Affecting Chomate Reduction in Enterobucter Cloacae strain HO1" in *Applied microbiology and Biotechnology*, 31(5-6), 567-570.

KANGHAROT B.S. et TRIPATHI D.M. (1990) "Gill Damage to Catfish, Saccolranchus Fossilis, Following Exposure to Chromium", in *Water and Soil Pollution*, 53(3-4), 379-390.

LEE D.G. (1980), "The Oxidation of Organic Compounds by Permanganate Ion and Hexavalent Chromium", Open Court Le Sable, Illinois.

LORET S.M. et DEVOS J-P. (1992), "Structure and Possible Functions of the Calcophorite-Rich Cells (R*Cells) in the Digestive Gland of the Shore Crab Carcinus Maneas", in *Cell Tissue Res.*, 267, 105-111.

LUCKEY T.D., VENUZOPAL B., HUTCHESON D. (1971), "Heavy Metal Toxicity, Safety and Hormonology", CRL Press.

MIKALSEN A., ALEXANDER J., ANDERSEN R.A. et INEGLMAN-SANBERG M. (1991), "Effect in Vivo Chromate, Acetone and Combined Treatments on Rat Liver in Vitro Microsomal Chromium (VI) Reductive Activity and on Cytochrome", in *Pharmacology and Toxycology*, 68(6), 456-463.

MOLIN Y.N., SALIKHOV K.M. et ZAMARAW K.I. (1980), "Spin Exchange. Principles and Applications in Chemistry and Biology", Springer Verlag, Berlin.

MOLNAR L., FISHER E. et KALLEY M. (1989), "Laboratory Studies on the Effect, Uptake and Distribution of Chromium in Eisenia Foetida (Annelida, Oligocheti)", in *Zoologisher Anzeiger*, 223(1-2), 56-57.

MOLNAR L., FISHER E. et VALLAG M. (1989), "Labotaries Studies on the Effect, Uptake and Distribution of Chromium in Eisenia Foetida (Annelida, Oligochaeta)", in *Zoologisher Anzeiger*, 223(1-2), 57-66.

MOULIN J-J., PORTEFOIX P., WILD P., MUR J-M. et MANTORT B. (1990), "Mortality Study amoung Workers Producing Ferroallays and Stainless Stell in France", in *British Journal of Industrial Medecine*, 47(8), 537-538.

NICOLAIDOV A. et NOTT J.A. (1990 "Mediteranean Pollution from a Ferro-Nickeil Smeter: Differential Uptake of Metals by some Gestropods", in *Marine Pollution Bulletin*,21(9), 137-143.

O'BRIEN P., BARNETT J. ET SWANSON F. (1985), "Chromium (V) Can Be Generated in the reduction of Chromium (VI) by Glutathione", in *Inorganic Chimica Acta*, 108, L19-L20.

O'BRIEN P., WANG G. ET WYATT P.B. (1992), "Studies of the Kinetics of the Reduction of Chromate by Gluthatione and Related Thiols", in *Polyhedron (The International Journal or Inorganic and Organometallic Chemistry)*, Vol.11, N°24, 3211-3216.

PERI J-P. (1976), "La Pollution des Eaux Marines", Bordas.

PHILLIPS D.J.H. et RAINBOW P.S. (1992), "Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants", in *Biochemical Biophysic Research Communication*, 163(1), 127-134.

PULLEN J.S.H. et RAINBOW P.S. (1991), "The Composition of Pyrophosphate Heavy Metal Detoxification Granules in Barnacles", in *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 150, 249-266.

RAINBOW P.S. et ABDENNOUR C. (1989), "Copper and Haemocyanin in the Mesopelagic Decapod Crustacean *Systellaspis debilis*", in *Oceanologica Acta*, Vol. 12, N° 1, 91-94.

RAMBY B. et RABEK J.F. (1977), "ESR Spectroscopy in Polymen Research", Springer Verlag, Berlin.

SHI X. et DALAL N.S.(1989), Chromium (V) and Hydroxyl radical Formation During the Glutathine Reductax Catalysed Reduction of Chromium (VI), in *Biochemical and Biophysical Research Communications*,163, 627-634.

SNEHLA G. (1990), "Vogel's Quantitative Inorganic Analysis", Longman Scientific & Technical.

Society for Experimental Biology: Seminar Series 2 (1976), "Effects of Polluants on Aquatic Organisms", A.P.M. Lockwood, Cambridge University Press.

STANDEVEN A.M. et WETTERHALM K.E. (1991), "Ascorbate is the Principal Reductant of Chromium (VI) in Rat Liver and kidney Ultrafiltrates", in *Carcinogenesis*, Vol.12, N°9, 1733-1737.

SUGIYAMA N., TSUZUKI K. et OGWA R. (1991),"Effect of the Ascorbic Acid on DNA Damage, Cytotoxicity, Gluthation Reductase and Formation of Paramagnetic Chromium in Chinese Hamster V.79 Treated with sodium Chromate (VI)", in *Journal of Biological Chemistry*, Vol.226, N°6, 3383-3386.

SUSUKI Y. et FUDUKA K. (1990), "Reduction of Hexavalent Chromium by Ascabic Acid and Glutathione with Special reference to the rat lung", in *Arch. Toxicology*, 65, 169-176.

THOMAS O., GALLOT S. et NAFRECHOUX E. (1990), "VV Multiwave length Absorptiometry (VVMA) for the Examination of Natural Waters and Wastewaters Part(III) : Determination of Cr(VI)", in *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 338(3), 241-244.

UNDERWOOD A. (1975), "Trace Element in Human and Animal Nutrition", W. Mertz.

VAN DER MEER C., TEUNISSEN C. et BOOG Th.F.M. (1988), "Toxicity of Sodium Chromate and 3.4 Dichloroaniline to Crustaceas", in *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol.40, N°2, 204-211.

VAN WEERELT M., PFEIFFER W.C. et FISZMAN M. (1984), "Uptake and Release of $^{51}Cr(VI)$ and $^{51}Cr(III)$ by Bamacles (Balanus Op)", in *Marine Environmental Research*,11, 201-211.

VENO S., SUSA N., FURUKAWA Y., AIKAWA K., ITAGAKI I., KOMIYAMA T. et TAKASHIMA Y. (1988), "The Relationship between the Development of Toxicity and Lipid Peroxidation Induced by Chromium Compounds in rats", in *Kitasato Archives of Experimental Medecine*, Vol.61, N°23, 137-147.

WALDRON H.A. (1980), "Metals in the Environment", S.Langard, 111-133.

WANG V.W.T. et RAINBOW P.S. (1986), "Apparent and real Variability in the Presence and metal Content of Metallothionlins in the crab Carcinus Maenas Including the Effect of Isolation procedure and Metal Induction", in *Comp. Biochemical Physiology*, Vol.83a, N°1, 157-177.

WEHSHI F.W., DEREK S. et KNEELAND J.B. (1998), "Biomedical Magnetic Resonance Imaging, Principles, Methodology and Applications", VCH Publishers Inc.

WEISS J.S., GREENBERG A. et NOSKER J.J. (1992), "Toxicity of Construction materials in the Marine Environnement: a Comparaison of Chromated Copper Assenate-Treated Wood and Recycled Plastic", in *Archives of Environmental Contamination and toxicology*, 22(1), 99-106.

WEISS P., WEISS J.S. et COOHILL L.M. (1990), "Toxicity to Estuarine Organisms of Leachates from Chromated Copper Arsenate Treated Wood", in *Archives of Enviromental Contamination and Toxicology*, 20(1), 118-124.

WHITE S.L. et RAINBOW P.S. (1986), "Accumulation of Cadmium by Palaemon Elegans (Crustacea Decapode)", in *Marine Ecology Progress Series*, 32, 17-25.

WIEGAND H.J, OTTENWALDER H. et BOLT H.M. (1987), "Bioavailability and metabolism of Hexavalent Chromium Compounds", in *Toxicological and Enviromental Chemistry*, Vol.14, 269-275.