

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE BIOLOGIE

THESE

MISSION
ÉCOLOGIE DU MILIEU

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Fabien GRUMIAUX

**Etude multiparamétrique de la contamination
métallique et organique du canal à grand gabarit
du Nord de la France, - Effets sur la macrofaune
benthique et caractérisation chez le gardon
(*Rutilus rutilus* L.) d'un biomarqueur d'exposition.**

PRESENTÉE ET SOUTENUE LE 10 JUILLET 1996 DEVANT LA COMMISSION

Jury:

Président	: M. A. DHAINAUT
Rapporteurs	: M. M. LAFONT : M. J.P. TRUCHOT
Examineurs	: Mme N. DHAINAUT-COURTOIS (Directeur de Recherches) : M. J.M. GRZYCH : M. A. LEPRETRE

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE
U.F.R. DE BIOLOGIE

THESE

EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'UNIVERSITE
EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

PAR

Fabien GRUMIAUX

**Etude multiparamétrique de la contamination
métallique et organique du canal à grand gabarit
du Nord de la France. - Effets sur la macrofaune
benthique et caractérisation chez le gardon
(*Rutilus rutilus* L.) d'un biomarqueur d'exposition.**

PRESENTEE ET SOUTENUE LE 10 JUILLET 1996 DEVANT LA COMMISSION:

Jury:

Président : M. A. DHAINAUT
Rapporteurs : M. M. LAFONT
 : M. J.P. TRUCHOT
Examineurs : Mme N. DHAINAUT-COURTOIS (Directeur de Recherches)
 : M. J.M. GRZYCH
 : M. A. LEPRETRE

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

R 9358AP

F

Tout d'abord, je tiens à remercier les personnes qui ont accepté de juger ce travail:

Madame le Professeur **N. DHAINAUT-COURTOIS**, dirigeant le Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie du Laboratoire de Biologie Animale de l'université des Sciences et Technologies de Lille, qui m'a accueilli dans son service et qui a assuré le suivi du travail de thèse,

Monsieur le Professeur **A. DHAINAUT**, de l'Université de Lille I, qui a accepté de présider ce jury. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail ainsi que pour les discussions fructueuses que nous avons eues.

Monsieur le Professeur **J.P. TRUCHOT**, Directeur de l'Unité de Formation et de Recherche de l'Université de Bordeaux I, qui me fait l'honneur d'accepter d'être rapporteur de mon travail,

Monsieur le Docteur **M. LAFONT**, Directeur de recherche au CEMAGREF, qui malgré ses charges, a accepté le travail de rapporteur,

Monsieur le Docteur **J.-M. GRZYCH**, Chargé de Recherches du Laboratoire des Hybridomes au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille qui m'a accueilli dans son laboratoire pour la production des anticorps monoclonaux dirigés contre la métallothionéine hépatique du gardon et qui a accepté de juger mon travail,

Monsieur le Docteur **A. LEPRETRE**, Maître de Conférences, laboratoire d'écologie numérique, Lille I, qui a pris le temps de lire mon mémoire et d'y apporter les précisions nécessaires,

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à **Sylvain Demuynck**, pour ses précieux conseils, les discussions pleines d'enseignements et aussi pour le temps qu'il a passé à lire mon mémoire afin d'y apporter les corrections nécessaires.

Je tiens à préciser ma gratitude à **Michel Salzet** qui m'a aidé à isoler la métallothionéine hépatique de gardon en m'apprenant l'utilisation du matériel de chromatographie à haute pression ainsi qu'à **Philippe Bulet** qui a déterminé la masse et la structure primaire de la métallothionéine.

Merci à **Sophia Lafitte** du Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire de l'Institut Pasteur de Lille, qui, avec gentillesse et patience, m'a appris les secrets de toutes les étapes de la réalisation d'un clone, et qui a passé beaucoup de temps pour la bonne marche de nos expériences. Je remercie également **Josette** et toutes les personnes qui m'ont accueilli sympathiquement dans leur laboratoire.

Je remercie **Françoise Bonet** qui m'a guidé lors de mes premiers pas dans le monde MacIntosh, **Marie-Christine Slomianny** pour m'avoir appris le maniement du matériel FPLC, ainsi que **Gérard Montagne, Annie Desmons, Régine Leroux, Loïc Brunet** pour leurs précieuses aides techniques.

Que Monsieur le **Professeur Wartel** soit ici remercié pour m'avoir permis d'utiliser les spectrophotomètres à flamme et à torche de son laboratoire de Chimie Analytique et Marine de l'université de Lille I, ainsi que toutes les personnes qui m'ont appris leurs fonctionnements, je pense particulièrement à **Bagdad** et à **Lucie**.

Je remercie également **M. Verdevoye** du SEMA pour les documents qu'il m'a fournis, les personnes des **Voies Navigables** qui m'ont donné des facilités pour emprunter les chemins de halage, **M. Chessel** qui m'a reçu dans son laboratoire de Lyon afin de m'initier au logiciel ADE-4, ainsi que **Jean Prygiel**, notre interlocuteur au niveau de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie.

Merci aux **Fédérations de Pêche du Nord et du Pas-de-Calais** pour les poissons qu'elles nous ont fournis.

J'ai une pensée pour toutes les personnes que j'ai croisées tout au long du DEA et de la thèse, je pense notamment à **François Septier, Jean Fewou** et à **Christelle Pruvost**.

Que tous les stagiaires qui m'ont aidé lors de leur passage dans le Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie soient ici sincèrement remerciés. Merci également à **Franck Mortreus** qui, sous les drapeaux, m'a précieusement aidé lors des dernières expériences de cette étude.

Je tiens à exprimer ma profonde amitié à **Robin Komont**, avec qui j'ai passé (et je passerai encore !) d'excellents moments tout au long de ces quelques années à partager le même bureau et les mêmes galères.

Remerciements

Que **Stéphanie**, ma soeur, **Xavier**, mon frère, **Chantal**, ma belle-soeur, sans oublier les "peppettes" et toute ma famille soient chaleureusement remerciés pour leur soutien et l'intérêt qu'ils ont portés à ce travail.

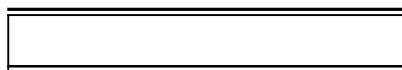
Nathalie, ma compagne, que tu soies remerciée ici pour ton aide et ton soutien moral que tu m'as apportés depuis quelques années. Que tes parents, tes frères et tes belles-soeurs soient également remerciés pour l'intérêt qu'ils ont montré à l'égard de mes travaux.

Enfin, c'est pour moi une grande joie de pouvoir dédier ce travail à **Annie** et **André**, mes parents, qui m'ont soutenu et ont cru en moi tout au long de mes d'études dont ce mémoire est l'aboutissement. Merci.

Ce travail a reçu le soutien financier de l'**Agence de l'Eau Artois-Picardie**, sans lequel il n'aurait pas pu aboutir. Tous nos remerciements.

Ce mémoire a été réalisé à l'aide de matériels Macintosh[®]

SOMMAIRE



	Page
Remerciements	1
Sommaire	4

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

<u>1. OBJECTIFS ET PRESENTATION DE L'ETUDE</u>	10
<u>II. GENERALITES</u>	12
1. Préambule	12
2. Les métaux traces dans l'écosystème aquatique	13
2.1 . Les principaux métaux traces et leurs sources	13
2.2. Le transport et la circulation	16
2.3. L'accumulation des métaux traces	16
3. Les métaux traces et les organismes	17
3.1. Métaux essentiels et non-essentiels	17
3.2. Les métaux et les invertébrés	20
3.3. Les métaux et les poissons	22
3.4. Les moyens de défense	25
3.4.1 . Les moyens non-biologiques	25
3.4.2. Les moyens biologiques	25
3.4.2.1. Les lysosomes	25
3.4.2.2. Les sphérocristaux	26
4. Les métallothionéines	26
4.1 . Définition	26
4.2. Métallothionéine <i>sensu stricto</i> , <i>sensu lato</i> , métalloprotéine non-métallothionéine ?	21
4.3. Ubiquité	28
4.4. Structure et conservation	29
4.5. Rôle, synthèse et dégradation	31
4.6. Quantification	32
4.6.1 . Les méthodes chromatographiques	33
4.6.2. Les méthodes de quantification par la saturation métallique	33
4.6.3. Les méthodes colorimétriques (dosage des groupements sulfhydryles)	34
4.6.4. Les méthodes électrochimiques	34
4.6.5. Les méthodes immunologiques	35
4.6.5.1. RIA	35

4.6.5.2. ELISA	36
4.7. Immunoréactivité	36
4.8. Les métallothionéines chez les poissons	38
5. Les moyens d'évaluation de la qualité des cours d'eau	43
5.1. Les méthodes physico-chimiques et chimiques	43
5.2. Les méthodes biologiques ou biocénotiques	44
5.2.1. La récolte des macroinvertébrés	44
5.2.1.1. Les moyens directs	44
5.2.1.2. Le piégeage par les substrats artificiels	45
5.2.2. Les indices biologiques	45
5.2.2.1. L'Indice Biotique	48
5.2.2.2. Les Indices de Qualité Biologique Globale et Potentielle	48
5.2.2.3. L'Indice Biologique Global Normalisé	49
5.2.2.4. L'Indice Chironomidien	49
5.2.2.5. Les indices utilisés à l'étranger	49
5.2.2.6. Les autres méthodes	50
5.3. Les méthodes biochimiques	50
III. CONTEXTE REGIONAL	51
1. Historique: aménagement des cours d'eau dans le Nord/Pas-de-Calais	51
2. Qualité des cours d'eau de la Région Nord/Pas-de-Calais	53

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

1. LE CANAL A GRAND GABARIT ET L'AA	64
1. Choix des sites	64
2. Méthodes d'échantillonnage	66
2.1. Méthode d'échantillonnage des macroinvertébrés benthiques	66
2.1.1. Les substrats artificiels	68
2.1.2. Tri et détermination	68
2.2. Prélèvements des sédiments	69
2.3. Prélèvements d'eau	69
3. Analyses chimiques et physico-chimiques des eaux et des sédiments	69
3.1. Analyses d'eau	69
3.2. Dosage des métaux dans les sédiments	70
3.2.1. Préparation des sédiments	70
3.2.2. Dosage par spectrophotométrie	70
3.3. Dosage des paramètres P, COT, NTK et mesure de la perte au feu	70
3.4. Caractérisation granulométrique	71
4. Analyse des données	71
4.1. Descripteurs de diversité et indices biologiques	71
4.1.1. L'indice de Shaiinon-Weaver (1948)	72
4.1.2. L'indice de Simpson (1949)	72
4.1.3. L'indice de Pielou (1975)	73

4.1 .4. Diagrammes Rang-Fréquence (DRF)	73
4.1 .5. Les indices biologiques	73
4.1.5.1. Les méthodes basées sur l'Indice Biotique de Tuffery et Verneaux (1968), l'Indice de Qualité Biologique Potentielle (IQBP) (Verneaux <i>et al.</i> , 1977) et l'Indice Biologique Global (AFNOR, 1992)	74
4.1.5.2. Le "score BMWP" britannique (Biological Monitoring Working Party, 1979)	74
4.2. Les méthodes statistiques	79
4.2.1. Analyse de variance	79
4.2.2. Analyse en Composantes Principales	79
4.2.3. Analyse Factorielle des Correspondances	79
4.2.4. Analyse de Co-inertie	80
II. LA METALLOTHIONEINE DE GARDON (<i>Rutilus rutilus</i>)	81
1. Le matériel biologique: le gardon	81
2. Purification de la métallothionéine hépatique	81
2.1 .Intoxication des poissons par du Cd et du Zn	83
2.2. Extraction tissulaire	83
2.3. Chromatographie de filtration sur gel	83
2.4. Détection de la métallothionéine	84
2.4.1. Dosage du Zn, du Cd et du Cu	84
2.4.2. Détection des groupements sulfhydriles	84
2.5. Chromatographie d'échange d'ions	84
2.6. Chromatographie en phase-inverse	85
2.7. Dosage de la métallothionéine par colorimétrie	85
3. Méthodes électrophorétiques	85
3.1. Electrophorèse monodimensionnelle en milieu dénaturant	85
3.2. Electrofocalisation	86
4. Caractérisation de la métallothionéine	86
4.1 .Electrophorèse capillaire	86
4.2. Réduction-alkylation	86
4.3. Masse moléculaire	87
4.4. Principe de la dégradation d'Edman	87
4.5. Séquençage en acides aminés de la région N-terminale	87
4.6. Clivage de la molécule et séparation des peptides par HPLC	87
5. Etude des effets du Cd et du Zn et de combinaisons des deux éléments en injections intrapéritonéales	89
5.1 .Protocole expérimental	89
5.2. Dosage des métaux	90
5.3. Dosage des groupements sulfhydriles	90
5.4. Analyse statistique	90
5.5. Analyses chromatographiques	90
6. Fabrication d'anticorps monoclonaux	91
6.1 .Immunisation de souris balb/c	91
6.2. Analyse de la réponse immune	91
6.3. Hybridation	93
6.4. Sélection des cellules hybrides	93
6.5. Dépistage des hybridomes positifs	94

6.5.1. ELIS \	94
6.5.2. DIA	96
6.6. Clonage	96
6.7. Détermination des isotopes	96

CHAPITRE III. RESULTATS

I. QUALITE PHYSICO-CHIMIQUE, CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DU CANAL A GRAND GABARIT, DE L'AA ET DE L'AA CANALISE	97
1. Qualité du milieu	97
1.1. Qualité de l'eau	97
1.1.1. Analyse des données	97
1.1.1.1. Comparaison des sites en fonction de leurs teneurs métalliques	97
1.1.1.2. Confrontation des données de pollution métallique des sites avec la grille de qualité des eaux de l'Agence de l'eau Artois-Picardie	99
1.1.2. Interprétation des résultats	101
1.2. Qualité des sédiments	102
1.2.1. Les teneurs métalliques dans les sédiments	102
1.2.1.1. Description	102
1.2.1.2. Comparaisons avec les valeurs naturelles	104
1.2.1.3. Comparaisons avec les normes	114
1.2.1.4. Confrontation des teneurs métalliques des sites étudiés avec les concentrations de référence données par le Ministère de l'Environnement (1993)	115
1.2.2. Les teneurs en NTK, COT et P, la perte au feu	117
1.2.3. Comparaison entre les sédiments piégés, les sédiments profonds et la fraction fine (<63µm)	117
1.2.3.1. Granulométrie	119
1.2.3.2. Etude des paramètres métalliques et organiques	119
1.2.3.3. Comparaisons inter-sites	124
1.2.3.4. Comparaisons intra-sites des sédiments au cours du temps	124
1.2.3.5. Etude des corrélations	128
1.2.3.6. Analyses en Composantes Principales	128
2. Les macroinvertébrés benthiques	134
2.1. Description des listes taxonomiques	134
2.2. Structure des communautés	143
2.2.1. Construction des réseaux trophiques de macroinvertébrés	143
2.2.2. Répartition en fonction des modes de nutrition	151
2.3. Les Diagrammes Rangs-Fréquences	160
2.4. Analyse Factorielle des Correspondances	165
2.5. Les indices de diversité, d'abondance-dominance et de régularité	165
2.6. Les indices biocénotiques et les "scores"	168
3. Relation entre les données chimiques et biologiques	172
3.1. Relations entre les indices et les variables chimiques des sédiments	172

3.1 .1. Relations entre les indices et les variables métalliques	172
3.1 .2. Relations entre les indices et les variables métalliques et organiques	174
3.2. Analyses de co-inertie	174
3.2.1 .Effet des paramètres métalliques sur la macrofaune benthique	174
3.2.1 .1. Analyse en composantes principales du tableau milieu	178
3.2.1 .2. Analyse en Composantes Principales du tableau faune	178
3.2.1 .3. Recherche d'une Co-inertie	183
3.2.2. Effet des paramètres métalliques et organiques sur la macrofaune	186
3.2.2.1. Analyse en composantes principales du tableau milieu	186
3.2.2.2. Analyse en Composantes Principales du tableau faune	190
3.2.2.3. Recherche d'une Co-inertie	190
4. Discussion et conclusion sur les études de terrain	197
 II. LA METALLOTHIONEINE DE GARDON	 203
1. Préparation de la métallothionéine hépatique	203
1.1. Fractionnement de l'extrait hépatique soluble de gardon	204
1.2. Fractionnement du pic III	208
1.3. Fractionnement du pic IIIA	208
2. Caractérisation de la métallothionéine hépatique	211
2.1 .Etude des formes oxydées de MTG 1 et MTG2.	211
2.2 .Comportement électrophorétique et point isoélectrique.	214
2.2.1. Comportement électrophorétique	214
2.2.2. Détermination du point isoélectrique (Pi)	217
2.3. Caractérisation de MTG 1	217
2.3.1 .Electrophorèse capillaire	217
2.3.2. Détermination de la masse moléculaire	222
2.3.3. Détermination de la structure primaire de l'isoforme MTG 1	222
2.3.3.1 .Détermination de la séquence N-terminale	222
2.3.3.2. Clivage enzymatique	222
3. Homologies avec d'autres métallothionéines	227
3.1 .Homologie avec les MT en général	227
3.2. Homologie avec les MT de poissons	230
4. Etude des effets du Cd et du Zn et de combinaisons des deux éléments en injections intrapéritonéales	233
4.1 .Dosages du Zn, du Cd et des SH dans l'extrait brut chauffé	233
4.1 .1. Le zinc	233
4.1.2. Lécadmium	234
4.1 .3. Les groupements sulfhydriles	235
4.2. Etude chromatographique	238
5. Production d'anticorps monoclonaux anti-métallothionéine de gardon.	249
5.1 .Réponse des souris immunisées	249
5.2. Fusions et rendement des fusions	249
5.3. Détermination des isotypes	249
5.4. Analyse de la stabilité des hybridomes	252
5.5. Clonage	254
5.6. Etude de la spécificité des anticorps monoclonaux	254
5.7. Approche monoclonale du niveau d'intoxication des gardons	257
6. Discussion-Conclusion sur l'étude de la métallothionéine	259

CHAPITRE IV. DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES
--

<u>I. DISCUSSION GENERALE</u>	263
<u>II. CONCLUSION GENERALE</u>	272

LISTES DES ABREVIATIONS, DES FIGURES ET DES TABLEAUX REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES RESUME ET ABSTRACT
--

Liste des abréviations	274
Liste des figures	276
Listes des tableaux	282
Références bibliographiques	286
Résumé	308
Abstract	309

CHAPITRE I.

INTRODUCTION

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1. OBJECTIFS ET PRESENTATION DE L'ETUDE

Notre travail de recherche s'intègre dans la thématique générale de notre laboratoire relative à la toxicologie et l'écotoxicologie de certains milieux aquatiques de la Région Nord-Pas-de-Calais. Les études commencées au niveau du milieu marin (estuaires et zones portuaires) (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1989, Septier *et al.*, 1991, Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991, Septier 1992, Demuynck, 1992, Salzet-Raveillon, 1993, Romont *et al.*, 1993, Romont et Dhainaut-Courtois, 1994a,b,c, Dhainaut et Romont, 1996, Dhainaut et Ruffin, 1996, Romont et Dhainaut, 1996, Romont, 1996) ont, à la demande de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie, été élargies il y a quelques années au Canal à Grand Gabarit puis, avec l'aide financière de l'Agence, de la Société des Eaux du Nord, du Conseil Régional, du Ministère de l'Environnement, de la DIREN, du CETE et de la DDE du Pas-de-Calais à des fleuves côtiers, des rivières et des rigoles (Dehay *et al.*, 1994, Grumiaux *et al.*, 1994, Blondel *et al.*, 1995, Dhennin *et al.*, 1996, Grumiaux et Dhainaut-Courtois, 1996).

Sur le terrain, en plus des analyses classiques portant sur un certain nombre de caractéristiques physico-chimiques et chimiques de l'eau et surtout des sédiments, la stratégie de recherche sur le compartiment biotique se situe, quand cela est possible, au niveau des communautés (structure et évolution,...), des populations (densité, dynamique,...) et des espèces indicatrices ou sentinelles. Celles-ci sont aussi utilisées au laboratoire pour les estimations de transfert de micropolluants à leur niveau et l'étude des effets de ces derniers avec caractérisation de marqueurs biochimiques.

En milieu marin, notre laboratoire a choisi d'axer ses recherches sur les macroinvertébrés endobenthiques, de récolte relativement aisée en substrat meuble, et qui peuvent être considérés comme très représentatifs des écosystèmes dont ils font partie. Dans ce type d'études, les poissons qui effectuent de grands déplacements n'ont **pas** été retenus.

Il en va tout-à-fait différemment **pour** la plupart des cours d'eau de la Région Nord-Pas-de-Calais, souvent fortement, voire totalement artificialisés. Tel est le cas du Canal à Grand Gabarit dont les bords représentés par un talus ont souvent été renforcés, empierrés, tandis que le fond est chargé en une vase très réductrice, le plus souvent dépourvue de macroinvertébrés. Ceci rend donc difficiles, voire impossibles, les études biologiques qui porteraient uniquement sur la faune endobenthique. C'est pourquoi, dans un souci de faciliter les comparaisons inter-sites, nous avons opté pour le développement d'un outil utilisable dans la plupart des cours d'eau de la Région. Nous avons décidé d'effectuer le piégeage de macroinvertébrés généralement épibenthiques. Ces études ont été menées en parallèle avec celles des sédiments piégés et des transferts des micropolluants du milieu abiotique au compartiment biotique. Dans la mesure du possible, avec l'aide des Fédérations de pêche, nos

recherches ont été étendues aux poissons: caractérisation des espèces et étude des contaminations dans un certain nombre de tissus (Grumiaux *et al.*, 1994).

Dans ce mémoire, nous ne ferons état que des résultats qui devraient donner lieu à des développements ultérieurs avec applications à des diagnostics écologiques et immunologiques. Les travaux présentés concernent:

- * **L'étude de la qualité des sédiments** qui comprend la réalisation des mesures des teneurs en certains métaux (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb et Zn), en carbone, en phosphore et en azote, et la recherche des relations entre ces différents paramètres.

- * **L'étude des peuplements de macroinvertébrés** qui consiste à réaliser des inventaires sur les sites d'étude, afin d'en déterminer les espèces communes à l'ensemble des sites qui pourraient ultérieurement faire l'objet de dosages de polluants, à établir un schéma des réseaux trophiques constitués par les macroinvertébrés benthiques, et à calculer, si possible, un indice de qualité hydrobiologique.

- * **L'étude des effets de la qualité des sédiments sur les communautés de macroinvertébrés**

- * **La caractérisation de la métallothionéine hépatique de gardon** dans le but de produire un anticorps monoclonal qui fera ultérieurement l'objet d'une mise au point d'un test immunologique d'évaluation de la qualité du milieu aquatique.

L'exposé de nos recherches est conduit en 4 chapitres.

- * Dans ce **premier chapitre** d'introduction, nous exposons quelques généralités sur les métaux traces dans l'écosystème aquatique, leurs effets chez les organismes aquatiques et les moyens de détoxification en insistant sur les métallothionéines. De plus, sont résumés brièvement quelques moyens d'évaluation de la qualité des cours d'eau. Nous abordons également le contexte régional.

- * Les matériels et les méthodes utilisés sont ensuite décrits **dans un deuxième chapitre**.

- * Les résultats sont présentés **dans le troisième chapitre** qui est composé de deux parties:

La première partie est **consacrée** à l'étude de la contamination métallique et organique du canal à grand gabarit du Nord de la France, de l'Aa et de l'Aa canalisé et de **ses** effets sur la macrofaune benthique. Nous avons tenté, à l'aide de méthodes statistiques, de mettre en évidence des relations entre la qualité des sédiments et les communautés de macroinvertébrés benthiques.

La deuxième partie concerne la caractérisation de la métallothionéine hépatique du gardon (*Rutilus rutilus*) **par** la détermination de **sa** structure primaire et **la** comparaison de **sa** séquence à celle d'autres métallothionéines. A la fin de cette deuxième partie, nous abordons la réalisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre cette métallothionéine.

* Pour clore cette thèse, dans un **quatrième chapitre**, nous discutons les différentes techniques que nous avons utilisées pour l'étude de la qualité du canal à grand gabarit, de l'Aa libre et canalisé, avant de terminer par une conclusion générale présentant quelques perspectives de travail.

II. GENERALITES

1. Préambule

Le développement fulgurant de la technologie au cours notamment de ces cinquante dernières années et l'important essor industriel qui en découle sont responsables d'une pollution d'origine anthropique qui ne cesse d'augmenter. Les besoins grandissant des industries entraînent parallèlement de nombreuses pollutions dues aux transports (ferroviaires, routiers, maritimes). A ces pollutions récentes, il ne faut pas oublier d'ajouter les pollutions historiques dont nous avons hérité des industries passées, à une époque où l'on se souciait peu des impacts sur l'environnement. Les pollutions provoquées par les métaux traces toxiques, les marées noires (Amocco Cadiz en 1978; Nowruz en 1983; et celles engendrées lors de la guerre du Golfe), les accidents des centrales nucléaires (Tchernobyl en 1986), les accidents d'usines chimiques (Sevezo en Italie en 1976; Bhopal en Inde en 1984; Usine Sandoz sur le Rhin en 1986) illustrent tragiquement la réalité des dangers qui menacent l'homme et son environnement. Ces accidents surviennent généralement dans des régions ou des zones fortement industrialisées et, par voie de conséquence, souvent densément peuplées. La sensibilisation de l'opinion publique et la prise de conscience des risques encourus pour la santé de l'homme et des autres espèces vivantes ne sont toutefois apparues que suite à quelques grandes catastrophes telles que celle survenue au Japon dans la baie de Minamata (au cours des années 50) provoquée par les dérivés organiques du mercure. La présence de concentrations élevées en métaux et métalloïdes dans l'environnement aquatique a été la cause d'un intérêt grandissant durant les quelques dernières décades, principalement à cause des effets indésirables à long terme sur le biotope de quelques espèces métalliques. C'est d'ailleurs à cause de la pollution cadmique des eaux potables que quelques dizaines de personnes ont été atteintes au Japon dans les années soixantes par la maladie d'Itaï-Itaï qui se traduit par des anomalies osseuses et des nécroses de divers organes (*in* Ramade, 1979). Si, dans certains cas, l'enrichissement métallique de l'écosystème aquatique a été substantiellement réduit par l'implantation de contrôles législatifs plus astreignants des industries et des décharges des boues d'épuration domestiques, la remobilisation de contaminants provenant d'une pollution historique reste encore importante (Fletcher *et al.*, 1994). Ces pollutions historiques sont également fortement présentes dans les friches industrielles et les sites "oubliés" de stockage des déchets.

Cependant, malgré des efforts de plus en plus grands, les pollutions du milieu aquatique demeurent encore actuellement un problème préoccupant. Elles ne sont pas sans effet sur la qualité du biotope qui peut être modifié ou dégradé et ainsi provoquer des perturbations au niveau de la faune.

Ces pollutions, lorsqu'elles sont accidentelles, peuvent présenter des effets spectaculaires (voir, par exemple, les nombreux accidents survenus sur le Rhin lors des vingt-cinq dernières années). Il n'en reste pas moins vrai que les pollutions chroniques, plus diffuses, plus sournoises aussi, peuvent également à moyen ou à long terme avoir des répercussions désastreuses non seulement sur les effectifs mais aussi sur la biodiversité à l'avantage des espèces ubiquistes, voire polluo-résistantes. Cette situation est particulièrement critique dans la région Nord/Pas-de-Calais qui est soumise à une densité de population et à une industrialisation importantes. La qualité générale (physico-chimique et biologique) de certaines rivières et certains canaux, devenus très rapidement des moyens d'éliminer les eaux usées vers la mer, s'est alors dégradée dangereusement.

Une première approche du problème a été effectuée grâce à la mise en place par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie d'un réseau important d'analyses physico-chimiques réalisées sur les eaux et les sédiments des rivières et canaux du Nord de la France en vue de connaître leur degré de pollution organique et minérale. Toutefois, jusqu'à ces dernières années, cette démarche ne faisait que peu appel au compartiment biotique.

2. Les métaux traces dans l'écosystème aquatique

2.1. Les principaux métaux traces et leurs sources

Les métaux traces sont des constituants normaux de l'écosphère (lithosphère, hydrosphère et atmosphère). Sur les dix éléments les plus abondants de la croûte terrestre, sept sont des métaux (Gidding, 1973): aluminium (Al: 7,5 g/100g de croûte terrestre), fer (Fe: 4,7%), calcium (Ca: 3,4%), sodium (Na: 2,6%), potassium (K: 2,4%), magnésium (Mg: 1,9%), titane (Ti: 0,6%). Ils sont présents naturellement dans les roches depuis l'origine de la Terre. Avant les interventions humaines, seules, l'eau et l'atmosphère par leur action d'érosion et de lessivage, et les retombées volcaniques, étaient principalement responsables de la remobilisation des métaux dans la biosphère. Ces facteurs naturels sont responsables d'un enrichissement en métaux des différents écosystèmes qui se traduit par un bruit de fond qui sert de niveau de référence. Cet enrichissement normal et inéluctable auquel la biosphère s'est adaptée depuis des millénaires, est variable selon la nature du sol (calcaire, granit, schistes, roches volcaniques..) et sa richesse en minerais. Le cycle biogéochimique des métaux traces est illustré par la figure 1.

Depuis l'exploitation industrielle des gisements métallifères, il est de plus en plus difficile de faire la part entre l'enrichissement naturel et l'enrichissement d'origine anthropique. En effet, les pays miniers ont vu se développer de fortes concentrations industrielles et humaines dont les rejets participent à la contamination de l'écosphère (Norris *et al.*, 1981; Niethammer *et al.*, 1985; Bubb et Lester, 1994; Horowitz et Elrick, 1993). Ainsi, chaque étape de fabrication de matériel contenant des métaux (exploitation, extraction, transformation, utilisation, déchets) devient une source potentielle de pollution. En plus de la "pollution" naturelle, trois autres sources principales sont donc apparues: les

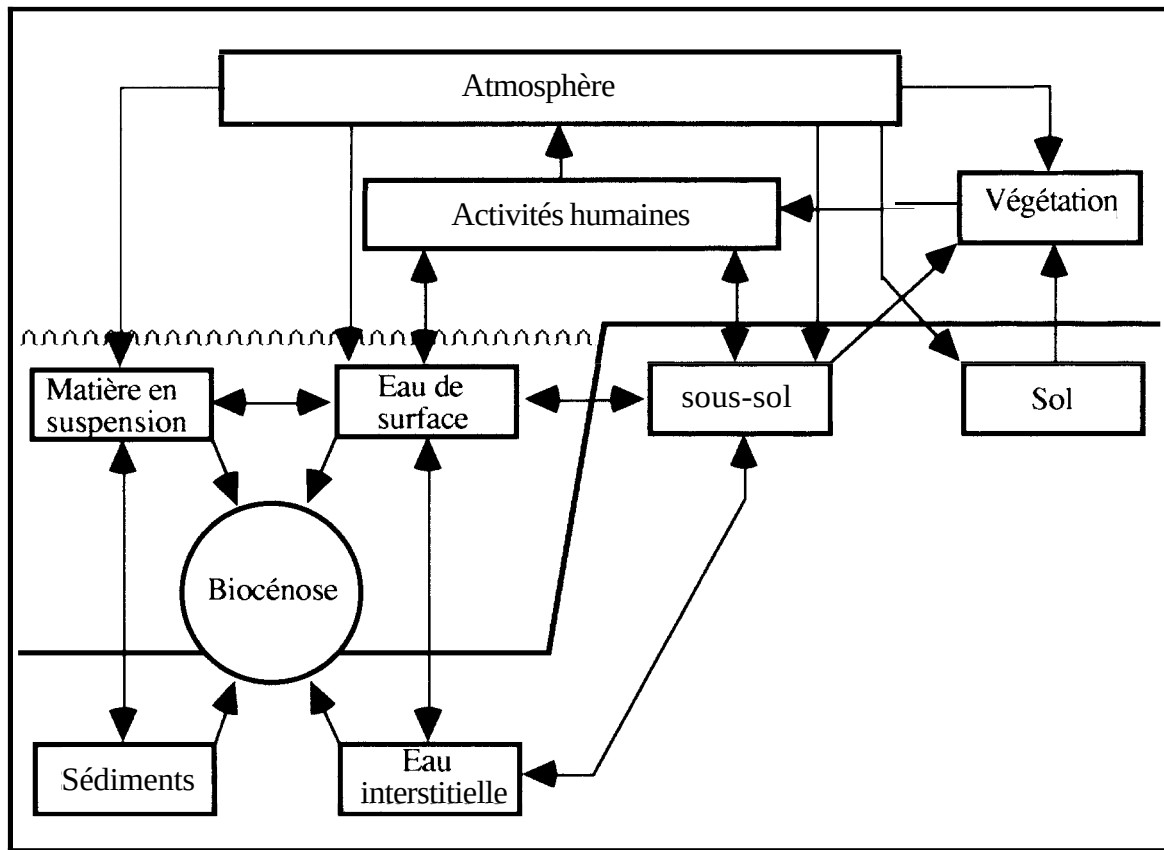


Figure 1. Cycle des métaux traces dans la nature. (d'après Salomons et Forstner, 1984)

Tableau 1. Métaux rejetés par les principales industries.

(suivant(•) Dean *et al.*, 1972 in Cosson (1987) & (*) Rapport de la DRIRE, 1992)

Secteurs d'activités	Métaux rejetés													
	Al*	As*	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Sn	Ti*	V*	Zn
Industrie chimique et parachimique * .			+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
verrerie *				+						+				+
Métallurgie-Sidérurgie Fonderie * .		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+
Traitement de surface * +			+	+	+	+			+	+		+		+
Industrie automobile * .			+	+	+				+	+				+
Industrie des fertilisants .			+	+	+	+	+	+	+	+				+
Pulpe de bois, Pâte à papier, Cartonnage, scierie * .				+	+		+		+	+				+

activités minières, la métallurgie lourde et les industries de transformation. le lessivage des zones d'épandage et de stockage de produits ou de déchets industriels ou domestiques. De nombreuses industries qui utilisent les métaux (tableau 1) contribuent ainsi à la contamination de l'écosphère (Franzin et Mc Farlane, 1980; Dissanayake *et al.*, 1983). Les principaux métaux lourds et leurs utilisations sont décrits ci-dessous (d'après Moore et Ramamoorthy, 1983).

- **L'arsenic** est surtout présent dans les phosphates, le charbon et les pyrites. Il est utilisé pour les préparations médicales, les alliages au plomb pour les projectiles. la composition des chaudières, les agents dépilatoires, les pigments de peinture, pour la coloration des verres, des céramiques et des émaux. les teintures et les tannins, les insecticides et les rodenticides.
- **Le cadmium** est présent dans les minerais de sulfate et de carbonate de zinc ou de plomb. Le cadmium est utilisé en galvanoplastie. dans les pigments de peinture, les stabilisants de PVC (stéarate de Cd), les batteries. De part son origine, le cadmium est souvent associé au zinc dans les rejets et a été une source de pollution longtemps ignorée dans la production de métaux tels que le cuivre, le plomb et le zinc. Le cadmium est également présent dans les superphosphates (engrais) qui pour des raisons de coûts ne sont pas purifiés (in Ramade, 1989).
- **Le chrome** est souvent associé au fer et au magnésium sous forme de chromite de fer ou de chromite de magnésium. Les minerais de chrome sont utilisés dans la métallurgie, dans la fabrication de matériaux réfractaires (briques, mortiers, fours...), dans l'industrie chimique (pigments, teintures, tannins. revêtements protecteurs,...).
- **Le cuivre** est largement répandu dans la nature sous forme libre (cuprite) ou dans des sulfures. des arseniures, des chlorures et des carbonates. L'ensemble de ses propriétés (malléabilité, ductibilité. conductivité, résistance à la corrosion...) lui confère un large éventail d'utilisations (électricité, plomberie, industrie automobile, pigments, tannins, industrie photographique, insecticides. fongicides, alguicides sous forme de sulfates).
- **Le mercure**, rare dans la croûte terrestre (minerai de cinabre essentiellement) est utilisé dans les peintures, les pâtes à papier, les produits de revêtement, les fongicides, les thermomètres, les piles.
- **Le nickel** est trouvé sous forme de sulfures, d'oxydes. de silicates et d'arseniures. Le nickel est surtout utilisé dans les industries métallurgiques pour la fabrication d'alliages et dans la galvanoplastie en raison de sa résistance à la corrosion, et ses bonnes conductivités thermiques et électriques.
- **Le plomb** est l'un des premiers métaux connus par l'homme. Il est assez répandu dans la nature. Le minerai le plus abondant est la galène dans laquelle le plomb est sous forme de sulfure. Il est utilisé en tuyauterie, en matériaux de construction, en soudure, dans les peintures, dans les munitions, dans les moulages et comme anti-détonnant dans les carburants. Sous forme organo-métallique. il est utilisé dans les peintures anti-incrustation. En raison de ses propriétés d'absorption des rayons gamma, il est employé dans les écrans de protection lors de l'utilisation de matériaux radioactifs.
- **Le zinc** est présent principalement dans des minerais de sulfures (blende) ou de carbonates (smithsonite). Des métaux traces (cadmium, germanium et gallium) associés aux sulfures de zinc sont

trouvés lors de l'extraction. Il est utilisé dans la galvanisation (propriété anti-corrosive), la fabrication d'alliages, les pigments, l'industrie automobile (carburateur, pompe, poignée...). Il fait partie des impuretés de certains engrais et notamment des superphosphates.

Une mauvaise gestion des matériaux usagés métalliques ou contenant des métaux peut entraîner une dispersion des polluants. C'est le cas de l'incinération des matières plastiques stabilisées par du stéarate de cadmium qui relargue ce métal toxique dans l'atmosphère. L'usage de compost fabriqué à partir des déchets urbains, ou l'épandage des boues résiduelles de stations d'épuration des eaux usées qui se sont développés depuis la fin des années 70 constituent aussi une importante source clandestine d'apport de métaux traces aux sols cultivés (Ramade, 1989). Ces métaux sont à nouveau disponibles pour les végétaux ou sont lessivés et emportés vers les cours d'eau. De nombreux rejets gazeux provenant de l'utilisation de combustibles fossiles contiennent des métaux lourds. Ainsi les carburants automobiles contenant du plomb (anti-détonnant) et le charbon ou le fuel libèrent des métaux lourds dans l'atmosphère lors de leur combustion. Après transport atmosphérique, ces métaux sont déposés principalement par les précipitations et se retrouvent dans les milieux aquatiques.

2.2. Le transport et la circulation

Les agents responsables de l'érosion des sols (l'eau, l'atmosphère) sont aussi les deux principaux agents de transport des métaux traces. Les interactions entre eux et avec la lithosphère sont multiples. Les rejets gazeux contenant des métaux sont transportés dans l'atmosphère puis déposés par les précipitations et se retrouvent dans les milieux aquatiques. S'ajoutent à ces apports indirects tous les apports directs des effluents et des lessivages. La distribution et le transport des métaux dans l'écosystème aquatique sont principalement contrôlés par les sédiments et la colonne d'eau. La mobilisation ou l'immobilisation des métaux à partir des sédiments dépend de la texture physique et de la nature de ces derniers qui en retour déterminent la quantité et les forces de liaison des métaux. Les modes de transport des métaux (sous forme particulaire, colloïdale, ionique ou encore complexée et dissoute...) sont fonction de la composition physico-chimique de la colonne d'eau. Les apports géologiques ou anthropiques façonnent la nature de la surface active des sédiments et du compartiment transporteur, la colonne d'eau. (*in* Moore et Ramamoorthy, 1984). Chaque cours d'eau est ainsi unique eu égard au transport et à la distribution des métaux. Ainsi, en fonction des paramètres physico-chimiques du milieu et de leur propre spéciation, le cheminement des métaux traces, des continents vers les océans, peut être interrompu par une accumulation temporaire dans les sédiments des rivières, des lacs ou des étangs (*in* Cosson, 1987).

2.3. L'accumulation des métaux traces

L'accumulation des métaux traces dans les milieux aquatiques se fait de façon prépondérante sous forme de particules qui sédimentent. Selon la nature de la liaison métal-particule, leur remobilisation sera plus ou moins aisée et fonction des changements des conditions

environnementales. Il faut donc garder à l'esprit que cette accumulation n'est que provisoire et qu'en aucun cas les métaux ainsi piégés ne sont définitivement éliminés des cycles biogéochimiques. (*n* Cosson, 1987).

3. Les métaux traces et les organismes

Avant d'évoquer l'absorption des métaux par les organismes vivants, il nous paraît nécessaire de définir quelques termes relatifs à la contamination.

Le processus de **bioaccumulation** est défini comme étant l'accumulation d'un polluant dans un organisme, résultant d'une contamination directe par l'eau ou indirecte par la voie alimentaire.

La **bioconcentration** d'une substance par un organisme peut se définir comme la prise directe de cette substance dans le milieu environnant, sans tenir compte de l'ingestion et de l'assimilation de matières contaminées. Elle correspond à une voie directe de contamination (transtégumentaire, par exemple). Pour les organismes aquatiques, elle est quantifiée par un **facteur de concentration**, F_c , égal au rapport de la concentration du toxique dans l'organisme par la concentration du même toxique dans l'eau. (*in* Cosson, 1987).

Le processus de **bioamplification** est une forme particulière de bioaccumulation, caractérisée par une augmentation de la concentration dans les prédateurs par rapport à leurs proies (Amiard-Triquet, 1989)

Dans l'environnement aquatique, l'absorption des métaux par les organismes vivants dépend de la concentration du métal et de sa forme chimique (Bordin *et al.*, 1992 *in* Schuhmacher *et al.*, 1995). Le taux d'absorption est dépendant de différents paramètres tels que la salinité, la température, la profondeur, le pH, l'alcalinité, la concentration en oxygène etc... (Hakanson, 1984). Ces variables peuvent directement ou non, séparément ou simultanément, avoir un impact sur la distribution des métaux dans l'eau et les sédiments et aussi sur l'effet écologique potentiel d'une substance toxique donnée (Schuhmacher, 1995). Les facteurs biotiques impliqués dans la bioconcentration sont également de première importance (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991): l'espèce, le mode de vie, la physiologie, l'âge et le sexe des individus peuvent largement intervenir sur le processus (Eisler, 1981; Septier *et al.*, 1991; Dhainaut-Courtois et Romont, 1996; Romont et Dhainaut-Courtois, 1996).

3.1. Métaux essentiels et non-essentiels

Tous les métaux sont potentiellement toxiques pour les organismes, mais il est possible de les distinguer en deux groupes en fonction de la manière dont se manifeste leur toxicité. Les métaux essentiels ou biogènes (tableau 2) sont nécessaires aux activités métaboliques de tous les organismes vivants. Ces éléments sont des composants d'enzymes ou de pigments respiratoires. Par exemple, l'hémoglobine et l'hémocyanine contenant respectivement du fer et du cuivre sont responsables du transport de l'oxygène. Les rôles des métaux au sein de l'organisme sont présentés dans le tableau 3.

En règle générale, les métaux essentiels apportés par l'alimentation sont efficaces à une concentration donnée en dessous de laquelle il peut se produire un phénomène de carence ou au-dessus de laquelle le métal devient toxique (figure 2a). Les carences ou déficiences peuvent entraîner des troubles du fonctionnement : une déficience en zinc peut être à l'origine de l'infantilisme et du retard de croissance (Vallée, 1976).

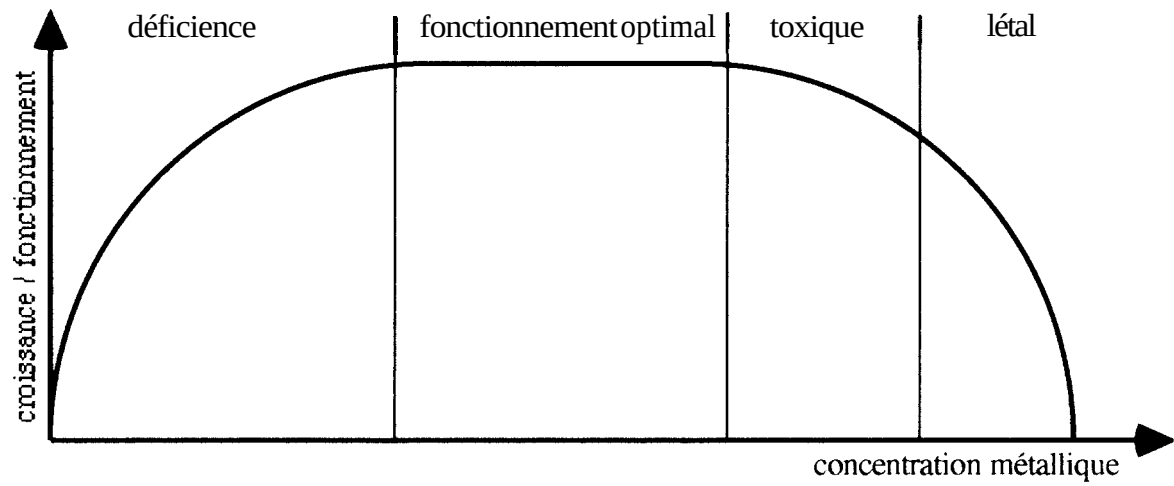
Tableau 2. Métaux essentiels et concentrations nécessaires pour l'homme (en mg/70kg). (numéros atomiques en caractères gras) (d'après Vahrenkamp, 1973).

Période	IA	IIA	Groupe							
3	11	12								
	Na	Mg								
	70	40								
4	19	20	VIB	VIIB	VIII	VIII	VIII	IB	IIB	
	К	Ca		25	26	27		29	30	
	250	1700		Mn	Fe	Co		Cu	Zn	
5			42							
										Mo
										5

Tableau 3. Rôle des métaux au sein de l'organisme. (d'après Simkiss, 1979).

MÉTAUX	SITES D'ACTION	RÔLES
Fer et cuivre	Cytochrome oxydase, diverses enzymes	Transfert des électrons
Calcium (métalloenzymes)	Amylase	Hydrolyse des polysaccharides
Manganèse (métalloenzymes)	Pyruvate carboxylase	Métabolisme des hydrates de carbone
Fer (métalloenzymes)	Catalases	Destruction du peroxyde d'hydrogène
Cobalt (métalloenzymes)	Methyl malonyl CoA mutase	Biosynthèse des acides gras
Zinc (métalloenzymes)	Anhydrase carbonique	Hydratation du dioxyde de carbone
Molybdène (métalloenzymes)	Xanthine oxydase	Métabolisme de la purine
Magnésium (activateur)	DNAase	
Zinc (activateur)	Acylase	Hydrolyses

a



b

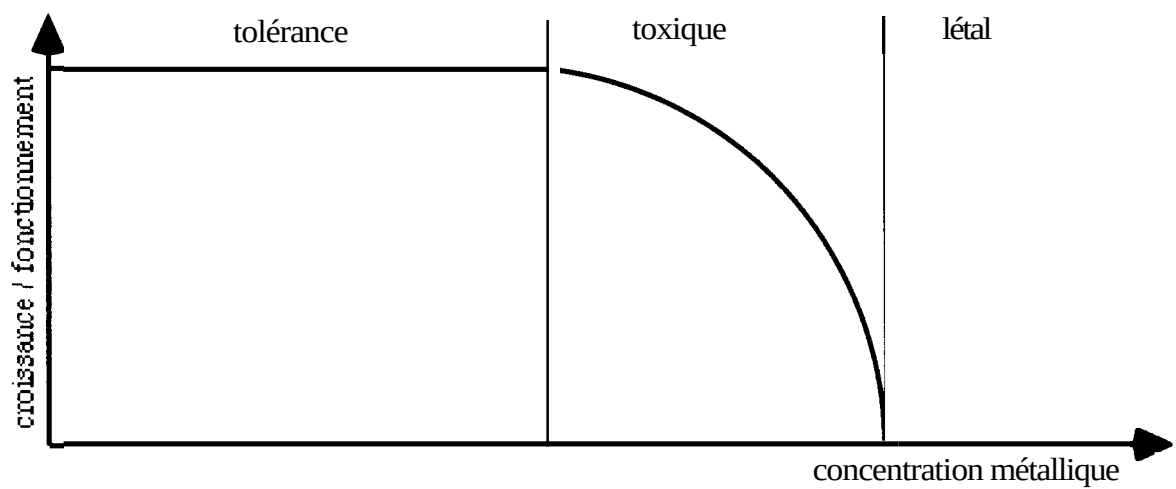


Figure 2. Effets des métaux traces sur l'organisme. (d'après Baccini *et al*, 1976)

a: Cas des métaux essentiels

b: Cas des métaux non essentiels

Les métaux non-essentiels sont des métaux pour lesquels aucun effet favorable n'a été mis en évidence quelles que soient les concentrations testées. La figure 2b présente leurs effets sur l'organisme.

Qu'il s'agisse d'éléments essentiels ou d'éléments indésirables, ceux-ci pourront donc être absorbés, véhiculés et stockés au sein des organismes, et éventuellement éliminés (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991). Ce processus a été décrit dès 1982 par Simkiss *et al.* pour les cations divalents.

3.2. Les métaux et les invertébrés

Les invertébrés regroupent de nombreux embranchements, il est alors difficile de généraliser les réponses des animaux à une contamination par les métaux traces. Les effets dépendent d'un grand nombre de facteurs intrinsèques tels que l'âge, la taille, le sexe, le stade reproducteur, et le rang nutritionnel (Moore et Ramamoorthy, 1983; Dhainaut-Courtois et Romont, 1996; Romont et Dhainaut-Courtois, 1996).

Chez les aselles (*Asellus* sp.) qui sont des détritivores benthiques continuellement en contact avec les sédiments et peu sensibles aux contaminations métalliques (Brown, 1976; Lewis, 1986), la résistance dépend des interactions métalliques et des concentrations dans les sédiments. En effet, *Asellus meridianus* tolère le plomb et le cuivre si l'eau et les sédiments contiennent une forte concentration en cuivre et des traces de plomb. Par contre, si les concentrations en cuivre et en plomb sont fortes, l'aselle n'est résistante qu'au plomb (Brown, 1976). Chez ces crustacés, la sensibilité vis-à-vis des métaux va donc dépendre de la teneur d'un métal par rapport aux autres et non pas de la charge métallique totale. Le rôle des facteurs physico-chimiques est également très important; le pH intervient sur l'accumulation du plomb tandis qu'il n'a pas d'effet sur celle du Zn qui est régulée par l'organisme (Lewis, 1986). Il faut signaler également que l'accumulation du cadmium chez *Asellus aquaticus* diffère chez les mâles, les femelles ou les juvéniles. De plus, les juvéniles nés de parents élevés dans des concentrations subléthales de cadmium ont une sensibilité accrue par rapport aux parents (Giudici *et al.*, 1986).

Le crustacé décapode *Paratya tasmaniensis*, intoxiqué par du cadmium (0,3 mg/l pendant 96 heures) présente une dégénérescence des mitochondries et une dilatation des membranes du réticulum endoplasmique granulaire (Lake et Thorp, 1974). À un taux de cadmium de 900 ppm dans le sédiment, les diptères du genre *Chironomus* disparaissent (Wentzel et McIntosh, 1977). L'exposition des mollusques *Anodonta cygnea* et *Unio elongatulus* au cadmium provoque une importante diminution du taux des métaux essentiels suite à une inhibition de la capacité régulatrice au niveau des branchies (Cassini *et al.*, 1986).

Rondelaud et ses collaborateurs (1976) ont remarqué que chez le mollusque *Lymnaea truncatula*, le cuivre est excrété par les granules des cellules de la glande digestive au niveau de l'hépatopancréas, qu'il est transporté par les amibocytes au niveau de la région péritentaculaire.

Chaisemartin (1975) rapporte que le cuivre affecte la mue des crustacés à partir de 0,02 mg/l, qu'il réduit la croissance, provoque des troubles respiratoires et d'osmorégulation au niveau des branchies, des troubles ioniques (Na^+ , Cl^- et K^+) dans l'hémolymphe.

D'Angelo et Sijnorile (1973) ont montré que le mercure se trouve essentiellement dans les cellules chloragogènes de l'annélide *Tubifex tubifex* après intoxication. Cependant, il est présent également dans les différentes structures de l'organisme même les plus externes, ce qui suggère que le mercure est absorbé essentiellement à travers le tube digestif et transféré par le milieu intérieur à toutes les cellules de l'organisme. Il a également des effets dépressifs sur le taux de respiration de *Tubifex tubifex* à des concentrations élevées (Brkovic-Popovic et Popovic, 1977). Dorn (1974) trouve que le mercure à des concentrations inférieures à 0,01 mg/l augmente la consommation d'oxygène chez le mollusque bivalve *Congeriuleucophaeta*.

Les concentrations de plomb dans les tissus de mollusques ne sont pas en corrélation avec celles du sédiment; au contraire, c'est l'eau qui joue, comme pour le zinc, le rôle prédominant dans la contamination de ces organismes (Newman et McIntosh, 1982). Le Pb peut provoquer des altérations dans les téguments de l'annélide oligochète *Eisenia foetida* (Wielgus-Serafinska et Strzelec, 1983) ainsi que dans le tissu hématopoïétique de l'annélide polychète *Perinereis cultrifera* (Lunetta-d'Ancona et Russo, 1983). Il provoque une hypersécrétion du mucus chez l'annélide polychète *Nereis diversicolor* (Dhainaut-Courtois *et al.*, 1988).

Chez les mollusques, le zinc à 200mg/l provoque chez l'espèce *Margaritifera margaritifera* une augmentation de la teneur en ce métal avec activation de l'anhydrase carbonique au niveau des branchies et du bourrelet palléal (Labat *et al.*, 1977). Le zinc est adsorbé sur l'exosquelette de *Gammarus aequiconda* Martinov impliquant un important facteur de concentration (Baudin, 1982).

Nous venons de voir que les métaux traces pouvaient s'accumuler et avoir des effets néfastes au niveau d'organes cibles. Mais l'action de ces métaux sur l'individu peut entraîner à plus grande échelle des modifications dans la structure des communautés. Les changements dans la structure et la diversité des communautés de macroinvertébrés ont été étudiés en tant qu'indicateurs de la contamination par les métaux lourds (Lange et Lambert, 1995). Les relations entre la contamination par les métaux lourds et les communautés de macroinvertébrés de 12 cours d'eau sont présentées par Gower *et al.* (1994). Les activités minières ont des effets drastiques sur les communautés des cours d'eau (Kiffney et Clements, 1994; Weis et Weis, 1994; Somerfield *et al.*, 1994; Havens, 1994). De fortes diminutions de la richesse taxonomique et de la diversité spécifique sont notées. Kiffney et Clements (1993) ont comparé les concentrations en métaux lourds dans les macroinvertébrés aux concentrations dans les eaux de rivière et ont conclu que les macroinvertébrés donnent une meilleure indication de la contamination métallique que les analyses d'eau.

3.3. Les métaux et les poissons

Chez les poissons, mais aussi chez les autres organismes aquatiques, il existe trois principales voies de pénétration des micropolluants dans l'organisme:

- au niveau des branchies, les micropolluants peuvent traverser la mince paroi des lamelles branchiales et être véhiculés par l'intermédiaire du sang vers les organes cibles.
- au niveau des téguments. Les organismes aquatiques ont la faculté, selon les espèces et les conditions physico-chimiques, de concentrer les toxiques directement à partir de l'eau par absorption à travers les téguments (Keck, 1977).
- par ingestion d'aliments contaminés (végétaux ou animaux).

Sans faire une liste exhaustive, nous exposons ci-dessous quelques effets des métaux traces sur les poissons. Les différentes études ont été réalisées soit sur des poissons prélevés dans leur milieu naturel, soit sur des poissons intoxiqués expérimentalement par l'eau ou par l'injection de sels métalliques.

L'aluminium

Comparativement à la toxicité des autres métaux lourds, celle de l'aluminium est faible (Sorenson *et al.*, 1974). Cependant, la croissance et la survie du saumon de l'Atlantique (*Salmo salar*) sont fortement diminuées à des concentrations d'aluminium de 124 à 264 ppb pendant une durée d'exposition de 60 jours. Les taux d'ARN et d'ADN, molécules les plus sensibles, sont réduits de façon significative à partir de 71 ppb d'Al pendant 60 jours (McKee *et al.*, 1989).

Le cadmium

Chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), le saumon de fontaine (*Salvelinus fontinalis*), la carpe (*Cyprinus carpio*) et la tanche (*Tinca tinca*), le cadmium provoque des nécroses et des sécrétions de mucus au niveau des téguments et des branchies, et des activations enzymatiques au niveau des reins, du foie, de la muqueuse digestive et des branchies (Schweiger, 1957). Chez les poissons, le cadmium entraîne surtout des anémies et une hyperexcitation précédant des contractions tétaniques dans la musculature du tronc pouvant provoquer des fractures de vertèbres. Ces symptômes seraient dûs à la rupture du rôle du calcium dans l'excitation du muscle strié (Larsson 1977). Un retard significatif de la croissance a été observé chez la truite de rivière (*Salmo trutta*) exposée à 3,4 ppb de cadmium (Benoit *et al.*, 1976). Chez le saumon de fontaine, une exposition au cadmium (10 à 25 ppb pendant 24 heures) provoque, chez le mâle, une hémorragie, une destruction des cellules limitantes des lobules testiculaires (Sangaland et O'Halloran, 1973). Chez la truite arc-en-ciel intoxiquée par le cadmium dans l'eau, 99% du contenu total en cadmium est trouvé dans le foie, le rein et les branchies (Thomas *et al.*, 1983).

Le chrome

Le chrome est plus toxique en eau douce qu'en eau dure. Chez le saumon, il provoque une altération cytologique avec une libération du cortisol au niveau des glandes endocrines (Pickering et Henderson, 1965).

Le cuivre

Pequignot et ses collaborateurs (1975) évoquent une diminution du nombre de cellules à mucus dans les branchies de la carpe et dans le tégument des alevins de truite intoxiqués par du cuivre. Chez la carpe, le cuivre sous forme de sulfate (0,2 ppm pendant 3 semaines) provoque un oedème branchial, des hémorragies rénales avec prolifération des parasites dans les reins et la rate et des corps de dégénérescence dans le foie (Pequignot, 1975).

Le mercure

Le mercure à une concentration de 0,25 à 1,1 ppm provoque chez la truite arc-en-ciel, le saumon, la carpe et la tanche, des altérations cytologiques et des nécroses, ainsi que la sécrétion de mucus au niveau des téguments et des branchies (Schweiger, 1957). Il provoque chez la truite arc-en-ciel exposée à 0,125 ppm pendant une heure des altérations cytologique et des nécroses avec hyperplasie au niveau des branchies (Amend *et al.*, 1969). Chez la truite arc-en-ciel, la présence de méthyl-mercure dans l'eau provoque une hyperplasie avec fusion des lamelles branchiales, un oedème des capsules de Bowmann et une dégénérescencetubulaire au niveau des reins (Wobeser, 1975).

Le plomb

Chez la carpe, le plomb à une concentration de 10ppm provoque l'altération des mastocystes au niveau des branchies et des cellules sanguines, un hématoците et une destruction des macrophages. Une altération du tissu lymphoïde intertubulaire est notée au niveau des reins et une baisse de glycogène dans les muscles. Une destruction des cellules et une accumulation du métal dans la pulpe blanche et diminution des érythrocytes dans la pulpe rouge sont observées dans la rate (Pequignot et Gire, 1975). Chez la même espèce, Pequignot (1975) rapporte que le plomb a une action sur les mastocystes de l'épithélium branchial.

Le zinc

L'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*) intoxiqué par du $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ présente au niveau des branchies des altérations des cellules de l'épithélium avec exfoliation et coalescence. Les érythrocytes sont également déformés (Matthiessen et Brafield, 1973). Le zinc sous cette forme détruit les cellules rénales (Watson et Mc Keown, 1976). Le zinc est plus toxique en eau douce qu'en eau dure (Cairns et Sheier, 1968). Il est également plus toxique à pH 8,0 qu'à pH 6,0 (Mount, 1968).

Les effets des différents métaux traces sur les poissons sont résumés dans le tableau 4.

Tableau 4. Quelques effets des métaux traces sur les poissons.

Métaux traces	Effets
Al	Diminution de la croissance Réduction des taux d'ARN et d'ADN
Cd	Nécroses et sécrétions de mucus (téguments et branchies) Activations enzymatiques (reins, foie, muqueuse digestive, branchies) Anémie Hyperexcitation avec des contractions tétaniques Retard de croissance Hémorragies Destruction des cellules limitantes des lobules testiculaires
Cr	Altération cytologique et libération du cortisol (glande endocrine)
Cu	Diminution des cellules à mucus (branchies et téguments) Oedème branchial Hémorragie rénale Corps de dégénérescence dans le foie
Hg	Altérations cytologiques Nécroses Sécrétions de mucus (téguments et branchies)
Pb	Altération des mastocytes (branchies et sang) Hématocrite Destruction des macrophages Altération du tissu lymphoïde intertubulaire (reins) Baisse du taux de glycogène (muscles) Destruction des cellules de la rate Accumulation dans la pulpe blanche (rate) Diminution des érythrocytes dans la pulpe rouge (rate)
Zn	Altération des cellules épithéliales, exfoliation, coalescence (branchies) Déformation des érythrocytes Destruction des cellules rénales

3.4 Les moyens de défense

Les moyens de défense contre les intoxications par les métaux lourds peuvent être de deux types: les moyens artificiels qui consistent à complexer le métal avec des ligands et de l'empêcher d'atteindre ses cibles et les moyens biologiques qui sont mis en oeuvre par l'organisme lui-même.

3.4.1. Les moyens non-biologiques

La toxicité des métaux lourds (Cd, Zn, Cu et Pb) chez les poissons est diminuée en présence d'éléments complexants tels que l'EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid) et le DTPA (diethylenediamine pentaacetic acid) (Muramoto, 1981). Le DMSA (Mesodimercaptosuccinic acid) et le DMPS (2,3-dimercapto- 1-propanosulfonic acid) sont également des antidotes contre le CuSO_4 chez la souris (Jones *et al.*, 1980) ou chez les rats dont l'excrétion urinaire du HgCl_2 est augmentée en présence de ces chélateurs (Ting *et al.*, 1965). Ces derniers empêchent alors la fixation des métaux dans l'organisme.

3.4.2. Les moyens biologiques

Au cours de l'évolution, les organismes vivants ont développé plusieurs mécanismes de défense contre la toxicité des métaux lourds:

- la diminution de l'absorption du métal qui peut être due à un changement de perméabilité membranaire ou à un piégeage dans la membrane même, suivi ou non d'un rejet dans le compartiment extérieur (Dhainaut-Courtoiset *et al.*, 1988),
- une importante excrétion urinaire du métal (Bryan *et al.*, 1986),
- une excrétion fécale (Bryan, 1967; Nordberg, 1972, Haguenoer et Furon, 1981) qui se fait dans le cas du cadmium par une élimination du métal contenu dans la bile et les sécrétions pancréatiques (Nordberg, 1972; Elinder, 1978),
- une hypersécrétion de mucus (Dhainaut-Courtoiset *et al.*, 1988)
- une accumulation de métal sous forme de concrétions minérales (sphérocristaux) ou dans des lysosomes (Martoja et Martoja, 1984),
- la synthèse de protéines qui fixent les métaux (métalloprotéines)(voir ci-après).

3.4.2.1. Les lysosomes

Il existe un certain nombre d'exemples pour lesquels l'intervention des lysosomes dans le piégeage et l'élimination des cations divalents non-essentiels a été postulé (Dhainaut-Courtoiset *et al.*, 1988). Chez la moule *Mytilus edulis*, 30 à 40 % du cadmium total ont été trouvés au niveau des lysosomes tertiaires (Georges et Pirie, 1979), le reste étant lié à une protéine de type métallothionéine. De même, Ballan-Dufrançais *et al.* (1982) ont montré par microanalyse aux rayons X, la présence

chez *Pecten maximus*, de cadmium dans les lysosomes des amœbocytes de la glande digestive. Selon ces auteurs, les vésicules restent dans les cellules sous forme de corps résiduels et sont à rapprocher des lysosomes tertiaires (George, 1983). Les amœbocytes de la glande digestive joueraient un rôle complémentaire de celui des organes excréteurs pour le nettoyage du milieu intérieur en stockant les métaux véhiculés par le sang.

3.4.2.2. Les sphérocristaux

Les sphérocristaux sont des formations concentriques intracellulaires essentiellement minérales qui apparaissent chez les animaux intoxiqués par les métaux lourds. Principalement composés de phosphates de calcium et de magnésium, ces structures pourraient à la fois jouer un rôle de réserve d'ions essentiels et intervenir dans le piégeage de métaux non-essentiels (Simkiss, 1979; Martoja et Martoja, 1984). Ces formations ont été décrites chez les protozoaires (Simkiss, 1976), les annélides (Boilly et Richard, 1978; Dennaï *et al.*, 1986; Dhainaut-Courtois *et al.*, 1988), les mollusques (Bryan *et al.*, 1977), les crustacés (Becker *et al.*, 1974; Guary et Négrel, 1981; Chassard-Bouchaud, 1982), les insectes (Martoja et Martoja, 1984) et les poissons (voir par exemple Dhainaut-Courtois *et al.*, 1991).

La formation des sphérocristaux et la synthèse des métalloprotéines constituent les mécanismes de détoxification les plus étudiés ces dernières années. Une partie de ce présent travail étant consacré à la métallothionéine de gardon, nous allons développer de façon plus approfondie l'étude de ces protéines de détoxification dans le paragraphe suivant.

4. Les métallothionéines

4.1. Définition

Margoshes et Vallee (1957) isolèrent pour la première fois une protéine fixatrice du cadmium dans le cortex rénal du cheval alors qu'ils travaillaient sur une métallo-enzyme dont le catalyseur aurait été le cadmium. Cette protéine de faible masse moléculaire ne possédait en fait aucune activité enzymatique mais fixait les ions cadmium de façon importante. En plus de sa forte teneur en métal, elle avait également un taux élevé en cystéine. C'est pour cela que Kagi et Vallee (1960) utilisèrent pour la première fois le terme de métallothionéine pour désigner cette protéine. Toutes les caractéristiques de ces protéines ont été progressivement énoncées par différents auteurs (Kagi *et al.*, 1974; Kojima *et al.*, 1976) et récapitulées par Kagi et Nordberg (1979):

- elles possèdent une teneur élevée en métal (Cd, Cu, Zn);
- leur composition en acides aminés est caractéristique: leur contenu en cystéine est élevé (environ 30% de résidus cystéiques correspondant à 20 ou 21 cystéines) mais il n'existe pas de ponts disulfures. Elles ne renferment aucun acide aminé aromatique, ni d'histidine;

- elles fixent généralement 7 atomes divalents, à raison d'un atome pour trois groupements sulfhydriles;
- leur faible masse moléculaire se situe entre 6 et 7 kDa d'après leur composition en acides aminés. Elle est d'environ 10kDa en chromatographie de filtration sur gel;
- elles sont constituées en général d'une chaîne d'une soixantaine d'acides aminés;
- la présence de liaisons Cd-mercaptan leur confère une forte absorbance à 254 nm, l'absence d'acide aminé aromatique se traduit par une faible absorbance à 280 nm;
- elles présentent une stabilité à la chaleur;
- elles ont une distribution caractéristique des résidus cystéiques (par exemple CYS-X-CYS).
- la synthèse des métallothionéines est inductible **par** les métaux lourds mais aussi par les hormones de la famille des glucocorticoïdes (Hyllner *et al.*, 1989), par les cytokines (Schroeder et Cousins, 1990), et diverses formes de stress chimiques et physiques (Kagi et Schaffer, 1988).

En 1987, Fowler et ses collaborateurs proposent, dans un article traitant de la nomenclature des métallothionéines, la définition suivante:

les polypeptides ressemblant à la métallothionéine du cortex rénal du cheval par plusieurs de leurs caractéristiques peuvent être désignés comme "métallothionéines".

4.2. Métallothionéine *sensu stricto*, *sensu lato*, métallobprotéine non-métallothionéine ?

De nombreuses protéines fixatrices de métaux ont été isolées à ce jour. Le terme métallothionéine, comme l'ont défini Kagi et Vallee en 1960, est utilisé pour toutes les protéines qui répondent aux critères structuraux de la métallothionéine isolée du cortex rénal du cheval par Margoshes et vallee (1957) considérée comme étant le standard. En l'absence d'une caractérisation totale des protéines (composition en acides aminés, séquençage,...), il est difficile de les classer dans différentes familles. C'est ainsi que de nombreux auteurs ont préféré utiliser les termes de "metallothionein-like protein" ou de "metal-binding protein" pour les protéines dont la composition en acides aminés et la structure primaire n'étaient pas connues.

Kagi et ses collaborateurs (1984) proposent quant à eux trois classes de métallothionéines (*in* Fowler *et al.*, 1987):

- **Classe 1:** polypeptides dont les localisations des cystéines sont étroitement apparentées à celles rencontrées dans la métallothionéine du cortex rénal du cheval. Cette classe inclut la plupart des métallothionéines animales, les Cu-thionéines de *Neurospora crassa* et d'*Agaricus bisporus* (*in* Turner et Robinson, 1995).
- **Classe II:** polypeptides dont les localisations des cystéines sont apparentées de façon lointaine à celle de la métallothionéine rénale de cheval, comme celles des levures (Winge *et al.*, 1985).

Cette classe comprend les métallothionéines de l'oursin, de nématodes, de plantes supérieures, et des levures *Saccharomyces cerevisiae* et *Candida albicans* (in Turner et Robinson, 1995).

- **Classe III:** polypeptides à thiolates métalliques atypiques auxquels appartiennent les métabolites secondaires des plantes supérieures, des algues eukaryotes et de certains champignons (in Turner et Robinson, 1995).

Bien qu'aujourd'hui, la vulgarisation des techniques de détermination de la composition en acides aminés et de séquençage permette de caractériser de plus en plus facilement les protéines, le problème de leur appellation reste toujours posé par le fait qu'elles ne répondent pas toutes à l'ensemble des critères structuraux de la métallothionéine standard. Stone et Overnell (1985), dans leur travail de synthèse, considèrent plusieurs groupes au sein des protéines fixatrices du cadmium. Tout d'abord la famille des métallothionéines regroupe toutes les protéines qui correspondent exactement aux critères structuraux de la métallothionéine standard du cheval. Un deuxième groupe est constitué des protéines riches en résidus cystéiques, fixant le cadmium, mais affichant une ou plusieurs différences caractéristiques avec la métallothionéine de cheval. Les protéines fixatrices du cadmium, sans **pour** autant présenter des teneurs élevées en cystéine sont considérées comme une catégorie à part. Cosson (1987) considère quant à lui qu'il y a la Métallothionéine, telle que l'a définie Vallee (*in* Kagi et Nordberg, 1979) et des métallothionéines. En effet, les protéines isolées chez des animaux prélevés dans des milieux naturels pollués ou non, ou intoxiqués, ne répondent peut être pas à tous les critères structuraux du standard, mais elles présentent avec lui suffisamment de similitudes structurales et fonctionnelles pour faire partie du groupe des métallothionéines *sensu lato*. Pour notre part, rejoignant l'opinion de Stone et Overnell (1985), nous considérons, comme l'ont proposé Dhainaut-Courtois *et al.* (1991), qu'une distinction peut **être** faite entre les métallothionéines *sensu stricto*, telles que les ont définies Kagi et Nordberg (1979), des métallothionéines *sensu lato* qui présentent beaucoup de similitudes structurales et fonctionnelles avec les métallothionéines *sensu stricto* et des métalloprotéines non-métallothionéines qui sont des protéines fixatrices des métaux et dont les caractéristiques structurales sont différentes de celles des métallothionéines. C'est le cas, par exemple, de l'hémérythrine, métalloprotéine qui lie le fer, le zinc et le cadmium chez l'annélide polychète, *Nereis (Hediste) diversicolor* (Demuynck, 1992; Dhainaut-Courtois et Romont, 1996).

4.3. Ubiquité

Depuis bientôt quarante ans, des protéines semblables à la métallothionéine de cheval ont été découvertes chez de nombreux organismes. En 1987, Cosson a essayé de dresser une liste, aussi exhaustive que possible, des organismes chez lesquels une protéine fixatrice de métaux lourds (essentiellement : Cd, Hg, Cu, Zn) avait été isolée et/ou caractérisée. Cette liste regroupe 109 espèces représentant procaryotes et eucaryotes, règne végétal et règne animal, invertébrés et vertébrés, organismes intoxiqués expérimentalement et organismes prélevés dans les milieux naturels.

4.4. Structure et conservation

Les métallothionéines sont des protéines de faible masse moléculaire. La différence de masse obtenue par chromatographie sur gel (environs 10kDa) ou par la composition en acides aminés (6 à 7 kDa) est due à la forme non-globulaire (Kito *et al.*, 1982)

Les métallothionéines de mammifères sont composées généralement de 61 acides aminés dont 20 à 21 résidus cystéiques. Cependant, la MT-1k humaine et la MT-2 de lapin possèdent une chaîne de 62 acides aminés. Des formes plus courtes existent chez les invertébrés et les champignons. Les deux isoformes de crabe contiennent respectivement 57 et 58 acides aminés. La métallothionéine du diptère *Drosophila melanogaster* est composée de 40 acides aminés. Les métallothionéines fixatrices du cuivre des champignons *Neurospora crassa* et *Agaricus bisporus* sont formées de 25 résidus (*in* Fowler *et al.*, 1987). Des alignements de 71 ou 72 résidus d'acides aminés ont été déterminés pour les formes monomériques et dimériques de la MT de moule, *Mytilus edulis* (Mackay *et al.*, 1993).

La structure primaire des métallothionéines est très bien conservée au cours de l'évolution parmi les différentes espèces, notamment au niveau de la position des résidus cystéiques qui forment des séquences Cys-Cys, Cys-x-Cys ou Cys-x-y-Cys (x et y étant des résidus autres que la cystéine). Les plus importantes variations de l'enchaînement des acides aminés dans les différents organismes sont localisés en dehors de ces séquences. Il existe trois types de zones situées sur la chaîne d'acides aminés des métallothionéines de mammifères (Bonnefous, 1985 d'après les données de Hunziker et Kagi, 1985). Des zones constantes (segments 1 à 7, 28 à 38 et 56 à 61) dans lesquelles la composition en acides aminés est pratiquement invariable, des zones variables, dans lesquelles les fréquences de substitution sont faibles, et des zones très variables où les substitutions sont fréquentes.

La structure de la métallothionéine est divisée en deux domaines α et β (Kagi et Nordberg, 1979) (figure 3). Le domaine N-terminal (β), composé des résidus 1 à 29, forme un groupement ("cluster") comprenant trois atomes de métal reliés à 9 cystéines (figure 4a). Le domaine C-terminal (α), composé des résidus 30 à 61, forme un groupement renfermant 4 atomes de métal reliés à 11 cystéines (figure 4b) (*in* Kagi et Kojima, 1987). A l'intérieur de chaque domaine, des interactions ioniques sont établies entre les atomes de soufre qui appartiennent aux résidus cystéiques et les ions métalliques divalents. L'analyse des spectres réalisés en Résonance Magnétique Nucléaire sur les métallothionéines de foie de lapin a montré que les ions Cu^{++} et Zn^{++} se fixent préférentiellement au niveau du domaine β , alors que les ions Cd^{++} se fixent préférentiellement au niveau du domaine α (Otvos et Armitage, 1980). Par contre, les ions Zn^{+} seront en α et les Cu en β dans une Cu-Zn-thionéine (*in* Cosson, 1987). L'affinité des métallothionéines pour les métaux, classée par ordre croissant, est la suivante: $\text{Zn} < \text{Pb} < \text{Cd} < \text{Cu} < \text{Ag} < \text{Hg} < \text{Bi}$ (d'après Otvos et Armitage, 1980, Waalkes *et al.*, 1984).

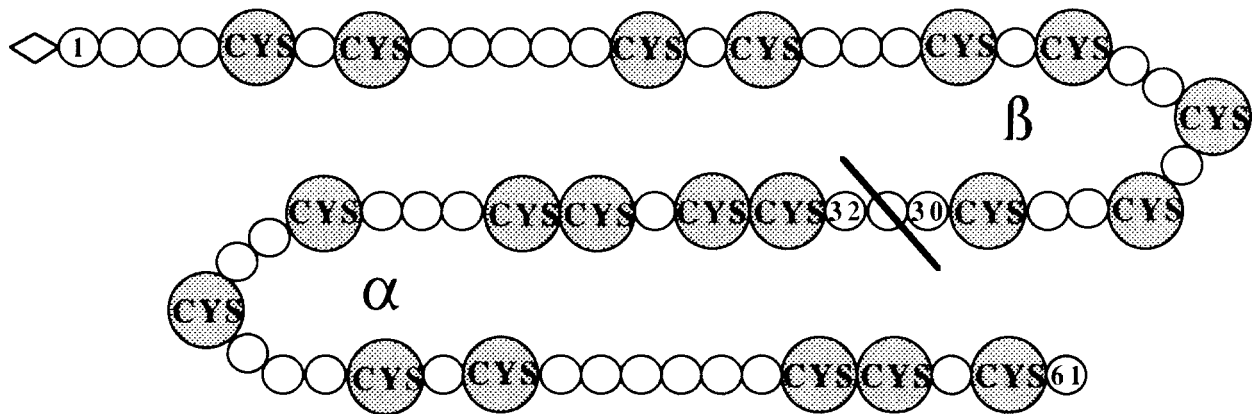


Figure 3. Répartition des résidus cystéines, séparation des chaînes α et β au sein des métallothionéines. (d'après Kagi et Nordberg, 1979).

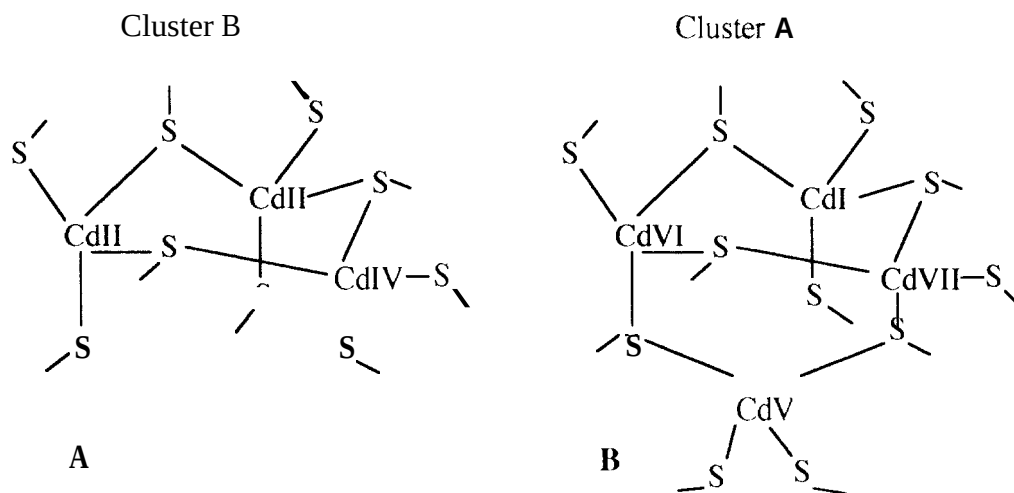


Figure 4. Structure des deux domaines de fixation des métaux de la métallothionéine de lapin. (in Kagi et Kojima, 1987).
A: domaine β (cluster B), B: domaine α (cluster A)

4.5. Rôle. synthèse et dégradation

L'ubiquité des métallothionéines ainsi que la grande conservation de leurs structures indiquent que ces protéines possèdent sans doute des fonctions physiologiques importantes (*in* Erraïss, 1989). Après quatre décennies d'étude des métallothionéines, le rôle de ces dernières n'est pas encore totalement élucidé. Cependant, de nombreux auteurs s'accordent pour attribuer aux métallothionéines un rôle **dans** la régulation du métabolisme de métaux essentiels tels que le zinc (Foulkes, 1981). La proposition de rôles dans des fonctions biologiques naturelles est renforcée par la présence de Cu- ou de Zn-thionéines en forte concentration dans les foies de fœtus et/ou de nouveau-nés de toutes les espèces de mammifères étudiées. Les explications de la présence et du rôle des métallothionéines ne sont toutefois qu'hypothétiques (Webb, 1987). Chez le rat nouveau-né et lors de stades de croissance et de développement, des teneurs élevées de Zn-thionéines et de Cu-thionéines sont détectées dans des tissus à croissance rapide (foie, tractus gastrointestinal, testicules). Ces métallothionéines présentes en grandes quantités doivent servir en tant que stock de métaux essentiels pour le métabolisme des acides nucléiques, la synthèse des protéines et d'autres processus métaboliques (Brady et Webb, 1981 *in* Duquesne, 1992). Le fait que la métallothionéine semble remplir des fonctions physiologiques dans des mécanismes cellulaires normaux a été prouvé de nombreuses fois pour les vertébrés (Cherian et Chan, 1993), tandis que les études sur la fonction physiologique des métallothionéines chez les invertébrés sont encore rares. Chez les crustacés décapodes, la métallothionéine entrerait dans l'homéostasie du cuivre durant la croissance (Engel et Brouwer, 1987 et 1991). Il a également été suggéré que la Cu-thionéine pourrait fonctionner comme un donneur potentiel du cuivre à l'apohémocyanine, la protéine transporteuse d'oxygène des crustacés (Brouwer *et al.*, 1986). Chez l'oursin *Stongylocentrotus purpuratus*, les métallothionéines semblent être impliquées dans diverses régulations d'éléments traces pendant l'embryogenèse (Nemer *et al.*, 1984).

Si la fonction originelle de la métallothionéine n'est pas la détoxification des métaux lourds, mais plutôt une participation (plus ou moins importante selon les espèces ou les phylums considérés) à l'homéostasie du zinc et/ou du cuivre, il ne faut pas pour autant nier **son** rôle dans la détoxification du cadmium par exemple (Cosson, 1987). A ce sujet, Petering et Fowler (1986), résumant les différentes hypothèses concernant le rôle des métallothionéines dans la détoxification du cadmium, proposent un modèle de fonctionnement en cas d'exposition aiguë et chronique. Ce modèle est basé sur de nombreuses études et fait référence tout d'abord au mécanisme rencontré dans le foie et secondairement dans les autres organes tels que le rein dans lesquels la métallothionéine peut être induite. Le cadmium entre dans la cellule et est initialement distribué parmi de nombreux sites ou ligands (Cd-L). Par un mécanisme inconnu actuellement, le métal induit la synthèse d'ARNm qui amène alors à la synthèse d'apo-thionéine. A cause de son importante affinité pour le cadmium, l'apo-thionéine entre . avec succès. en compétition avec les ligands (Cd-L). Le cadmium est alors emprisonné dans les métallothionéines. Quand la métallothionéine est biodégradée, le cadmium qui est

libéré induit de nouveau la synthèse d'apo-thionéine. Un état d'équilibre est alors établi entre le taux de biodégradation et le taux de biosynthèse. Dans ce modèle, il y a deux conditions sous lesquelles le cadmium est toxique: avant l'induction initiale de métallothionéine quand le cadmium est lié au ligand non-métallothionéine et peut alors perturber diverses fonctions biochimiques et lorsque le cadmium pénètre dans la cellule en quantité trop importante. Dans ce cas, le taux de synthèse peut être inférieur au taux de dégradation de la métallothionéine et de libération du cadmium. Ce modèle ne répond pas au problème posé par les intoxications chroniques par de faibles quantités de cadmium. Petering et Fowler (1986) ont émis l'hypothèse suivante: si relativement peu de cadmium entre dans le tissu, il pourrait ne pas être lié à la métallothionéine. Le tissu aurait un seuil d'induction de la synthèse de métallothionéine supérieur à la quantité de métal présent et sous lequel le cadmium se lierait au ligand non-métallothionéine après s'être lié aux métallothionéines présentes à un taux de base normal. Il faut remarquer cependant que les métallothionéines ayant fixé le cadmium chez les mammifères ne sont pas excrétées **par** l'organisme mais s'accumulent au contraire au niveau des reins, y provoquant parfois des lésions (Squibb *et al.*, 1982; Cherian, 1982, *in* Erraiss, 1989).

Les processus de dégradation des métallothionéines sont encore aujourd'hui mal connus. En théorie, les métallothionéines peuvent être incorporées **dans** des lysosomes et former des polymères insolubles secrétés des cellules par exocytose (*in* Duquesne, 1992). La dégradation des métallothionéines semble influencée par la nature des espèces métalliques liées. Le temps de demi-vie de la Cd-thionéine (3,7 jours) est supérieur à celui de la Zn-thionéine (18 à 20 heures) (Feldman et Cousins, 1976). Les apo-thionéines ou les métallothionéines incomplètement insaturées sont plus sujettes à la dégradation par les enzymes protéolytiques (Feldman *et al.*, 1978, Bremmer et Beattie, 1990).

4.6. Quantification

Comme nous l'avons vu précédemment, les métallothionéines ont la propriété d'être induites par les métaux lourds non seulement par des intoxications en laboratoire mais également lors de contamination du milieu naturel. L'intérêt de ces protéines en tant qu'indicateurs biologiques de contamination par les métaux traces a donc rapidement été envisagé. Cependant, lorsque nous projetons d'utiliser les métallothionéines en tant que biomarqueurs de pollution, il est important de ne pas oublier que ces protéines semblent remplir également des fonctions physiologiques apparentées au métabolisme cellulaire normal (Berger *et al.*, 1995). Les métallothionéines sont alors présentes à un seuil normal de fonctionnement cellulaire. Les multiples propriétés caractéristiques des métallothionéines ont **été** exploitées par de nombreux auteurs pour la mise au point de techniques de quantification de ces protéines. Parmi ces propriétés, nous pouvons citer l'absorbance de la Cd-thionéine à 254 nm, la liaison de 7 atomes de métal divalent par mole de métallothionéine, la richesse

en cystéine. la réversibilité de la liaison métal-thionéine ainsi que les forces de liaison métal-thionéine qui sont différentes selon les métaux considérés (*in* Duquesne. 1992).

George et Olsson (1994), dans un travail de synthèse sur les métallothionéines en tant qu'indicateurs de la pollution par les métaux traces, classent les méthodes utilisées pour la détection des métallothionéines ou des ARNm des métallothionéines en deux groupes. Le premier groupe inclut les méthodes indépendantes des espèces (les chromatographies, les saturations métalliques, les méthodes polarographiques), le deuxième groupe comprend les méthodes plus spécifiques (les méthodes immunologiques et la détermination des ARNm des métallothionéines par les acides nucléiques complémentaires).

4.6.1. Les méthodes chromatographiques

Les techniques chromatographiques sont utiles pour diagnostiquer la présence de métallothionéines dans les organismes. C'est d'ailleurs par ces techniques que débutent la plupart des études des métalloprotéines car elles sont facilement repérables dans les fractionnements **par** la présence de métaux ou de groupements sulfhydriles. La procédure la plus commune est la filtration sur gel sur des colonnes de type Sephadex G-75 et le calcul de l'aire du pic de métallothionéine (Chen et Ganther, 1975). Olafson et Thompson (1974) et Bouquegneau *et al.* (1975) ont estimé les teneurs en métallothionéines de fractions isolées par filtration sur gel en analysant les concentrations métalliques et / ou en mesurant l'absorbance à 254 nm.

Par ailleurs, les techniques chromatographiques permettent aussi d'isoler et de quantifier des isoformes (chromatographie par échange d'ions ou en phase inverse).

4.6.2. Les méthodes de quantification par la saturation métallique

Les méthodes de quantification des métallothionéines par la saturation métallique sont basées sur les différences d'affinité des métaux pour ces protéines. Le principe est de saturer les métallothionéines par un métal froid unique ou par son radio-isotope, de le doser et de déterminer la quantité de métallothionéines d'après le rapport qui existe entre ce métal et la protéine (par exemple sept atomes de Cd par molécule de métallothionéine). L'un des principaux problèmes de cette méthode est d'éliminer l'excès de métal sous forme libre et les ligands autres que la métallothionéine. Ceci peut s'effectuer par dénaturation à l'acide ou à la chaleur ou par chromatographie.

La première méthode proposée est celle de Piotrowski *et al.* (1973) qui consiste à saturer les métallothionéines par du mercure radioactif (^{203}Hg). La technique utilise la propriété de la métallothionéine d'être soluble dans l'acide trifluoroacétique et permet d'éliminer les autres protéines susceptibles de lier le Hg. Cette méthode est peu utilisée en raison du manque de sensibilité et des interférences par les composants de faible masse moléculaire liant le Hg tels que le glutathion, le

sélénium, etc. (*in* George et Olsson, 1994). Une autre méthode proposée par Onasaka et Cherian (1982) et modifiée par Eaton et Toal (1982) utilise le cadmium (^{109}Cd) comme métal radioactif saturant. L'ajout d'hémoglobine pure permet de fixer le métal saturant en excès. L'hémoglobine et les ligands du métal autres que la métallothionéine sont éliminés par une dénaturation à la chaleur suivie d'une centrifugation. Cette méthode peut sous-estimer la quantification si la métallothionéine a lié du mercure ou du cuivre qui présentent une très forte affinité pour la protéine. Hamilton et Mehrle (1987) ont utilisé cette technique pour quantifier la métallothionéine dans des extraits de foies de saumons de fontaine (*Salvelinus fontinalis*). En 1986, Scheuhammer et Cherian proposent une méthode de saturation à l'argent dérivée de la méthode au cadmium d'Onosaka et Cherian (1982). Quand la technique de saturation à l'argent est comparée à la technique de saturation au cadmium, d'excellentes correspondances sont obtenues pour la quantification de métallothionéines provenant de diverses sources telles que la Zn-MT II, la métallothionéine d'échantillons de rein et de foie humains et la métallothionéine rénale de rats adultes injectés avec du mercure. Cependant, dans le cas où les échantillons comprennent une grande quantité de Cu-thionéine, la technique au cadmium tend à sous-estimer la concentration en métallothionéine. Ceci est attribué à l'inaptitude du cadmium à déplacer le cuivre dans les conditions de l'étude.

4.6.3. Les méthodes colorimétriques (dosage des groupements sulfhydriles)

La grande quantité de cystéine dans les métallothionéines est un fait unique dans les protéines. Le dosage des groupements thiols par colorimétrie a donc été envisagé pour quantifier les métallothionéines. Ceci est réalisable grâce au réactif d'Ellman (Ellman *et al*, 1961) ou acide dithionitrobenzoïque (DTNB) qui donne une coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la quantité de groupements thiols dans une solution. Cette technique a été employée pour déterminer la quantité de métallothionéines dans des fractions isolées par chromatographie (Tukendorf et Baszynski, 1985; Berthet, 1989). Elle peut également être utilisée pour doser les groupements thiols directement dans des surnageants d'organes. Wofford et Thomas (1984) et Spry et Wood (1989) ont utilisé cette technique après avoir dénaturé le surnageant à l'acide. Dans ce cas, c'est l'ensemble des groupements thiols (métallothionéines, glutathion et cystéines) qui est quantifié. Duquesne (1992) a montré que l'utilisation de cette méthode après dénaturation par la chaleur et filtration par centrifugation ne permet pas de doser la métallothionéine en exclusivité. En effet, après les différentes étapes de purification, l'échantillon contient encore des produits de faibles masses moléculaires provenant de la dégradation des composés de masses élevées.

4.6.4. Les méthodes électrochimiques

La polarographie à impulsions différentielles (DPP) est basée sur la détection d'une variation d'intensité de courant électrique qui apparaît quand un composé est oxydé ou réduit et utilise la

spécificité du potentiel d'oxydo-réduction du composé mesuré. La détermination de protéines contenant des cystéines telles que les métallothionéines par la DPP repose sur la détection du signal donné par la réduction de l'hydrogène des groupements sulfhydriles en présence d'un tampon ammoniacal contenant du cobalt mise au point par Brdiczka en 1933 (*in* George et Olsson, 1994).

4.6.5. Les méthodes immunologiques

Parmi les méthodes développées pour quantifier les métallothionéines dans les échantillons biologiques, les techniques immunologiques sont les plus spécifiques et les plus sensibles. Cependant peu de tests immunologiques ont été élaborés à ce jour du fait de la difficulté d'obtenir des anticorps dirigés contre la métallothionéine (Hogstrand et Haux, 1990). Les avantages des tests immunologiques sont de pouvoir doser de nombreux échantillons en même temps et qu'ils sont applicables quels que soient les métaux liés aux métallothionéines. Les Cu-métallothionéines peuvent ainsi être dosées alors que les techniques de saturation métallique, par exemple, ne le permettent pas (George et Olsson, 1994). Les inconvénients majeurs proviennent du fait que les anticorps anti-métallothionéine ne montrent dans certains cas aucune réaction croisée entre différentes espèces (voir le paragraphe 7.8.) et qu'il est difficile d'obtenir des anticorps de bonne qualité. En effet, les métallothionéines sont faiblement immunogènes même lorsqu'elles sont couplées à des transporteurs (Garvey *et al.*, 1982, Merha et Bremmer, 1983). De plus, l'absence de groupements aromatiques exclut la possibilité d'incorporer directement l'iode radioactif dans la molécule traceuse (Brady et Kafka, 1979). Les tests immunologiques concernant les espèces aquatiques sont adaptés des protocoles développés à l'origine pour la quantification des métallothionéines de mammifères. Deux types de tests sont généralement utilisés pour quantifier les métallothionéines: les RIA (Radio Immuno Assay) et les ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay).

4.6.5.1. RIA

Le principe des RIA est de mettre en compétition une quantité connue de métallothionéines marquées à l'iode radioactif avec la quantité de métallothionéine à déterminer en présence d'anticorps dont la quantité est limitée (insuffisante par rapport au nombre d'antigènes total) (voir, par exemple, Hogstrand et Haux, 1990). Avec l'augmentation de la métallothionéine à déterminer, les chances de liaison des molécules traceuses à l'anticorps vont diminuer. Lorsque la réaction antigène-anticorps (métallothionéine marquée ou non) est terminée, ce complexe est précipité à l'aide d'anticorps dirigés contre le premier et la solution est centrifugée. La radioactivité est alors mesurée dans le culot. Le nombre de pulsions comptées est inversement proportionnelle à la quantité de métallothionéine présente dans l'échantillon à doser. La technique RIA appliquée à la métallothionéine de perche (*Perca fluviatilis*) montre une très bonne corrélation avec le dosage en DPP (Hogstrand et Haux, 1992).

4.6.5.2. ELISA

Afin de permettre la quantification des métallothionéines, les tests de type ELISA sont généralement utilisés en compétition. Une quantité connue de métallothionéine est **déposée** au fond des puits de microplaques (phase solide). L'échantillon à doser est incubé avec l'anticorps anti-métallothionéine présent en quantité connue (phase liquide). Lors de cette pré-incubation, les métallothionéines à déterminer se lient aux anticorps. La phase liquide est ensuite déposée dans les puits des microplaques. Les anticorps libres se lient alors avec les métallothionéines de la phase solide. Après lavage, un deuxième anticorps marqué par une enzyme, dirigé contre le premier, va se lier à ce dernier. La quantité du premier anticorps est alors déterminée à travers l'activité de l'enzyme liée au deuxième anticorps lorsque le substrat est ajouté. La réponse est alors inversement proportionnelle à la quantité de métallothionéines présentes dans l'échantillon à doser.

Actuellement deux tests de type ELISA ont été utilisés pour quantifier les métallothionéines de poissons: l'un pour la métallothionéine de la truite arc-en-ciel (*Onchorynchus mykiss*) (Norey *et al.*, 1990), et l'autre pour la métallothionéine du poisson-chat (*Heteropneustes fossilis*) (Chatterjee et Maiti, 1990). Un test a également été élaboré pour la moule (*Mytilus edulis*) (Roesijadi *et al.*, 1988).

4.7. Immunoréactivité

Chez les mammifères, les deux principales régions antigéniques sont la partie N-terminale acétylée de la métallothionéine (les sept premiers acides aminés) et la séquence d'acides aminés 20 à 25 riche en lysine (Winge et Garvey, 1983, Garvey, 1984, Kikuchi *et al.*, 1990). Des comparaisons des propriétés immunologiques des métallothionéines provenant de différentes espèces ont été réalisées à partir de sérums produits contre les métallothionéines de poisson-chat (*Heteropneustes fossilis*), de truite (*Salmo gairdneri*), de perche (*Perca fluviatilis*) et de cheval (*Equus caballus*) (Chatterjee et Maiti, 1990, Norey *et al.*, 1990, Hylland *et al.*, 1995) (tableau 5). Le sérum produit contre la métallothionéine de truite reconnaît totalement les métallothionéines de plie, de flet, de turbot, de perche, de saumon et de brochet, mais ne reconnaît pas celles de l'homme, de la souris, du rat, du crabe (*Cancer pagurus*) ou de vers (*Lumbricus rubellus*). Une reconnaissance partielle a été trouvée avec les métallothionéines de moules et d'huîtres. Le sérum produit contre la métallothionéine de cheval reconnaît totalement celles de l'homme, de la souris et du rat (Norey *et al.*, 1990). Les métallothionéines de poisson-chat (*Heteropneustes fossilis*) présentent une homologie partielle avec celles de crabe (*Scylla serrata*) et de crapaud (*Bufo melanosticta*) mais pas avec les métallothionéines de mammifères ou d'oiseaux (*Gallus domesticus*) (Chatterjee et Maiti, 1990). Hylland et ses collaborateurs (1995) ont caractérisé les métallothionéines de poissons tropicaux, subtropicaux et de régions tempérées à travers leur relative réactivité vis-à-vis de deux sérums anti-métallothionéine de poisson produits chez le lapin. Le premier est dirigé contre la métallothionéine de morue (*Gadus*

Tableau 5. Immunoréactivité de métallothionéine hépatique de diverses espèces vis-à-vis de différents anticorps polyclonaux.

ALM: Anticorps de lapin anti-MT de morue, ALP: Anticorps de lapin anti-MT de perche, AST: Anticorps de souris anti-MT de truite, ASC: Anticorps de souris anti-MT de cheval, ALPC: Anticorps de lapin anti-MT de poisson chat. Auteurs: 1: Hylland *et al*, 1995, 2: Norey *et al*, 1989, 3: Chatterjee et Maiti, 1990. +: réactivité, (+): faible réactivité, -: pas de réactivité, + -: réactivité partielle, o: non-testé.

		Auteurs: Anticorps:	1 ALM	1 ALP	2 AST	2 ASC	3 ALPC
Espèces							
AGNATHES							
Myxine	<i>Myxine glutinosa</i>		-	(+)	o	o	o
POISSONS							
	<i>Agonus cataphractus</i>		+	+	o	o	o
Acara rouge	<i>Hemichromis bimaculatus</i>		(+)	+	o	o	o
Anguille	<i>Anguilla anguilla</i>			+	o	o	o
Brochet	<i>Esox lucius</i>		o	o	+		o
Flet	<i>Pseudopleuronectes flesus</i>		o	o	+		o
Gardon	<i>Rutilus rutilus</i>		(+)	+	o	o	o
Grenadier	<i>Coryphaenoides rupestris</i>		+	+	o	o	o
Haddock	<i>Melanogrammus aeglefinus</i>		+	+	o	o	o
Hareng	<i>Argentina silus</i>		+	+	o	o	o
Limande	<i>Limanda limanda</i>		+	+	o	o	o
Merlan	<i>Merlangius merlangius</i>		+	+	o	o	o
Merlu	<i>Merluccius merluccius</i>		+	+	o	o	o
Morue	<i>Gadus morhua</i>		+	+	o	o	o
Perche	<i>Perca flavienscens</i>		+	+	+		o
Perche grimpeuse	<i>Anabrus testudineus</i>		o	o	o	o	+
Plie	<i>Pleuronectes platessa</i>		(+)	+	+		o
Poisson chat	<i>Platydoras costalis</i>		+	-	o	o	o
Poisson chat	<i>Heteropneustes fossilis</i>		o	o	o	o	+
Poisson rouge	<i>Carassius auratus</i>		(+)	+	o	o	o
Raie	<i>Raja clavata</i>		+	(+)	o	o	o
Requin	<i>Squalus acanthias</i>		-	(+)	o	o	o
Saumon	<i>Salmo salar</i>		o	o	+		o
Sculpin	<i>Myoxocephalus scorpius</i>		+	+	o	o	o
Silure	<i>Clarias batrachus</i>		o	o	o	o	+
Sole	<i>Solea solea</i>		+	(+)	o	o	o
Truite	<i>Salmo trutta</i>		(+)	+	o	o	o
Truite arc-en-ciel	<i>Salmo gairdneri</i>		o	o	+	-	o
Turbot	<i>Scophthalmus maximus</i>		+	+	+		o
MAMMIFERES							
Cheval	<i>Equus caballus</i>		o	o		+	o
Homme	<i>Homo sapiens</i>		o	o		+	o
Lapin	<i>Oryctolagus cuniculus</i>		o	o		+	o
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>		o	o		+	
Hamster	<i>Cricetus cricetus</i>		o	o	o	o	
OISEAUX							
Poulet	<i>Gallus domesticus</i>		o	o	o	o	
AMPHIBIENS							
Crapaud	<i>Bufa melanosticta</i>		o	o	o	o	+ .
INVERTEBRES							
Lombric	<i>Lumbricus rubellus</i>		o	o			o
Moule	<i>Mytilus edulis</i>		o	o	+ -		o
Huître	<i>Ostrea edulis</i>		o	o	+ -		o
Crabe	<i>Cancer pagurus</i>		o	o			o
Crabe	<i>Scylla serrata</i>		o	o	o	o	+ -

morhua) possédant une méthionine dont la partie N-terminale est "libre", le deuxième contre la métallothionéine de perche (*Perca fluviatilis*) possédant une méthionine dont l'extrémité N-terminale est bloquée. Les essais ont été réalisés sur des gels de polyacrylamide puis en immunoblots. Les métallothionéines des 21 espèces testées réagissent de façon croisée avec au moins l'un des deux antisérums. Les résultats des travaux suggèrent que la partie N-terminale, bien qu'importante, n'est pas fondamentale pour la reconnaissance de métallothionéines de poissons par des anticorps produits chez des mammifères et qu'il existe des régions antigéniques supplémentaires. Les réactivités relatives des deux sérums dirigés contre des métallothionéines provenant d'espèces appartenant à différents groupes taxonomiques reflètent des différences plutôt au niveau de la famille qu'entre des lignées phylogénétiques majeures. D'après l'ensemble de ces études, il semble que les déterminants antigéniques des métallothionéines soient différents chez les mammifères, les oiseaux ou les poissons (Duquesne, 1992). Les métallothionéines de poissons possèdent 3 résidus aminés avant le premier résidu cystéique de la partie N-terminale tandis que les métallothionéines de mammifères en possèdent 4. Ceci peut expliquer l'absence totale de réaction immunologique croisée entre les métallothionéines de poissons et de mammifères (Kille *et al.*, 1991); l'un des principaux épitopes antigéniques étant localisé dans cette région (Winge et Garvey, 1983).

Le sérum anti-métallothionéine de truite produit chez la souris reconnaît de la même manière les apo- et holo-thionéines de truite qui présentent des contenus métalliques différents. Ceci indique que l'antigénicité ne dépend pas de la présence ou de la nature des métaux liés à la protéine (Norey *et al.*, 1990).

4.8. Les métallothionéines chez les poissons

Les métallothionéines ont été étudiées chez de nombreux poissons téléostéens tels que la truite arc-en-ciel (Woodworth *et al.*, 1983, Ley *et al.*, 1983, Roch et MacCarter, 1984, Olsson *et al.*, 1988, Norey *et al.*, 1990,), la perche (Olsson et Haux, 1986, Olsson et Hogstrand, 1987, Hogstrand et Haux, 1990), la loche des pierres (Brown *et al.*, 1987), le poisson-chat (Bentley, 1991), le carrassin doré (Suzuki *et al.*, 1987, Carpene et Vasak, 1989), le gardon (Woodworth *et al.*, 1983, Brown *et al.*, 1986, Bonwick *et al.*, 1991), le chabot (Benson et Birge, 1985), la carpe (Kito *et al.*, 1982), la morue et le flet (Duquesne, 1992) (voir tableau 6).

Les métallothionéines des poissons se trouvent principalement dans les branchies, le foie, les reins et les intestins; de petites quantités sont également présentes dans le sang (Noël-Lambot *et al.*, 1978, Reichert *et al.*, 1979, Kito *et al.*, 1982). Des métallothionéines ont été découvertes chez la loche, le gardon et la truite arc-en-ciel qui ont subi des injections de cadmium par voie intrapéritonéale. Le contenu en métaux était plus faible dans le foie et les reins des truites que chez les loches et les gardons qui sont des espèces plus résistantes aux contaminations métalliques.

Tableau 6. Quelques espèces piscicoles chez lesquelles la métallothionéine a été étudiée.

1P: injection intrapéritonéale

Espèces	Organe	Mode d'intoxication	Auteurs
<i>Anguilla anguilla</i>	Foie	Cd (eau)	Noel-Lambot <i>et al.</i> , 1978
<i>Carassius auratus</i>	Foie	Cd (IP)	Carpene et Vasak, 1988
<i>Carassius auratus</i>	Foie	Cd (Eau et IP)	Suzuki <i>et al.</i> , 1987
<i>Carrassius auratus</i>	Foie et rein	Cd, Zn, Hg (IP)	Marafante, 1976
<i>Gadus morhua</i>	Foie, rein et cerveau	Cd et Zn (IP)	Hylland <i>et al.</i> , 1994
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Foie et rein	Cd (Eau et IP)	Woodworth et Pascoe, 1983
<i>Ictalurus punctatus</i>	Foie	Cd (Eau)	Zhang et Schlenk, 1995
<i>Ictalurus punctatus</i>	Foie	Cd (IP)	Sclenck et Zhang, 1995
<i>Limanda limanda</i>	Foie	Cd (IP)	Duquesne et Richard, 1995
<i>Microstomus kitt</i>	Foie	Cd (IP)	Duquesne et Richard, 1995
<i>Noemacheilus barbatulus</i>	Foie et rein	Cd (IP)	Woodworth <i>et al.</i> , 1983
<i>Onchorynchus kisutch</i>	Foie et reins	Cd (eau)	Reichert <i>et al.</i> , 1979
<i>Pagrus major</i>	Foie	Cd, Zn (IP)	Kuroçhima, 1995
<i>Perca fluviatilis</i>	Foie	Cd (IP)	Olsson et Hogstrand, 1987
<i>Pimephales promelas</i>	Branchie	Cd (Eau)	Benson et Birge, 1987
<i>Pleuronectes platessa</i>	Foie	Cd (Ip)	Overnell et Combs, 1979
<i>Rutilus rutilus</i>	Foie et rein	Cd (IP)	Woodworth <i>et al.</i> , 1983
<i>Salmo gairdneri</i>	Foie	Cd (IP)	Beattie et Pascoe, 1979
<i>Salmo gairdneri</i>	Foie et rein	Cd (IP)	Woodworth <i>et al.</i> , 1983
<i>Salmo gairdneri</i>	Foie	Zn (IP)	Ley <i>et al.</i> , 1983
<i>Scyliorhinus caniculus</i>	Foie	Cd (Eau et IP)	Hidalgo et Flos, 1986

Cependant, aucune corrélation n'a été trouvée entre la quantité de protéines fixatrices du cadmium et la sensibilité de chaque espèce au cadmium (Woodworth *et al.*, 1983). Par contre, il semble exister une corrélation positive entre la concentration en métallothionéine hépatique et le temps d'exposition au cadmium par l'eau chez le gardon. Le taux d'augmentation de la concentration en métallothionéine est plus rapide chez le gardon que chez des espèces plus sensibles telles que certaines espèces de salmonidés (Bonwick *et al.*, 1991). Chez la perche, l'augmentation du contenu hépatique en cadmium est corrélée positivement avec l'augmentation du contenu en métallothionéines (Olsson et Haux, 1986).

Les métallothionéines des poissons sont détectées aussi bien après une exposition aux métaux par l'eau qu'artificiellement par des injections dans la cavité intrapéritonéale. Dans le cas de la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*), la majeure partie du cadmium injecté dans la cavité intrapéritonéale est séquestrée par deux isoformes de métallothionéines. Par contre, lorsque les truites sont exposées au cadmium et au zinc dans l'eau des aquariums, le cadmium est lié à deux protéines de faible masse moléculaire dont les caractéristiques sont différentes de celles des métallothionéines tandis que le zinc est plutôt lié à une métallothionéine. Deux mécanismes semblent donc être impliqués dans la protection contre les métaux lourds (Thomas *et al.*, 1983). Chez la truite arc-en-ciel, le cadmium et le cuivre sont liés par une métallothionéine hépatique de masse moléculaire d'environ 7700 Da lorsque le poisson est injecté par du zinc (Ley *et al.*, 1983). Dans le foie, les reins et les branchies de gardons et de loches, les métaux toxiques sont complexés à une seule forme de métallothionéine (Brown *et al.*, 1986). La masse moléculaire de la métallothionéine de gardon a été déterminée à 6340 ($\pm$ 838) Da par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Lors de l'électrophorèse, la métallothionéine se polymérise en di- et tétramère (Bonwick *et al.*, 1991). Chez la dorade, deux isoformes sont induites par le cadmium et le zinc. Le ratio calculé entre les deux isoformes étant variable selon les concentrations utilisées des deux métaux, les deux isoformes semblent avoir des fonctions biologiques différentes (Kuroshima, 1995). Chez *Ictalurus punctatus* injecté par du cadmium, deux isoformes hépatiques d'environ 10 kDa sont isolées (Zhang et Schlenk, 1995). La séparation des isoformes dépend de la technique chromatographique utilisée. En effet, Olsson et Hogstrand (1987) ont isolé deux isoformes de la métallothionéine hépatique de perche par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) sur une colonne échangeuse d'anions, alors qu'une seule isoforme est séparée en chromatographie DEAE Sephadex **A-25**. Les apo-thionéines hépatiques de perche ont une masse d'environ 6000 Da.

La composition en acides aminés (tableau 7) et la séquence (tableau 8) des métallothionéines de poissons sont proches de celles des métallothionéines de mammifères. Il faut cependant noter la présence de 4 résidus d'acides aminés avant le premier résidu cystéique dans les métallothionéines de mammifères alors qu'il n'y en a que trois dans celles des poissons. L'antépénultième résidu cystéique est en position 55 chez les poissons alors qu'il est en position 57 chez les mammifères.

Tableau 7. Composition en acides aminés (% de résidus) de quelques métagéothionéines de vertébrés.

Espèces	Organes	Isoformnes	Lys	His	Arg	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	AUTEURS
Poissons																				
<i>Cyprinus carpio</i>	Hepato-pancreas	MT-I	11.37	-	-	8.47	7.10	11.23	3.11	4.89	10.64	5.82	34.24	1.98	1.01	0.11	-	-	-	Kilo et <i>ai</i> , 1982
		MT-II	10.09	-	-	9.10	8.47	10.13	3.50	4.16	11.13	5.59	31.90	2.35	1.68	0.99	-	-	-	
<i>Pleuronectes plaessa</i>	Foie		10.24	0	T	9.74	9.37	9.10	5.02	6.44	10.85	2.73	31.12	1.84	2.80	T	0.76	0	T	Chernell et <i>al.</i> , 1979
<i>Anguilla anguilla</i>	Foie	MT-I	10.5	0.4	0.8	8.3	8.8	8.9	6.1	3.9	9.6	6.3	24.4	4.2	1.6	1.3	2.2	0	1.1	Noel-Lambot et <i>ai</i> 1978
		MT-II	9.6	0.8	0.7	9.4	8.4	8.1	7.7	5.3	9.3	6.3	20.0	4.8	1.6	1.3	3.2	0	1.3	
<i>Perca fluviatilis</i>	Foie	MT-I	9.8	0	0	6.9	11.3	10.6	3.3	8.9	12.8	4.5	28.2	2.4	1.2	0	0	0	0	Olsson et Hogstrand. 1987
		MT-II	9.6	0.4	0.6	7.1	9.7	9.7	3.8	7.9	11.0	4.5	30.7	2.6	1.4	0.6	0.9	0.2	0.5	
<i>Salmo gairdneri</i>	Foie		12.2	-	-	10.0	5.4	13.7	6.3	6.7	9.8	5.5	25.2	2.6	1.7	T	0.9	T	T	Ley et <i>al.</i> , 1983
<i>Salmo gairdneri</i>	Foie	MT-I	10.4	0	0	10.1	6.8	14.0	4.2	3.1	9.6	4.8	32.8	1.9	1.3	0	0	0	0	Olsson et Hogstrand. 1987
		MT-II	10.8	0	0	12.5	7.3	15.8	3.5	3.0	9.8	4.9	28.4	1.7	2.2	0.1	0.1	0	0	
<i>Gadus morhua</i>	Foie		11.48	-	-	11.48	9.84	6.56	6.56	3.28	6.56	4.92	32.79	3.28	1.64	-	1.64	-	-	Hylland et <i>al.</i> , 1994
<i>Scyliorhinus caniculus</i>	Foie		19.1	-	5.1	8.2	5.8	6.4	6.4	4.0	7.5	8.7	16.0	4.8	-	3.0	4.1	-	1.4	Hidalgo et Flos, 1986
			11.4	-	3.6	9.7	5.9	8.9	6.3	5.2	10.2	7.2	20.3	5.2	0.1	1.5	3.5	0.5	0.8	
<i>Limanda limanda</i>	Foie	MT-I	6.7	1.5	0	9.7	5.6	16.3	12.5	4.9	20.5	5.3	7.7	3.5	0	1.8	2.5	0	0	Duquesne et Richard. 1994
		MT-II	10.9	0.6	0	9.5	8.0	13.3	7.1	6.9	12.7	3.0	22.5	2.4	0.9	0.6	0.6	0	0	
<i>Microstomus kitt</i>		MT-I	7.0	3.5	0	9.2	7.1	13.9	11.6	5.5	19.3	5.4	9.6	4.0	0	1.6	2.3	0	0	Duquesne et Richard. 1994
		MT-II	9.9	0.5	0	9.5	10.0	8.3	7.7	8.1	10.2	2.8	26.9	3.2	1.2	0.6	1.2	0	0	
<i>Carrassius auratus</i>		MT-I	10.16	-	-	9.6	7.06	11.03		4.04	10.97		31.82	2.07	1.39	0.41	0.47	-	-	Carpene et Vasak. 1988
		MT-II	9.51	-	-	9.18	8.36		11.80	3.80		10.34	31.93	2.82	1.50	0.75	0.77	-	-	
Mammifères																				
<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Foie	MT-I	13.2	-	-	8.0	5.8	12.9	4.5	5	6.5	12.1	28.9	-	1.6	1.4	-	-	-	Nordberg et <i>ai</i> , 1972
		MT-II	11.8	-	-	8.4	5.2	11.8	2.4	9.1	7.2	14.1	26.6	-	1.8	1.7	-	-	-	
<i>Equus</i>	Rein		11.1	-	1.9	5.0	1.8	11.9	4.7	2.9	9.2	11.6	33.9	4.5	1.5	-	-	-	-	Kojima et <i>al.</i> , 1976

Tableau 8. Séquences en acides aminés de métallothionéines de poissons et de mammifères. La numérotation correspond à la celle des séquences de métallothionéines de mammifères.

(1):Kille *et al.*, 1991

(2):Chan *et al.*, 1989

(3):George *et al.*, 1990

(4):Kojima *et al.*, 1976

(5):Kojima *et al.*, 1979

(6):Kimura *et al.*, 1979

	1	10	20
Poissons			
<i>Salmo gairdneri</i> MTA (1)	M D P - C E C S K T G S C N C G G S C K C		
<i>Salmo gairdneri</i> MTB (1)	M D P - C E C S K T G S C N C G G S C K C		
<i>Esox lucius</i> (1)	M D P - C E C S K T G S C N C G G S C K C		
<i>Noernacheilus barbatulus</i> (1)	M D P - C E C S K T G T C N C G A T C K C		
<i>Pleuronectes flesus</i> (2)	M D P - C E C S K T G T C N C G G S C T C		
<i>Pleuronectes platessa</i> (3)	M D P - C E C S K T G T C N C G G S C T C		
Mammifères			
<i>Equus caballus</i> MT1A(4)	M D P N C S C P T G G S C T C A G S C K C		
<i>Equus caballus</i> MT1B(5)	M D P N C S C V A G E S C T C A G S C K C		
<i>Oryctolagus</i> MT1 (6)	M D P N C S C A A B G S C T C A T S C R C		
<i>Oryctolagus</i> MT2 (6)	M D P N C S C A A D G S C T C A T S C K C		
		30	40
Poissons			
<i>Salmo gairdneri</i> MTA (1)	S N C A C T S C K K A S C C D C C P S G C		
<i>Salmo gairdneri</i> MTB (1)	S N C A C T S C K K - S C C P C C P S D C		
<i>Esox lucius</i> (1)	S N C A C T S C K K - S C C S C C P S G C		
<i>Noernacheilus barbatulus</i> (1)	T N C Q C T T C K K - S C C S C C P S G C		
<i>Pleuronectes flesus</i> (2)	K N C S C T T C N K - S C C P C C P S G C		
<i>Pleuronectes platessa</i> (3)	K N C S C T T C N K - S C C P C C P S G C		
Mammifères			
<i>Equus caballus</i> MT1A(4)	K E C R C T S C K K - S C C S C C P G G C		
<i>Equus caballus</i> MT1B(5)	K Q C R C A S C K K - S C C S C C P V G C		
<i>Oryctolagus</i> MT1 (6)	K E C K C T S C K K - S C C S C C P A G C		
<i>Oryctolagus</i> MT2 (6)	K E C K C T S C K K - S C C S C C P S G C		
		50	60
Poissons			
<i>Salmo gairdneri</i> MTA (1)	S K C A S G C V C K G K T C D T S C C Q		
<i>Salmo gairdneri</i> MTB (1)	S K C A S G C V C K G K T C D T S C C Q		
<i>Esox lucius</i> (1)	S K C A S G C I C K G K T C D T S C C Q		
<i>Noernacheilus barbatulus</i> (1)	S K C A S G C V C K G N S C D S S C C Q		
<i>Pleuronectes flesus</i> (2)	P K C A S G C V C K G K T C D T T C C Q		
<i>Pleuronectes platessa</i> (3)	P K C A S G C V C K G K T C D T S C C Q		
Mammifères			
<i>Equus caballus</i> MT1A(4)	A R C A Q G C V C K G A S D K C S C C A		
<i>Equus caballus</i> MT1B(5)	A K C A Q G C V C K G A S D K C S C C A		
<i>Oryctolagus</i> MT1 (6)	T K C A Q G C I C K G A S D K C S C C A		
<i>Oryctolagus</i> MT2 (6)	A K C A Q G C I C K G A S D K C S C C A		

5. Les moyens d'évaluation de la qualité des cours d'eau

Face au problème grandissant de la pollution dans la région, des organismes publics tels que l'Agence de l'Eau Artois-Picardie, les Voies Navigables de France ou le Service Régional de l'Aménagement des Eaux (SRAE) (actuellement DIREN-SEMA: Direction Régionale de l'Environnement - Service d'Etude des Milieux Aquatiques) effectuent des mesures afin de déterminer l'état des eaux et de rechercher l'origine des polluants. Ces mesures sont effectuées soit dans les compartiments abiotiques (eau et sédiments), soit dans ou à l'aide du compartiment biotique (végétaux, macroinvertébrés benthiques, poissons...)

5.1. Les méthodes physico-chimiques et chimiques

Les méthodes physico-chimiques et chimiques utilisées pour évaluer la qualité des cours d'eau sont surtout basées sur le dosage de polluants ou de micropolluants (métaux, pesticides, hydrocarbures, polychlorobiphényles, molécules organiques...). Ainsi, l'Agence de l'Eau effectue des analyses physico-chimiques dans l'eau et les sédiments sur un réseau de mesures qui comporte 189 points (donnée de 1992).

Principaux paramètres mesurés sur l'eau:

- le pH,
- la conductivité,
- le taux de matières en suspension,
- la DB05 (Demande Biologique en Oxygène en 5 jours),
- la DCO (Demande Chimique en Oxygène),
- la teneur en oxygène dissous,
- le pourcentage de saturation en oxygène,
- la teneur en NH_4^+ , NO_2^- et NO_3^- ,
- l'azote Kjeldahl,
- la teneur en PO_4^{3-} ,

Principaux paramètres mesurés sur les sédiments:

- la fraction < à $50\text{ }\mu\text{m}$,
- la fraction insoluble,
- la perte au feu,
- les teneurs en Fe, Mn, Cu, Zn, Pb, Cr, Cd, Hg, **As**.

Dans le cadre d'études spécifiques ou de sous-réseaux, d'autres mesures peuvent être réalisées (analyses bactériologiques, dosage des chlorures...)

5.2. Les méthodes biologiques ou biocénétiques

En plus de l'étude des compartiments eau et sédiment, il est intéressant d'étudier le compartiment biotique et notamment les macroinvertébrés benthiques dont certaines espèces sont indicatrices de milieux sains ou de milieux contaminés. Chessman (1995) qui a mis au point une technique rapide d'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau australiens a choisi de travailler à partir des macroinvertébrés benthiques pour quatre raisons:

- les macroinvertébrés sont ubiquistes et variés et les différents taxons présentent de fortes variations dans leur sensibilité aux polluants;
- ils occupent un rôle central dans l'écologie des rivières et sont présents dans de nombreux maillons de la chaîne alimentaire de par leurs habitudes alimentaires variées;
- ils sont généralement sédentaires et ont un cycle de vie de quelques semaines à quelques années, ainsi la recolonisation se fait lentement après une perturbation;
- ils possèdent une taille suffisante pour l'étude, le stockage et le transport et peuvent être collectés facilement en grand nombre avec un simple équipement léger.

A ces raisons, il convient d'ajouter que l'écologie et la systématique des macroinvertébrés sont aujourd'hui bien connues et que leur habitat se trouvant à l'interface substrat / eau, ils intègrent les altérations de la qualité de l'eau et du substrat (*in* Agences de l'Eau, 1993).

5.2.1. La récolte des macroinvertébrés

5.2.1.1. Les moyens directs

Nous appelons moyens directs l'ensemble du matériel à utiliser manuellement qui permet de collecter les macroinvertébrés directement dans leur milieu de vie (méthodes de capture) en opposition aux méthodes nécessitant une période de piégeage (substrats artificiels). Les principales techniques d'échantillonnage utilisées en eau douce sont décrites dans l'étude bibliographique des méthodes biologiques d'évaluation de la qualité des eaux de surface continentales (Agences de l'Eau, 1993):

- les dragues qui servent à racler le sédiment sur une surface précise afin de prélever la partie superficielle du fond et les organismes qui y vivent.
- les bennes dont les plus connues sont la benne Ekman pour l'utilisation en substrat fin (vase), la benne de Petersen pour les fonds durs et la benne Van Veen. Elles permettent de prélever un volume constant de sédiment.
- les carottiers sont des systèmes tubulaires qui permettent le découpage d'un échantillon (carotte) dans un sédiment. ils sont intéressants pour étudier la répartition verticale du macrobenthos dans le sédiment.
- les filets. Plusieurs types de filets existent: les filets fixés de type Surber universellement employés (voir par exemple Davies et Nelson, 1994; Hayford *et al.*, 1995). constitués de deux cadre articulés

l'un sur l'autre, l'un portant un filet, l'autre délimitant la zone de prélèvement. Les filets poussés sont des sortes de pelles munies d'un filet, poussées dans le substrat sur une surface donnée. Les filets à main ou troubleaux sont utilisés sur une longueur déterminée en général dans les herbiers.

Chessman (1995) utilise pour l'étude des rivières australiennes un filet à main d'une ouverture de 320 x 250 mm et de mailles de 0,25 mm pour collecter les macroinvertébrés après les avoir délogés en remuant le sédiment avec les pieds, en retournant et frottant les pierres à la main. D'autres auteurs collectent à la main pendant un temps donné des végétaux et des pierres qui sont ultérieurement triés (Jespersen, 1990; Brodersen, 1995)

5.2.1.2. Le piégeage par les substrats artificiels

Le prélèvement des invertébrés n'est pas aisé dans les canaux. L'utilisation de carottiers ou de bennes va permettre de capturer la faune endobenthique immobile (oligochètes, mollusques bivalves...) mais la faune épibenthique risque de fuir avant d'être capturée. Les filets à main, peu maniables quand l'eau est relativement profonde (cas des canaux), vont au contraire favoriser la capture de l'épibenthos plutôt que celle de l'endobenthos, le fond des canaux étant souvent recouvert de blocs de pierre qui empêchent parfois l'accès au sédiment meuble. La technique la mieux adaptée à la capture des invertébrés dans les canaux est l'utilisation de substrats artificiels immergés le long des berges. Ces substrats seront colonisés par la faune sédentaire ou par la faune en dérive. De nombreux types de substrats artificiels existent : Regis *et al.* (1980) ont utilisé des substrats de corde pour récolter la macrofaune benthique de la Soane à son entrée dans l'agglomération lyonnaise. Cellot et Bournaud (1988) utilisent des cailloux dans des cages grillagées (immersion pendant 7 jours dans le Rhône). Dethier (1988) a utilisé des paniers en treillis inoxydable (mailles d'un cm) de forme cubique d'environ 20 cm de côté, remplis de cailloux de 3 à 6 cm, immergés pendant un mois pour étudier le Rhône genevois. De Pauw *et al.* (1986) ont choisi la fixation ou la colonisation de substrats artificiels composés de morceaux de briques entourés d'un filet en polypropylène (volume de 4500 cm³) immergés pendant 3 semaines. Le SEMA étudie la faune benthique des canaux du Nordpas-de-Calais en posant des substrats artificiels cylindriques standards, de type CEMAGREF, composés de quatre niveaux en béton et de brosses qui fournissent un abri aux macroinvertébrés (voir paragraphe III. Contexte régional et tableau 14).

5.2.2. Les indices biologiques

Pour les raisons citées précédemment, les invertébrés benthique sont utilisés pour évaluer la qualité des cours d'eau. L'ensemble des méthodes d'évaluation de la qualité des cours d'eau découlent directement ou indirectement du Système Saprobique de Kolkwitz et Marsson (1908). "L'arbre généalogique" des méthodes biocénologiques est présenté sur la figure 5. Deux grands types de méthodes sont utilisées à ce jour (*in* Agences de l'Eau, 1993):

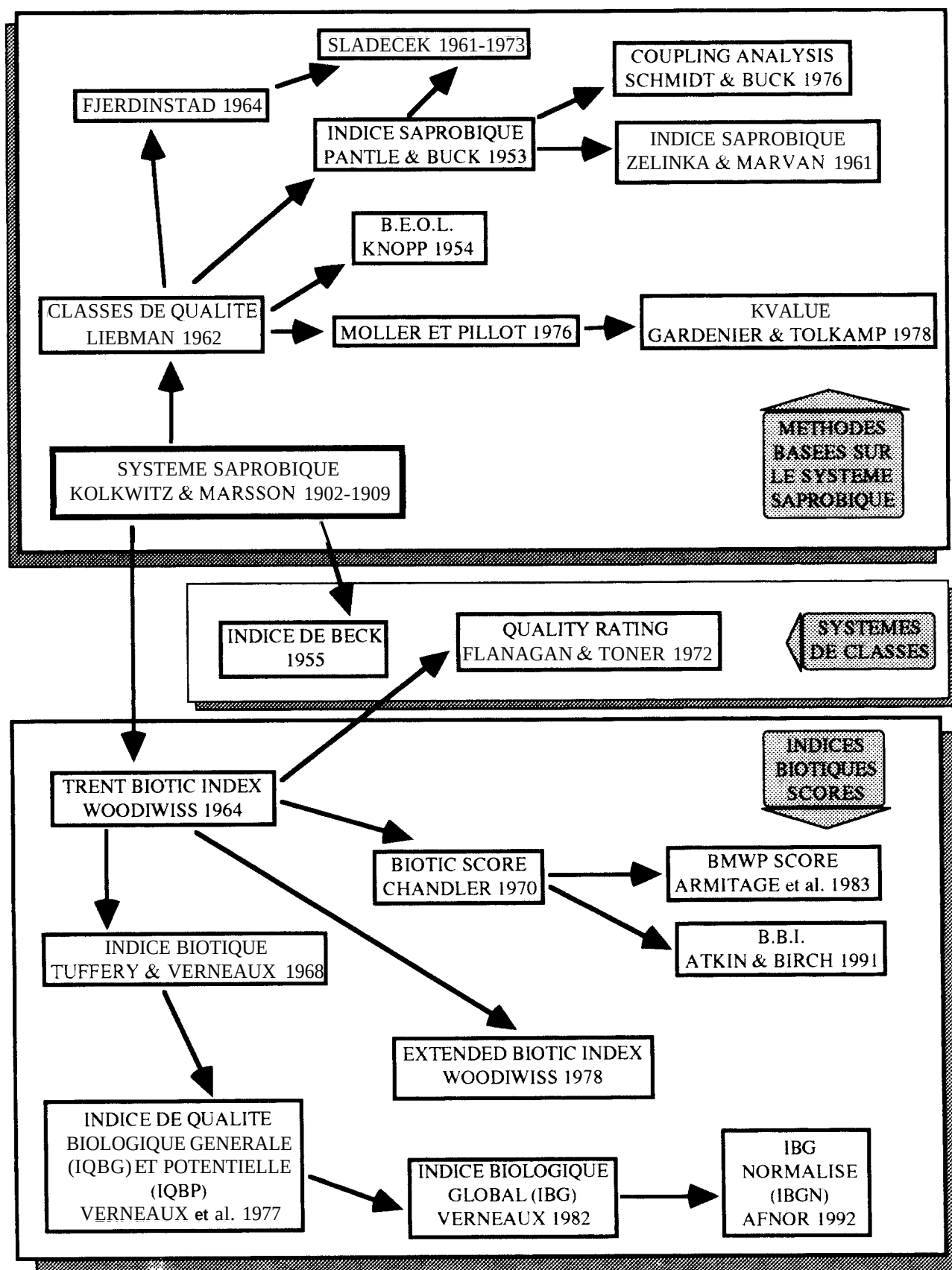


Figure 5. Les différents types de méthodes d'évaluation de la qualité des eaux dérivées du Système Saprobique. (d'après Agences de l'Eau, 1993).

- **Les méthodes basées sur le Système Saprobique**. Au début du siècle, Kolkwitz et Marsson (1908) ont proposé une liste d'espèces indicatrices de la pollution organique des eaux. Ces espèces sont classées selon leur capacité à consommer la matière organique (*in* Ramade, 1989). Ainsi, des groupements d'invertébrés ou saprobies permettent de classer les eaux selon cinq catégories (*in* Dajoz, 1975; Tuffery, *in* Pesson, 1976):

(1) les eaux thiosaprobies chargées d'hydrogène sulfuré dans lesquelles les associations sont composées de bactéries sulfuraires et de quelques rares rotifères.

(2) les eaux polysaprobies riches en matières organiques et à faible teneur en oxygène. Dans ces eaux, il se forme du gaz carbonique, de l'hydrogène sulfuré et du sulfure de fer. Les invertébrés y vivant sont des saprobiontes.

(3) les eaux mésosaprobies α et β moins chargées en matières organiques que les précédentes tendent à une certaine épuration. Dans les zones β mésosaprobies, la matière organique est transformée en nitrites ou en nitrates ou sur le point d'être minéralisée totalement; par contre, dans les zones α mésosaprobies, elle est au stade d'acides aminés, de sels ammoniacaux et de nitrites. Les invertébrés rencontrés dans ces eaux sont dits saprophiles.

(4) les eaux oligosaprobies sont pures et non polluées. Leur concentration en oxygène dissous est proche de la saturation et la teneur en azote organique est inférieure à 1 mg/l.

(5) les eaux catharoprobies sont exceptionnellement pures.

Il faut signaler que la méthode des saprobies est uniquement destinée à définir les divers degrés de la pollution organique bien qu'elle soit utilisée avec abus pour d'autres types de pollution.

- **Les Indices Biotiques et les "Scores"**. Se basant sur le fait que la richesse spécifique augmente naturellement avec l'augmentation des teneurs en sels nutritifs (jusqu'à un certain niveau d'enrichissement), que la structure de la communauté d'invertébrés varie de l'amont vers l'aval selon le rang ou le niveau typologique des cours d'eau, que les divers taxons manifestent une sensibilité différente à la pollution, les auteurs se sont basés sur une approche à la fois quantitative (mesure de la diversité ou de la richesse spécifique) et qualitative (présence ou absence d'espèces indicatrices). Les indices biotiques sont déterminés à l'aide de grilles d'espèces classées selon leur sensibilité à la pollution. Les indices biotiques donnent une valeur de la qualité du milieu qui est aussi fonction de la richesse taxonomique de l'échantillon. Le déséquilibre d'un milieu aquatique, résultant d'une pollution, se traduit en effet par la disparition d'un nombre plus ou moins grand d'espèces caractéristiques de la biocénose et par l'apparition de nouvelles espèces adaptées à cette pollution. Une chute de la valeur des indices, sans explication naturelle (changement de substrat, infiltration, prélèvement d'eau...) témoigne d'une pollution (Khalaf et Lahoud, 1983). Les méthodes des scores donnent un score de qualité du milieu qui résulte de la somme des scores attribués à chaque espèce (note donnée en fonction de la polluosensibilité du taxon et en fonction du milieu où l'espèce est rencontrée).

L'inventaire des méthodes d'évaluation de la qualité de l'eau à l'aide des macroinvertébrés ayant été réalisé par les Agences de l'Eau (1993), le but, ici, n'est pas de faire une liste exhaustive des méthodes existant à ce jour. Nous donnerons simplement quelques exemples d'indices utilisés en France et à l'étranger.

5.2.2.1. L'Indice Biotique

Cette méthode adaptée de l'Indice de Trent (Woodiwiss, 1964) a été mise au point pour les eaux françaises par Tuffery et Verneaux (1968). Douze paramètres conditionnant la nature du milieu doivent être relevés: (1) la catégorie piscicole, (2) la largeur du cours d'eau, (3) la zone écologique où se trouve la station, **(4)** l'altitude, (5) la nature géologique régionale, (6) la nature géologique du lit, (7) la granulométrie du fond, (8) la nature de la couverture végétale, (9) la vitesse du courant, (10) l'éclairement, (11) la turbidité et (12) la couleur de l'eau. La station étant caractérisée, les auteurs proposent d'effectuer trois prélèvements en milieu lentique (zone à courant lent) à l'aide d'un troubleau et trois en milieu lotique (zone à courant rapide) à l'aide d'un filet Surber (lorsque les deux faciès existent). Un tableau à double entrée permet de donner un Indice compris entre 0 et 10. L'Indice est le point de recoupement entre la ligne (groupe faunistique) et la colonne (richesse en unités systématiques). Cette méthode permet de mesurer la qualité le long d'un cours d'eau de façon ponctuelle et de faire des comparaisons entre deux stations d'un même cours d'eau. Cette méthode est applicable à des cours d'eau de faible profondeur mais pas à des fleuves profonds ou à des canaux.

5.2.2.2. Les Indices de Qualité Biologique Globale (IQBG) et Potentielle (IQBP)

Ces indices sont basés sur les mêmes principes que l'Indice Biotique. Pour que la méthode soit plus performante, les auteurs proposent d'échantillonner suivant six couples substrat - vitesse différents (échantillonnage différentiel). L'indice est également déduit d'un tableau à double entrée: verticalement, les groupes faunistiques repères classés par ordre de sensibilité à la pollution, horizontalement, la richesse taxonomique. Si la faune est récoltée à l'aide d'un filet Surber dans les six couples substrat - vitesse, nous obtenons l'IQBG. Pour l'application en milieu profond, il convient d'utiliser des substrats artificiels de type CEMAGREF (à raison de deux substrats par faciès). Dans ce cas, l'indice calculé est l'IQBP qui donne une indication sur la qualité biologique potentielle puisque la colonisation des substrats se fait par la dérive générale des organismes, et par des déplacements secondaires d'amplitudes plus faibles (*in* Agences de l'Eau, 1993). Dans le cas des canaux de la région Nordpas-de-Calais, où le courant est faible, la colonisation se fait moins par la dérive que par des déplacements volontaires des organismes dus à l'attrait qu'offrent les substrats en tant que nouveaux habitats.

5.2.2.3. L'Indice Biologique Global Normalisé (IBGN)

Cet indice fait l'objet d'une norme AFNOR NFT90-350 (1992). L'IBGN correspond à la combinaison du couple nature (ordonnées)- variété (abscisse) de la macrofaune benthique déterminé à partir d'une grille comportant 9 groupes faunistiques repères. Des prélèvements sont effectués à raison de 8 par station dans des habitats distincts (8 couples substrat - vitesse) à l'aide de filet de type Surber en faciès lotique ou en troubleau en faciès lentique. La valeur de l'indice varie de 0 (très mauvaise qualité) à 20 (très bonne qualité). Cet indice est applicable à de nombreux cours d'eau excepté la zone des sources, certains cours inférieurs des grands cours d'eau et les milieux atypiques tels que les canaux et les zones estuariennes.

5.2.2.4. L'Indice Chironomidien

L'Indice Chironomidien (Bazerque *et al.*, 1989) est basé sur l'étude de la structure des peuplements de chironomides. Les exuvies des chironomides sont collectées à l'aide d'un filet à dérive de type Brundin. Après détermination du nombre et de l'abondance relative des espèces de chironomides de l'échantillon, l'indice est déduit d'un tableau à double entrée comprenant horizontalement la structure des peuplements mesurée par la richesse spécifique ou l'indice de Shannon-Weaver (1949) et verticalement la liste d'espèces indicatrices rangées en fonction de leur sensibilité croissante à la pollution. La valeur de l'indice est comprise entre 1 et 10. Cette méthode est applicable tout le long des cours d'eau, quels qu'ils soient, et elle reflèterait bien la qualité globale du milieu puisqu'elle intègre la qualité de l'eau et celle du substrat.

5.2.2.5. Les indices utilisés à l'étranger

En Grande-Bretagne, le score BMWP (Biological Monitoring Working Party, 1979) est utilisé de préférence dans les cours d'eau à faciès lotique. Les macroinvertébrés sont échantillonnés en remuant le substrat avec le pied en amont d'un filet standard pendant trois minutes dans tous les habitats les plus importants. A chaque famille collectée, selon sa tolérance à la pollution, correspond un score qui est une note de 1 à 10. Le score BMWP est la somme des Scores des familles présentes dans l'échantillon. Chessman (1995) a adapté cette méthode aux macroinvertébrés et aux rivières d'Australie. Le logiciel RIVPACS (River Invertebrate Prediction And Classification System) mis au point par l'"Institute of Freshwater Ecology" de Grande-Bretagne en 1980, permet de prédire pour un milieu donné la liste des taxons qui peuvent être présents en fonction de certaines variables physiques et/ou chimiques du milieu étudié. A partir de la liste obtenue, il est possible de calculer le score BMWP qui est comparé au score obtenu par l'échantillonnage.

L'Indice Biotique Belge (BBI) a été normalisé par l'Institut Belge de Normalisation en 1984 (NBN 1984). Il est basé sur l'Indice Biotique de Tuffery et Verneaux (1968) avec des adaptations au niveau du protocole d'échantillonnage et en particulier l'utilisation de substrats artificiels peu coûteux.

permettant de travailler dans des cours d'eau importants tels que les canaux. D'après De Pauw et ses collaborateurs (1992) qui ont testé deux types de substrats (un filet plastique rempli de morceaux de brique ou une boîte remplie de billes), cette méthode fournit des informations sur l'effet des pollutions organiques et inorganiques, des pollutions toxiques aiguës, de changements du milieu physique, et sur le phénomène d'autoépuration.

5.2.2.6 Les autres méthodes

Citons pour mémoire qu'il existe de nombreuses autres méthodes qui utilisent les organismes vivants pour évaluer la qualité des cours d'eau telles que, par exemple, les méthodes utilisant les bryophytes (Empain, 1978) ou les diatomées (Prygiel, 1991; Prygiel et Coste, 1993).

5.3. Les méthodes biochimiques

Les méthodes biocénétiques permettent de donner une évaluation de l'état actuel du milieu étudié alors que les effets des polluants ont déjà perturbé les communautés. L'intérêt d'utiliser une approche biochimique réside en sa capacité de prévention. En effet, si l'effet d'une pollution peut être détecté au niveau de l'individu, des mesures peuvent être entreprises avant que l'ensemble de la structure du peuplement ou de la communauté soit atteint. Haux et Forlin (1988) ont défini plusieurs critères que doit posséder un indicateur biochimique:

- la réponse de l'indicateur doit être détectable avant que l'ensemble de la population ne soit affectée par une contamination excessive,
- sa réponse doit être aussi spécifique que possible afin d'identifier un composé ou un groupe de composés chimiques responsables,
- sa réponse doit permettre d'établir une relation "dose-réponse" liée au degré de la pollution en prenant en compte les facteurs endogènes et exogènes qui affectent la réponse.

La métallothionéine qui répond à ces différents critères a déjà fait l'objet de méthodes d'évaluation de la pollution de milieux aquatiques par les métaux traces grâce à son dosage dans les organes de poissons (reins, foie, branchies) (Roch *et al.*, 1982; Olsson et Haux, 1986; Hogstrand et Haux, 1990; Sulaiman *et al.*, 1991). La métallothionéine du gastéropode terrestre *Helix pomatia* est également utilisée comme biomarqueur de l'exposition au Cd (Berger *et al.*, 1995).

III. CONTEXTE REGIONAL

1. Historique: aménagement des cours d'eau dans le Nord/Pas-de-Calais

La région Nord/Pas-de-Calais, riche en zones humides en raison du mauvais drainage naturel et des pentes relativement faibles, constitue l'extrémité ouest de la vaste plaine de l'Europe septentrionale qui, née au pied de l'Oural, vient mourir au nord du Cap Gris-Nez, au niveau de la Flandre-Maritime.

A l'époque romaine, cette région de basses terres était, pour une grande partie, recouverte de marécages. La façade maritime était envahie par la mer qui s'enfonçait à marée haute jusqu'à Saint-Omer par le delta de l'Aa. Depuis le haut Moyen-Age, les populations locales ont lutté pour assurer la continuité du cordon littoral afin de protéger les terres intérieures de l'invasion de la mer et pour assécher les lagunes subsistant derrière ce cordon. Ainsi, des barrages ont **été** construits sur l'Aa qui permettaient l'écoulement des eaux de source et de pluie à marée basse et la réduction de l'invasion de la mer à marée haute. En raison de la nécessité pour les populations du maintien près de la surface d'une nappe d'eau douce superposée à l'eau saumâtre du sous-sol, des ingénieurs hollandais vinrent quadriller les marais avec des canaux (les watergangs) et des digues. Des moulins à vent pompaient les eaux pour les relever et permettre leur écoulement.

Ces canaux ont été peu à peu utilisés pour le transport des personnes et des marchandises. Ainsi, le développement de l'agriculture et des villes a été, de tout temps, lié à la construction des canaux. Les canaux et les stations de pompage associées ont permis le contrôle du niveau de la nappe phréatique. L'homme a pu ainsi rendre fertiles des terres qui ne l'étaient pas.

A la fin du 19^{ème} siècle, les industries se sont installées le long des canaux existants, afin d'utiliser l'eau nécessaire à la fabrication, au refroidissement des machines et au nettoyage des installations. Ces voies d'eau étaient également utilisées pour le transport des matières premières et des produits finis. C'est à cette époque que le réseau des voies navigables s'est développé par l'aménagement des rivières et la construction de nombreux canaux pour les besoins de l'industrie.

Actuellement, les canaux contribuent encore beaucoup à la vie économique de la région dans les domaines suivants:

- l'irrigation et le drainage des terres agricoles,
- la protection contre les inondations,
- le soutien des étiages,
- l'alimentation en eau urbaine et industrielle.
- le transport des marchandises.

C'est pour ce dernier point que les canaux ont subi et subissent encore de nombreux aménagements (consolidation des berges, curages, élargissement, construction d'écluses).

Actuellement, le réseau des voies navigables du Nord/Pas-de-Calais, d'une longueur de 680 km, comporte trois types de canaux adaptés aux activités de transport:

- Un canal à grand gabarit qui relie Lille et Valenciennes à Dunkerque. Ce canal, artère maîtresse du réseau, permet la navigation de convois poussés de plus de 3000 tonnes. Il est composé des canaux suivants:
 - le canal de l'Escaut de Valenciennes à Bouchain (à l'aval de Valenciennes, ce canal est relié au réseau belge).
 - le canal de la Sensée, de Bouchain à Douai,
 - le canal de la Deûle, de Douai à Lille en passant par Billy-Berclau.
 - le canal d'Aire, d'Aire-sur-la-Lys à Billy-Berclau,
 - le canal de Neuffossé, d'Aire-sur-la-Lys à Saint-Omer,
 - une partie de l'Aa canalisé, de Saint-Omer à Ruminghem,
 - le canal de Bourbourg, de Ruminghem à Dunkerque,
- Un canal à gabarit intermédiaire (canal du Nord) qui permet la navigation de convois de 800 tonnes. Ce canal assure la liaison entre la région Nord/Pas-de-Calais et la région parisienne,
- Des canaux à petit gabarit dont l'intérêt principal est de relier des villes économiquement importantes au canal à grand gabarit. Ces canaux sont :
 - le canal de la Sambre à l'Oise,
 - le canal de Saint-Quentin,
 - le canal de Lens,
 - le canal de Roubaix,
 - le canal de Furnes,
 - le canal de Bergues,
 - le canal de Bourbourg,
 - le canal de Calais.

Les canaux à petit gabarit regroupent également les rivières et fleuves canalisés tels que la Deûle, la Lys, la Scarpe, l'Escaut, la Sambre et l'Aa dont l'estuaire a été remplacé par un chenal canalisé au 18^{ème} siècle (Saunier. eau et environnement. 1989).

Ces nos jours, le public montre un engouement particulier pour les canaux et autres zones humides, ce qui leur confère un rôle touristique et de loisir. Ainsi, de nombreux équipements et

installations ont été réalisés pour ces nouveaux besoins: bases, relais et haltes nautiques. Ce rôle touristique et de loisir est essentiellement tenu par les canaux à petit gabarit.

(Les données de l'historique sont tirées des articles et ouvrages suivants: Direction Régionale de la Navigation du Nordpas-de-Calais, 1986; Dambre, 1989; Graveline, 1991)

2. Qualité des cours d'eau de la Région Nord/Pas-de-Calais

Les activités économiques de la région Nord/Pas-de-Calais sont directement liées à l'évolution des cours d'eau; ainsi de nombreuses villes et agglomérations se sont développées à proximité immédiate de ceux-ci. Les canaux sont alors devenus de bons moyens pour évacuer les eaux usées urbaines. Actueiement, de nombreux réseaux urbains sont reliés à des stations d'épuration afin de limiter les rejets ménagers dans les cours d'eau. La situation en 1990 (tableau 9) montre que globalement la capacité des stations d'épuration paraît suffisante en regard du nombre d'habitants dans le département du Nord. Cependant, la capacité d'épuration de certains arrondissements est trop faible par rapport à l'importance de la population (cas d'Avesnes-sur-Helpe: capacité de 195 000 eqH pour 245 **460** habitants, et Valenciennes: 3 14 500 eqH pour 349 262 habitants). De plus, la pollution industrielle de type organique rejetée dans le milieu dans le Nord/Pas-de-Calais est d'environ 3 200 000 eqH (DRIRE, 1992). Bien qu'il existe des systèmes d'épuration, des effluents toxiques et organiques sont rejetés dans le milieu naturel. La situation en 1979 (Noël *et al.*, 1980) est présentée par la figure 6. Cette situation s'est améliorée pour les rejets toxiques, mais les résidus anciens piégés dans les sédiments posent encore de sérieux problèmes de nos jours.

Bien que des efforts soient effectués pour améliorer les stations d'épuration et en augmenter le parc (exemple de la nouvelle station d'épuration de Douai mise en service en 1993), ces stations sont encore trop peu nombreuses et n'ont pas un rendement suffisant. Un bon nombre de stations n'effectuent qu'un traitement partiel des effluents et rejettent ainsi de l'azote directement dans le milieu après l'avoir, en quelque sorte, concentré. De plus, bien que l'azote organique soit relativement bien oxydé dans les stations, le rendement est parfois insuffisant pour arriver aux nitrates; selon Bacrot (1983), les rejets seraient donc sous forme ammoniacale asphyxiante pour le milieu. Il faut ajouter à cela toutes les installations qui ne sont pas encore reliées aux réseaux et dont les effluents ne subissent aucun traitement avant d'être rejetés. Les polluants liés aux rejets domestiques sont essentiellement : les nitrates, les phosphates, les détergents, l'azote ammoniacal, des matières organiques, certains métaux lourds, des hydrocarbures, des pesticides, des polychlorobiphényles (PCB),...

Tableau Y. Populations du département du Nord et stations d'épuration: situation en 1990

eqH: équivalent habitant

eqH 54 DCO: équivalent habitant ramené à 54 g de Demande Chimique en Oxygène
(Service d'Assistance Technique à l'Exploitation des Stations d'Épuration, 1989)

ARRONDISSEMENTS	NOMBRE DE COMMUNES	NOMBRE D'HABITANTS	NOMBRE DE FILIERES	eqH	CAPACITE	
					DCO	eqH 54
Avesnes-sur-Helpe	1 5 1	245 460	1 9	195 000	2 20 320	
Cambrai	1 1 5	162 162	1 7	161 300	181 690	
Douai	6 4	247 015	1 8	237 100	258 700	
Dunkerque	1 1 5	375 073	3 1	522 260	580 340	
Lille	1 2 5	1 152 883	1 8	1 332 300	1 729 560	
Valenciennes	8 2	349 262	1 7	314 500	329 160	
Total NORD	6 5 2	2 531 855	1 2 0	2 762 460	3 299 770	

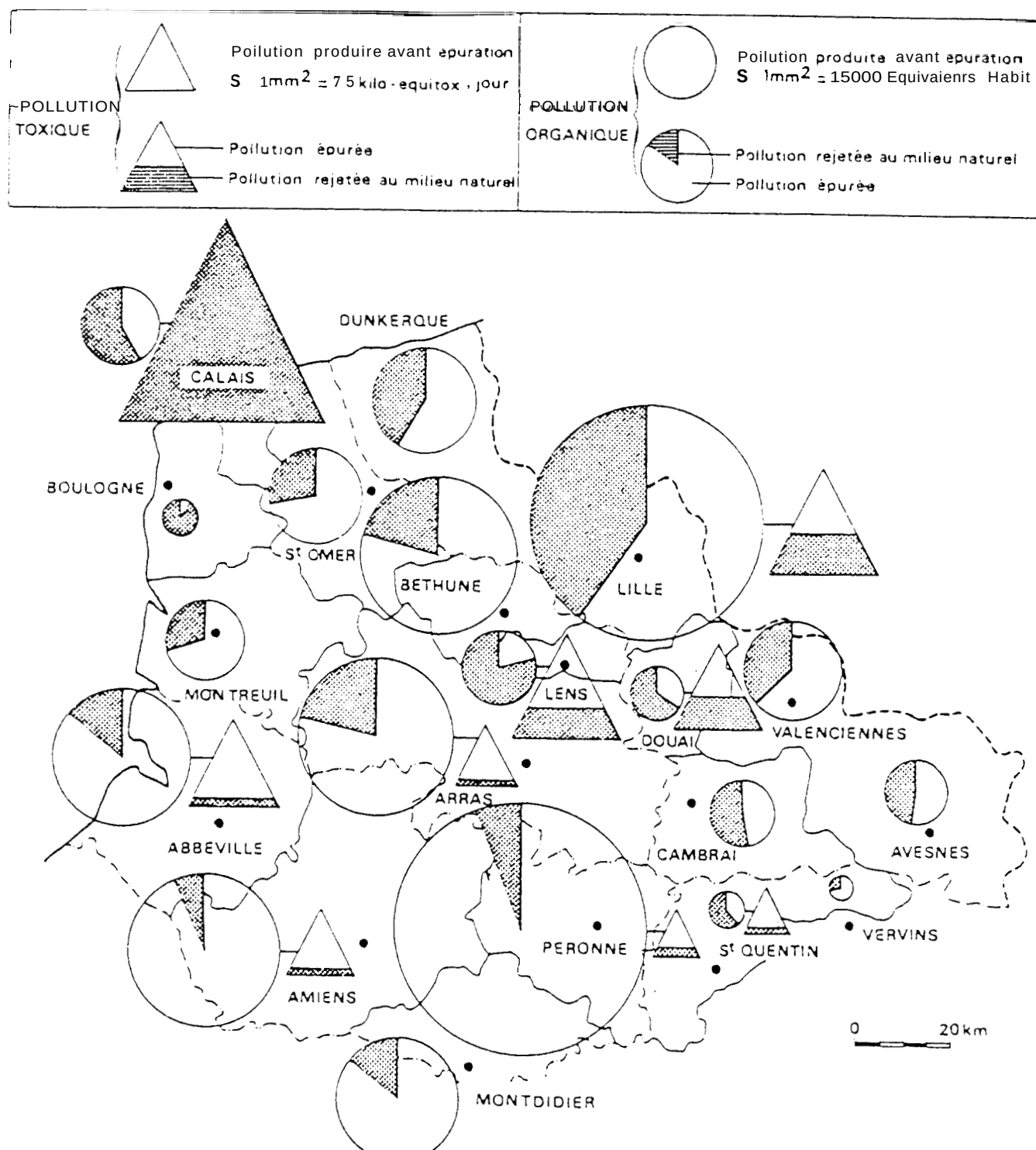


Figure 6. Répartition géographique des pollutions par arrondissements en 1979.
(Noel *et al.*, 1980)

Pour des raisons économiques (cf. historique), les industries se sont installées le long de la voie d'eau. Les principales industries situées le long du canal à grand gabarit sont présentées dans le tableau 10 et leur situation géographique est visualisée sur la figure 7. La majeure partie des industries est localisée le long des canaux de la Deûle, de la Scarpe et de l'Escaut dans le Bassin Minier. Une grande partie est constituée d'industries chimiques, parachimiques et métallurgiques qui rejettent essentiellement des polluants toxiques tels que les métaux traces et d'industries alimentaires responsables le plus souvent d'une pollution organique. Ces industries contribuent à la dégradation des cours d'eau en rejetant des effluents chargés en éléments polluants. Concernant les métaux lourds, les plus importants rejets industriels de la région sont repris dans le tableau 11.

Les valeurs des paramètres mesurés dans l'eau et les sédiments le long du canal à grand gabarit sont résumées dans les tableaux 12 et 13. L'ensemble des paramètres considérés permet d'apprécier le degré de pollution organique et minérale du canal à grand gabarit depuis l'amont jusqu'au littoral et ainsi de classer l'eau analysée selon une grille de qualité générale allant de 1 (qualité la meilleure) à 4 (qualité la plus mauvaise). Ces tableaux montrent que le canal à grand gabarit est nettement pollué, notamment dans le douaisis où les points d'analyse présentent les plus fortes teneurs métalliques dans les sédiments (tableau 13) et des eaux de classe 4 (tableau 12). C'est dans cette zone que nous avons relevé la plus forte concentration industrielle (figure 7). A Courrières, par exemple, les sédiments sont très fortement chargés en Cd (plus de 1000 ppm), en Pb (plus de 7000 ppm), en mercure (plus de 28 ppm) et en arsenic (plus de 140 ppm). Les points les moins pollués tant sur le plan des sédiments que de l'eau sont celui de Férin en amont de Douai sur le canal de la Sensée et celui de Ouve-Wirquin sur l'Aa (pas de métaux contaminants, eau de classe 2).

Rappelons que le SEMA a étudié la faune benthique des canaux du Nord/Pas-de-Calais en posant des substrats artificiels standards cylindriques, de type CEMAGREF. Les échantillonnages permettent de calculer un Indice de Qualité Biologique Potentielle à l'aide d'une grille mise au point par Verneaux *et al.* (1976). D'après les résultats du SEMA de 1990 et 1992 (tableau 14), la qualité du canal à grand gabarit, mesurée par cette méthode, est bien souvent critique et atteint des niveaux dangereux, témoins d'une très forte pollution à Beuvry-les-Béthune (point de côte hydrologique 63000) et au niveau de Saint-Omer (points 102000 et 105000). Ceci montre que tous les efforts pour améliorer la qualité des eaux du canal sont encore insuffisants.

Récemment, le Ministère de l'Environnement a établi une carte de la pollution métallique des rivières, fleuves et canaux de France à partir des teneurs en métaux lourds (cadmium, chrome, cuivre, mercure, nickel, plomb et zinc) mesurées dans des mousses aquatiques et les sédiments. Des facteurs de pollution calculés à partir de valeurs de référence permettent de classer les sites selon trois niveaux de qualité (N1: contamination absente ou faible, N2: contamination probable, N3: contamination certaine) (Ministère de l'Environnement, 1993). La qualité du canal à Grand Gabarit ainsi déduite est bien souvent classée au niveau N3 notamment dans le bassin minier.

Tableau 10. Industries implantées dans le bassin versant du canal à grand gabarit; canaux et rivières recevant leurs rejets.
(d'après le rapport de la DRIRE, 1992)

N °	INDUSTRIES	COMMUNES	CANAL	TYPES D'INDUSTRIE
1	Sical	Lumbres	Aa	Papier-Carton
2	Argo-Wiggins	Wizernes	Aa	Papier-Carton
3	Cascades Avoil-Vallé	Blendecque	Aa	Papier-Carton
4	GSA Brasseries	Saint-Omer	Aa	Alimentaire
5	Verrerie et cristallerie	Arques	Neuffossé	Verrerie
6	Bonduelle	Renescure	Neuffossé	Alimentaire
7	Sté des verres de sécurité	Blaringhem	Neuffossé	Verrerie
8	Firestone	Béthune	Aire	Chimie et parachimie
9	Schenectady	Béthune	Aire	Chimie et parachimie
10	Roquette	Lestrem	Lys	Alimentaire
11	ICI	Choques	Clarence	Chimie et parachimie
12	Ovonor	Annezin-lez-Béthune	Lawe	Alimentaire
13	Sobeal	Béthune	Lawe	Alimentaire
14	Lofidep	Ruitz	Lawe	Chimie et parachimie
15	STA	Ruitz	Lawe	Automobile
16	SC Grande Paroisse	Mazingarbe	Surgeon	Chimie et parachimie
17	SAV	Mazingarbe	Surgeon	Chimie et parachimie
18	Technochim	Mazingarbe	Surgeon	Chimie et parachimie
19	Nord Helio Service	Mazingarbe	Surgeon	Traitement de surface
20	Cerestar	Haubourdin	Deûle	Alimentaire
21	Lever	Haubourdin	Deûle	Chimie et parachimie
22	Pie qui chante	Wattignies	Deûle	Alimentaire
23	Le Mahieu	Gondcourt	Deûle	Chimie et parachimie
24	Gervais Danône	Seclin	Deûle	Alimentaire
25	Mayolande	Seclin	Deûle	Alimentaire
26	Gist Brocades	Seclin	Deûle	Chimie et parachimie
27	Yoshida France	Seclin	Deûle	Textile
28	Nitrochimie	Billy-Berclau	Deûle	Chimie et parachimie
29	Française de mécanique	Douvrin	Deûle	Automobile
30	Soromat	Wingles	Deûle	Traitement de surface
31	BSN	Wingles	Deûle	Verrerie
32	BP Chemicals	Wingles	Deûle	Chimie et parachimie
33	Elf Atochem	Vendin-Le-Vieil	Deûle	Chimie et parachimie
34	Sublistalic	Hénin	Deûle	Traitement de surface
35	Cray Valley	Drocourt	Deûle	Chimie et parachimie
36	Coke de Drocourt	Drocourt	Deûle	Centrale thermique
37	Métaleurop	Noyelles-Godault	Deûle	Transformation des métaux
38	Promerac	Flers-en-Escrebieux	Deûle	Traitement de surface
39	Mac Cain	Harnes	Deûle	Alimentaire

Tableau 10 (suite). Industries implantées dans le bassin versant du canal à grand gabarit: canaux et rivières recevant leurs rejets.
(d'après le rapport de la DRIRE, 1992).

N °	INDUSTRIES	COMMUNES	CANAL	TYPES D'INDUSTRIE
4 0	Les enfants de Gayant	Douai	Scarpe	Alimentaire
4 1	Ressort Industrie	Douai	Scarpe	Traitement de Surface
4 2	Saprotec	Douai	Scarpe	Traitement de surface
4 3	Somenor	Douai	Scarpe	Traitement de surface
4 4	St Grande Paroisse	Waziers	Scarpe	Chimie et parachimie
4 5	Somenor	Sin-le-Noble	Scarpe	Traitement de surface
4 6	SIPC	Courchelettes	Scarpe	Chimie et parachimie
4 7	CECA	Corbehem	Scarpe	Chimie et parachimie
4 8	Geeraert et Matthys	Corbehem	Scarpe	Chimie et parachimie
4 9	Stora Feldmuehle	Corbehem	Scarpe	Papier-Carton
5 0	Perstop	Brebières	Scarpe	Chimie et parachimie
5 1	Vieille Montagne	Auby	Scarpe	Transformation des métaux
5 2	Chambourcy	Cuincy	Scarpe	Alimentaire
5 3	Renault	Cuincy	Scarpe	Automobile
5 4	CECA	Feuchy	Scarpe	Chimie et parachimie
5 5	SIO	Saint-Laurent-Blangy	Scarpe	Alimentaire
5 6	Rhône-Poulenc	Saint-Laurent-Blangy	Scarpe	Chimie et parachimie
5 7	Oldham	Tilloy-les-Mofflaines	Scarpe	Transformation des métaux
5 8	Saint Gobin	Aniche	Scarpe	Verrerie
5 9	Sicover	Aniche	Scarpe	Verrerie
6 0	BSN	Aniche	Scarpe	Verrerie
6 1	Finimétal	Biache-Saint-Vaast	Sensée	Traitement de surface
6 2	Vallourec	Saint-Saulve	Escaut	Transformation de métaux
6 3	Chevalier Martin	Saint-Saulve	Escaut	Alimentaire
6 4	PPG	Valenciennes	Escaut	Chimie et parachimie
6 5	Devos	Valenciennes	Escaut	Traitement de surface
6 6	Metalescaut	Trith-Saint-Léger	Escaut	Transformation de métaux
6 7	Valdunes	Trith-Saint-Léger	Escaut	Transformation de métaux
6 8	NRF Service Radiateurs	Trith-Saint-Léger	Escaut	Traitement de surface
6 9	SNFA	Rouvignies	Escaut	Traitement de surface
7 0	Gist Brocades	Prouvy	Escaut	Alimentaire
7 1	Franco-Belge	Prouvy	Escaut	Alimentaire
7 2	Boulonnerie	Thiant	Escaut	Traitement de surface
7 3	SNCZ	Bouchain	Escaut	Chimie et parachimie
7 4	EDF	Bouchain	Escaut	Centrale Thermique
7 5	Beghin	Escaudoevres	Escaut	Alimentaire
7 6	Métaleurop	Escaudoevres	Escaut	Transformation de métaux
7 7	Cedilac Candia	Awoingt	Escaut	Alimentaire
7 8	Cambrachrome	Neuville-Saint-Remy	Escaut	Traitement de surface
7 9	Intexal	Cambrai	Escaut	Textile
8 0	Verrerie	Masnière	Escaut	Verrerie
8 1	Bedet	Elincourt	Escaut	Textile
8 2	Delcar	Elincourt	Escaut	Textile
8 3	Noroxo	Harne	Lens	Chimie et parachimie
8 4	Elf Atochem	Loison-sous-Lens	Lens	Chimie et parachimie
8 5	Trefilunion	Loison-sous-Lens	Lens	Traitement de surface



Figure 7. Localisation des industries dans le bassin versant du canal à grand gabarit.
(la numérotation des industries correspond à celle du tableau 10).

Tableau 11. Liste des plus importants rejets industriels de métaux du Nord/Pas-de-Calais. (DKIRE, 1992).

Etablissements	Rejets (Kg/jour)	Milieu récepteur
Tioxide (Calais)	Fe: 27640 Ti: 5700 V : 960 Mn: 612 Cr: 387 Zn: 66 Ni: 10,9 Pb: 1,14 Cu: 0,77	Mer, via le fossé des fortifications
visserie et Boulonnerie (Fourmies)	Zn: 9	La Planchette
Sollac (Mardyck)	Fe: 13,7 Cr: 6,8	Bassin de Mardyck
Selnor (Lesquin)	Zn: 8,2 Fe: 5 Ni: 2,6	La Marque
Tréfilunion (Loison)	Zn: 8 Fe: 7,4	Canal de Lens
Lambin (Lomme)	Fe: 43,3 Cu: 27,8 Zn: 16,4 Cd: 9,5 Cr: 4,7	La Marque
Sollac (Dunkerque)	Fe: 69,8 Cr: 2,4 Pb: 1,1 Hg: 0,2	Mer du Nord
Produits Chimiques (Loos)	Zn: 66 Hg: 0,025	La Deûle
Métaleurop (Noyelles-Godault)	Zn: 18,45 Pb: 18,4 Cd: 6 Hg: 0,0318	Canal de la Haute Deûle
Vieille Montagne (Auby)	Zn: 51,4 Cd: 1,2	La Scarpe
SFPO (Boulogne-sur-Mer)	Mn: 105 Zn: 28 Fe: 12 Pb: 2,1	Mer du Nord
CEAC (Lille)	Pb: 3	La Marque
Rechim (Croix)	Fe: 6	La Marque
SNCZ (Bouchain)	Cr: 19 Zn: 2,6	Canal de l'Escaut
Rhône-Poulenc (La Madeleine)	Cu: 1,1	La Deûle
verrerie-Cristallerie (Arques)	Pb: 1,7	Canal de Neuffossé
Vieille Montagne (Calais)	Hg: 0,15	Nappe des sables
Stein Industries 'Lys lez Lannoy)	Ni: 4,8	L'Espierre
Saprectec (Frais Marais)	Zn: 123	La Scarpe

Tableau 12. Mesures effectuées sur l'eau des différents points situés le long du canal à Grand Gabarit et de l'Aa dans ses portions libre et canalisée (moyennes sur 1989 et 1990). Agence de l'Eau Artois-Picardie (1990).

Pointe	Commune	Canal	pH	Cond. μS/cm	MES mg/l	DB05 mg/l	DCO mg/l	O ₂ mg/l	BAT %	NH ₄ mg/l	NO ₂ mg/l	NO ₃ mg/l	NTK mg/l	PO ₄ mg/l	QG
015 000 Trith-St Léger		Escaut	7,6	656	39	7,6	35	8,6	81	1,42	0,57	22,7	2,8	1,47	3
014 000 Rouvignies		Escaut	7,7	663	29	6,7	26	9,3	88	1,33	0,52	23,6	2,1	1,49	3
013 000 Neuville/Escaut		Escaut	7,7	612	26	6,2	25	9,9	96	1,04	0,44	21,9	1,6	1,09	3
024 000 Bouchain		Sensée	7,6	540	26	7,9	32	9,5	88	0,27	0,16	5,0	1,3	0,35	3
046 000 Férin		Sensée	7,9	530	13	3,9	15	9,5	90	0,20	0,20	14,0	1,3	0,22	2
076 000 Flers <i>en</i> Escrebieux		Deûle	7,7	644	15	6,2	26	7,5	72	1,62	0,87	21,6	3,0	1,19	3
077 000 Courrières		Deûle	7,6	754	20	8,3	33	5,5	53	4,48	0,87	20,1	6,7	1,94	4
078 000 Courrières		Deûle	7,6	856	19	10,2	37	4,4	42	6,68	1,63	23,2	8,5	3,12	4
062 000 Quinchy		d'Aire	7,6	893	12	8,6	36	2,9	30	9,95	2,13	22,6	11,9	4,13	4
063 000 Beuvry les Béthune		d'Aire	7,6	959	11	8,7	34	4,7	45	12,70	2,92	27,9	14,7	4,32	4
063 900 Aire sur-la Lys		d'Aire	7,6	879	24	11,2	32	7,2	70	8,05	3,32	35,1	8,6	3,55	4
105 000 Arques		Neuf fossé	7,6	890	28	12,4	38	7,9	77	5,39	1,35	32,8	7,1	3,46	4
101 000 Wizernes		Aa	7,8	535	10	4,3	16	10,5	99	0,25	0,26	17,2	1,3	0,38	2
102 300 St Momelin		Aa canalisé	7,5	772	18	10,2	36	5,2	50	2,93	1,35	21,0	4,2	1,92	4
133 030 Ruminghem		Aa canalisé	7,6	755	14	6,8	29	4,8	47	2,6	1,16	18,9	3,5	1,63	3
104 000 St Folquin		Aa canalisé	7,6	762	15	7,7	35	6,2	59	2,25	0,97	19,0	3,4	1,73	3
106 000 Capelle-Brouck		Haute Colme	7,9	856	20	6,5	38	9,1	87	1,42	0,59	19,3	2,8	1,76	3
109 300 Grande-Synthe		Nouvelle desserte	8,2	1560	19	7,0	50	10,0	96	1,98	0,71	11,0	3,1	3,56	3

Signification de la qualité générale (QG)

Qualité 1 (bonne): Eau facilement transformable en eau potable et permettant la vie et la reproduction des poissons (y compris les salmonidés).

Qualité 2 (assez bonne): Eau également transformable en eau potable **quoique** difficilement, et permettant encore la vie des cyprinidés.

Qualité 3 (médiocre): Eau pouvant poser des problèmes quant à la survie des poissons et seulement utilisable pour des usages industriels peu exigeants.

Qualité 4 (mauvaise ou très mauvaise): Eau dont la seule prétention est de ne **pas** constituer un risque pour la santé publique.

Tableau 13. Mesures effectuées sur les sédiments des différents points situés le long du canal à Grand Gabarit et de l'Aa dans ses portions libre et canalisée. Valeurs de 1989, sauf (1): 1987 et (2): 1990. —: Valeur non donnée par l'Agence. Agence de l'Eau Artois-Picardie (1990).

Points	Commune	Canal	Fraction < 50 µm	Insolubles feu	Perte au feu	teneurs en métaux (mg/kg de poids sec)										Eléments contaminants
						Fe	Mn	Cu	Zn	Pb	Cr	Cd	Hg	As		
015 000 Trith-St-Léger		Sa aWC	52 2#	≤8 2	12 3#	33≤00	≤3≤	3# 3 10#1	2#5	35	2 #	0 35	8 12	Zn		
014 000 Rouv ignies		Sa aWC	3≤ 2#	≤≤ 3	12 22	≤≤800	8≤#	72 ≤ 1332	30#	23≤	#	0 3#	11 #2	Zn-3# Cr		
013 000 Neuville/Escaut		Escaut	46,74 (1)	57,3	17,1	26700	1100	63,2 4372	268	630	45,2	7,6	—	Cu-Zn-Pb-Cr-Cd-Hg		
024 000 Bouchain		Sensée	58,21	53,8	23,59	20800	566	18	260	73	55	0,54	0,1	4,61	Hg	
046 000 Férin		Sensée	70,53 (1)	44,2	10,8	14700	421	17	311	185	34,5	0,62	0 1	—	Néant	
076 000 Flars en Sa rebi ux Deûle		Deûle	51 05	32 5	12 2≤	33400	560	90#	17025	2#5C	92	720	591	1C# 1	Ci Zn 3#-Cd-Hg 3#	
077 000 Courrière		Deûle	2≤ 3#	55 2	27 32	23#00	3#7	305	30#0	7450	9	15#5	5#0 C	140 #	Ci Zn Ph-Pb-Hg 3#	
073 000 Courrières		Deûle	23 1#	48 3	25 3#	2≤300	372	354	13335	10025	126	5#50	22 8	201 0	Ci 3# Ph-Pb-Hg 3#	
0≤2 000 L'An hv		D'Aire	39 03	37 ≤	20 85	23300	352	71	32≤5	≤28	73	35#	5 #2	≤2 3	Ci Zn Ph 3#-Hg-Ar	
0≤3 000 Beuvry la-Béthune		D'Aire	37 03	77 4	12 3	22#00	480	≤5	215#	3#7	≤3	147	1 37	24 51	Zn-Ph-Cd-Hg	
0≤3 300 Aire sur-la-Lys		D'Aire	3# 3#	73 3	8 08	27≤00	323	2#	372	200	13≤	27 5	0 23	3# 71	Z. -Cd	
1#05 000 Arques		Leuffoo3é	23 8#	≤7 7	13 32	27000	33≤	42	3#7	135	≤≤	# 3	0 27	10 5#	Zn	
101 000 Wi enes		Aa	2# 21	≤≤ 1	10 ≤2	1#300	3#3	33	45≤	53 5	23	0 21	0 22	2 #5	Néant	
102 000 St Monelin		Aa analisé	7 #≤	31 3	1 ≤7	3200	230	7	215	210	35	3 1	0 03	≤ 43	Zo-P -Cd	
103 000 Ruminghem		Aa canalisé	3 1 (2)	30 2	3 15	7#00	1##	11	≤2	≤4	15	0 33	0 11	# 38	Néant	
104 000 St Folquin		Aa canalisé	≤ 27 (2)	7# 2	3 #	22100	3#2	2≤ 7	257	15#	≤3 ≤	# ≤	0 53	—	Néant	
106 000 Canaille-Brouk		Haute Colme 11 6 (2)	76 1	76 1	7 14	21400	238	46	925	1 45	50	0 35	0 04	4 00	Zn-Pb	
109 300 Grand-Synthe		Haute Colme 20 8 (2)	≤7 3	9 #1	23000	223	17	172	107	30	0 53	0 0#	5 77	≤ant		

Tableau 14. IQBP et indices de pollution (IP) donnés par le SKAE en 1990 et en 1992 sur des points situés le long du canal à Grand Gabarit et de l'Aa canalisé.

Dans la région, le SRAE considère qu'un indice égal à 10 est normal pour les canaux compte tenu de la nature des milieux. L'indice de pollution est calculé en ôtant la valeur de l'IQBP de la valeur de l'indice normal (10). La signification de l'IP est la suivante:

- IP < 2: Bonne qualité
- 2 ≤ IP < 4: Qualité acceptable
- 4 ≤ IP < 6: Qualité douteuse
- 6 ≤ IP < 8: Qualité critique
- 8 ≤ IP < 10: Qualité dangereuse

Points	Communes	Canaux	IQBP 1990	IP 1990	IQBP 1992	IP 1992
014 000	Rouvignies	Escaut	3	7	3	7
076 000	Flers-en-Escrebieux	Deûle	3	7	5	5
078 000	Courrières	Deûle	3	7	2	8
063 000	Beuvry-les-Béthune	D'Aire à la Bassée	2	8	2	8
102 000	Saint-Momelin	Aa	1	9	3	7
105 000	Arques	Neuffossé	2	8	3	7
106 000	Capelle-Brouck	Haute Colme	9	1	10	0
104 000	Saint-Folquin					

CHAPITRE II.

MATERIELS
ET
METHODES

CHAPITRE II. MATERIELS ET METHODES

I. LE CANAL A GRAND GABARIT ET L'AA

1. Choix des sites

Les sites de l'étude correspondent à quelques points du réseau de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie. Ils se situent le long du canal à Grand Gabarit de l'amont de Douai à l'aval de Gravelines, sur le fleuve Aa et sur l'Aa canalisé. Ils ont été choisis soit **pour** la faible contamination (sites "témoins") soit pour le haut degré de la pollution toxique et organique connue à leur niveau.

Ces points, au nombre de 14, sont décrits ci-après:

• **Point de code hydrologique: 46000**

Cours d'eau : le canal de la Sensée.

Commune : Férin (59)

Lieu de prélèvement : Pont de la D 956,

Justification du prélèvement : Amont de la confluence de la Scarpe (rivière à forte pollution),
Amont de Douai.

Appelé dans l'étude : Site de Férin ou site 46.

Ce point est considéré comme "témoin" du fait de **sa** bonne qualité.

• **Point de code hydrologique: 76000**

Cours d'eau : le canal de la Deûle.

Commune : Flers-en-Escrebieux (59).

Lieu de prélèvement : Pont de la D 125,

Justification du prélèvement : Aval de Douai,
Amont de l'usine Métaleurop, et du bassin minier.

Appelé dans l'étude : site de Flers-en-Escrebieux ou site 76.

• **Point de code hydrologique: 77000**

Cours d'eau : le canai de la Deûle.

Commune : Coumères (59).

Lieu de prélèvement : Pont du CD 46,

Justification du prélèvement : Amont de la confluence avec le canai de Lens.

Appelé dans l'étude : site de Courrières 1 ou site 77.

• Point de code hydrologique: 78 000

Cours d'eau : le canal de la Deûle.

Commune : Coumères (59).

Lieu de prélèvement : Pont de la RN 319,

Justification du prélèvement : Aval de la confluence avec le canal de Lens.

Appelé dans l'étude : site de Coumères 2 ou site 78.

• Point de code hydrologique: 79000

Cours d'eau : le canal de la Deûle.

Commune : Don (59).

Lieu de prélèvement : Pont de la D 125,

Justification du prélèvement : Aval de la confluence avec le canal d'Aire.

Appelé dans l'étude : site de Don ou site 79.

• Point de code hydrologique: 80 000

Cours d'eau : le canal de la Deûle.

Commune : Haubourdin (59).

Lieu de prélèvement : Premier pont à Haubourdin,

Justification du prélèvement : Amont de l'agglomération lilloise.

Appelé dans l'étude : site de Haubourdin ou site 80.

• Point de code hydrologique: 62000

Cours d'eau : le canal d'Aire à La Bassée.

Commune : La Bassée (62).

Lieu de prélèvement : Pont de la D 75,

Justification du prélèvement : Aval de l'usine Métaleurop et de La Bassée.

Appelé dans l'étude : site de La Bassée ou site 62.

• Point de code hydrologique: 63000

Cours d'eau : le canal d'Aire à La Bassée.

Commune : Béthune (62).

Lieu de prélèvement : Pont du CD 72,

Justification du prélèvement : Aval de la confluence du **Surgeon**

Appelé dans l'étude : site de Béthune ou site 63.

• Point de code hydrologique: 63 900

Cours d'eau : le canal d'Aire à La Bassée.

Commune : Aire sur la Lys (62).

Lieu de prélèvement : Pont du CD 194,

Justification du prélèvement : Amont d'Aire sur la Lys.

Appelé dans l'étude : site d'Aire ou site 639.

• Point de code hydrologique: 105 000

Cours d'eau : le canal de Neuffossé.

Commune : Arques (62).

Lieu de prélèvement : Amont de l'écluse des Fontinettes

Justification du prélèvement : Amont de la confluence avec l'Aa canalisé.

Appelé dans l'étude : site d'Arques ou site 105.

• **Point de code hydrologique: 101 000**

Cours d'eau : l'Aa.

Commune : Ouve-Wirquin (62).

Lieu de prélèvement : en amont du point de code hydrologique: 101 000.

Justification du prélèvement : Amont du fleuve.

Appelé dans l'étude : site d'Ouve-Wirquin ou site 101.

• **Point de code hydrologique: 102 000**

Cours d'eau : le canal de l'Aa.

Commune : Saint Momelin (59).

Lieu de prélèvement : Pont de la RN 28,

Justification du prélèvement : Aval de Saint Omer.

Appelé dans l'étude : site de Saint Momelin ou site 102.

• **Point de code hydrologique: 103000**

Cours d'eau : le canai de l'Aa.

Commune : Rumingham (62).

Lieu de prélèvement : Pont du Ruth.

Justification du prélèvement : Aval de la confluence avec le canal de la Haute-Colme.

Appelé dans l'étude : site de Rumingham ou site 103.

• **Point de code hydrologique: 104000**

Cours d'eau : le canal de l'Aa.

Commune : St-Folquin (Le Guindal) (62).

Lieu de prélèvement : Pont de la D 229.

Justification du prélèvement : Aval de la confluence avec le canal de Bourbourg,
Aval de la prise d'eau pour l'agglomération de Dunkerque.

Appelé dans l'étude : site du Guindal ou site 104.

La localisation de ces sites est précisée sur la figure 8.

2. Méthodes d'échantillonnage

2.1. Méthode d'échantillonnage des macroinvertébrés benthiques

Comme nous l'avons précisé au cours de l'introduction, la capture des macroinvertébrés dans les canaux n'est pas aisée du fait de la profondeur et de la rareté des habitats. En raison de l'impossibilité d'utiliser des moyens directs (filet de Surber, troubleau...), nous avons dû utiliser des substrats artificiels. Les prélèvements ont été réalisés en février, avril et juin 1992, en octobre 1994 et en mars 1995 pour les sites 46, 76, 62, 63, 105, 101, 104, en mai 1992 pour les sites 105, 101000 et 104, en septembre 1994 pour les sites 77, 78, 79, 80, 639, 102 et 103.

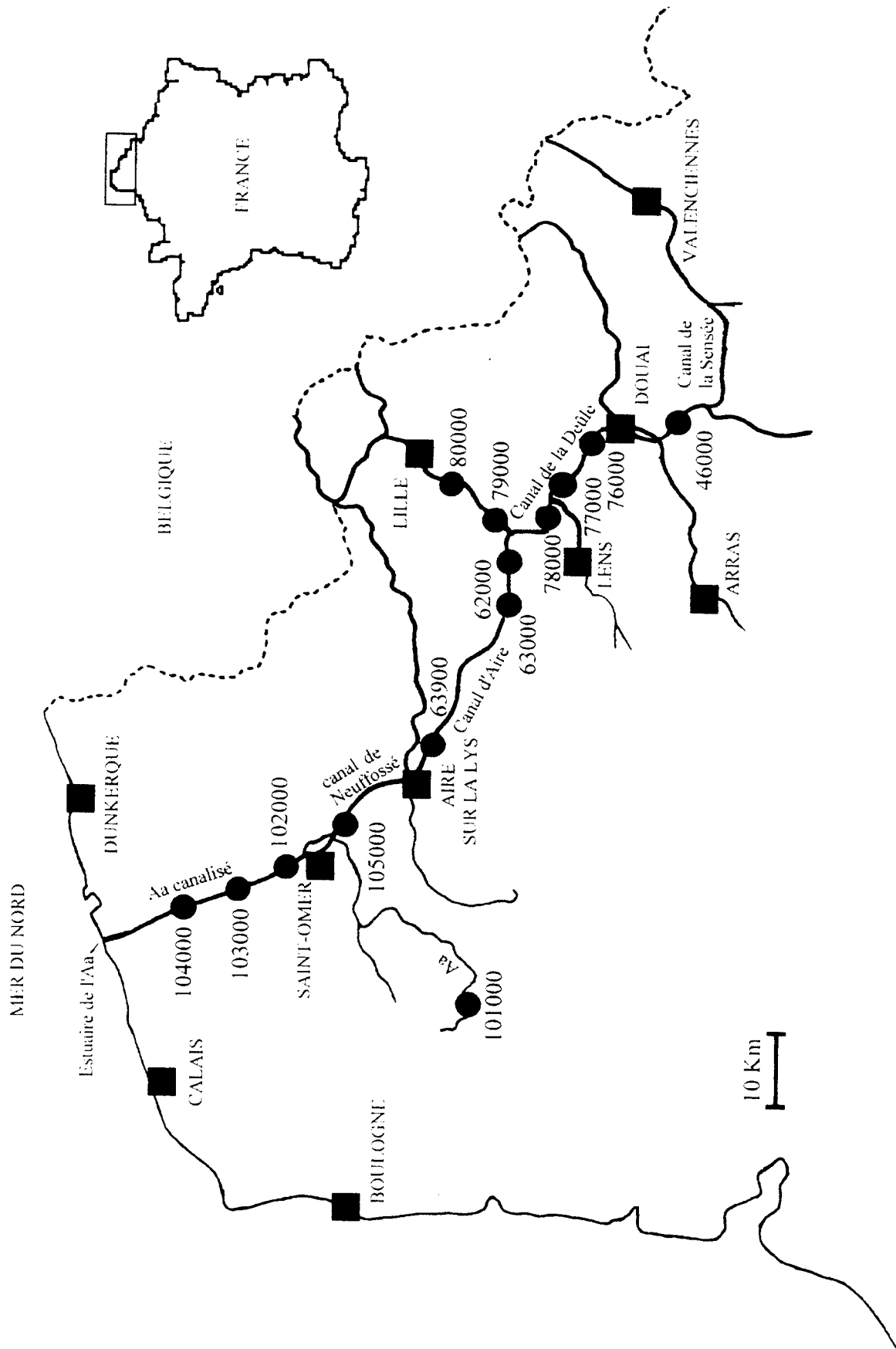


Figure X Localisation des sites étudiés.

2.1.1. Les substrats artificiels

Les substrats artificiels conçus dans notre Service permettent de répondre à plusieurs critères indispensables à l'étude des cours d'eau de la Région Nord / Pas-de-Calais: maniement facile, faible coût, utilisation possible dans des cours d'eau atypiques tels que les canaux aussi bien que dans les rivières naturelles, de la source au cours inférieur. Sans être parfaite, cette technique permet de recueillir la macrofaune benthique des canaux plus facilement que d'autres. Tout comme d'autres techniques de piégeage, elle ne donne pas une image parfaitement fidèle des biocénoses existantes mais elle permet d'effectuer des comparaisons de différents types de cours d'eau dans l'espace et dans le temps en utilisant les mêmes substrats, ce qui est impossible à l'heure actuelle avec les techniques normalisées. Nos substrats artificiels sont constitués d'un support lourd en béton (50 x 15 x 20 cm) dans lequel sont disposées trois boîtes rectangulaires en plastique (10 x 10 x 15 cm), elles même placées dans des sachets en plastique de trois litres. Ces boîtes reçoivent des bottes de tiges de phragmites d'une hauteur de 30 cm. Un grillage en PVC maintient le tout. Une anse en fil de fer plastifié permet de manipuler le piège. Ce système permet de récupérer les boîtes pendant le relevé des pièges. Le sachet plastique est remonté autour des tiges de phragmites afin d'éviter la fuite des invertébrés. La base lourde peut être laissée sur place pour des récoltes ultérieures. A chaque site échantillonné, 4 substrats artificiels sont posés sur le fond du cours d'eau, perpendiculairement au courant. Les pièges sont attachés les uns aux autres à une distance minimale de 50 cm et, si possible, reliés discrètement à la berge. La période de piégeage est de 4 semaines. A la fin de cette période, les substrats sont remontés à l'aide d'une perche. Les boîtes contenant les phragmites et les macroinvertébrés piégés sont placées dans des sacs en plastique de trente litres, puis amenées au laboratoire.

2.1.2. Tri et détermination

Les tiges de phragmites, les boîtes et les sachets plastiques, sont lavés à l'eau courante. Les tiges de phragmites sont séchées à l'air libre pour une utilisation ultérieure. Les macroinvertébrés sont récoltés dans des tamis de mailles comprises entre 0,5 et 2 mm. Ils sont identifiés jusqu'à la famille. Les espèces sont différenciées le plus souvent possible. Les déterminations sont réalisées à l'aide de clefs de détermination (Patée, 1981; Richoux, 1982a, b,c; Lafont, 1983; Henry et Magniez, 1983; Dethier, 1985 et 1986; Tachet *et al.*, 1984; Vergon et Bourgeois, 1993) et d'ouvrages généraux (Descamp, 1971; Matthey *et al.*, 1984; Sandhall, 1991; Sterry, 1992; Zimmer *et al.*, 1993; Mulhauser et Monnier, 1995). Les macroinvertébrés triés sont conservés dans une solution de formol du commerce dilué à 5%.

2.2. Prélèvement des sédiments

Le sédiment, lieu privilégié de piégeage des métaux (Cairns *et al.*, 1984), constitue le substrat dans ou sur lequel vivent les invertébrés benthiques. Ainsi le sédiment considéré pour cette étude a été celui s'étant déposé au fond des pièges posés au niveau des berges des différents sites pendant une durée de 4 semaines.

L'intérêt de ce choix réside dans deux points majeurs:

- La possibilité de révéler une contamination relativement jeune du sédiment, celui-ci représentant la part récente de la sédimentation naturelle ou de la remobilisation d'une couche très superficielle du sédiment sous l'effet des mouvements des masses d'eaux occasionnés par le trafic fluvial.
- La plus grande probabilité de mettre en évidence les éventuels transferts de polluants à partir du sédiment vers les organismes; cette fraction du sédiment étant totalement en contact avec les organismes, contrairement à la zone plus profonde du sédiment récupérable en utilisant la technique du carottage et qui est totalement dépourvue de faune.

Du sédiment a également été prélevé dans le fond des cours d'eau à l'aide d'un seau galvanisé tenu par une corde d'environ 20 mètres à partir de la berge. Les sédiments ainsi récupérés ont été stockés dans des sacs en plastique de 6 litres ou dans des flacons en polyéthylène d'une contenance d'un litre en chambre froide juste avant leur utilisation ou au congélateur à -20°C. Ces prélèvements ont été réalisés en octobre 1994 et mars 1995 pour les sites 46, 76, 62, 63, 105, 101, 104 et en septembre 1994 pour les sites 77, 78, 79, 80, 639, 102 et 103.

2.3. Prélèvement d'eau

Des prélèvements d'eau de surface ont été réalisés en mai et juin 1992 sur les sites 46, 76, 62, 63, 105, 101 et 104 à une profondeur de 50 cm avec des flacons d'un litre préalablement traités par l'Institut Pasteur de Lille pour l'analyse des hydrocarbures et des PCB. Ces prélèvements ont également été utilisés pour des analyses de métaux.

3. Analyses chimiques et physico-chimiques des eaux et des sédiments

3.1. Analyses d'eau

Les mesures des teneurs métalliques par spectrophotométrie, des teneurs en hydrocarbures totaux et en PCB par chromatographie en phase gazeuse ont été confiées au Service des Eaux et Environnement de l'Institut Pasteur de Lille.

3.2. Dosage des métaux dans les sédiments

3.2.1. Préparation des sédiments

Concernant les sédiments des pièges, un échantillon est composé du mélange d'une partie équivalente des sédiments de chacune des trois logettes du substrat artificiel. Ainsi, pour chaque site, quatre échantillons sont constitués dans la mesure où aucun substrat n'a été perdu.

Les analyses des sédiments ont été réalisées sur la fraction inférieure à 2 mm ou la fraction inférieure à 63 μm . Un gramme de sédiment est minéralisé dans 4 ml d'acide chlorhydrique concentré (Suprapur 37%) et 10 ml d'acide nitrique concentré (Suprapur 65%) pendant une nuit à froid dans un bécher en téflon recouvert d'un verre de montre. Après deux heures de chauffage à reflux à 150°C, le résidu est amené à sec (à 150°C) puis repris deux fois par 10 ml d'acide chlorhydrique 1N, filtré sur papier Whatman 2V et complété avec de l'eau distillée à 100 ml.

3.2.2. Dosage par spectrophotométrie

Les métaux (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique en flamme à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer 2380 équipé d'un brûleur air-acétylène. L'aluminium est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre à torche à plasma d'argon (3510 ICP Spectrometer ARL). Les dosages ont été réalisés par nos soins dans le laboratoire de Chimie Analytique et Marine de Lille I dirigé par le Professeur Wartel.

Les résultats obtenus en ppm ont été retranscrits en $\mu\text{g/g}$ de matière sèche par la formule suivante:

$$x (\mu\text{g/g}) = \frac{\text{valeur obtenue } (\mu\text{g/ml}) \times \text{volume de dilution (ml)}}{\text{masse (g) d'échantillon sec minéralisé}}$$

3.3. Dosage des paramètres P, COT, NTK et mesure de la perte au feu

Les dosages du phosphore total (P), du Carbone Organique Total (COT) et de l'Azote Total Kjeldahl (NTK) ainsi que la mesure de la Perte au Feu (PF) ont été effectués sur les sédiments piégés, les sédiments du fond des cours d'eau et sur la fraction fine ($< 63 \mu\text{m}$) de ces derniers récoltés en septembre et octobre 94 et en mars 95. Trois mesures ont été réalisées pour chaque prélèvement de sédiment.

Phosphore Total. Le phosphore total a été mesuré par une méthode calorimétrique en utilisant le protocole, les réactifs et l'appareillage HACH.

Carbone Organique Total. Le COT a été déterminé en utilisant le spectrophotomètre HACH DR/2000 et les réactifs HACH après une extraction au bichromate de potassium 1 N ($K_2Cr_2O_7$) et à l'acide sulfurique concentré (95 %, H_2SO_4).

Azote Total Kjeldahl. Le NTK a été mesuré par une méthode colorimétrique en utilisant le protocole, les réactifs et le matériel HACH après une minéralisation des échantillons avec de l'acide sulfurique à 95 % (H_2SO_4) et du peroxyde d'oxygène à 50 % (H_2O_2) dans le minéralisateur HACH DIGESDHAL.

Perte au Feu. La Perte au Feu représente le pourcentage de poids perdu par calcination à 1010°C dans un four à moufle durant 2 heures de 5 grammes de sédiments secs. La perte au feu permet d'apprécier la quantité totale de matière organique présente dans le sédiment.

3.4. Caractérisation granulométrique

L'analyse granulométrique des sédiments piégés et des sédiments récoltés au fond des cours d'eau en septembre et octobre 94 et en mars 95 a été réalisée par voie humide. Trente grammes de sédiments secs sont mis en suspension dans 0,5 l d'eau avant de séparer six fractions sous l'eau courante à travers cinq tamis de mailles: 1mm, 500 μ m, 250 μ m, 100 μ m et 63 μ m. Chaque fraction sédimentaire a ensuite été séchée et pesée. Dans le cas des sédiments piégés dans les substrats artificiels (quantités obtenues relativement faibles), moins de 30 g de sédiments ont été utilisés.

4. Analyse des données

4.1. Descripteurs de diversité et indices biologiques

Les échantillons de faune prélevés dans les cours d'eau étudiés proviennent de l'interaction entre les substrats artificiels et les communautés benthiques de chaque site. L'utilisation des substrats artificiels ne nous donne pas la certitude d'obtenir une liste faunistique exhaustive des macroinvertébrés vivant dans le milieu. Nous attirons donc l'attention sur le fait que nous travaillons sur la diversité des échantillons et non pas sur celle des communautés de macroinvertébrés benthiques réelles des cours d'eau étudiés. La technique de piégeage étant la même dans l'espace et dans le temps, des comparaisons inter-sites et inter-dates pourront être faites.

4.1.1. L'indice de Shannon-Weaver (1948)

L'indice de Shannon-Weaver repose sur la Théorie de l'Information proposée par Shannon en 1948. Cet indice, qui permet d'apprécier la diversité d'un peuplement, est une quantité positive prenant sa valeur maximale quand un seul élément (espèce par exemple) est présenté en **plus** d'un exemplaire (individu) et **sa** valeur minimale quand tous les éléments ont même fréquence. Ces deux bornes croissent avec le nombre total d'éléments (espèce) (Frontier et Pichod-Viale, 1991). Les espèces rares pèsent d'un poids beaucoup plus faible que les plus communes. Cet indice a pour formule:

$$H' = \sum_{i=1}^S \frac{N_i}{N} \log_2 \left(\frac{N}{N_i} \right) \quad \text{où} \quad \begin{array}{l} S = \text{nombre total d'espèces de l'échantillon,} \\ N = \text{nombre total d'individus de l'échantillon,} \\ N_i = \text{nombre total d'individus de l'espèce de rang } i. \end{array}$$

Les indices de diversité communément rencontrés dans les échantillons ou les inventaires, quel que soit le groupe zoologique ou botanique étudié, prennent des valeurs comprises entre moins de 1 (0,5 est un indice très faible), et 4,5 environ (Frontier et Pichod-Viale, 1991).

4.1.2. L'indice de Simpson (1949)

L'indice de Simpson permet de mesurer la dominance dans une communauté benthique. Dans notre cas la dominance calculée est celle de l'échantillon qui est lui-même le reflet de la communauté benthique du site étudié. Cet indice est calculé à l'aide de la formule suivante:

$$C = \sum_{i=1}^S \left(\frac{N_i}{N} \right)^2 \quad \text{où} \quad \begin{array}{l} S = \text{le nombre total d'espèces échantillonnées,} \\ N = \text{le nombre total d'individus,} \\ N_i = \text{le nombre d'individus de l'espèce de rang } i. \end{array}$$

La dominance quasi-absolue d'une seule espèce est exprimée par un indice proche de 1. Si les espèces sont nombreuses et ont toutes le même poids dans l'échantillon (équirépartition), l'indice s'approche de 0.

4.1.3. L'indice de Pielou (1975)

L'indice de régularité ou "evenness" (indice de Pielou) correspond au rapport de l'indice de diversité H' sur la valeur maximale de H' en cas d'équirépartition, laquelle correspond au cas où toutes les espèces sont représentées chacune par le même nombre d'individus. Dans ce cas, $H' = \log_2 S$, d'où:

$$E = \frac{H'}{\log_2 S} \quad \text{où } \begin{array}{l} S = \text{le nombre total d'espèces échantillonnées,} \\ H' = \text{l'indice de Shannon-Weaver.} \end{array}$$

La régularité (e) tend vers 0 quand la quasi totalité des effectifs correspond à une seule espèce du peuplement. Elle tend vers 1 lorsque chaque espèce est représentée par le même nombre d'individus (Pielou, 1975). Les régularités courantes rencontrées dans les échantillons ou les inventaires sont de l'ordre de 0,8 à 0,9 (Frontier et Pichod-Viale, 1991).

4.1.4. Diagrammes Rangs-Fréquences (DRF)

Des diagrammes rangs-fréquences ont été construits suivant Frontier (1976). Les fréquences et les rangs des taxons considérés selon leur abondance sont présentés en ordonnées et en abscisses respectivement après une transformation logarithmique. Les DRF permettent de visualiser la distribution des abondances relatives, leur forme reflétant la diversité et pouvant être interprétée comme caractéristique d'un stade de l'évolution des communautés:

- stade 1: courbe concave, inflexion, faible diversité: communauté pionnière ou restant à ce stade à cause de pressions environnementales,
- stade 2: courbe convexe, diversité maximale = communauté mature,
- stade 3: courbe rectiligne, plus faible diversité que le stade 2 = stade final de succession.

4.1.5. Les indices biologiques

Nous avons utilisé des substrats artificiels conçus par le Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie (SHE) nous permettant, à faible coût, d'étudier de nombreux sites en même temps, afin d'effectuer des comparaisons entre les communautés potentiellement présentes. N'ayant pas à notre disposition de méthode dont les protocoles permettent l'utilisation de ce type de piège et l'étude des rivières et canaux de la Région Nordpas-de-Calais, nous avons utilisé des grilles de calculs d'indices ou des méthodes existantes. Le calcul d'indices a pour but de vérifier si nous pouvons obtenir des résultats cohérents en utilisant notre technique de piégeage vis-à-vis des analyses de la qualité du biotope.

Les indices découlant de l'Indice Biotique de Tuffery et Verneaux (1968) sont déduits de tableaux standards à double entrée adaptés à chaque technique. Le principe de déduction de l'indice est le même quel que soit le tableau utilisé. Verticalement, nous trouvons une liste de groupes faunistiques classés suivant une sensibilité décroissante à la pollution, horizontalement, la classe de richesse taxonomique. La liste de groupes faunistiques est parcourue de haut en bas en s'arrêtant au premier groupe trouvé dans l'échantillon. Ce groupe est dit groupe actif. L'intersection entre la ligne

du groupe actif et la colonne de la richesse taxonomique de l'échantillon nous donne la valeur de l'indice du site étudié qui varie de 0 à 10 ou de 0 à 20 selon la méthode utilisée.

4.1.5.1. Les méthodes basées sur l'Indice Biotique de Tuffery et Verneaux (1968), l'Indice de Qualité Biologique Potentielle (IQBP) (Verneaux *et al.*, 1977) et l'Indice Biologique Global Normalisé (AFNOR, 1992)

En Belgique, les Indices Biotiques de Woodiwiss (1964) et de Tuffery et Verneaux (1968) ont été adaptés, surtout au niveau du protocole d'échantillonnage, des niveaux d'identification taxonomique (pour une identification plus rapide) et de la place occupée par certains taxons, pour calculer un Indice Biotique Belge (De Pauw et Vanhooren, 1983; NBN, 1984). Cet indice est calculé avec le tableau standard de l'IB proposé par Tuffery et Verneaux (1968). Les échantillonnages dans les canaux sont réalisés à l'aide de substrats artificiels, alors qu'à l'origine, les échantillonnages pour calculer ce type d'indice se font au filet de Surber dans des faciès lotiques et lentiques.

Dans la même optique, nous avons utilisé la grille de Tuffery et Verneaux (1968) (tableau 15) pour calculer un indice noté IB* à partir de nos échantillonnages à l'aide de substrats artificiels. Les limites pratiques de détermination taxonomique sont données dans le tableau 16. L'indice calculé est compris entre 1 et 10.

D'autres indices ont été déduits des tableaux standards de détermination des IQBP (tableau 17) et des IBGN (tableau 19) pour chacun des échantillonnages. Ces indices sont compris entre 1 et 20. Les limites de détermination de l'IQBP sont données dans le tableau 18. Les macroinvertébrés sont déterminés jusqu'à la famille pour l'IBGN. Les taxons qui sont présentés par moins de trois individus, considérés comme accidentels, ne sont pas pris en compte.

4.1.5.2. Le "Score BMWP britannique (Biological Monitoring Working Party, 1979)

Nous avons déjà exposé la méthode britannique des scores dans le chapitre 1.5.3.2.5. Pour chaque site étudié et pour chaque prélèvement, un score BMWP* a été calculé à partir de chaque score attribué aux familles (tableau 20). Les scores varient entre 0 et 250: plus ils sont élevés, moins le milieu est pollué. Un score **ASPT** (Average Score Per Taxon) peut être calculé en divisant le score BMWP par le nombre total de taxons récoltés ayant un score. Ce score varie entre 0 et 7.

Les indices et les scores calculés lors de notre étude seront notés IB*, IQBP*, IBGN*, BMWP* et ASPT* car notre méthodologie diffère de celles préconisées par les auteurs notamment en ce qui concerne notre méthode de piégeage.

Tableau 15. Grille standard de détermination des Indices Biotiques
(Verneaux et Tuffery, 1968)

I Groupes faunistiques		II	III Nombre total des unités systématiques présentes				
			0 - 1	2 - 5	6 - 10	11 - 15	16 et
			Indice biotique				
1 Plécoptères ou Ecdyonuridés	1	1 seule U.S.	-	7	8	9	10
	2		5	6	7	8	9
2 Trichoptères à fourreaux	1	+ d'une U.S.	-	6	7	8	9
	2	1 seule U.S.	5	5	6	7	8
3 Ancyliidés Ephéméroptères sauf Ecdyonuridés	1	+ de 2 U.S.	-	5	6	7	8
	2		3	4	5	6	7
4 <i>Aphelocheirus</i> Odonates ou Gammaridés ou Mollusques (sauf Sphaeridés)	0	Toutes le U.S.	3	4	5	6	7
5 Asellus ou Hémiptères (s.) <i>Aphelocheirus</i>	0		2	3	4	5	-
6 Tubificidés ou Chironomidés des groupes <i>Thummi</i> et <i>plumosus</i>	0	Toutes le U.S. ci-dessus absentes	1	2	3		
7 Eristalinés	0	Toutes le U.S. ci-dessus absentes	0	1	1		

Tableau 16. Limites pratiques de détermination taxonomique

ORDRES	LIMITES
Plécoptères	genre
Trichoptères	famille
Ephéméroptères	genre
Odonates	genre
Coleoptères	famille
Mollusques	genre ou espèce selon les cas
Crustacés	famille
Mégaloptères	genre
Hémiptères	genre
Diptères	famille, sous-famille ou tribu selon les cas
Planaridés	genre ou espèce selon les cas
Hirudinées	genre ou espèce selon les cas
Oligochètes	famille
Nématodes	présence
Hydracariens	présence

Tableau 17. Grille standard de détermination des Indices de Qualité Biologique Potentielle

76

Diversité taxonomique des groupes repères				Diversité taxonomique de l'échantillon				
Groupes faunistiques repères				>30	30 ≥ d < 25	25 ≥ d > 19	19 ≥ d > 12	d ≤ 12
Plécoptères	I	1	23	20	19	18	17	16
<i>Setipalpia</i>	I	2	<3	19	18	17	16	15
Heptageniidae except Heptagenia	II	1	22	18	17	16	15	14
	II	2	1	17	16	15	14	13
Plécoptères except Nemouridés	III	1	≥ 3	16	15	14	13	12
<i>Filipalpia</i>	III	2	<3	15	14	13	12	11
Trichoptères à fourreau larvaire	IV	1	25	14	13	12	11	10
	IV	2	<5	13	12	11	10	09
Ephéméroptères except <i>Epeorus</i> , Ecdyonurus, Rhythrogena, Baetis, Caenis, Ephemerella	V	1	≥ 6	12	11	10	09	08
Nemouridés	V	2	<6	11	10	09	08	07
<i>Elminthidés</i>								
<i>Heptagenia</i>								
Trichoptères sans fourreau larvaire	VI	1	≥ 5	10	09	08	07	06
					08	07	06	05
					07	06	05	04
Mollusques								
Gammaridés	VII	2	<6	07	06	05	04	03
<i>Caenis</i>								
Coléoptères except <i>Elminthidae</i>								
Chironomidae	VIII	1	≥ 3	06	05	04	03	02
Oligochètes								
Hirudinées								
<i>Asellus</i>	VIII	2	<3	05	04	03	02	01
Dendrocœlum								

Tableau 18. Limites pratiques de détermination taxonomique

ORDRES	LIMITES
Plécoptères	genre
Trichoptères	genre ou famille (Leptoceridae, Limnephilidae, Sericostomatidae)
Ephéméroptères	genre
Odonates	genre ou famille (Coenagrionidae)
Coleoptères	famille ou genre (Dryopidae, Elminthidae, Haliplidae, Hydraenidae)
Mollusques	genre ou famille (Hydrobiidae, Planorbidae, Unionidae, Valvatidae)
Crustacés	famille
Mégaloptères	genre
Hémiptères	famille ou genre (Aphelocheirus)
Diptères	famille
Planipennes	ordre
Collembolés	ordre
Lépidoptères	ordre
Hydracariens	ordre
Crustacés macroscopiques	famille
Triclades	genre
Oligochètes	classe
Hirudinées	famille ou genre (Helobdella, Herniclepsis)
Nématodes	classe

Tableau 19. Grille standard de détermination de l'IBGN (d'après AFNOR 1992)

Classe de variété		14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
Sommes des taxons		>	49	44	40	36	32	28	24	20	16	12	9	6	3
Taxons	GI	50	45	41	37	33	29	25	21	17	13	10	7	4	1
Chloroperlidae Perlidae Perlodidae Taeniopterygidae	9	20	20	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9
Capniidae Brachycentridae Odontoceridae Philopotamidae	8	20	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8
Leuctridae Glossosomatidae Beraeidae Goeridae Leptophlebiidae	7	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7
Nemouridae Lepidostomatidae Sericostomatidae Ephemeridae	6	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6
Hydroptilidae Heptageniidae Polymitarcidae Potamanthidae	5	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5
Leptoceridae Polycentropodidae Psychomyidae Rhyacophilidae	4	17	16	15	12	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4
Limnephilidae* Hydropsychidae Ephemerellidae* Aphelocheiridae	3	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3
Baetidae* Caenidae* Elmidae* Gammaridae* Mallonidae	2	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2
Chironomidae* Asellidae' Achètes Oligochètes*	1	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1

Tableau 20. Tableau de détermination du score BMWP

Familles	Score
<i>Siphonuridae, Heptageniidae, Leptophlebiidae, Ephemerellidae, Potamanthidae, Ephemeridae, Taeniopterygidae, Leuctridae, Capniidae, Perlodidae, Perlidae, Chloroperlidae, Aphelocheiridae, Phryganeidae, Molannidae, Beraeidae, Odontoceridae, Leptoceridae, Goeridae, Lepidostomatidae, Brachycentridae, Sericostomatidae</i>	10
<i>Astacidae, Lestidae, Agriidae, Gomphidae, Cordulegasteridae, Aeshnidae, Corduliidae, Libellulidae, Psychomyiidae, Philopotamidae</i>	8
<i>Caenidae, Nemouridae, Rhyacophilidae, Polycentropodidae, Limnephilidae</i>	7
<i>Neritidae, Viviparidae, Ancyliidae, Hydroptilidae, Unionidae, Corophiidae, Gammaridae, Platycnemididae, Coenagriidae</i>	6
<i>Mesoveliidae, Hydrometridae, Gerridae, Neptidae, Naucoridae, Noronectidae, Pleidae, Corixidae, Haplidae, Hygrobiidae, Dytiscidae, Gyrinidae, Hydrophilidae, Clambidae, Helodidae, Dryopidae, Elminthidae, Chrysomelidae, Curculionidae, Hydropsychidae, Tipulidae, Simuliidae, Planariidae, Dendrocoelidae</i>	5
<i>Baetidae, Sialidae, Piscicolidae</i>	4
<i>Valvatidae, Hydrobiidae, Lymnaeidae, Physidae, Planorbidae, Sphaeridae, Glossiphoniidae, Hirudidae, Erpobdellidae, Aseliidae</i>	3
<i>Chironomidae</i>	2
<i>Oligochaeta (toutes les classes)</i>	1

4.2. Les méthodes statistiques

4.2.1. Analyse de variance

Des analyses de variance (ANOVA) à une voie ou à deux voies ont permis de vérifier s'il existait des variations inter-sites à un moment donné ou inter-dates au sein d'un même site pour les teneurs des différents paramètres mesurés dans les sédiments. Le cas échéant, les teneurs moyennes ont été comparées à l'aide de tests de comparaison multiple de **type** Student-Newman-Keuls (test SNK) ou de type Bonferroni.

4.2.2. Analyse en Composantes Principales

Initialement proposée par Hirschfeld (1935), l'Analyse en Composantes Principales (ACP), est un outil mathématique d'ordination des structures et d'interprétation écologique qui consiste à représenter sur un plan un ensemble d'individus associé à un ensemble de **p** variables correspondant à un espace à **p** dimensions. L'ACP permet de visualiser, sous forme graphique, le maximum de l'information contenue dans un tableau de données. Longtemps ignorée (Hill, 1974), à cause de la lourdeur des calculs difficilement réalisables sans ordinateur, l'ACP est une technique d'ordination largement utilisée actuellement (voir par exemple, Greenacre et Vrba, 1984) et très bien décrite dans l'ouvrage de Escoffier et Pagès (1990).

Des combinaisons linéaires des variables initiales permettent d'obtenir de nouvelles variables qui servent à définir les axes de l'ACP. L'axe principal est celui qui permet d'avoir la variance maximale des individus. La deuxième composante est recherchée de façon à ce qu'elle ait une corrélation linéaire nulle avec la première et, à **son** tour, la plus grande variance. Cette deuxième composante fournit la plus grande information possible complémentaire de la première. Et ainsi de suite, jusqu'à la **pième** composante principale. Les deux premiers axes portent souvent la majorité de l'information contenue dans le tableau de données, mais ce n'est pas systématique (cas **par** exemple où toutes les variables ne sont pas corrélées entre elles).

4.2.3. Analyse Factorielle des Correspondances

L'Analyse Factorielle des Correspondances (AFC) (Hirschfeld, 1935, Fisher, 1940, Benzécri, 1973, Greenacre et Vrba, 1984) est une méthode statistique essentiellement descriptive qui permet de condenser et projeter sous forme graphique le maximum de l'information contenue dans un tableau de données d'effectifs. Ces données se présentent sous forme de tables de contingence (effectifs correspondant à une variable donnée pour une série d'unités systématiques), ou de tableaux de valeurs binaires ou ordinales (présence/absence d'espèces par exemple dans chaque prélèvement), ou

de tableaux disjonctifs (par exemple, répartition d'espèces dans chaque prélèvement en terme d'absence, présence, densité). L'AFC procède alors par comparaisons des profils lignes d'une part, des profils colonnes d'autre part, par l'intermédiaire de la distance du X^2 . Les axes principaux extraits dans l'espace des lignes et dans celui des colonnes s'avérant être les mêmes, il est alors possible de réaliser une projection simultanée (projection duale) des points-lignes et des points-colonnes, qui sont donc mis en correspondances.

Dans notre étude, nous avons utilisé les AFC pour illustrer graphiquement les différences entre les échantillons de macroinvertébrés collectés dans les différents sites et pour mettre en évidence l'inféodation d'une ou plusieurs espèces à un site déterminé. Dans certains cas, des pièges ont été détruits ou ont disparus. Dans ce cas, l'abondance des macroinvertébrés a **été** calculée par piège et par site pour homogénéiser les données. Les espèces ayant une fréquence par substrat inférieure à 1 **pour** chaque période d'échantillonnage ainsi que les espèces trouvées dans deux échantillonnages seulement ont été considérées comme rares et n'ont pas été retenues pour ces analyses.

4.2.4. Analyses de co-inertie

L'analyse de co-inertie (Chessel et Mercier, 1993) est une méthode statistique qui synthétise l'analyse inter-batterie de Tucker (1958), l'analyse des correspondances de tableaux de profils écologiques de Romane (1972) et l'analyse canonique sur variables qualitative de Cazes (1980) qui sont des couplages simples de triplets statistiques ACP-ACP, ACM-ACM (Analyse des Correspondances Multiples) et ACM-AFC. Un triplet statistique (X , D_p , D_n) est composé d'un tableau X de données, d'une matrice des poids D_p associés aux colonnes de X et d'une matrice des poids D_n associés aux lignes de X . En écologie, l'analyse de Co-inertie va permettre de vérifier s'il existe une Co-structure entre un tableau X (triplet X , D_p , D_n) de données environnementales et un tableau Y (triplet Y , D_q , D_n) de données faunistiques ou floristiques.

Dolédec et Chessel (1994) résument le principe de l'analyse de Co-inertie très simplement. Soient X le tableau de données environnementales et Y le tableau de données faunistiques. **Des** analyses séparées font ressortir un axe principal dont la direction vectorielle maximise la variabilité (ou l'inertie) des coordonnées des projections des individus de chacun des tableaux de données. Cependant, il paraît concevable d'isoler un nouvel axe dans le premier espace multidimensionnel ("l'axe environnemental") et un second axe dans l'autre espace multidimensionnel ("axe faunistique"), de telle manière que la covariance entre les deux nouveaux jeux de coordonnées des projections des lignes de chacun des deux tableaux soit maximale. Cette covariance maximale traduit une corrélation et simultanément des déviations **standards** maximales des deux nouveaux jeux de coordonnées environnementales et faunistiques.

Afin de valider l'existence d'une co-structure significative entre les deux tableaux de données, il est nécessaire d'effectuer un test de signification. Ceci est réalisé à l'aide d'un test de Monte-Carlo où les lignes des tableaux X et Y sont permutées simultanément. A chaque permutation aléatoire une nouvelle covariance est calculée. Si la covariance obtenue dans l'analyse de Co-inertie est supérieure à celles obtenues par les permutations, l'existence significative d'une Co-structure entre les deux tableaux est validée.

Dans notre cas, les tableaux de données environnementales sont composés des résultats des mesures des différents paramètres dans les sédiments piégés et les tableaux faunistiques sont composés des relevés de macroinvertébrés benthiques. Les analyses de co-inertie ont été réalisées à l'aide du logiciel ADE4 (Chessel et Dolédec, 1993) fonctionnant avec Hypercard[©] sur du matériel Macintosh[®].

II. LA METALLOTHIONEINE DE GARDON

1. Le matériel biologique: le gardon (*Rutilus rutilus*)

Le gardon (*Rutilus rutilus* L.) est un ostéichthyen d'eau douce de la famille des cyprinidés. Il possède un corps de couleur argentée, allongé et comprimé latéralement. Sa bouche a une ouverture étroite, pratiquement horizontale. La nageoire dorsale est située à l'aplomb des nageoires pelviennes contrairement à la nageoire dorsale du rotengle qui est placée nettement en arrière des pelviennes. Les nageoires pectorales, pelviennes, anales et l'iris de l'oeil sont rougeâtres. Il vit souvent en bancs dans la végétation subaquatique des rives des lacs, des étangs et des cours d'eau à faible courant et parfois même en eau saumâtre. Son régime alimentaire, variant avec l'âge, est constitué de petits invertébrés aquatiques, de végétaux et de détritus. Bien connu des pêcheurs, ce poisson est souvent consommé par l'homme et est également la proie de poissons carnassiers tels que les brochets, les sandres, les perches et les anguilles, eux-mêmes consommés par l'homme qui est, par conséquent, le dernier maillon de la chaîne alimentaire.

Les gardons utilisés pour la production de métallothionéine proviennent du commerce, de pêcheurs ou de la pisciculture de M. Patoor à Bergues. Ils sont conservés vivants dans des bacs en polyéthylène de 500 litres d'eau de réseau aérée continuellement et partiellement remplacée toutes les 48 heures.

2. Purification de la métallothionéine hépatique

Les différentes étapes de purification de la métallothionéine hépatique du gardon sont résumées par la figure 9.

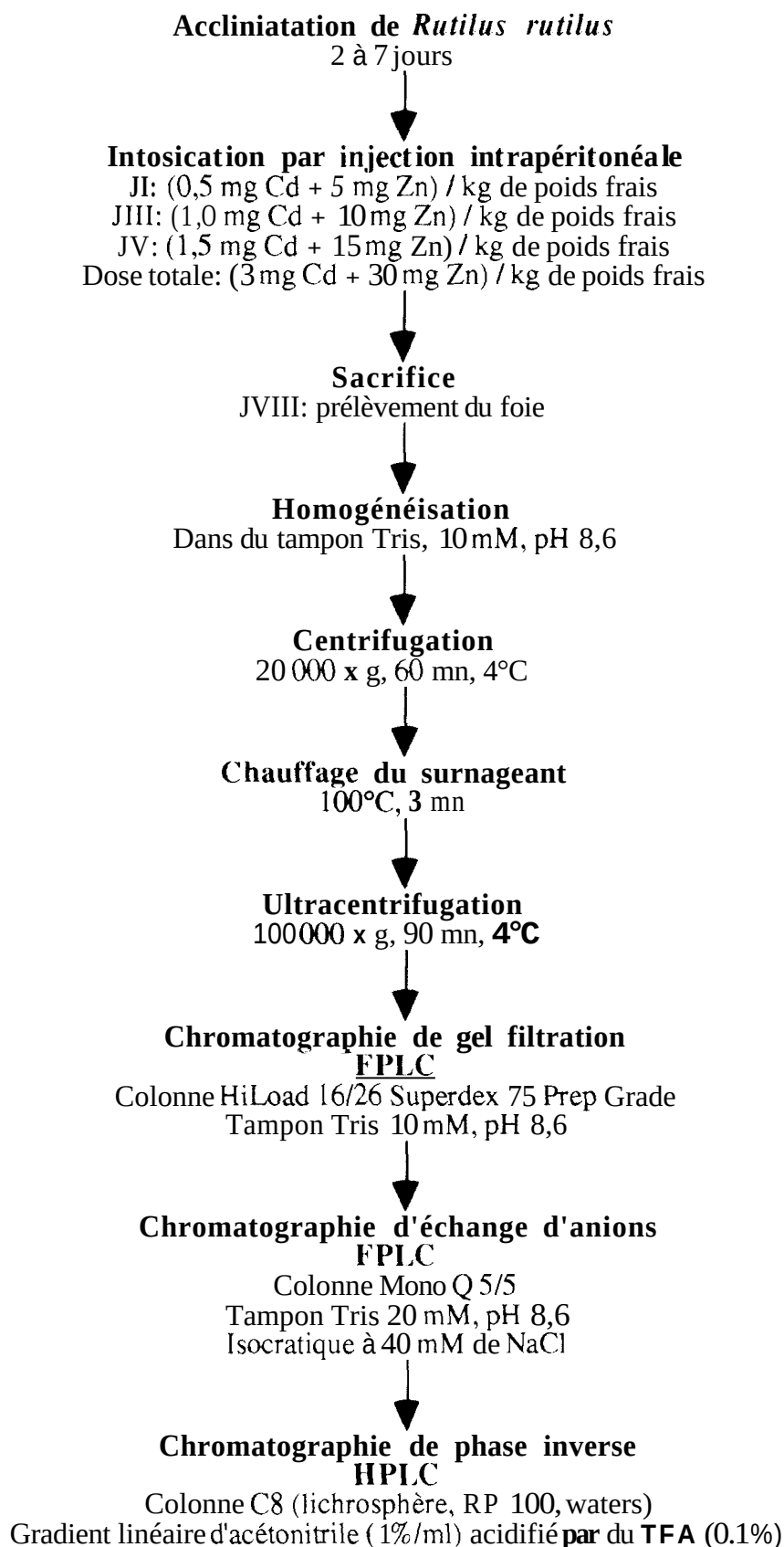


Figure 9. Les différentes étapes de la purification de la métallothionéine.

2.1. Intoxication des poissons par du Cd et du Zn

Sachant que le prétraitement avec de faibles doses de métaux prévient ou réduit la toxicité aiguë de plus fortes doses chez les poissons (Cherian et Nordberg, 1983), nous avons utilisé une méthode d'intoxication dérivée de celle utilisée par Hamilton et Mehrele (1987) pour induire la métallothionéine de truite et de celle d'Hogstrand et Haux (1990) pour induire la métallothionéine de perche. Les gardons sont intoxiqués expérimentalement par des injections d'une solution saline (0,9%) de zinc et de cadmium dans la cavité intrapéritonéale. L'injection de doses croissantes permet d'habituer le poisson et d'amplifier la synthèse de métallothionéine. Le premier jour, les poissons reçoivent 0,5 mg de cadmium et 5,0 mg de zinc par kilogramme de poids frais. Le troisième jour, ils reçoivent 1 mg de Cd et 10 mg de Zn par kilogramme de poids frais. La dernière dose (1,5 mg de Cd et 15 mg de Zn par kilogramme de poids frais) est administrée le cinquième jour. La dose totale injectée est donc de 3 mg de Cd et 30 mg de Zn par kilogramme de poids frais. Le huitième jour, les gardons sont sacrifiés par un séjour de quelques minutes dans une solution léthale de MS 222 (Méthyl sulfonate) à 1 gramme par litre d'eau d'élevage.

2.2. Extraction tissulaire

Les foies prélevés juste après le sacrifice des gardons sont rincés dans une solution de tampon Tris (**Tris-hydroxy-méthyl-amino-méthane**) 10 mM ajusté à pH 8,6 par l'acide chlorhydrique (HCl), puis broyés à l'aide d'un homogénéiseur Polytron dans deux volumes du même tampon. Ces étapes s'effectuent sur de la glace pilée.

L'homogénat obtenu est centrifugé à 20 000 x g pendant 60 min à 4°C (centrifugeuse Beckman, rotor JA20). Le surnageant obtenu est chauffé au bain-marie à 100°C pendant 3 mn afin de faire précipiter les protéines thermosensibles et d'inhiber les actions enzymatiques (la métallothionéine étant thermorésistante). Il est ensuite centrifugé à 100 000 x g pendant 90 mn à 4°C sur une ultracentrifugeuse Beckman équipée d'un rotor SW40. La fraction soluble ainsi séparée est prélevée et utilisée immédiatement ou congelée à -20°C en aliquotes de 2 ml.

2.3. Chromatographie de filtration sur gel

La première étape de la purification de la métallothionéine de gardon consiste en une chromatographie de filtration sur gel de l'extrait soluble réalisée par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) sur une colonne HiLoad 16/60 Superdex 75 Prep Grade (Pharmacia) dont le domaine de séparation des protéines globulaires est de 3 à 70 kDa. L'extrait soluble (2 ml) est filtré sur un substrat de porosité 0,22 µm puis déposé sur la colonne préalablement équilibrée dans du tampon Tris 10 mM, pH 8,6. L'élution est effectuée au débit de 1 ml/mn. L'absorbance est mesurée

en continu au cours de la séparation, à 280 nm (absorbance des ac des aminés aromatiques) et à 254 nm (absorbance des liaisons Cd-SH). Des fractions de 2 ml sont recueillies.

2.4. Détection de la métallothionéine

2.4.1. Dosage du Zn, du Cd et du Cu

Le Zn et le Cd sont dosés directement dans les fractions collectées par spectrophotométrie d'absorption atomique à la flamme (Perkin Elmer 2380). Bien que les poissons n'aient pas subi d'injection de cuivre, nous avons dosé ce métal afin de mettre en évidence un éventuel rôle de la métallothionéine dans la prise en charge du cuivre.

2.4.2. Détection des groupements sulfhydriles

Le réactif d'Ellman (Ellman *et al.*, 1961) peut être utilisé pour quantifier les métallothionéines (Tukendorf et Baszynski, 1985; Berthet, 1989; Duquesne, 1992). Dans notre purification, il est utilisé pour déterminer quelles sont les fractions riches en groupements thiols.

100 à 300 µl des fractions à analyser sont déposés dans des puits d'une microplaque (destinée en principe aux dosages immunologiques). Du tampon (utilisé pour les chromatographies) est ajoutée pour obtenir un volume total de 300 µl. 50 µl de solution de 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (40 mg de DTNB dans 10 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,8) ont été ajoutés. Le temps de réaction est de 30 mn. La lecture d'absorbance est faite à 410 nm sur un lecteur de plaques (Dynatech, MR 5000). Le maximum d'absorbance correspond aux fractions contenant le maximum de groupements thiols.

2.5. Chromatographie d'échange d'ions

Les fractions riches en Cd, Zn et en groupements thiols sont regroupées et déposées sur une colonne (0,5 x 5,0 cm) de résine échangeuse d'anions (MonoQ HR 5/5, Pharmacia) équilibrée avec du tampon Tris 10 mM, pH 8,6. La colonne est éluée avec un gradient discontinu de NaCl à 0,05 M pendant 15 mn, à 0,1 M pendant 5 mn et à 1 M pendant 5 mn à un débit de 1 ml/min. L'absorbance est mesurée à 254 nm et à 280 nm. Des fractions de 1 ml sont recueillies. Celles-ci sont soumises au dosage du Cd, du Zn, du Cu et des groupements thiols.

2.6. Chromatographie en phase-inverse

Les fractions riches en Cd, Zn et en groupements thiols issues de la chromatographie d'échange d'anions ont été séparées par HPLC (High Performance Liquid Chromatography) sur une colonne C8 (lichrosphère, RP 100, waters) de phase inverse équilibrée avec de l'eau acidifiée au TFA (Acide Trifluoroacétique) (0,1%). La colonne est éluée par un gradient linéaire d'acétonitrile (20-50%) acidifié au TFA (0,1 %) à un débit de 1 ml/mn. L'absorbance est mesurée à la fois à 226 nm (absorbance de la liaison peptidique) et à 254 nm. Cette étape chromatographique a été réalisée en utilisant le système HPLC Gold (Beckman) équipé d'un détecteur à barrette de photodiodes (168, Beckman).

2.7. Dosage de la métallothionéine par colorimétrie

Après la dernière étape de purification, les fractions contenant la métallothionéine sont évaporées par rotation sous vide (Speed Vack Vacuum, Savant) jusqu'au moins 1/5^{ème} du volume de départ, afin d'éliminer l'acide trifluoroacétique et l'acétonitrile. 10 µl de l'échantillon sont alors déposés dans des puits de microplaques. 290 µl d'eau bidistillée sont ajoutés pour obtenir un volume total de 300 µl. 50 µl de la solution de DTNB sont ajoutés. Après trente minutes l'absorbance est lue à 410 nm sur le lecteur de plaque. Les valeurs d'absorbance sont transformées en concentrations en groupements sulfhydryles en les comparant à une gamme de calibration préparée avec du glutathion réduit. La concentration en métallothionéine est obtenue en divisant la valeur calculée par 20, nombre correspondant au nombre de résidus cystéiques par molécule.

3. Méthodes électrophorétiques

Plusieurs techniques électrophorétiques ont été utilisées au cours de notre étude afin de contrôler les différentes séparations chromatographiques et de caractériser les isoformes de la métallothionéine.

3.1. Electrophorèse monodimensionnelle en milieu dénaturant

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (sodium dodecyl sulfate) a été effectuée selon la méthode de Laemmli (1970). Des gels de 0,75 mm d'épaisseur ont été utilisés. Le gel de séparation est constitué d'un gradient d'acrylamide 5-25%. Avant le dépôt, les échantillons à analyser ont été traités pendant 3 mn à 100°C dans le tampon de reprise Tris/HCl 62,5 mM, pH 6,8; SDS 2% (V/V); saccharose 10% (V/V); et β-mercaptoéthanol 5% (V/V), ce dernier permettant la rupture des ponts disulfures dans la molécule et ainsi la dissociation de molécules oligomériques. Un mélange de protéines de masses moléculaires connues: 94 kDa (phosphorylase B), 67 kDa (albumine), 43 kDa (ovalbumine), 30 kDa (anhydrase carbonique), 20 kDa (trypsine inhibiteur), 14,4 kDa (α-

lactalbumine) a été analysé conjointement aux échantillons. Lors de l'emploi de grandes cuves (15x20 cm) la migration a été effectuée 15mA pendant 5 h dans le tampon Tris-Glycine 25mM, pH 8,3; SDS 0,1% (V/V). Dans certains cas, l'analyse électrophorétique a été effectuée à 200V pendant 2 h en utilisant des gels de dimensions plus restreintes (7x10 cm). Le gel a ensuite été coloré sous agitation par le bleu de Coomassie à 0,1% dans le mélange isopropanol 25% / acide acétique 10% / eau 65% pendant 1h30 puis décoloré par l'acide acétique à 10%.

3.2. Electrofocalisation

L'électrofocalisation a été réalisée en utilisant le "Phast Gel System" (Pharmacia) sur un "Phast Gel" IEF 3-9 permettant la séparation de constituants de point isoélectrique compris entre 3 et 9 unités pH. La migration des échantillons ainsi que les étapes de coloration et de décoloration du gel ont été effectuées selon les conditions opératoires décrites par la firme. Un mélange de protéines de point isoélectrique déterminé (3-9, Pharmacia) a été analysé conjointement aux échantillons.

4. Caractérisation de la métallothionéine

Le séquençage de la métallothionéine de gardon a été réalisé à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR 9022 CNRS, à Strasbourg, selon le protocole décrit ci-après.

4.1. Electrophorèse capillaire

Avant le séquençage, la pureté de la métallothionéine a été contrôlée par une électrophorèse capillaire (Applied Biosystems model 270A-HT). Un capillaire de silice de 72 cm de long a été utilisé. La séparation d'un échantillon de 2nl est effectuée de l'anode à la cathode (voltage de 20 kV) sous vide dans un tampon citrate (20 mM) à pH 2,5 à une température de 30°C. La détection est faite à 200 nm.

4.2. Réduction-alkylation

40 µl de volume réactionnel (1,4 g de chlorure de guanidine 6M, 1,25 ml de Tris/HCl 1M, pH 7,5, 10 µl d'EDTA 0,5M, QSP 2,5 ml d'eau milliQ) et 2 µl de DTT sont ajoutés à 5 µl de la solution de métallothionéine. Le mélange est chauffé à 45°C au bain-marie pendant une heure à l'obscurité sous N₂. Après ajout de 2 µl de 4-vinylpyridine (4Vp), le mélange est à nouveau chauffé à 45°C au bain marie pendant 10mn à l'obscurité. La réaction est arrêtée par 150 µl de TFA 0,01% dans l'eau milliQ. La métallothionéine est séparée par chromatographie de phase-inverse (HPLC) en utilisant un gradient d'acétonitrile 10-60% en 50 min.

4.3. Masse moléculaire

La masse moléculaire de MTG1 a été déterminée à l'aide d'un spectromètre de masse **par** electrospray (VG Biotech Bio-Q, Manchester) après l'avoir dissoute dans un mélange eau/méthanol (50:50; v:v). La masse moléculaire de MTG1 réduite et alkylée a été déterminée en spectrophotométrie d'adsorption laser (MALDI-TOF) (Bruker, Bremen, Allemagne) après l'avoir reprise dans 1,5 µl d'une solution matricielle de α-cyano-acétone.

4.4. Principe de la dégradation d'Edman

Cette technique élaborée par Edman (1950, 1956) ou méthode au PITC (phényl-isothiocyanate) permet le décrochement récurrent des acides aminés à partir de l'extrémité NH₂-terminale des protéines et peptides (figure 10). Chaque cycle de dégradation est composé de 3 étapes:

- 1 - couplage du PITC au groupement amine du premier résidu N-terminal de la molécule.
- 2 - clivage de la **phényl-thiocarbamyl-protéine** (PTC-protéine) par une cyclisation en milieu acide (acide trifluoroacétique) donnant un dérivé thiazolinone-acide aminé (**ATZ-AA**) et la protéine diminuée de son premier acide aminé.
- 3 - conversion du dérivé thiazolinone instable en un dérivé plus stable, le phényl-thiohydantoin-acide aminé (**PTH-AA**) qui est alors identifié.

Dans le cas de la dégradation automatisée, l'identification de l'acide aminé est plus couramment réalisée à l'aide d'un système de chromatographie liquide à haute performance (HPLC) couplé au séquenceur (passage sur une colonne de phase-inverse C-18 et comparaison de son temps de rétention avec celui des 20 acides aminés courants d'un mélange traité de manière similaire à l'échantillon).

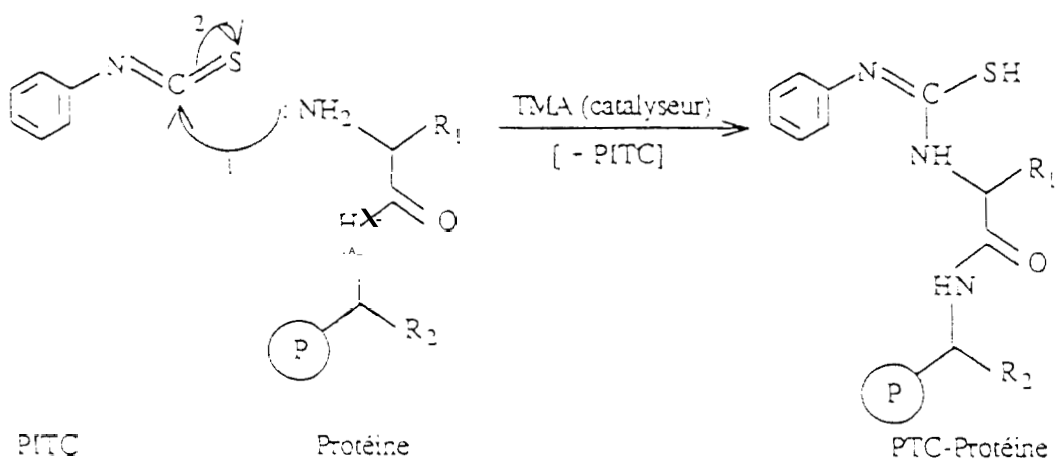
4.5. Séquence en acides aminés de la région N-terminale

La dégradation automatique d'Edman de la métallothionéine purifiée et la détection des dérivés phénylthiodantoin (PTH-Xaa) sont réalisées sur un séquenceur automatique (Applied Biosystems, model 473A).

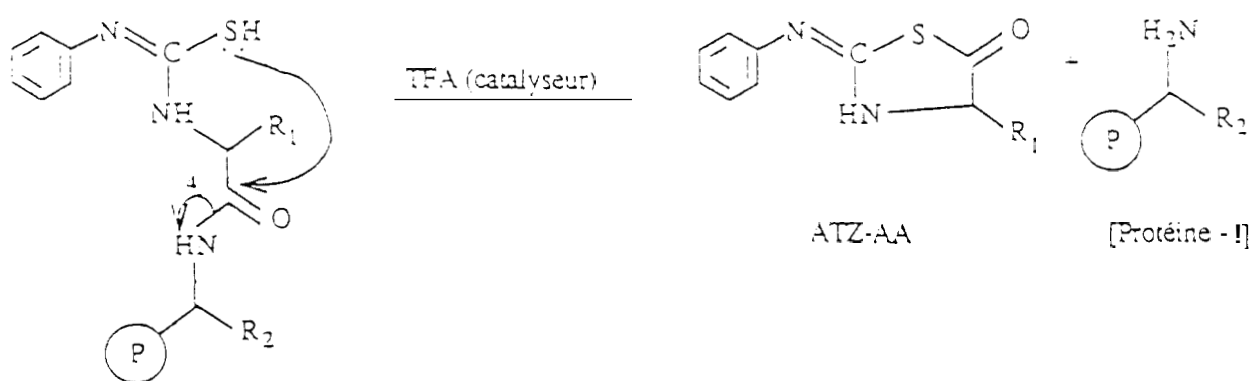
4.6. Clivage de la molécule et séparation des peptides par HPLC

La longueur de la molécule étant trop importante pour permettre son séquençage complet à partir de la protéine native, des clivages ont été réalisés afin d'obtenir des peptides plus courts.

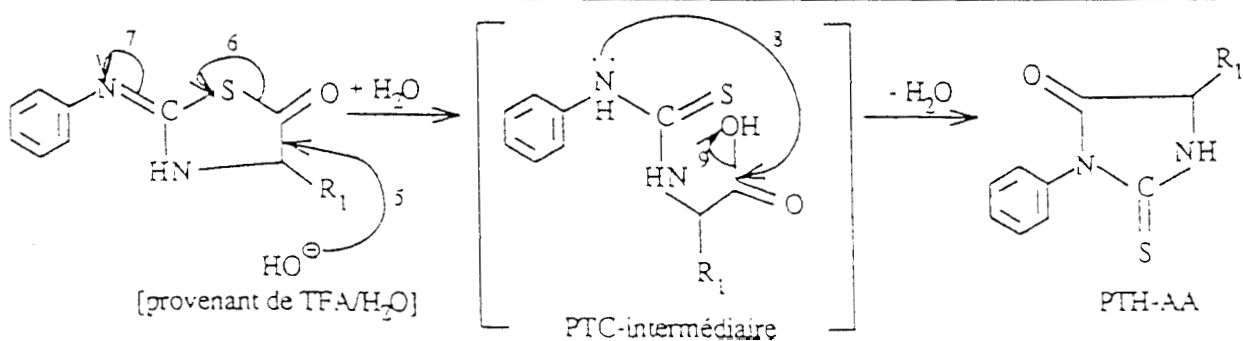
La stratégie de coupure employée a été définie en fonction de la séquence de l'extrémité N-terminale précédemment déterminée et de la ressemblance aux séquences des métallothionéines de poissons et des autres vertébrés. La faible quantité de résidus de Lysine (bien répartis le long de la protéine) nous a conduits à réaliser une coupure par l'endoprotéinase Lys-C (*Achromobacter* protease



COUPLAGE



CLIVAGE



CONVERSION

Figure 10. Etapes de la dégradation d'Edman

I, Takara, Kyoto, Japon). MTG1 réduite et alkylée (3µg) a été ajoutée au tampon de digestion (Tris 10 mM, pH 9,0; 0,01 % Tween 20) et incubée pendant 18h avec 5 pmol d'endoprotéinase Lys-C à 37°C. La réaction a été arrêtée par l'adjonction de 100 µl d'eau/TFA (0,1 %). La séparation des peptides a été réalisée par chromatographie de phase inverse sur une colonne C-18 (Aquapore, 250x4,8 mm, Browlee) en utilisant un gradient de 2 à 70% de tampon **B** dans **A** (B = 75% d'acétonitrile dans de l'eau acidifiée par 0,05 % de **TFA**, A = eau avec 0,05 % de TFA) pendant 120 min. à 0,25 ml/min. Les différents peptides obtenus ont été concentrés par rotation sous vide (Speed Vack Vacuum, Savant) avant d'être soumis à un séquençage direct et à une détermination de masse par MALDI-TOF.

5. Etude des effets du Cd et du Zn et de combinaisons des deux éléments en injections intrapéritonéales

5.1. Protocole expérimental

Nous avons étudié l'effet de l'injection intrapéritonéale chez le gardon de Cd et/ou de Zn en doses faibles ou fortes sur l'accumulation hépatique de ces métaux. Les doses fortes de Cd et de Zn, notées dose Cd⁺ et dose Zn⁺, correspondent à celles utilisées dans le protocole d'induction de la métallothionéine en vue de sa purification. Les valeurs des doses faibles, notées dose Cd⁻ et dose Zn⁻, correspondent à la moitié de la valeur des doses fortes. Les intoxications ont été réalisées par injections de 3 doses croissantes espacées de 48 h. L'expérience nécessite 9 essais correspondant aux 8 combinaisons possibles entre les 2 métaux, compte tenu que chaque métal est apporté à deux doses différentes, et à l'essai témoin. Les poissons de l'essai témoin ont subi des injections d'une solution de NaCl à 0,9%. Les animaux des huit autres essais ont reçu les doses totales suivantes:

- Cd⁻: 1,5 mg de Cd/kg de poids frais,
- Cd-Zn⁻: 1,5 mg de Cd/kg de poids frais et 15 mg de Zn/kg de poids frais,
- Cd-Zn⁺: 1,5 mg de Cd/kg de poids frais et 30 mg de Zn/kg de poids frais,
- Cd⁺: 3 mg de Cd/kg de poids frais,
- Cd+Zn⁻: 3 mg de Cd/kg de poids frais et 15 mg de Zn/kg de poids frais,
- Cd+Zn⁺: 3 mg de Cd/kg de poids frais et 30 mg de Zn/kg de poids frais,
- Zn⁻: 15 mg de Zn/kg de poids frais.
- Zn⁺: 30 mg de Zn/kg de poids frais,

Chaque essai est composé de 5 lots de 5 poissons disposés de façon aléatoire dans des bacs en matière plastique d'une contenance de 20 litres. L'expérience a été réalisée dans de l'eau de réseau à une température de 13°C. Le volume d'injection des différentes solutions de métaux ont été adaptées au poids de chaque gardon.

Trois jours après la dernière injection, les gardons ont été sacrifiés et les foies immédiatement prélevés. Les cinq foies des cinq poissons d'un même lot ont été traités ensemble selon le protocole décrit dans le paragraphe II.2.2. précédent. Nous avons obtenu ainsi 45 extraits hépatiques qui ont été analysés ultérieurement.

5.2. Dosage des métaux

Une aliquote de 200 µl de chaque extrait a été minéralisée dans 2 ml d'acide nitrique concentré (Suprapur 65%) pendant une nuit à froid dans un tube à essai. Après deux heures de chauffage à reflux à 120°C, et évaporation jusqu'à disparition des vapeurs blanches, deux ml d'un mélange de minéralisation (HNO₃, H₂SO₄, HClO₄, dans les proportions 10/2/3 en volume) ont été ajoutés. Après chauffage à 180°C jusqu'à réduction de moitié du volume, le minéralisat a été complété à 5 ml avec de l'eau bidistillée.

Les teneurs en Cd et en Zn ont été déterminées à l'aide d'un spectrophotomètre d'absorption atomique en flamme. Les valeurs ont été rapportées à la quantité de protéines de chaque extrait déterminée par la méthode Biorad.

5.3. Dosage des groupements sulfhydriles

Les teneurs en groupements sulfhydriles ont été déterminées selon le protocole décrit précédemment (§ 11.2.7.). Afin de libérer l'ensemble des groupements sulfhydriles qui pourraient être liés à des métaux, nous avons travaillé sous des conditions dénaturantes et en présence d'un chélateur. Des aliquotes de 20 µl de chaque extrait ont été diluées dans du tampon Tris HCl, 0,1 M, pH 8,6 contenant 2% de SDS et 0,5 mg/l d'EDTA. Les teneurs en groupements sulfhydriles ont été rapportées à la quantité de protéines.

5.4. Analyse statistique

Des ANOVA ont permis de vérifier s'il existait des variations entre les différents essais pour les teneurs des extraits hépatiques en Cd, en Zn et en groupements sulfhydriles. Le cas échéant, les teneurs moyennes ont été comparées à l'aide de tests de comparaison multiple de **type SNK**.

5.5. Analyses chromatographiques

Pour chaque essai, nous avons constitué un échantillon de 2 ml formé de 5 aliquotes de **400 µl** provenant des 5 extraits hépatiques des 5 lots constituant cet essai. Un ajustement des concentrations

protéiques des 9 échantillons a été obtenu par dilution des échantillons les plus concentrés. Deux ml de chaque échantillon ainsi constitué ont été déposés sur une colonne de gel filtration et chromatographiés selon la méthode décrite précédemment (§ II.2.3).

6. Production d'anticorps monoclonaux

La production d'anticorps monoclonaux a été réalisée à l'Institut Pasteur de Lille, au Centre d'Immunologie et de Biologie Parasitaire (Unité Inserm U.167) dirigé par le Pr. Capron. L'intérêt majeur des anticorps monoclonaux est qu'ils sont produits par une souche qui est en théorie "immortelle". Ceci permet d'obtenir des grandes quantités d'anticorps spécifiques. Les différentes étapes de fabrication des anticorps monoclonaux dirigés contre la métallothionéine hépatique de gardon sont résumées par la figure 11.

6.1. Immunisation de souris balb/c

Des souris Balb/c femelles âgées de huit semaines ont été immunisées par 10 µg de MTG1 en présence d'adjuvant complet de Freund (ACF) en injection sous-cutanée de 50 µl (rapport solution antigénique/adjuvant 50% vol:vol). Des rappels à intervalles d'injection de 3 à 4 semaines ont été réalisés en présence d'adjuvant incomplet de Freund (AIF). Quatre jours avant leur sacrifice, les souris subissent un dernier rappel. Les animaux sont saignés quelques jours après chaque injection par ponction rétro-orbitale, après anesthésie à l'éther. Quatre jours après la dernière immunisation, les souris sont saignées et le sérum est récupéré après coagulation.

6.2. Analyse de la réponse immune

La réponse spécifique de la métallothionéine chez les souris immunisées a été recherchée par la technique d'électrotransfert (Towbin *et al.*, 1979). La migration de la métallothionéine est réalisée sur un gel d'acrylamide 14% (SDS-PAGE). Elle est ensuite électrotransférée sur une feuille de nitrocellulose de 0,45 µm (Schleider et Schuell, RFA) (2 h à 60 V dans une cuve de transfert HSI, USA, tampon de transfert: Tris HCl 20 mM, glycine 0,15 mM, méthanol 20%), puis saturée par une solution à 3% de lait écrémé dans du PBS (tampon $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$, 10 mM, pH 7,3). La qualité du transfert est vérifiée en colorant les protéines sur une piste par l'amido-schwartz avant l'étape de saturation.

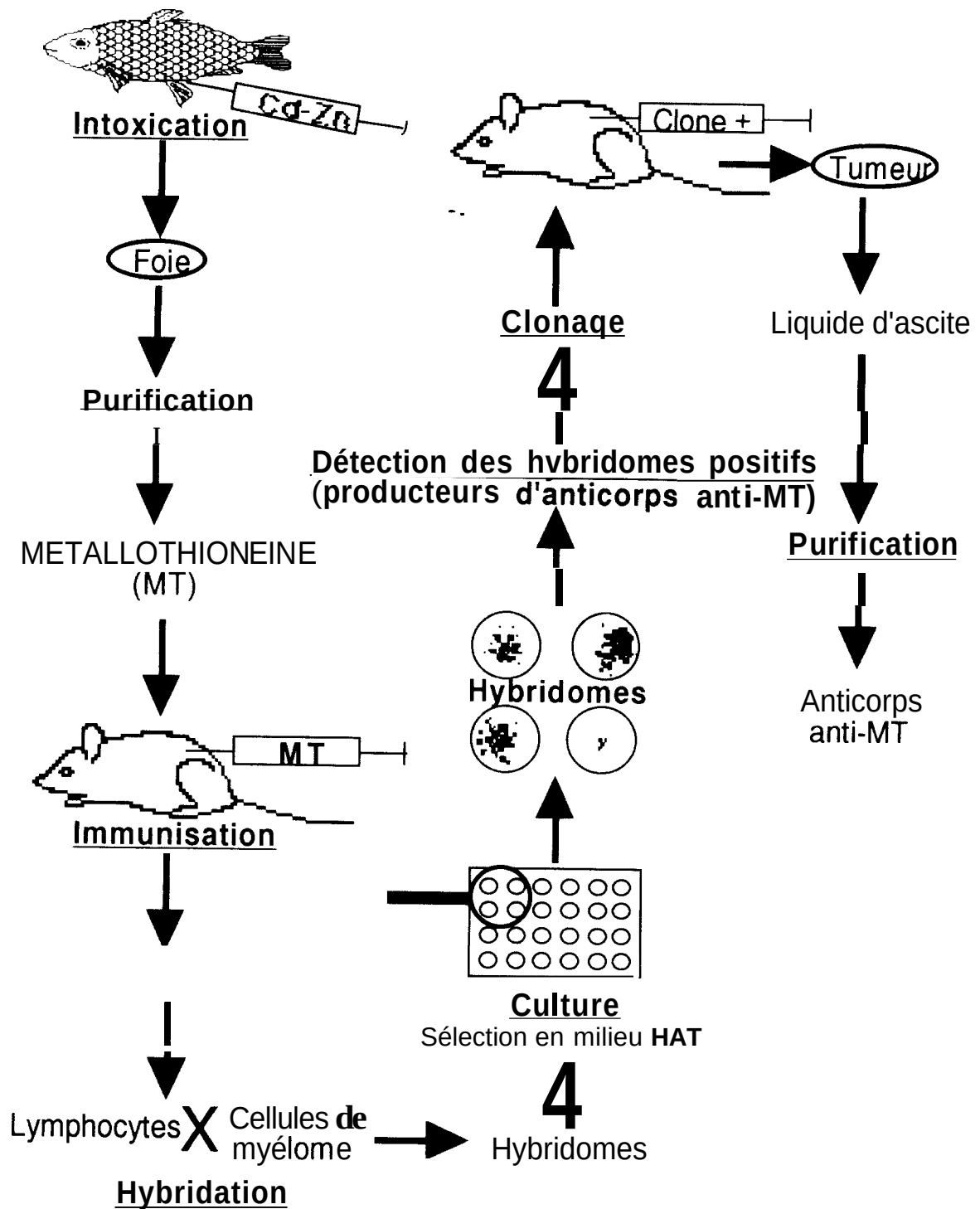


Figure 11. Étapes de production d'anticorps monoclonaux spécifiques de la métallothionéine hépatique de gardon.

Les bandes de nitrocellulose sont incubées pendant une à trois heures avec le sérum des souris immunisées dilué au vingtième dans du PBS. Tous les lavages sont effectués en PBS-Tween-20 (Merck, France) 0,1 % (3 à 5 lavages de 10 mn). Les bandes sont ensuite incubées pendant une heure à température ambiante avec des anticorps de lapin anti-IgG de souris marqués à la peroxydase (Diagnostics Pasteur, France, Paris) dilués au 1/10000^{ème} dans une solution de sérumalbumine bovine (SAB) à 3 % dans le PBS. Après lavage, l'immunoréactivité est révélée en quelques minutes par le mélange (4-Chloro-1-naphthol / H₂O₂ / méthanol / PBS).

6.3. Hybridation

La production d'anticorps monoclonaux anti-métallothionéine de gardon a été envisagée par fusion des lymphoblastes de **souris** immunisées avec une lignée continue d'un myélome de souris Balb/c. Cette souche nommée SP2O ne sécrète pas d'Ig et est déficiente en enzyme hypoxanthine-**guanine-phosphoribosyl-transférase** (HGPRT) (elle ne peut pas utiliser des nucléotides préformés, l'hypoxanthine et la thymidine) donc sensible à l'aminoptérine qui bloque la synthèse *de novo* des nucléotides. Cette caractéristique permet la sélection des hybridomes dans un milieu sélectif approprié.

Quatre jours après la dernière immunisation, la rate de la souris est prélevée stérilement et homogénéisée au potter dans du milieu B (tableau 21). Les lymphoblastes sont filtrés sur blutex, lavés et centrifugés en milieu B (voir tableau 21) puis comptés. Leur hybridation avec les cellules de myélome (1 cellule myélomateuse / 5 lymphoblastes) est réalisée sous agitation douce pendant 1 minute par adjonction goutte à goutte d'une solution de polyéthylène-glycol / diméthylsulfoxyde (PEG/DMSO) (Boehringer, France) qui favorise la fusion des cellules (Pontecorvo, 1975, Davidson *et al.*, 1976).

6.4. Sélection des cellules hybrides

Après la fusion, le culot cellulaire est lavé pour éliminer l'excès de PEG/DMSO. Les cellules sont distribuées dans les plaques de culture cellulaire 24 ou 96 puits (Nunc, France) à raison de 25000 ou 50000 cellules/puits contenant des cellules nourricières. Ces dernières (essentiellement des macrophages) ont été préparées par lavage péritonéal de souris Balb/c. Les hybridomes sont alors sélectionnés en milieu **HAT** (voir tableau 21) selon le principe de Littlefield (1964). Dans ces conditions, cinq possibilités se présentent:

- 1- Les cellules de myélome non hybridées HGPRT- sensibles à l'aminoptérine meurent rapidement.

- 2- Des cellules de myélome hybridées entre elles meurent rapidement pour la même raison.
- 3- Les lymphoblastes non hybridés sont incapables de se multiplier.
- 4- Les lymphoblastes hybridés entre eux ne se multiplient pas non plus.
- 5- Les lymphoblastes hybridés avec les myélomes possèdent les caractéristiques des deux types cellulaires: la faculté de vivre en milieu contenant l'aminoptérine provenant des lymphoblastes HGPRT⁺ et la faculté de se multiplier provenant des cellules myélomateuses.

Les plaques sont incubées en atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C. Les cultures sont observées quotidiennement sous microscope afin de détecter les clones présents dans chaque puits, d'éliminer les puits contaminés, de remettre en suspension les amas cellulaires et de changer les milieux régulièrement. Les clones sélectionnés sont passés progressivement en milieu HT, puis A (voir tableau 21) en procédant par des dilutions au 1/2 successives. Ils sont d'abord cultivés en présence de cellules nourricières puis sans celles-ci.

6.5. Dépistage des hybridomes positifs

Les méthodes immunologiques de dépistage des hybridomes positifs sont pratiquées à partir des surnageants des puits qui présentent un tapis monocellulaire uniforme, afin de conserver ou d'éliminer rapidement les hybridomes en fonction des résultats. Les surnageants sont testés en méthodes immuno-enzymatique (technique ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, ou **DIA**: Dot Immuno-binding Assay).

6.5.1. ELISA

Des plaques de type ELISA (Immuno-modules, Nunc, France) sont sensibilisées **par** l'antigène à raison de 100 µl/puits d'une solution de métallothionéine à 2,5 ou 5 µg/ml en tampon phosphate salé (0,01M, pH 7,2, NaCl: 9 g/l) (PBS) et incubé pendant 3 heures à 37°C. Les plaques sont ensuite saturées pendant une heure à température ambiante par une solution de gélatine bovine (Sigma, France) à 0,5% dans du **PBS** (200 µl/puits). Les plaques peuvent alors être conservées après lavage et séchage pendant deux semaines à 4°C. Les sérums dilués au 1/1000^{ème} et les surnageants (purs) sont incubés dans les puits pendant 1h30 à 37°C. La fixation des anticorps spécifiques est révélée par des anticorps de lapin anti-Ig de souris marqués à la peroxydase incubés 1 heure à température ambiante. Tous les lavages sont effectués en PBS-Tween 0,1% à l'aide d'un laveur automatique (Diagnostics Pasteur, France). La coloration qui apparaît quelques minutes après l'ajout du substrat (Tampon Phosphate 0.1 M ajusté avec de l'acide citrique à pH 5,5 et Ortho Phénylènediamine Dihydrochloride, OPD, Sigma, France) est arrêtée **par** 100 µl d'HCl 2N et mesurée à 492 nm. Deux réplicats de chaque échantillon sont analysés.

Tableau 21. Composition et utilisation des milieux de culture cellulaire
(in Grzych, 1982)

NATURE	COMPOSITION	UTILISATION
Milieu A	Milieu DMEM ^(a) NaHCO ₃ : 4x10 ⁻³ M AANE ^(b) : 3,5% SVF ^(c) : 15% Gentamicine: 8 mg/l Glutamine: 4mM pH 7,2 - 7,3	Culture des cellules myélomateuse et hybrides
Milieu B	Milieu DMEM ^(a) NaHCO ₃ : 4x10 ⁻³ M HEPES: 25 mM Gentamicine: 8 mg/l Glutamine: 4mM pH 7,3	Fusion cellulaire
Milieu HAT	Milieu A contenant: Hypoxanthine: 1x10 ⁻⁴ M Aminoptérine: 4x10 ⁻⁴ M Thymidine: 1,6x10 ⁻⁵ M	Sélection des hybrides cellulaires
Milieu HT	Milieu HAT sans aminoptérine	Culture des cellules hybrides (transition entre le milieu HAT et le milieu A)

(a) DMEM: milieu de Eagle modifié par Dulbecco à 4,5 g/l de glucose

(b) AANE: acide amine non essentiel

(c) **SVF**: sérum de veau foetal décomplémenté par chauffage 1 heure à 56°C

Gentamicine (Schering - Plough)

Glutamine (Seromed, RFA)

Milieu Dulbecco (Gibco BRL, France)

Milieu HAT et HT (Sigma, France)

SVF (Boehringer, France)

6.5.2. DIA

La technique DIA est réalisée selon la méthode décrite par Salzet *et al.* (1993). 1 µl de la solution de métallothionéine purifiée est déposé sur une bande de nitrocellulose. Cette dernière est chauffée à 130°C pendant 30 min, puis saturée avec du TBS-Tween-lait (Tris/HCl 0,05M, pH 7,4, NaCl: 0,9%, Tween 20: 0,05%) pendant 30 min. Le surnageant de culture pure ou le sérum dilué au 1/1000^{ème} dans du TBS-Tween-20 est incubé une nuit à température ambiante sous agitation. Trois lavages au TBS-Tween-20 sont réalisés avant d'incuber la feuille de nitrocellulose avec le deuxième anticorps (anticorps de lapin anti-Ig de souris) marqué à la peroxydase pendant deux heures à température ambiante sous agitation. Après lavage, la révélation est faite avec le substrat DAB (Sigma, France). La révélation est arrêtée à l'eau.

6.6. Clonage

Les hybridomes positifs sont ensuite clonés par la technique de dilution limite qui consiste à répartir une suspension cellulaire à raison de x ml par alvéole d'une plaque de culture cellulaire mais de telle façon que ces x ml ne contiennent qu'une seule cellule (*in* Grzych, 1982). Ainsi nous déposons en moyenne une seule cellule dans chaque puits contenant du milieu A et un tapis de cellules péritonéales adhérentes de souris Balb/c. Ceci permet d'assurer une production stable d'anticorps. La multiplication des cellules permet d'obtenir plusieurs millions de cellules **par** clone, qui peuvent être conservées par congélation dans l'azote liquide (6.10⁶ cellules/ml dans 90%SVF / 10% DMSO). Les plaques de culture sont observées tous les jours. Les clones producteurs d'anticorps spécifiques sont sélectionnés et multipliés.

6.7. Détermination des isotypes

Les anticorps spécifiques de MTG1 produits par les hybridomes ont été caractérisés par la technique ELISA. Les puits des plaques ELISA sensibilisés par MTG1 (5 µg/puits) ont été incubés avec les surnageants de culture des hybridomes positifs. Les anticorps spécifiques fixés à la MTG1 ont été identifiés en utilisant des réactifs marqués à la peroxydase reconnaissant spécifiquement les IgG1, les IgG2a, les IgG2b, les IgG3, les IgM ou reconnaissant toutes les Ig de souris (Southern Biotechnology Associates, Inc., USA).

RESULTATS

CHAPITRE III. RESULTATS

I. QUALITÉ PHYSICO-CHIMIQUE, CHIMIQUE ET BIOLOGIQUE DU CANAL À GRAND GABARIT, DE L'AA ET DE L'AA CANALISE.

Pour éviter les redites et apporter plus de clarté dans notre exposé, les comparaisons entre les résultats de nos propres analyses et les données relatives, par exemple, aux valeurs de référence et aux normes actuelles seront effectuées immédiatement après la présentation de ceux-ci et non en fin de chapitre.

1. Qualité du milieu

1.1. Qualité de l'eau

Le dosage des métaux (**Al**, Cd, Cr, **Cu**, Fe, Pb, Zn), des hydrocarbures et des PCB dans les eaux brutes prélevées dans les différents sites étudiés en mai et juin 1992, a été réalisé **par** l'Institut Pasteur de Lille.

1.1.1. Analyse des données

Les résultats regroupés dans le tableau **22** révèlent que les teneurs en Cr, en hydrocarbures et en PCB dans les eaux, pour la plupart des sites, sont inférieures à la limite de détection de l'appareil utilisé. Pour certains sites, les teneurs en Cd, Pb et Zn sont également inférieures à **la** limite de détection.

1.1.1.1. Comparaison des sites en fonction de leurs teneurs métalliques

La comparaison des sites, métal par métal, permet d'effectuer un classement sommaire des différents sites étudiés (tableau **23**).

Concernant **les** éléments métalliques très toxiques tels que le Cd et le Pb, deux constatations émergent:

- les sites de La Bassée (62) et de Béthune (63) sont les plus enrichis en métaux, suivis de très près **par** le site d'Arques.
- Les sites les moins touchés **par** l'enrichissement métallique sont les sites d'Ouve-Wirquin (101) et de Férin (46).

Tableau 22. Concentration en métaux traces, hydrocarbures et PCB ($\mu\text{g/l}$) dans les eaux superficielles brutes.

<: sous la limite de détection; Hyd.: hydrocarbures

Sites et dates		TENEURS DANS LES EAUX ($\mu\text{g/l}$)								
		Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	Hyd	PCR
46	15/06/92	60	<0,5	<5	10	80	< 10	< 10	<0,1	<0,05
	15/04/94								<0,1	<0,05
76	15/06/92	55	<0,5	<5	10	160	10	50	<0,1	<0,05
	15/04/94								0,1	<0,05
62	15/06/92	30	2	<5	10	120	15	60	<0,1	<0,05
	15.04.94								<0,1	0,07
63	15/06/92	50	2	<5	10	100	14	60	<0,1	<0,05
	15/04/94								<0,1	<0,05
101	13/05/92	30	<0,5	<5	10	50	< 10	10		
	17/06/92	50	<0,5	<5	10	70	< 10	< 10		
	15/04/94								<0,1	<0,05
105	13/05/92	100	1	<5	10	190	<10	60		
	17/06/92	110	0,5	<5	10	190	16	40		
	15/04/94								<0,1	<0,05
104	13/05/92	33	<0,5	<5	10	40	< 10	20		
	17/06/92	70	<0,5	<5	10	160	10	20		
	15/04/94								<0,1	<0,05

Tableau 23. Classement des sites en fonction des teneurs en métaux traces dans les eaux brutes.

Métal	CLASSEMENT DES SITES (concentrations métalliques décroissantes)
Al	Arques > autres sites
Cd	[La Bassée; Béthune > Arques]>> autres sites
Cr	Ensemble des sites équivalent
Cu	Ensemble des sites équivalent
Fe	Arques >> Flers-en-Escrebieux; Le Guindal > La Bassée; Béthune > Férin; Ouve-Wirquin
Pb	Tous les sites > Férin; Ouve-Wirquin
Zn	La Bassée; Béthune; Arques; Flers-en-Escrebieux >> Le Guindal > Férin; Ouve-Wirquin

Ces données permettent d'envisager le classement des différents sites en fonction des teneurs métalliques décroissantes dans les eaux comme suit:

La Bassée; Béthune > Arques > Flers-en-Escrebieux; Le Guindal > Férin; Ouve-Wirquin

Concernant les éléments métalliques Al et Fe, on constate que le site d'Arques apparaît comme le site le plus enrichi. C'est également le site dont la teneur en matières en suspension est la plus importante (voir tableau 12 de l'introduction) . Les fines particules étant connues pour adsorber un certain nombre de micropolluants, il serait intéressant de pouvoir vérifier si ces deux phénomènes sont corrélés.

1.1.1.2. Confrontation des teneurs métalliques des eaux avec la grille de qualité des eaux de l'Agence de l'eau Artois-Picardie

En se référant uniquement aux teneurs métalliques, les eaux des différents sites étudiés peuvent être classées grâce à la grille de qualité des eaux (brutes)(tableau 24) de la façon suivante:

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Férin, Flers-en-Escrebieux, Ouve-Wirquin, Arques et Le Guindal: Classe 1 - La Bassée et Béthune: Classe 2 |
|--|

Les eaux de Férin, Flers-en-Escrebieux, Ouve-Wirquin, Arques et Le Guindal sont considérées, selon cette grille de qualité, comme exemptes de pollution métallique. Par contre, les eaux de La Bassée et Béthune sont classées comme eaux de médiocre qualité en raison d'une contamination par le Cd ($2\mu\text{g/l}$ ou ppb). Outre les polluants métalliques, la qualité des **eaux** est déterminée par les matières oxydables et l'azote. Concernant les sites étudiés, les données de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie sur ces différents paramètres de qualité entre 1985 et 1990 (tableau 12 de l'introduction) montrent que les eaux de La Bassée, Béthune et Arques, fortement chargées en azote et phosphore, correspondent à la Classe 4. La qualité des **eaux** des autres sites selon ces mêmes critères est jugée de passable (qualité 2) à médiocre (qualité 3). Le classement en eaux de mauvaise qualité des sites de La Bassée, de Béthune et d'Arques sur la base des matières organiques, azotées et phosphatées (Agence de l'Eau, 1990), concorde avec celui déterminé par les teneurs métalliques. **Par** contre, il est à noter que le classement en qualité 2 et 3 des autres sites (Férin, Ouve-Wirquin, Flers-en-Escrebieux et Le Guindal) est attribuable aux matières oxydables, azotées et phosphatées, mais non aux polluants métalliques.

Tableau 24. Grille de qualité des cours d'eau (eaux brutes).
(Agence de l'eau Artois-Picardie)

PARAMETRES	C:LASSES D			
	1	2	3	4
O₂ dissous mg/l	2 5	2 3	> 1	< 1
O ₂ dissous %	≥ 70	2 50	> 10	≤ 10
DBO5 mg/l	≤ 5	1 10	≤ 25	> 25
DCO mg/l	1 25	≤ 40	≤ 80	> 80
KMnO ₄ 4h (oxydabilité) mg/l	1 5	≤ 8	> 8	
NO₃⁻ mg/l	≤ 25	≤ 50	≤ 80	> 80
NH₄⁺ mg/l	≤ 0,5	≤ 2	≤ 8	> 8
NO ₂ ⁻ mg/l	≤ 0,3	a 1	> 1	
NTK mg/l	≤ 2	≤ 3	≤ 10	> 10
NH₃⁺ mg/l	≤ 0,025	≤ 0,1	1 l	> 1
PO ₄ ³⁻	≤ 0,5	I I	≤ 2	> 2
MeST mg/l	1 70		> 70	
Coliformes fécaux	≤ 5000	> 5000		
E.coli	≤ 2000	> 2000		
Indice biotique	2 7	≥ 5	2 3	< 3
Phosphore total	≤ 0,3	≤ 0,6	1 l	> 1
SEC mg/l	< 0,5	< 1,0		
Phénols mg/l	< 0,001	< 0,050	≤ 0,500	> 0,500
ABS (détergents) mg/l	≤ 0,2	≤ 0,5	> 0,5	> 5,0
Fe mg/l	< 1,0	≤ 1,5	> 1,5	> 15,0
Mn mg/l	< 0,25	≤ 0,50	> 0,50	> 5,00
F mg/l	< 1,0	1 1,7	> 1,7	> 20,0
Cu mg/l	< 0,05	< 1,00	< 10,00	> 10,00
Zn mg/l	< 0,5	< 1,0	≤ 5,0	> 5,0
As mg/l	< 0,01	< 0,05	≤ 1,00	> 1,00
Cd mg/l	≤ 0,001	≤ 0,005	> 0,005	> 0,050
Cr mg/l	≤ 0,05		> 0,05	> 0,50
Pb mg/l	≤ 0,05		> 0,05	> 0,50
Se mg/l	≤ 0,01		> 0,01	> 0,10
Hg mg/l	≤ 0,0005	≤ 0,0010	> 0,0010	> 0,0100
CN⁻ mg/l	≤ 0,05		> 0,05	> 0,50
Cl ⁻ mg/l	a 200		> 200	
SO ₄ ²⁻ mg/l	≤ 150	≤ 250	> 250	
Conductivité	≤ 2000		> 2000	
pH	2 6,5 et ≤ 8,5		< 6,5 ou > 8,5	
Chlorophylle	≤ 60	≤ 120	≤ 300	> 300

Pour chaque paramètre, c'est la valeur atteinte pendant 90% du temps qui sert de référence. Elle est estimée en prenant la (n/10 - 0,5)^{ème} valeur dans l'ordre des plus mauvaises aux moins mauvaises. Si n<5, on prend la valeur la plus mauvaise, éventuellement on interpole. La qualité du cours d'eau est celle du paramètre le plus défavorable. Néanmoins, on définit des paramètres "secondaires" pour lesquels 2 d'entre eux sont nécessaires pour déclasser les cours d'eau: ils sont en caractères fins sur le tableau, les paramètres importants étant en caractères gras.

1.1.2. Interprétation des résultats

D'après l'analyse des données, on constate que le classement des sites, effectué sur la base des teneurs métalliques, concorde bien avec les niveaux de qualité déterminés pour ces sites par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie. On note également que les meilleures eaux tant sur le plan des teneurs en matières organiques, phosphatées et azotées, que sur celui des concentrations en polluants métalliques majeurs (Cd, Pb, Zn) se situent au niveau des points de Férin (46) et d'Ouve-Wirquin (101) sur le fleuve Aa qui se jette en aval de l'agglomération d'Arques dans le canal de Neuffossé. Cette bonne qualité par rapport à l'ensemble des autres points s'explique parfaitement par la position géographique privilégiée de ces points situés tous deux en amont des zones de fortes pollutions. On constate de plus que la qualité décroît de Férin (46) à Flers-en-Escrebieux (76), de Flers-en-Escrebieux à La Bassée (62) puis Béthune (63), points situés les uns à la suite des autres en aval de Férin. Par contre, il est à noter que le point situé à Arques (105) (en aval de Béthune) est, au regard de teneurs métalliques, situé entre Flers-en-Escrebieux et La Bassée - Béthune et présente un niveau de qualité identique à celui de Flers-en-Escrebieux. Ces résultats indiquent une amélioration de la qualité des eaux du canal en comparaison des sites les plus atteints de La Bassée et de Béthune. Celle-ci peut être attribuée à une très faible exportation des polluants provenant de ces derniers sites, par une capacité importante de fixation des polluants par les sédiments ou par le résultat d'une forte dilution des polluants qui peut être produite par un apport d'eaux provenant d'affluents de meilleure qualité. Il convient cependant de souligner que les teneurs sont quand même supérieures à celles observées sur le site de Flers-en-Escrebieux. Cette constatation est peut-être à relier à la présence en amont du point d'Arques de l'agglomération de Béthune (figure 8) dont les rejets peuvent affecter la qualité de l'eau. Concernant le site d'Arques, les teneurs particulièrement élevées (supérieures à l'ensemble des autres sites étudiés) en Al et Fe dans l'eau pourraient trouver leur explication dans une importante remise en suspension des sédiments liée au trafic fluvial important sur ce site. En effet, ces éléments sont en plus fortes teneurs dans les sédiments fins et les données de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie (1990) montrent que ce site présente des teneurs de matières en suspension (MES) particulièrement élevées (34 et 27,6 mg/l en 1985 et 1990 respectivement). Enfin, au niveau du point du Guindai (104000) sur l'Aa canalisé, la qualité s'améliore encore par rapport au point d'Arques situé en amont. Ainsi, pour les teneurs métalliques en polluants majeurs (Cd, Pb et Zn), ce point est approximativement équivalent à celui de Flers-en-Escrebieux et se situe, d'un point de vue niveau de qualité, entre les sites de Férin et de Flers-en-Escrebieux. Cet accroissement de la qualité par rapport au site d'Arques est peut-être à mettre en relation avec une forte immobilisation des polluants dans les sédiments qui s'effectue le long du canal.

Du fait que les résultats d'analyse de PCB et d'hydrocarbures sont souvent sous les limites de détection des appareils utilisés, aucune remarque ne peut être faite quant à la contamination de l'eau

par ces polluants. Nous avons tout de même une teneur en hydrocarbures de 0,1 µg/l à Flers-en-Escrebieux en avril 1994 ainsi qu'une teneur en PCB de 0,7 mg/l à La Bassée à la même époque.

De nombreux résultats étant sous la limite de détection des appareils utilisés, il n'était pas possible de réaliser des analyses statistiques raisonnables.

1.2. Qualité des sédiments

Les sédiments ont été prélevés en décembre 1991 (sites 62 et 63), en février 1992 (sites 46, 76, 62, 63), en avril 1992 (sites 46, 76, 62, 63), en mai 1992 (sites 105, 101, 104), en juin 1992 (sites 46, 76, 62, 63, 150, 101, 104), en septembre 1994 (sites 77, 78, 79, 80, 102, 103), en octobre 1994 (sites 46, 62, 63, 105, 101, 104) et en mars 1995 (sites 46, 76, 62, 63, 105, 101), lors des différentes récoltes d'invertébrés. Le tableau 25 illustre les résultats en termes de teneurs moyennes des dosages des métaux (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) effectués par Spectrophotométrie d'Absorption Atomique à la Flamme (SAAF) et par Spectrophotométrie d'Emission Atomique en Torche à Plasma d'Argon (pour l'Al) dans les sédiments des différents sites piégés dans les substrats artificiels. Ces données sont exprimées en mg de métal/g de sédiment sec (ppm).

1.2.1. Les teneurs métalliques dans les sédiments

1.2.1.1. Description

La représentation sous la forme de diagrammes en barres de la teneur moyenne ($n=3$) de chacun des 7 éléments métalliques dosés dans les sédiments des sites étudiés (figures 12 à 19) montre d'une manière générale que la pollution métallique augmente du point Férin (46) aux points La Bassée (62) et Béthune (63) qui présentent tous deux de très fortes teneurs métalliques. En aval de ces deux sites, la situation tend à s'améliorer [sites d'Arques (105), du Guindal (104) et Ouve-Wirquin (101)]. Concernant le canal de la Deûle, les teneurs en cadmium augmentent jusqu'au site 79 à Don en aval du canal de Lens et les teneurs en cuivre, plomb et zinc augmentent jusqu'au site 78 en aval du canal de Lens. Les teneurs en Cd, Cu, Pb et Zn diminuent ensuite au niveau du site 80 (Haubourdin).

Les métaux lourds peuvent être classés selon leur abondance relative dans les sédiments de la façon suivante:



Cet ordre est trouvé dans la plupart des sites avec des inversions possibles entre le Fe et l'Al ou entre le Pb et le Cr pour le site 101 par exemple. Cet ordre peut changer quand les sédiments sont anormalement chargés. Les séquences $\text{Cd} > \text{Cu} > \text{Cr}$ ou $\text{Cu} > \text{Cd} > \text{Cr}$ sont trouvées dans les sédiments chargés des sites 62, 63, 78 et 79 par exemple.

Tableau 25. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés des sites étudiés. (mg/kg de sédiment *sec*) Caractères **gras**: moyenne. Caractères *italiques*: écart type (n=3). F: février 92, **A**: avril 92, **Ma**: mai 92, J: juin 92, S; septembre 1994, O: octobre 94, **M**: mars 1995.

SITES	Al		Cd		Cr		Cu		Fe		Pb		Zn	
46 F	7356	452	3,67	0,58	69,33	3,22	13,83	0,78	8344	725	128,3	8,5	163,3	40,7
46 A	6964	800	4,43	1,46	25,10	4,55	16,37	1,60	9045	809,5	197,7	30,2	262,7	32,3
46 J	11229	255	2,13	0,12	30,73	3,79	16,23	1,29	11065	1144	166,3	3,2	287,3	13,3
46 O	5977	434	4,73	0,12	27,33	1,15	15,37	0,38	8842	486	125,0	9,6	160,8	17,7
46 M	6975	802	5,53	0,25	37,33	0,58	15,60	1,06	7857	335	129,7	13,3	131,5	22,8
76 F	13739	1869	6,67	0,58	108,4	14,86	41,83	2,06	11718	1937	405,0	23,6	1085,0	182,2
76 A	7783	793	7,77	0,90	36,03	6,42	33,83	7,31	10636	814	291,3	57,5	687,3	136,2
76 J	13053	1151	3,67	0,67	50,43	5,05	35,93	8,89	13117	827	258,0	69,2	772,7	159,8
76 M	10239	646	8,07	1,50	81,67	3,79	62,13	13,02	14920	871	476,3	106,8	881,3	149,4
77 S	14022	774	58,2	7,5	50,5	3,8	44,9	3,5	5089	1200	524,1	12,2	865,4	74,4
78 S	12276	1018	142,3	13,6	46,2	4,8	109,2	13,2	3961	491	120,0	36,4	1705,9	111,3
79 S	11485	1066	223,5	34,5	52,5	6,2	79,75	8,4	5077	1393	860,0	69,2	1518,5	130,8
80 S	13164	2035	57,0	8,3	47,6	3,2	45,9	6,6	5920	326	598,9	71,7	638,2	35,6
62 D	12147	834	143,0	6,6	121,0	16,7	155,7	13,6	15068	2443	730,7	80,3	1471,7	221,2
62 F	23813	3040	146,7	13,8	132,9	8,8	155,9	17,7	20371	2278	1002	97,8	2153,3	337,2
62 A	17170	935	149,0	20,2	51,80	2,79	202,5	93,3	16827	1355	866,0	78,9	2510,7	337,9
62 J	21072	877	174,6	15,3	58,3	1,2	140,3	21,8	17148	2115	798,0	72,5	2698,0	246,2
62 O	14085	486	196,0	6,56	77,0	0,0	132,7	1,1	16667	465	892,7	10,8	2490,0	55,7
62 M	15889	1692	177,8	14,0	91,0	6,0	141,8	3,7	16384	645	840,0	37,7	2328,1	142,3
63 D	8455	269	151,7	7,6	101,3	3,8	125,0	4,0	12292	1291	597,7	28,0	920,0	20,0
63 F	17514	541	166,0	34,7	125,8	5,2	92,0	13,0	13412	386	665,0	101,3	2230,0	693,5
63 A	14990	518	180,9	5,2	53,77	1,80	95,0	3,7	14366	1397	771,0	21,8	1716,7	144,6
63 J	13958	478	189,6	3,7	58,4	12,1	100,3	8,4	14644	2009	749,0	71,8	1724,0	73,0
63 O	7829	814	78,0	7,9	65,33	13,5	65,6	5,2	14100	2880	431,7	37,2	872,5	85,1
63 M	9022	2395	49,3	17,1	53,7	13,8	54,2	18,2	11129	2601	344,7	72,4	631,3	240,0
105 Ma	3804	255	8,0	0,8	104,0	22,6	14,0	2,7	2305	367	178,5	15,3	251,0	13,1
105 J	5952	1124	12,9	1,3	109,9	26,1	15,1	3,7	4331	381	205,5	26,4	261,0	36,1
105 O	8342	914	15,3	1,2	67,33	7,23	31,1	5,2	17117	1878	243,7	17,0	360,3	34,4
105 M	17784	956	12,0	1,1	110,3	8,02	33,8	2,7	126171	1743	216,7	17,1	315,7	39,5
101 Ma	4076	824	2,0	0,3	39,2	5,3	19,0	0,7	4258	232,6	63,0	5,7	234,0	34,0
101 J	1908	209	2,0	0,3	44,0	8,2	33,0	7,0	6203	320	79,0	11,4	310,0	41,7
101 O	7686	1666	2,7	0,5	37,7	5,0	21,2	1,2	12100	2538	35,3	3,8	85,0	15,2
101 M	5261	584	2,8	0,3	27,3	1,5	11,9	0,7	7031	606	47,3	11,9	78,9	0,0
102 S	115931	1160	15,4	2,7	57,8	5,7	24,5	2,6	6324	416	261,0	39,4	219,5	30,7
103 S	23311	3458	19,5	5,4	82,8	5,6	48,5	12,2	10490	1212	366,3	42,6	316,8	38,0
104 Ma	2808	335	8,0	1,7	62,0	8,6	18,0	2,7	5872	982,2	113,5	12,3	404,0	53,0
104 J	5392	1555	10,0	1,5	132,0	9,6	22,0	3,7	3264	338	120,7	16,8	402,0	62,2
104 O	14822	1790	10,3	0,6	96,7	10,0	45,1	0,7	23592	2044	277,0	6,6	314,2	16,7

Après avoir réalisé des ANOVA à une voie pour chaque période de prélèvement montrant l'existence de variations des teneurs métalliques intersites, nous avons effectué des tests de comparaisons multiples de type Student-Newman-Keuls. Pour les prélèvements des sites 62 et 63 de décembre 1991, les comparaisons de moyennes ont été réalisées à l'aide d'un test t bilatéral. En marge de ces diagrammes, figurent les résultats des tests de comparaison de moyennes pour chaque métal, pour chaque période entre chacun des sites étudiés sous forme de traits qui relient deux sites dont les différences de teneurs métalliques sont significatives. Nous avons également fait figurer sur ces diagrammes les valeurs naturelles pour la région Nordpas-de-Calais, les valeurs limites d'épandage et les limites des niveaux de qualité définis par le Ministère de l'Environnement (voir les § suivants).

Il apparaît, à partir de ces données, que:

- les sites de La Bassée (62) et de Béthune (63) sont les sites où les sédiments sont les plus enrichis par les métaux, notamment par le Cd, le Cu, le Pb et le Zn (figures 13, 14, 16, 18, 19). Ces résultats concordent avec les teneurs particulièrement élevées en Cd et Pb déterminées dans le cas de l'eau brute. Les sites de Courrières et de Don (78 et 79) sont également fortement touchés par la contamination en Cd, Cu, Pb et Zn (figure 17).
- les sites les moins touchés par la contamination dans les sédiments sont ceux de Férin (46) et d'Ouve-Wirquin (101) (figures 13, 14, 15, 16, 18, 19). Les données sont comparables à celles obtenues pour l'eau brute.

D'une manière très générale, en tenant compte de l'ensemble des métaux analysés, les sites peuvent être classés en fonction de la richesse métallique des sédiments selon le schéma suivant :

La Bassée;	Béthune	>>	Flers-en-E.	>	Le Guindal	>	Arques	>	Férin	>	Ouve-W.
62	63		76		104		105		46		101

Ce classement se rapproche de celui effectué dans le cas des eaux brutes des différents sites.

1.2.1.2. Comparaisons avec les valeurs naturelles

En comparant les teneurs métalliques moyennes de chacun des 7 métaux dans les sédiments des différents sites étudiés aux valeurs naturelles dans les sédiments (figures 12 à 19) données par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie, on constate que :

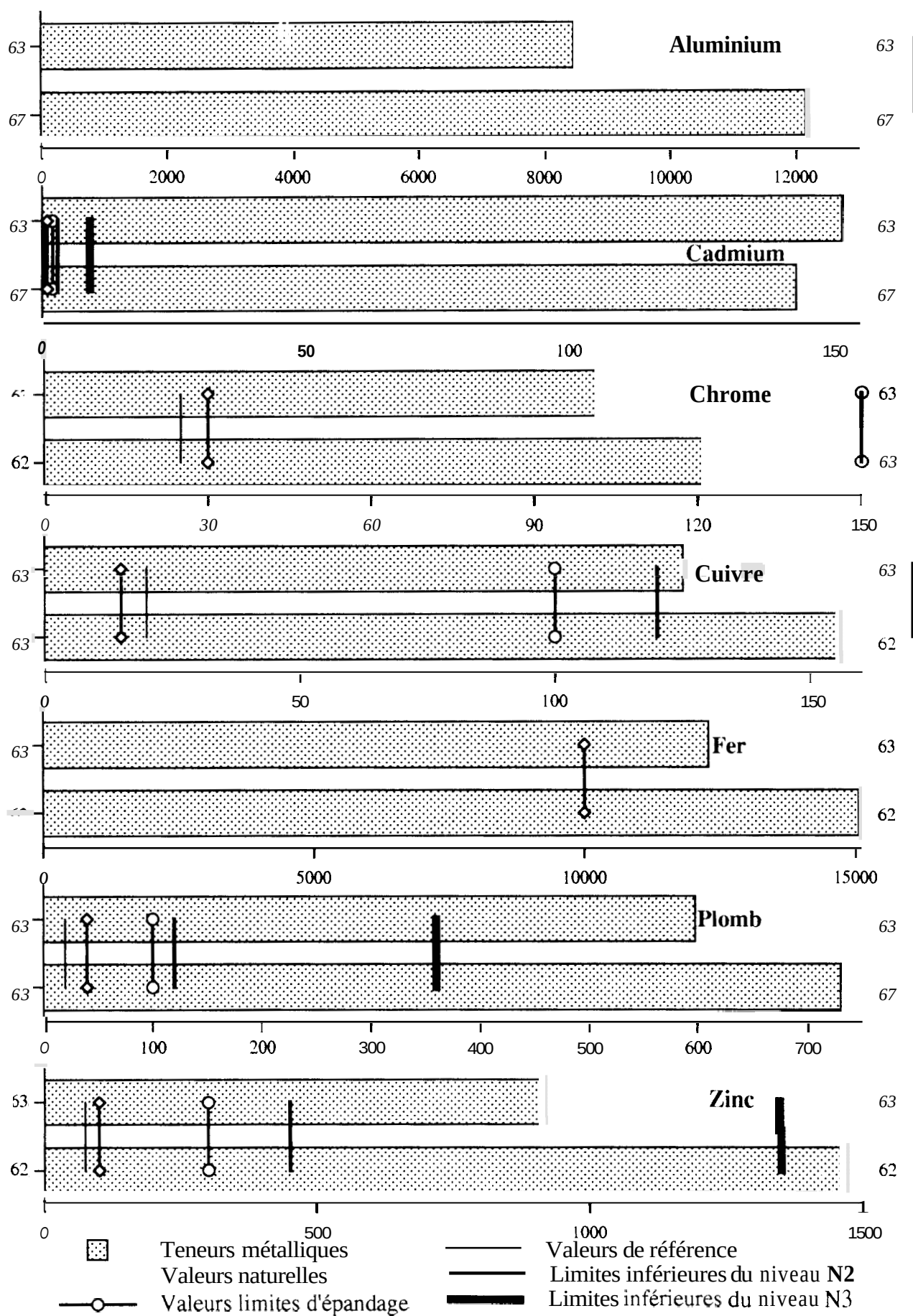


Figure 12 . Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en décembre 1991. Comparaison avec les valeurs naturelles, les valeurs de référence et les valeurs limites d'épandage. Toutes les teneurs sont données en ppm. Les barres verticales dans la marge de droite correspondent à une différence significative entre les teneurs de deux sites. Traits épais: $p < 0,01$ Traits fins: $p < 0,05$

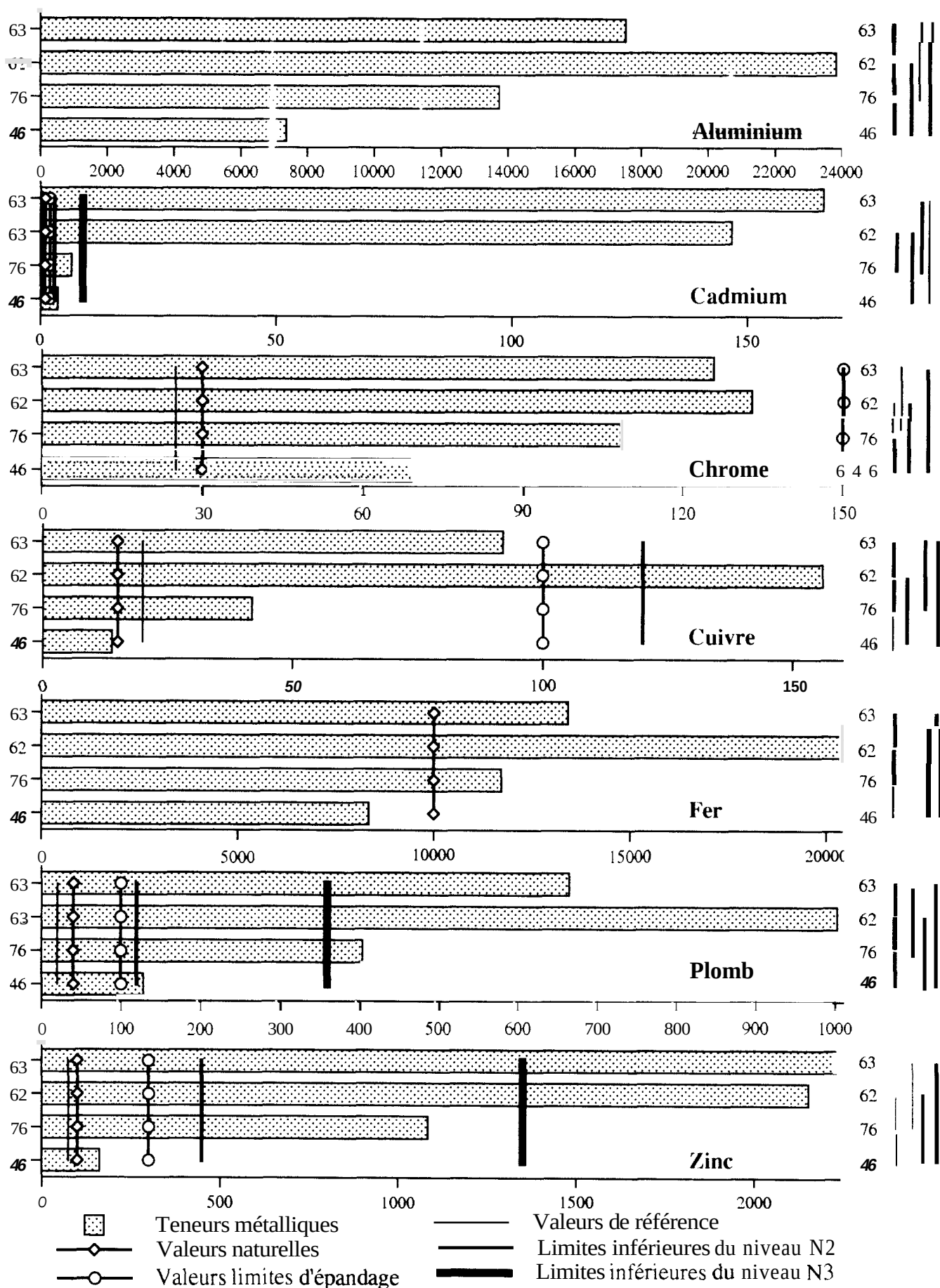


Figure 13 . Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en février 1992. Comparaison avec les valeurs naturelles, les valeurs de référence et les valeurs limites d'épandage. Toutes les teneurs sont données en ppm. Les barres verticales dans la marge de droite correspondent à une différence significative entre les teneurs de deux sites. Traits **épais**: $p < 0,01$ Traits **fin**: $p < 0,05$

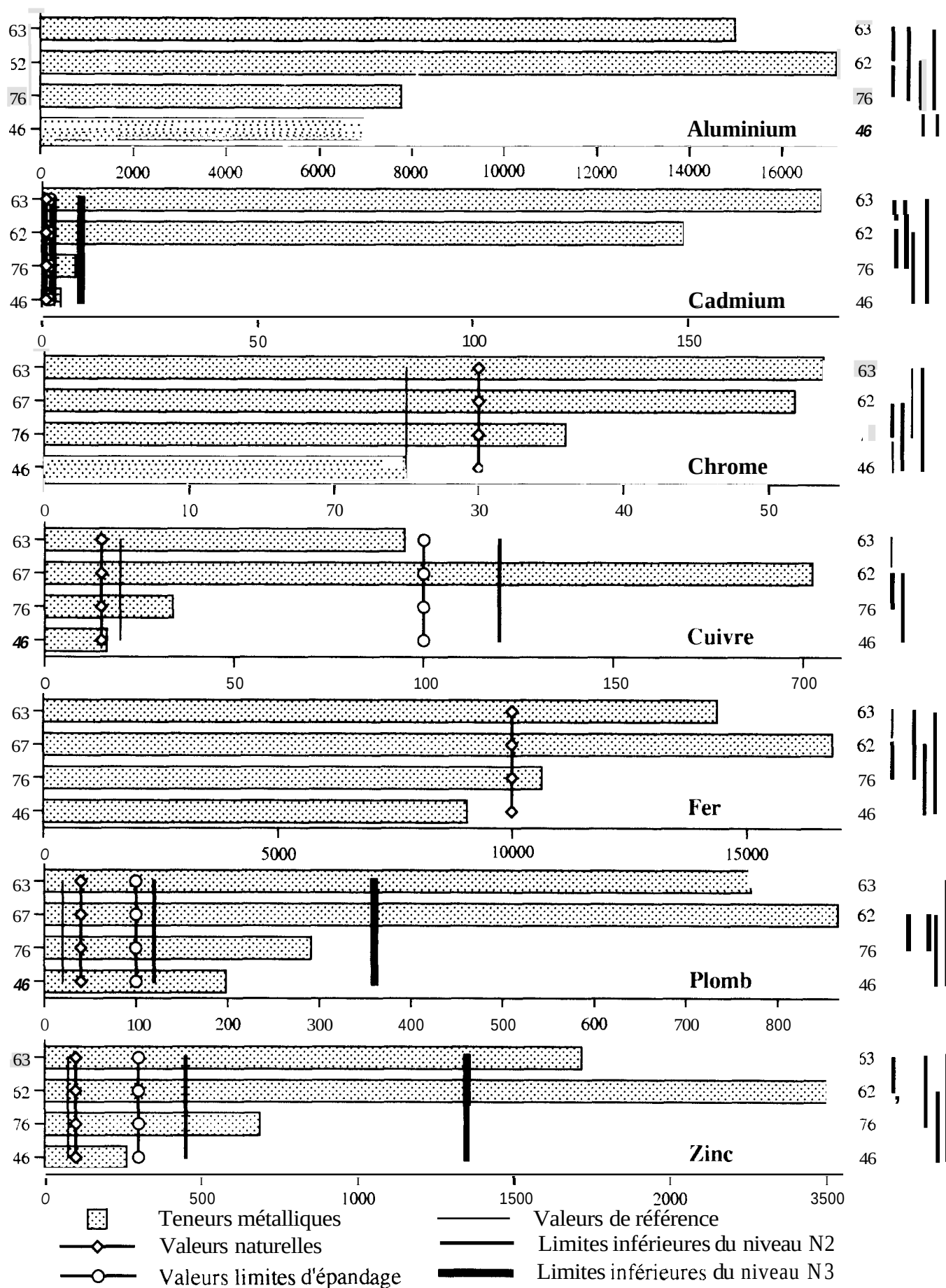


Figure 14 . Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en avril 1992. Comparaison avec les valeurs naturelles, les valeurs de référence et les valeurs limites d'épandage. Toutes les teneurs sont données en ppm. Les barres verticales dans la marge de droite correspondent à une différence significative entre les teneurs de deux sites. Traits épais: $p < 0,01$ Traits fins: $p < 0,05$

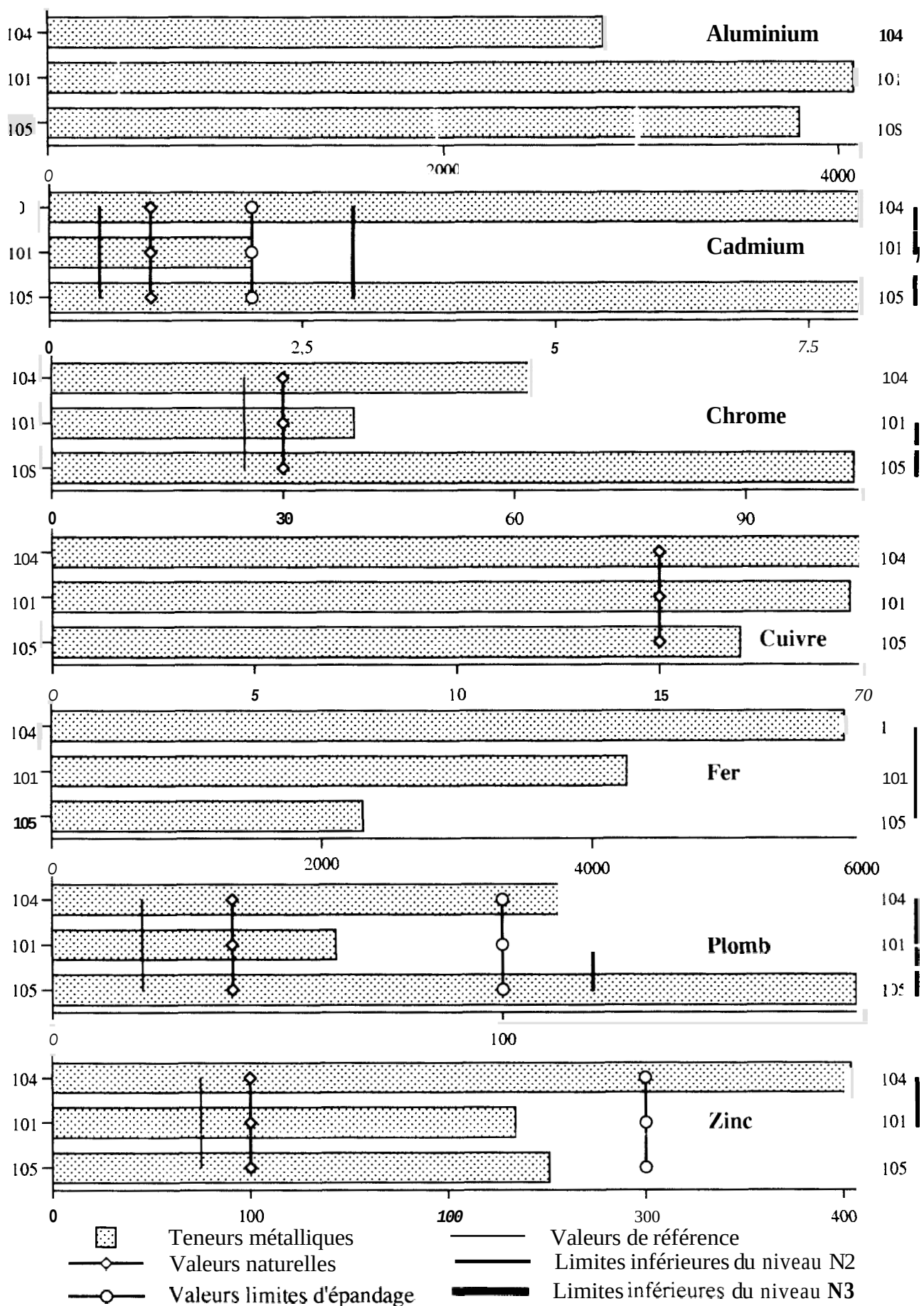


Figure 15. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en mai 1992. Comparaison avec les valeurs naturelles, les valeurs de référence et les valeurs limites d'épandage. Toutes les teneurs sont données en ppm. Les barres verticales dans la marge de droite correspondent à une différence significative entre les teneurs de deux sites. Traits épais: $p < 0,01$ Traits fins: $p < 0,05$

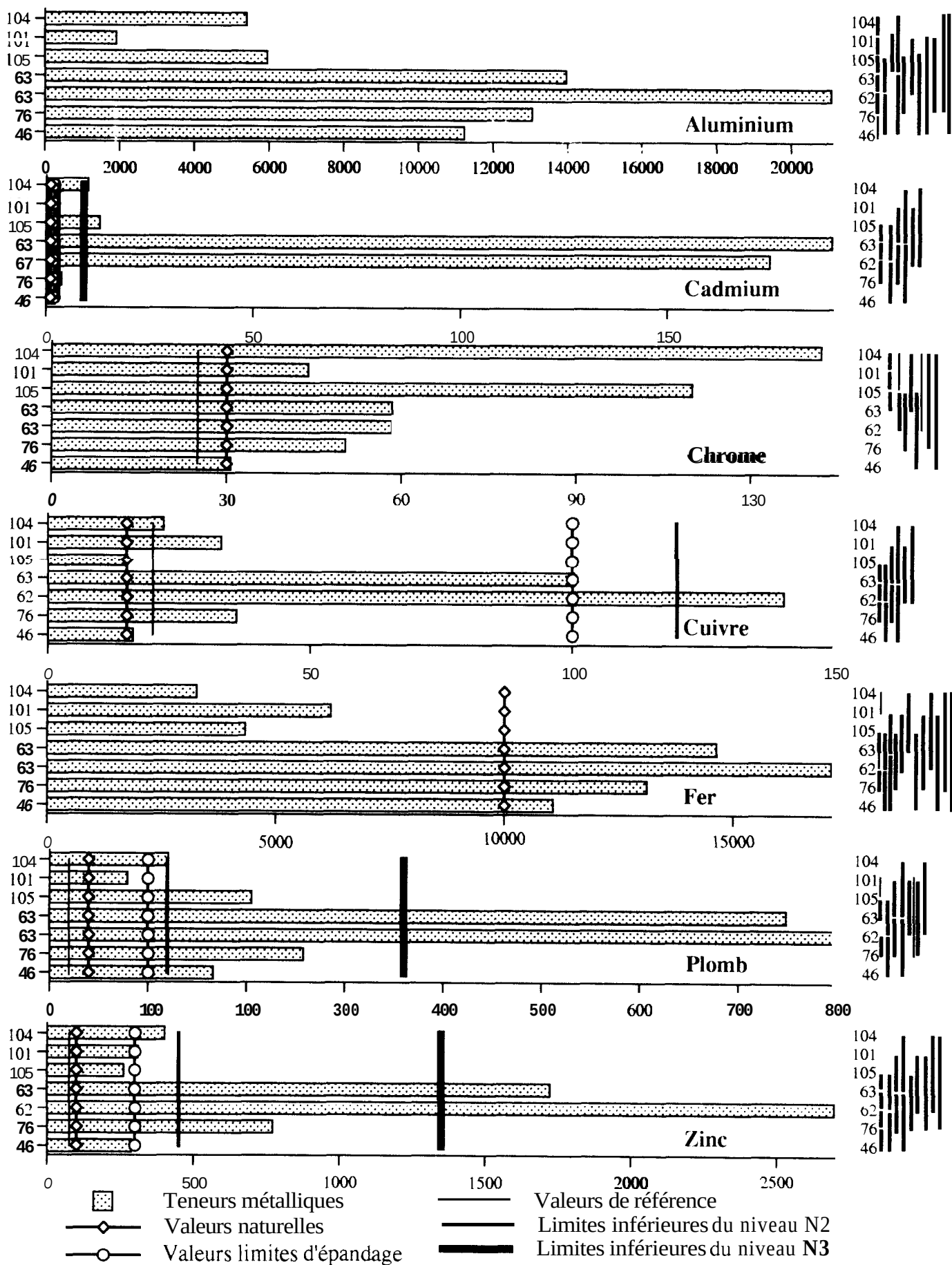


Figure 16 . Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en juin 1992. Comparaison avec les valeurs naturelles, les valeurs de référence et les valeurs limites d'épandage. Toutes les teneurs sont données en ppm. Les barres verticales dans la marge de droite correspondent à une différence significative entre les teneurs de deux sites. Traits épais: $p < 0,01$ Traits fins: $p < 0,05$

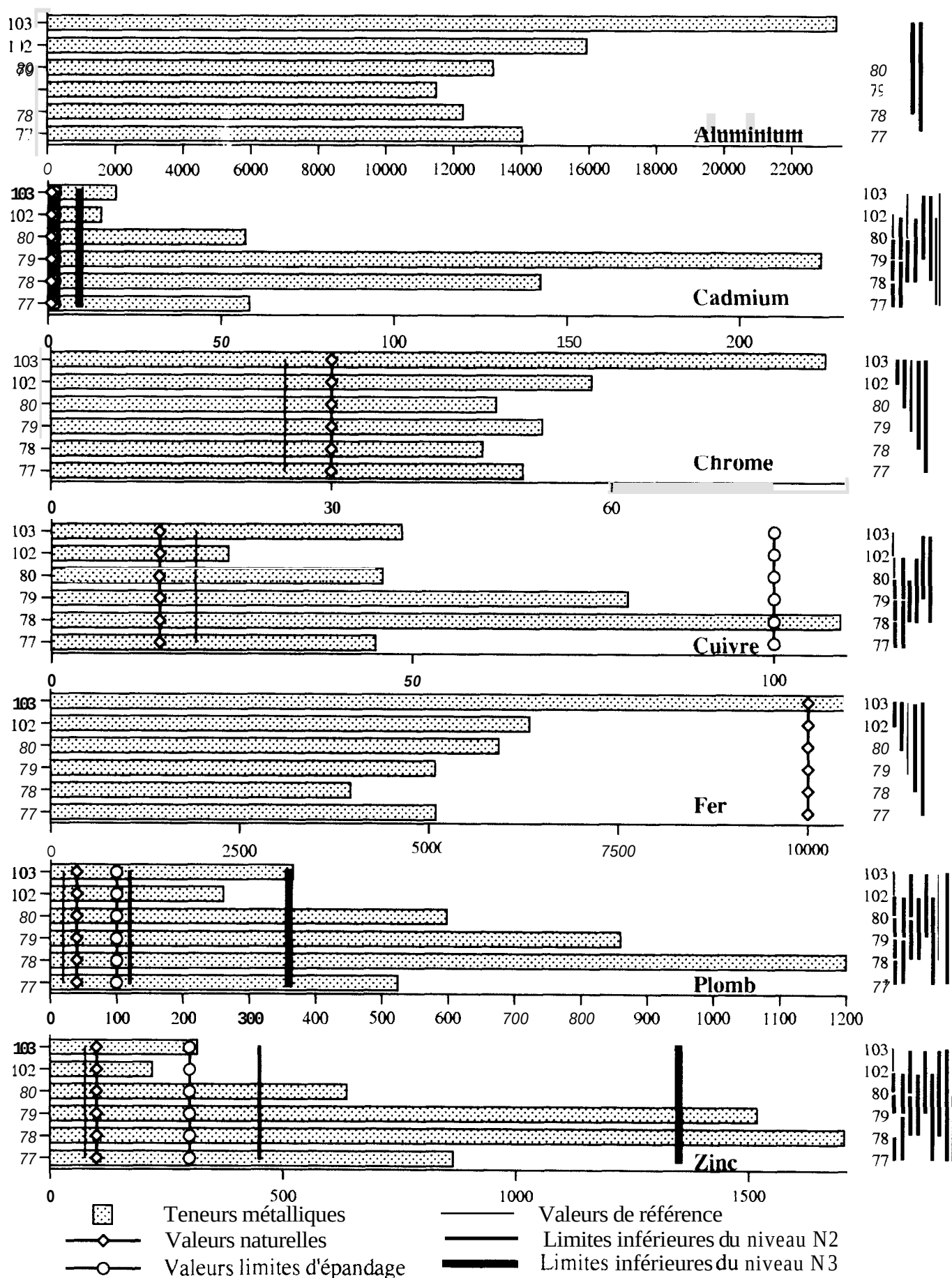


Figure 17 . Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en septembre 1994. Comparaison avec les valeurs naturelles, les valeurs de référence et les valeurs limites d'épandage. Toutes les teneurs sont données en ppm. Les barres verticales dans la marge de droite correspondent à une différence significative entre les teneurs de deux sites. Traits épais: $p < 0,01$ Traits fins: $p < 0,05$

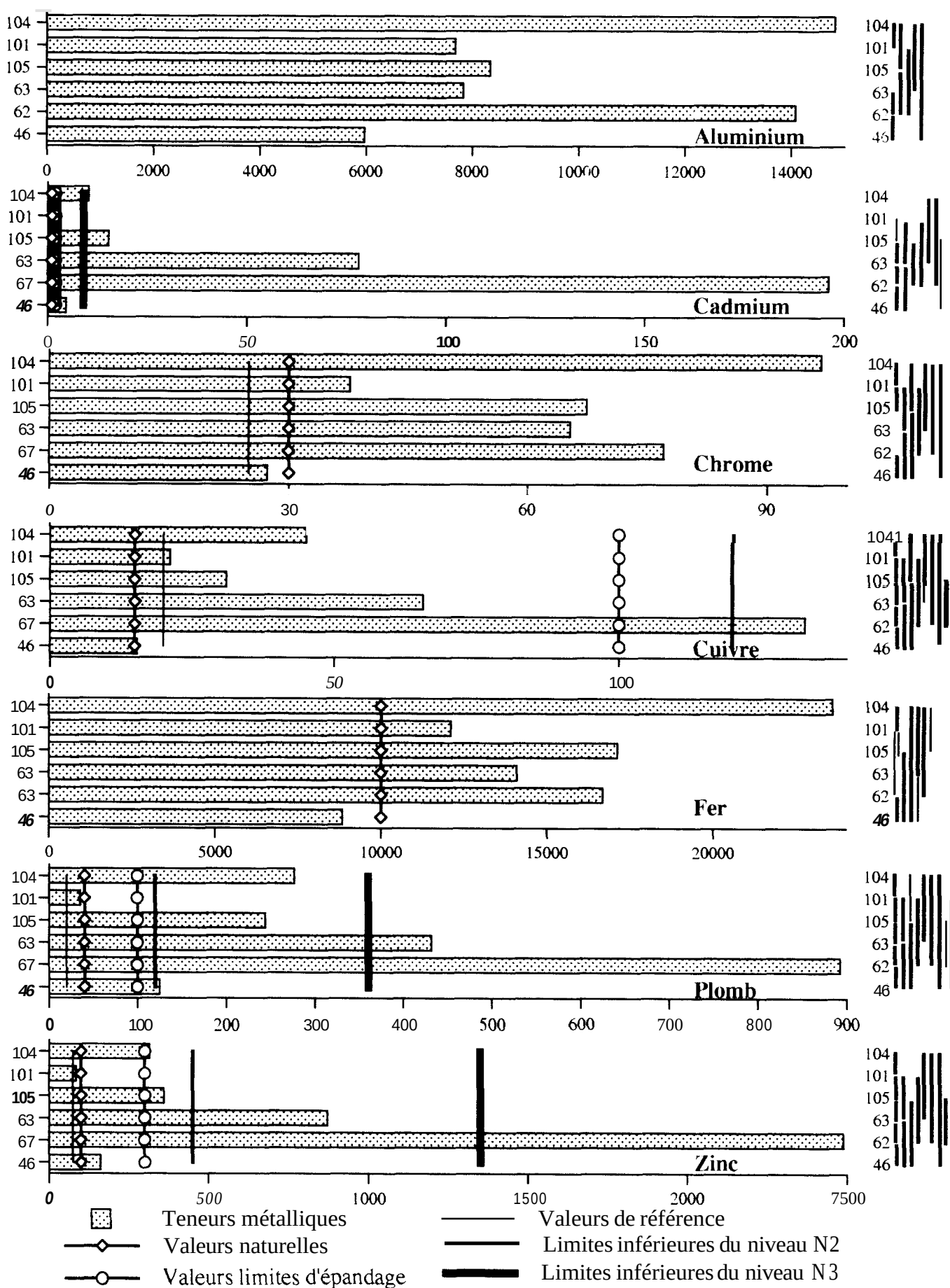


Figure 18 . Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en octobre 1994. Comparaison avec les valeurs naturelles, les valeurs de référence et les valeurs limites d'épandage. Toutes les teneurs sont données en ppm. Les barres verticales dans la marge de droite correspondent à une différence significative entre les teneurs de deux sites. Traits épais: $p < 0,01$ Traits fins: $p < 0,05$

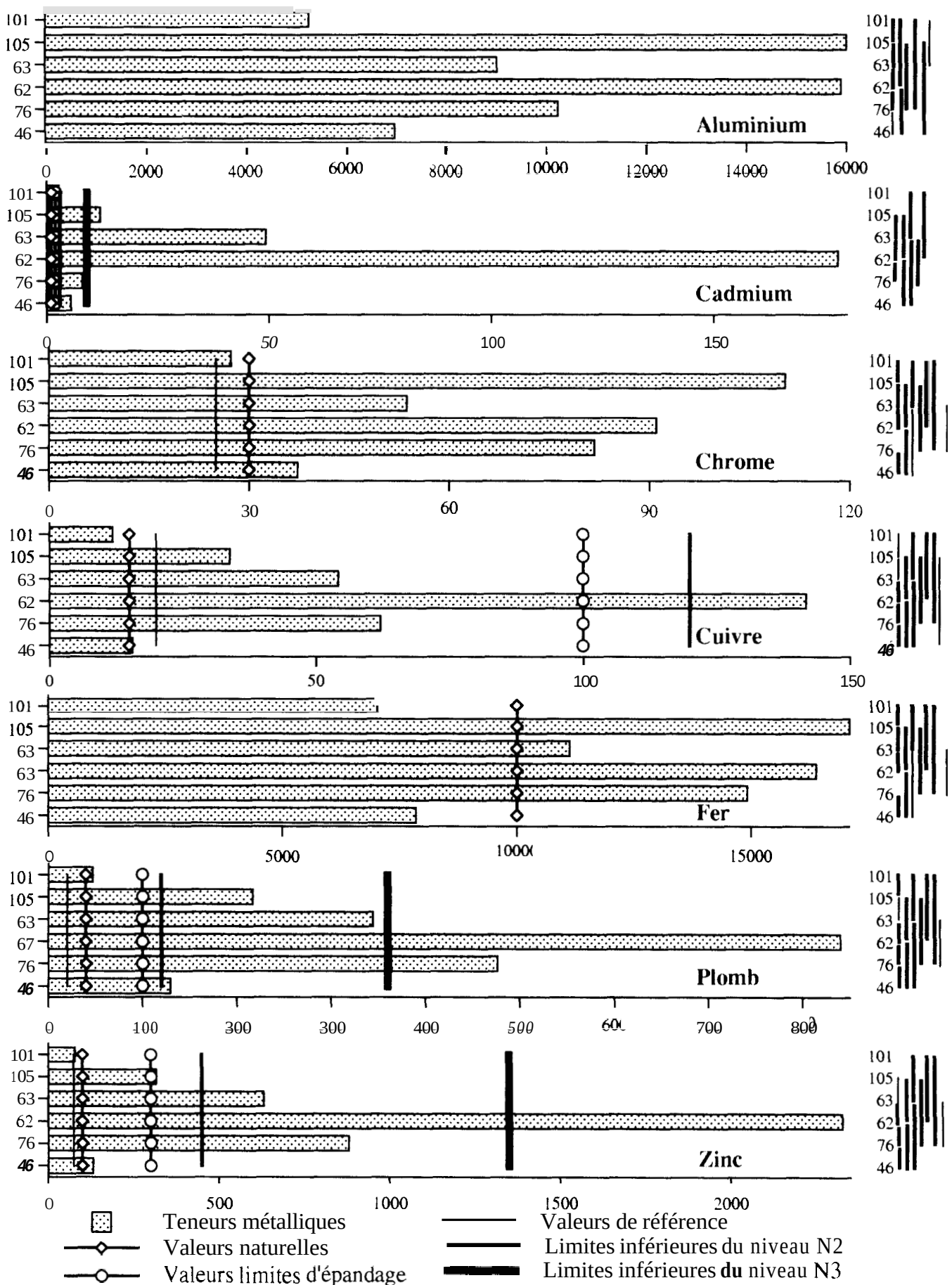


Figure 19 . Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en mars 1995. Comparaison avec les valeurs naturelles, les valeurs de référence et les valeurs limites d'épandage. Toutes les teneurs sont données en ppm. Les barres verticales dans la marge de droite correspondent à une différence significative entre les teneurs de deux sites. Traits épais: $p < 0,01$ Traits fins: $p < 0,05$

- la concentration en Cd des sédiments est supérieure à la valeur naturelle de 1 ppm pour l'ensemble des sites. De 2 à 5 fois supérieure pour les sites de Féris (46) et d'Ouve-Wirquin (101), elle atteint 150 à 200 fois la valeur naturelle pour les sites de La Bassée (62) et de Béthune (63), voire 225 fois pour le site de Don (79) en septembre 1994.
- les concentrations en Cu à Féris (46) sont équivalentes à la valeur naturelle. Par contre, elles sont de 5 à 13 fois supérieures pour les sites de La Bassée (62) et de Béthune (63).
- les concentrations en Fe dépassent rarement 2 **fois** les valeurs naturelles.
- les concentrations en Pb sont supérieures aux valeurs naturelles pour tous les sites excepté pour la concentration mesurée en octobre 1994 à Ouve-Wirquin. Dans le cas des sites de Béthune (63) et de La Bassée (62), elles sont respectivement de 8 à 18 et de 18 à 25 fois supérieures.
- les concentrations en Zn sont supérieures aux valeurs naturelles pour tous les sites excepté en octobre 1994 et mars 1995 pour le site d'Ouve-Wirquin (101). D'environ 3 fois pour les sites de Féris (46) et d'Ouve-Wirquin (101), elles sont entre 6 et 25 fois supérieures pour les sites de Flers-en-Escrebieux (76), La Bassée (62 000) et Béthune (63).

En considérant qu'un sédiment est significativement contaminé en un métal donné dès lors que sa teneur est supérieure à 5 fois la valeur naturelle (critère empirique retenu par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie), la comparaison des teneurs métalliques des sédiments des différents sites avec les valeurs naturelles permet de dégager les constatations suivantes:

- l'ensemble des sites, excepté ceux de Féris (46) et d'Ouve-Wirquin (101), sont significativement contaminés par le Cd. La contamination est très importante pour les sites situés sur le canal de la Deûle (sites 76, 77, 78, 79 et 80) et sur le canal d'Aire (sites 62 et 63).
- la mesure des concentrations en Cu montre que les sites de Béthune (63) (sauf en octobre 1994 et mars 1995), de La Bassée (62), de Courrières (78) et d'Haubourdin (79) sont significativement contaminés par le **Cii**.
- les sédiments de l'ensemble des sites excepté les sites de Féris (46), d'Ouve-Wirquin (101), d'Arques (105) en mai 1992, du Guinda1 (104) en mai et juin 1992 sont significativement contaminés par le Pb.
- les sédiments des sites du canal de la Deûle (76-77-78-79-80) et du canal d'Aire (62-63) sont significativement contaminés par le Zn.

- selon ce critère, les sédiments de l'ensemble des sites ne sont pas contaminés par le Cr et le Fe.

En conclusion sur cette partie, dans laquelle nous utilisons alternativement de la significativité analytique et de la significativité empirique, nous pouvons déterminer deux catégories de sites selon l'absence ou la présence de contamination métallique de leurs sédiments :

- les sites de Férin et d'Ouve-Wirquin dont les sédiments ne sont pas significativement contaminés par les polluants métalliques,
- les autres, tous considérés comme ayant des sédiments contaminés significativement par les polluants métalliques. Parmi ceux-ci, une hiérarchie peut être déterminée par comparaison des teneurs métalliques de la façon suivante :

62 - 63 - 78 - 79 (Cd, Cu, Yb, Zn)	>	76 - 77 - 80 (Cd, Pb, Zn)	>	105 - 102 - 103 - 104 (Cd)
---------------------------------------	---	------------------------------	---	-------------------------------

où les métaux cités entre parenthèses sont ceux traduisant une contamination significative des sédiments des sites considérés.

1.2.1.3. Comparaisons avec les normes

Pour les différents sites de l'étude, la teneur moyenne des sédiments en chacun des 7 métaux a été comparée à la valeur limite d'épandage (Norme NFU **AFNOR** 44041). Ces données sont également présentées dans les figures 12 à 19.

De ces données, il apparaît que:

- l'ensemble des sites de l'étude présente une concentration en Cd supérieure ou égale à la valeur limite d'épandage (VLE) et atteint 90 à 110 fois cette valeur dans le cas des sédiments de La Bassée (62), de Béthune (63) et de Don (79).
- les concentrations en Cr des sédiments sont dans tous les cas inférieures à la VLE.
- la concentration en Cu du sédiment est inférieure à la VLE pour l'ensemble des sites excepté celui de La Bassée (62), de Béthune (63) en décembre 1991 et juin 1992, et de Courrières (78).

- les concentrations en Pb des sédiments sont supérieures à la VLE pour l'ensemble des sites excepté celui d'Ouve-Wirquin (101).
- les concentrations en Zn sont supérieures à la VLE pour les sites du canal de la Deûle (76-77-78-79-80), du canal d'Aire (62 et 63), du canal de Neuffossé (105) en octobre 1994 et mars 1995, de l'Aa (101) en juin 1992 et de l'Aa canalisé (sites 103 et 104).

En conclusion, tous les sites étudiés dépassent la valeur limite des sols pour au moins l'un des contaminants métalliques (Cd). Ce résultat signifie que ces sédiments ne peuvent, par leur toxicité potentielle, être épandus sur les terrains riverains. On peut cependant noter que, dans le cas du site d'Ouve-Wirquin, la contamination est restreinte au seul élément Cd contrairement aux autres sites. Il est prudent de signaler de nouveau que les sédiments analysés dans cette étude sont prélevés dans les substrats artificiels mais non en profondeur au niveau du fond du chenal.

1.2.1.4. Confrontation des teneurs métalliques des sites étudiés avec les concentrations de référence données par le Ministère de l'Environnement (1993)

Le Ministère de l'Environnement a défini trois niveaux de contamination possible des sédiments pour chaque métal (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn):

- niveau N1: contamination absente ou faible, non susceptible *a priori* d'entraîner des nuisances (à savoir une limitation d'usages de l'eau ou des désordres écologiques).
Facteur limite de pollution: 0 à 6 fois les valeurs de référence.
- niveau N2: contamination probable: la surveillance du milieu et des effets doit y être renforcée.
Facteur limite de pollution: 6 à 18 fois les valeurs de référence.
- niveau N3: contamination certaine risquant parfois de provoquer des nuisances plus ou moins graves.
Facteur limite de pollution: plus de 18 fois les valeurs de référence.

Pour chaque site étudié, des facteurs de pollution ont été calculés en faisant le rapport entre la valeur mesurée et la valeur de référence correspondante exprimées en mg/kg de matières sèches. La comparaison des facteurs calculés aux facteurs limites de pollution permettent de déterminer le niveau de qualité qui correspond au niveau le plus défavorable. Les limites inférieures des niveaux de pollution N2 et N3 sont présentées pour chaque site et pour chaque métal **dans** les figures 12 à 19. Les niveaux de contamination (N1 à N3) des sédiments des sites étudiés sont présentés dans le tableau 26.

Tableau 26. Niveau de qualité des sédiments piégés des sites étudiés selon les normes du Ministère de l'Environnement.

F: février 92, A: avril 92, Ma: mai 92, J: juin 92, S; septembre 1994, O: octobre 94, M: mars 1995.

SITES	Cd	Cr	c u	Pb	Zn
46 F	N2	N1	N1	N2	N1
46 A	N2	N1	N1	N2	N1
46 J	N1	N1	N1	N2	N1
46 O	N2	N1	N1	N2	N1
46 M	N2	N1	N1	N2	N1
76 F	N2	N1	N1	N3	N2
76 A	N2	N1	N1	N2	N2
76 J	N2	N1	N1	N2	N2
76 M	N2	N1	N1	N3	N2
77 S	N3	N1	N1	N3	N2
78 S	N3	N1	N1	N3	N3
79 S	N3	N1	N1	N3	N3
80 S	N3	N1	N1	N3	N2
62 D	N3	N1	N2	N3	N3
62 F	N3	N1	N2	N3	N3
62 A	N3	N1	N2	N3	N3
62 J	N3	N1	N2	N3	N3
62 O	N3	N1	N2	N3	N3
62 M	N3	N1	N2	N3	N3
63 D	N3	N1	N2	N3	N2
63 F	N3	N1	N1	N3	N3
63 A	N3	N1	N1	N3	N3
63 J	N3	N1	N1	N3	N3
63 O	N3	N1	N1	N3	N2
63 M	N3	N1	N1	N2	N2
105 Ma	N2	N1	N1	N2	N1
105 J	N3	N1	N1	N2	N1
105 O	N3	N1	N1	N2	N1
105 M	N3	N1	N1	N2	N1
101 Ma	N1	N1	N1	N1	N1
101 J	N1	N1	N1	N1	N1
101 O	N1	N1	N1	N1	N1
101 M	N1	N1	N1	N1	N1
102 S	N3	N1	N1	N2	N1
103 S	N3	N1	N1	N3	N1
104 Ma	N2	N1	N1	N1	N1
104 J	N3	N1	N1	N2	N1
104 O	N3	N1	N1	N2	N1

Les niveaux de qualité des sites étudiés permettent de les classer de la façon suivante:

N 3		N 3		N 3		N 2		N I	
62-63-78-79	<	77-80-103	<	76	102-104-105	<	46	<	101
(Cd-Pb-Zn)		(Cd-Pb)		(Pb)	(Cd)		(Cd-Pb)		

Les éléments responsables du niveau de qualité sont indiqués entre parenthèses.

1.2.2. Les teneurs en NTK, COT et P, la perte au feu

Les paramètres NTK, COT, P et la perte au feu mesurés en septembre 1994 dans les sites 77, 78, 79, 80, 102 et 103, en octobre 1994 dans les sites 46, 62, 63, 105, 101 et 104 et en mars 1995 dans les sites 46, 76, 62, 63, 105, et 101 sont présentés dans le tableau 27. Nous ne commenterons dans ce paragraphe que les résultats de septembre 1994. Les autres résultats sont commentés dans le paragraphe 1.2.3.

Les analyses de variance réalisées pour chaque paramètre mesuré dans les sédiments des sites 77, 78, 79, 80, 102 et 103 révèlent qu'il existe des variations significatives. Les résultats des tests SNK sont présentés dans le tableau 28. Les teneurs en NTK sont relativement homogènes dans les sédiments des différents sites et sont comprises entre 1975 et 2791 mg/g de sédiment sec. Les teneurs en P sont les plus élevées dans les sédiments des sites 102 et 103 de l'Aa canalisé et les plus basses dans les sédiments du site 77 du canal de la Deûle. Les pourcentages de COT les plus élevés ont été relevés dans les sédiments des sites 78, 80 et 103, et les moins élevés dans les sédiments du site 77. Le plus faible pourcentage de perte au feu est noté pour les sédiments du site 77, les plus forts dans les sédiments des sites 78, 80, 102 et 103.

1.2.3. Comparaison entre les sédiments piégés, les sédiments profonds et la fraction fine (<63µm)

En octobre 1994 et en mars 1995, nous avons collecté des sédiments en profondeur en plus des sédiments piégés dans les substrats artificiels. Sur les sédiments piégés, les sédiments profonds et la fraction fine (<63µm) de ces derniers, nous avons mesuré les teneurs en Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn, NTK, COT et P ainsi que la Perte au Feu dans le but de comparer les trois types de sédiments.

Tableau 27. Teneurs en NTK, Y, COT et perte au feu dans les sédiments.

S: septembre 1994, O: octobre 1994, M: mars 1995, MOY: moyenne, ET: Ecart Type (n=3).

Teneurs en µg/g de sédiments sec

% Pourcentages par rapport au poids sec

SITES	NTK µg/g		P µg/g		COT %		PF %	
	MOY	ET	MOY	ET	MOY	ET	MOY	ET
77S	2475	75	495	57	1,07	0,06	6,95	0,30
78S	2200	312	1029	123	5,09	0,60	26,44	0,18
79S	2791	131	1087	155	2,37	0,03	10,16	0,17
80S	2375	43	1038	105	6,60	0,30	20,00	0,16
102s	2400	130	1448	139	4,90	1,59	24,32	0,48
103S	1975	354	2038	76	6,45	0,20	25,37	0,25
46O	4750	465	1223	190	3,88	0,24	21,89	1,30
46M	1960	151	242	16	2,42	0,47	22,04	0,23
76M	3940	771	1744	355	5,77	0,71	15,90	1,90
62O	14200	4372	3015	264	6,74	0,33	27,49	1,20
62M	9140	625	5165	919	6,31	0,21	27,29	0,19
63O	7825	826	2608	284	6,32	0,46	18,73	3,13
63M	8780	2570	4300	1415	6,12	0,31	23,31	2,16
105O	4140	8%	1705	2277	4,22	0,40	11,54	1,79
105M	6080	1447	2277	505	5,49	0,57	15,92	2,41
101O	5980	1706	1079	157	6,59	0,66	15,14	2,87
101M	1860	365	423	98	2,23	0,41	14,77	3,51
104O	8850	1031	2279	185	6,35	0,05	21,39	0,51

77	78	79	80	102	103	SITES
	pa, COT ^a , PF ^a	pa, COT ^c , PF ^a	pa, COT ^a , PF ^a	pa, COT ^a , PF ^a	pa, COT ^a , PF ^a	77
		NTK ^a		Pb	pa, COT ^c	78
	COT ^b , PF ^a		COT ^a , PF ^a	Pb, COT ^a , PF ^a	pa, COT ^a , PF ^a	79
	PF ^a			Pb, PF ^a	pa, PF ^a	80
	PF ^a				pa, COT ^c , PF ^a	102
	PF ^a	NTK ^b				103

1.2.3.1. Granulométrie

La figure 20 donne les résultats de l'analyse de la granulométrie réalisée sur les sédiments piégés et les sédiments profonds. Selon la classification de Larssonneur (1987), les sédiments profonds et piégés des sites 73, 63 et 104 et les sédiments piégés des sites 46 et 105 sont sablo-vaseux ($25\% < \text{silts et argile} < 75\%$). Les sédiments profonds des sites 46 et 62 sont vaseux. Les sédiments profonds des sites 105 et 101 et les sédiments piégés des sites 62 et 101 sont vaseux ou sablo-vaseux selon la période de prélèvement. Dans tous les cas, la fraction des silts et argiles est comprise entre 45 et 90%.

1.2.3.2. Etude des paramètres métalliques et organiques

Les tableaux 29 et 30 donnent les résultats de la mesure des différents paramètres. Quel que soit le **type** de sédiment analysé, le classement des métaux selon leur abondance relative est le même que celui décrit précédemment avec les mêmes inversions lorsque le sédiment est fortement chargé (voir § 1.2.1.1.). Les teneurs en Al ne peuvent pas être discutées du fait du manque de références. Les teneurs en Cd, Cr, Cu, Fe et Zn des sédiments piégés et des sédiments profonds du Canal à Grand Gabarit et de l'Aa canalisé sont plus élevées (excepté le site 46 pour le Fe) que les teneurs naturelles du Bassin Artois-Picardie, quelle que soit la période de prélèvement. Les teneurs en Cd et Cr des sédiments du site 101 sont plus élevées et les teneurs des autres paramètres plus faibles ou légèrement supérieures aux valeurs naturelles. Le tableau 31 nous renseigne sur les niveaux de contamination métallique des différents sites étudiés et sur les métaux incriminés selon les critères de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie et du Ministère de l'Environnement. Les sédiments du site 101 ne sont pas significativement contaminés par les différents métaux dosés. Il apparaît que le site est cependant classé au niveau **N2** car les sédiments profonds ont une teneur élevée en Cd. Les sédiments des sites localisés dans le bassin minier (76-62-63) sont contaminés par le Cd, le Cr, le Cu et le Zn. Les teneurs importantes en Cd, Pb et Zn des sédiments permettent de classer le site **46** au niveau N2. Les autres sites sont classés au niveau N3 principalement à cause des teneurs élevées en Cd, Pb et Zn. Le Cd qui est présent en teneurs élevées est souvent un des paramètres responsables de la très mauvaise qualité du Canal à Grand Gabarit.

Les plus fortes teneurs en NTK, P, COT et la perte au feu la plus élevée ont été mesurées dans les sédiments du site 62 quels que soient le type de sédiment analyse et la période de prélèvement. Les sites 63 et 104 présentent également des valeurs élevées pour ces paramètres. Les plus faibles valeurs sont mesurées dans les sédiments des sites 101, 46 et 105.

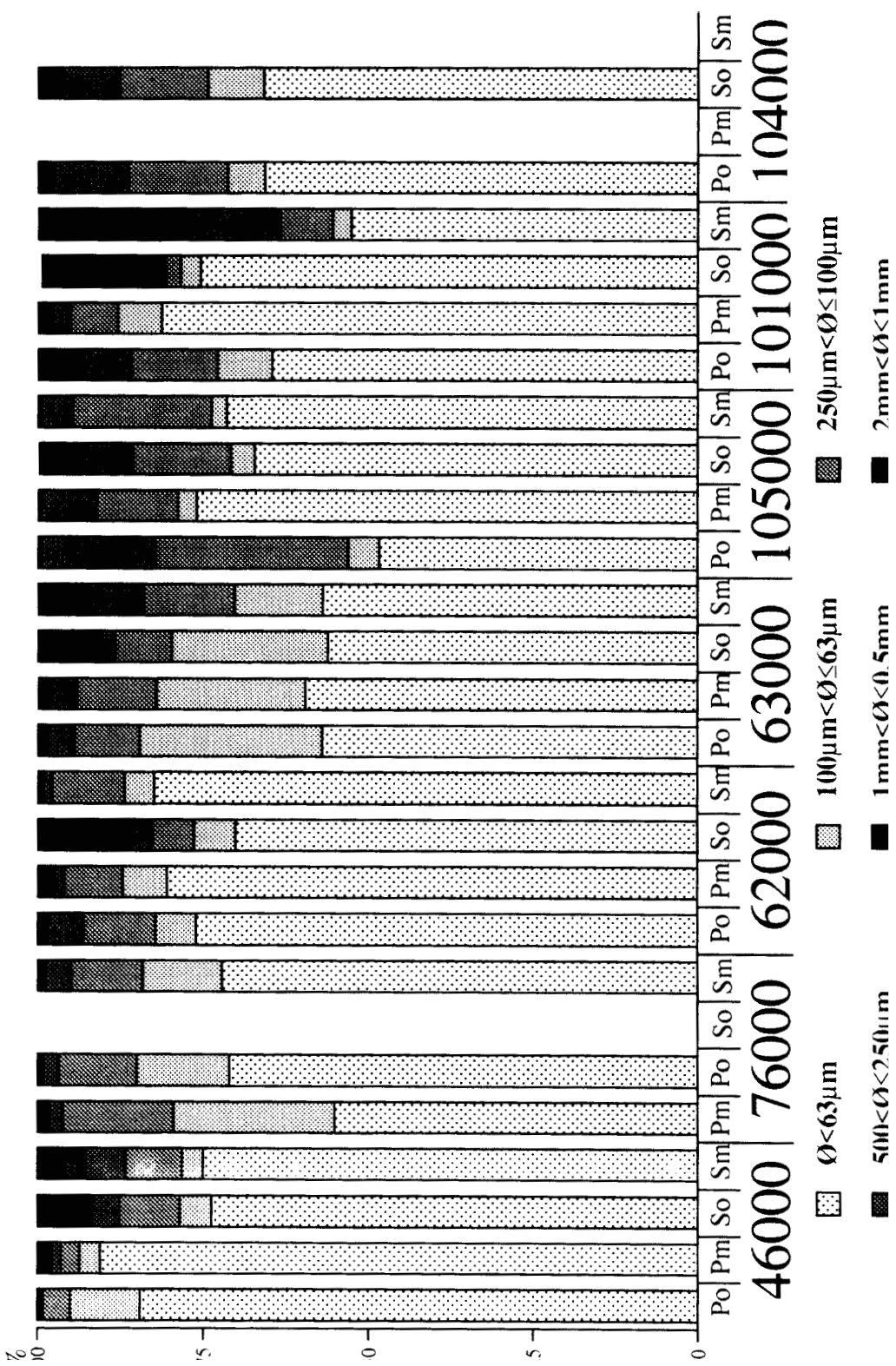


Figure 20. Proportion de chaque fraction granulométrique dans les sédiments profonds (P) et piégés dans les substrats (S) du canal à Grand Gabarit, de l'Aa et de l'Aa canalisé. o: notes 1004 m. mare 1005

Tableau 29. Teneurs moyennes en métaux (Moy) et écarts-types (ET) dans les sédiments piégés et profonds en octobre 1994 et mars 1995.
Valeurs en µg/g de sédiment sec

		Octobre 94						Mars 95					
		Piégés		Profonds		Fraction fine		Piégés		Profonds		Fraction fine	
		Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
Al (µg/g)	46	5871	413	9705	859	7268	760	6975	802	7977	452	7705	732
	76			11277	1937	10115	1081	10239	645	11562	1343	11456	878
	62	13935	497	18646	598	12953	2340	15889	1692	15051	1661	15466	1440
	63	8047	795	9867	823	9979	684	9022	2395	8046	1009	9236	1021
	105	7602	1657	6939	451	9203	46	17784	956	9519	594	13032	1919
	101	7411	1467	7702	391	5893	365	5261	584	13216	2001	6632	520
	104	13769	2563	21779	1307	16869	624						
Cd (µg/g)	46	2,00	0,0	4,83	0,21	3,50	0,10	6,27	0,67	8,17	0,12	7,27	0,59
	76			21,37	0,29	16,87	0,59	8,07	1,50	17,43	0,91	18,73	1,36
	62	189,50	14,06	291,70	1,49	246,63	2,31	177,83	13,97	183,50	24,17	183,63	27,49
	63	70,25	16,80	94,53	3,58	99,93	3,23	49,33	17,13	83,20	11,60	112,73	13,51
	105	14,50	1,91	10,07	0,15	13,00	0,26	12,03	1,07	12,93	2,08	14,47	1,00
	101	1,50	0,58	3,30	0,40	1,47	0,06	4,03	0,42	4,60	0,10	3,70	0,10
	104	10,25	0,50	9,5	0,20	7,70	0,26						
Cr (µg/g)	46	65,75	1,71	117,33	6,66	52,33	5,03	42,17	1,27	51,27	6,36	47,73	2,75
	76			218,67	55,77	129,33	8,62	80,83	9,15	91,10	5,31	114,50	4,06
	62	136,25	6,99	191,67	20,98	123,00	7,00	94,43	8,77	64,93	5,30	91,00	4,23
	63	94,50	32,48	127,67	21,01	121,33	25,74	56,03	16,31	119,77	15,78	59,9	4,55
	105	89,50	7,94	62,33	16,56	70,33	4,51	116,73	20,84	110,87	10,54	74,53	10,50
	101	70,00	15,12	46,67	5,86	12,00	1,73	35,90	1,31	52,07	3,31	28,53	1,72
	104	149,75	35,67	132,67	12,10	123,67	3,06						
Cu (µg/g)	46	15,78	0,87	22,46	0,72	16,57	0,32	15,60	1,06	22,07	1,75	16,97	0,67
	76			141,13	7,60	123,13	3,11	62,13	13,02	128,6	6,58	130,83	8,07
	62	136,68	8,07	158,73	4,99	121,97	0,86	141,83	3,67	143,73	8,36	122,10	13,41
	63	59,58	12,84	32,43	1,59	41,33	1,10	54,2	18,23	51,77	9,26	70,60	7,63
	105	28,58	6,58	16,13	0,59	26,83	0,91	33,77	2,86	28,30	6,91	29,33	0,90
	101	19,58	3,40	11,27	1,06	8,47	0,49	11,90	0,72	17,13	0,72	9,97	0,50
	104	43,65	2,95	42,57	0,68	42,43	0,45						
Fe (µg/g)	46	8906	417	12252	2804	9614	472	7857	335	9406	568	9198	50
	76			15996	1582	12782	1203	14920	871	12896	679	13025	533
	62	17350	1418	16662	267	15316	553	16384	645	13214	493	13539	512
	63	13219	2939	13272	693	11868	1011	11129	2601	9807	823	10457	523
	105	16288	2258	14476	1318	17412	648	26171	1743	17837	2857	19259	1516
	101	11888	2115	8360	335	7206	1148	7031	606	8918	945	7835	613
	104	16856	9765	23826	240	22386	421						
Pb (µg/g)	46	133,00	17,83	228,00	6,08	188,67	9,02	129,67	13,32	212,00	27,51	189,67	12,42
	76			1926,67	95,56	1946,67	77,42	476,33	106,84	1397,67	43,32	1759,67	119,89
	62	872,00	42,26	1182,33	15,01	1001,33	10,50	340,00	37,72	866,33	52,94	848,00	111,73
	63	392,25	84,49	320,67	19,04	363,67	10,69	344,67	72,43	445,33	51,60	605,33	84,91
	105	225,25	39,36	194,67	9,29	304,33	2,52	216,67	19,09	235,33	57,73	283,00	19,97
	101	35,75	3,20	28,00	1,00	21,67	0,58	47,33	11,93	48,00	2,00	44,67	0,58
	104	274,75	6,99	265,00	4,36	265,00	0,00						
Zn (µg/g)	46	158,13	15,46	342,67	10,07	298,67	16,65	131,53	22,75	368,27	22,81	249,93	22,75
	76			3929,33	119,09	3145,33	82,01	881,27	149,37	2275,50	45,55	2670,13	120,58
	62	455,63	82,42	4185,33	161,11	3256,00	66,57	1328,13	142,27	2499,13	91,16	2328,13	376,43
	63	795,63	168,73	1224,00	110,50	1442,67	71,70	531,33	240,04	1039,10	99,30	1315,33	60,28
	105	333,13	60,77	308,00	22,27	462,00	8,49	315,67	39,45	473,53	39,45	341,97	22,75
	101	89,38	15,19	92,00	8,00	61,33	6,11	78,90	0,00	236,80	0,00	78,90	0,00
	104	307,50	19,04	344,00	21,17	373,33	30,29						

Tableau 30. Moyenne (Moy) des teneurs en NTK, COT, P et PF et écarts-types (ET) correspondants dans les sédiments piégés et profonds en octobre 1994 et mars 1995.

%: g pour 100 g de sédiment sec

µg/g de sédiment sec

		Octobre 94						Mars 95					
		Piégés		Profonds		Fraction fine		Piégés		Profonds		Fraction fine	
		Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET	Moy	ET
NTK (µg/g)	46	4750	465	4620	453	3840	629	1960	151	5960	544	3600	216
	76			4880	151	2970	270	3940	771	5380	302	4627	310
	62	14200	4372	8075	843	9450	1375	9140	625	8220	982	5880	262
	63	7825	826	2240	375	2850	572	8780	2570	2860	510	3280	400
	105	4140	896	2300	135	2480	332	6080	1447	2920	601	2940	334
	101	5980	1706	2470	634	1145	117	1860	365	2300	250	1640	139
	104	8850	1031	7700	630	8445	502						
P (µg/g)	46	1233	190	695	71	727	30	242	16	771	139	787	56
	76			1863	120	2645	159	1744	355	1768	221	2385,4	141
	62	3015	264	2293	227	2985	110	5165	919	2655	266	3270	499
	63	2608	284	1537	43	2374	116	4300	141,5	1562	407	2568,75	590
	105	1705	156	447	30	914	50	2277	505	776	217	1095,83	10
	101	1079	157	548	76	491	16	423	98	675	111	739,58	185
	104	2279	185	1756	116	3173	184						
CO? %	46	3,88	0,24	5,01	0,52	3,90	0,23	2,42	0,47	4,92	0,61	4,59	0,42
	76			6,50	0,21	6,95	0,53	5,77	0,71	6,25	0,21	6,22	0,14
	62	6,74	0,33	6,59	0,11	7,18	0,33	6,31	0,21	6,33	0,13	6,33	0,12
	63	6,32	0,46	3,13	0,18	4,07	0,18	6,12	0,31	4,44	0,58	5,61	0,32
	105	4,22	0,40	2,20	0,07	3,40	0,05	5,49	0,57	3,62	0,66	3,99	0,13
	101	6,59	0,66	3,12	0,24	2,06	0,06	2,23	0,41	3,54	0,38	2,53	0,10
	104	6,35	0,05	6,31	0,06	6,20	0,38						
PF a	46	21,89	1,30	22,78	0,07	19,27	0,09	22,04	0,23	23,10	0,52	19,93	0,67
	76			18,51	0,24	19,813	1,34	15,90	1,90	21,36	0,59	20,61	0,45
	62	27,49	1,20	24,60	1,73	20,14	0,16	27,29	0,19	25,19	0,86	20,52	1,31
	63	18,73	3,13	18,41	7,70	13,04	0,15	23,31	2,16	13,43	1,09	16,46	1,00
	105	11,54	1,79	7,18	0,11	11,65	0,05	15,92	2,41	11,87	2,40	13,17	0,25
	101	15,14	2,87	9,90	0,07	5,27	0,09	14,77	3,51	11,60	1,06	7,09	0,72
	104	21,39	0,51	22,99	0,03	23,09	0,12						

Tableau 31. Métaux contaminants et niveau de contamination des sites étudiés selon la prise en compte des sédiments profonds ou piégés.

Sites	Métal contaminant (Teneurs 5 fois plus élevées que les valeurs naturelles)					Niveau de contamination et métal incriminé (Selon les valeurs de référence du Ministère de l'Environnement)				
	Sédiments profonds		Sédiments récents		AEAP 1990	Sédiments profonds		Sédiments récents		Min. Env. 1993
	Octobre 1994	Mars 1995	Octobre 1994	Mars 1995		Octobre 1994	Mars 1995	Octobre 1994	Mars 1995	
46	Pb	Cd, Pb	Pb	Aucun	Aucun	N2 (Cd, Pb)	N2 (Cd, Pb, Zn)	N2 (Pb)	N2 (Cd, Pb)	N2 (Pb, Zn)
76	Cd, Cr, Cii, Pb, Zii	Cd, Cii, Pb, zii		Cd, Pb, Zn	Cd, Cu, Pb, Zn	N3 (Cd, Pb, Zn)	N3 (Cd, Pb, Zn)		N3 (Pb)	N3 (Cd, Cii, Pb, Zn)
62	Cd, Cr, cii, Pb, Zn	Cd, Cu, Pb, Zn	Cd, cii, Pb, Zn	Cd, Cu, Pb, Zn	Cd, Cii, Pb, Zn	N3 (Cd, Pb, Zn)	N3 (Cd, Pb, Zn)	N3 (Cd, Pb, Zn)	N3 (Cd, Pb, Zn)	N3 (Cd, Pb, Zn)
63	Cd, Pb, Zn	Cd, Pb, Zn	Cd, Pb, Zn	Cd, Pb, Zn	Cd, Pb, Zn	N3 (Cd)	N3 (Cd, Pb)	N3 (Cd, Pb)	N3 (Cd)	N2 (Pb)
105	Cd	Cd, Pb	Cd, Pb	Cd, Pb	zn	N3 (Cd)	N3 (Cd)	N3 (Cd)	N3 (Cd)	N2 (Cd, Pb)
101	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	Aucun	N2 (Cd)	N2 (Cd)	NI	N1	N1
104	Cd, Pb		Cd, Pb		Aucun	N3 (Cd)		N3 (Cd)		N2 (Cd, Pb)

1.2.3.3. Comparaisons inter-sites

Des analyses de variance à une voie réalisées pour chaque paramètre en fonction de la période de prélèvement ont montré qu'il existait des différences significatives inter-sites des teneurs moyennes métalliques et organiques. Nous avons donc réalisé des tests de comparaison multiples pour comparer les sites entre eux. Les tableaux 32 et 33 résument les résultats des tests **SNK** réalisés pour chaque **type** de sédiment et pour les deux périodes de prélèvement. La règle pour lire les tableaux est la suivante: les paramètres cités sont ceux dont la concentration est significativement plus forte dans les sédiments du premier site (en colonne) que dans ceux du deuxième site (en ligne). Les chiffres (1, 2, 3) font référence au niveau de signification. Les résultats concernant les sédiments piégés sont repris des analyses précédentes. Quels que soient les sédiments ou la période, il apparaît que les sites situés dans le Bassin Minier sont significativement plus chargés en métaux lourds et en matières organiques que les autres sites. Les sédiments des sites 62 et 76 sont significativement plus chargés en matières organiques que l'ensemble des autres sites. Les sédiments du site 76 sont les plus chargés en Pb en octobre 1994 et en Cr et Pb en mars 1995. Les sédiments du site 101 sont les moins chargés sauf pour l'Al **dans** les sédiments profonds en mars 1995 et en COT dans les sédiments profonds et piégés en octobre 1994. Les sédiments des sites 105 et 104 et principalement les fractions fines de ces sédiments sont plus chargés en Fe. Les concentrations en Al dans les sédiments du site 104 sont significativement plus élevées que dans les autres sites.

1.2.3.4. Comparaisons intra-sites des sédiments (piégés, profond, fraction fine) au cours du temps

Les résultats des analyses de variance à deux voies qui nous ont permis de mettre en évidence l'existence de différences significatives dans le temps et entre les différents types de sédiments sont présentés dans le tableau 34. En mars 1995, il apparaît qu'il n'y a pas de différence significative entre les différents types de sédiments pour l'Al, le Cu, le Fe et la perte au feu. En octobre 1995, il n'y a pas de différence significative pour l'Al et le COT. Il apparaît également qu'il n'y a **pas** de variation significative pour les teneurs en Al, Cr, Cu dans les sédiments profonds en fonction de la période de prélèvement. C'est également vrai pour le Cu et la perte au feu (PF) dans les sédiments piégés et **pour** le Fe, le Pb, le NTK et le P dans les fractions fines. Concernant les différentes variations significatives, chaque paire d'échantillons période/paramètre ou type de sédiments/ paramètres doit être considérée individuellement. Afin de comparer uniquement les couples de moyennes (même sédiments à deux dates différentes ou deux **type** de sédiment à la même date) nous avons utilisé le test de Bonferroni. Les tests réalisés (non présentés) n'ont pas permis de faire une généralisation du comportement des différents paramètres mesurés aussi bien dans le temps qu'à travers les trois types de sédiments analysés car les variations ne vont pas toutes dans le même sens. Chaque cas semble être un cas particulier.

Tableau 32. Comparaison des sites selon les mesures des différents paramètres dans les sédiments piégés (a), dans les sédiments profonds (b) et dans les fractions fines (c) (octobre 1994) à l'aide de tests SNK. 1: $p < 0.05$, 2: $p < 0.01$, 3: $p < 0.001$. La teneur d'un paramètre du 1er site (en ligne) est significativement plus élevée que dans le 2d (en colonne).

46	62	63	105	101	104		
a	Al ³ Cd ³ Cr ² Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ p ³ NTK ³ COT ³ PF ²	Cd ³ Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ p ³ COT ³	Cd ² Cu ¹ Fe ³ Pb ² Zn ¹ p ¹	COT ³	Al ³ Cd ¹ Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ² Zn ¹ p ³ COT ³	46	
					Fe ²	62	
	Al ³ Cd ³ Cr ¹ Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ NTK ² p ¹ PF ³				Al ³ Cr ² Fe ³	63	
PF ³	Al ³ Cd ³ Cr ¹ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ³ PF ² COT ³		COT ³ PF ¹	Al ³ Cr ² Fe ² p ² PF ³ COT ³	105	
Pb ² PF ²	Al ³ Cd ³ Cr ² Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ NTK ² p ³ PF ³	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ³	Cd ² Fe ¹ Pb ³ Zn ² p ²		Al ³ Cr ² Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ² p ³ PF ²	101	
	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ² p ² PF ²	Cd ³ Cu ² Zn ³ Pb ²				104	
46							
b	76	62	63	105	101	104	
	Cd ³ Cr ² Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ³ COT ³	Al ³ Cd ³ Cr ¹ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ COT ³	Cd ³ Cu ² Pb ¹ Zn ³ p ³	Cd ²		Al ³ Cu ³ NTK ³ p ³ COT ³	46
		Al ³ Cd ³ Cu ³ Zn ² NTK ³ p ³	Cd ³			Al ³ NTK ³	76
NTK ³ COT ³	Pb ³					Al ²	62
NTK ³ COT ³	Cr ² Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ³ p ² COT ³	Al ³ Cd ³ Cr ¹ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ COT ³				Al ³ Cu ² Fe ¹ NTK ³ p ¹ COT ³	63
Al ¹ Cr ¹ Cu ¹ NTK ³ COT ³ PF ³	Al ² Cd ³ Cr ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ COT ³ PF ²	Al ³ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ COT ³ PF ³	Al ¹ Cd ³ Cr ² Cr ³ Cu ³ Pb ² Zn ³ p ³ COT ² PF		COT ³	Al ³ Cr ³ Cu ³ Fe ¹ NTK ³ p ³ COT ³ PF ³	105
Al ¹ Cr ¹ Cu ² Fe ¹ Pb ³ Zn ² NTK ³ COT ³ PF ³	Al ² Cd ³ Cr ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ COT ³ PF ²	Al ³ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ COT ³ PF ³	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ³ PF ²	Cd ³ Pb ³ Zn ²		Al ³ Cr ² Cu ³ Fe ² Pb ³ Zn ¹ NTK ³ p ³ COT ³ PF ³	101
	Cr ² Cu ³ Pb ³ Zn ³	Cr ¹ Cu ³ Pb ³ Zn ³ p	Zn ³				104
46	76	62	63	105	101	104	
c	Al ¹ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Fe ² Pb ³ Zn ³ p ³ PF ² COT ³	Al ³ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³	Al ¹ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Fe ² Pb ³ Zn ³ p ³	Al ¹ Cd ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ² PF ³		Al ³ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Fe ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³	46
		Al ² Cd ³ Fe ² Zn ² NTK ³ p ² PF ¹	Cd ³	Fe ³		Al ³ Fe ³ Pb ² NTK ³ p ³ PF ³	76
	Pb ³			Fe ²		Al ³ Fe ³ PF ³	62
PF ³	Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ¹ PF ³ COT ³	Al ¹ Cd ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³		Fe ³		Al ³ Fe ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³	63
PF ³ COT ³	Cd ¹ Cr ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ³ PF ³ COT ³	Al ² Cd ³ Cr ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³	Cd ³ Cr ³ Cu ³ Pb ¹ Zn ³ p ³ PF ³ COT ³			Al ³ Cr ³ Cu ³ Fe ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³	105
Cr ³ Cu ³ Fe ² Pb ³ p ³ p ¹ NTK ² PF ³ COT ³	Al ² Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ NTK ¹ p ³ PF ³ COT ³	Al ³ Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³	Al ² Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ NTK ¹ p ³ PF ³ COT ³	Al ² Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ NTK ¹ p ³ PF ³ COT ³		Al ³ Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ NTK ³ p ³ PF ³ COT ³	101
	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ COT ²	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ COT ²	Cd ³ Pb ² Zn ³	Cd ¹			104

Tableau 33. Comparaison des sites selon les mesures des différents paramètres **dans** les sédiments piégés (a), les sédiments profonds (b) et dans les fractions fines (c) (octobre 1995) à l'aide de tests **SNK**. 1: $p < 0.05$, 2: $p < 0.01$, 3: $p < 0.001$. La teneur d'un paramètre du 1er site (en ligne) est significativement plus élevée que dans le 2d (en colonne).

46	76	62	63	105	101	
a	Al ¹ Cr ² Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ TOC ³	Al ³ Cd ³ Cr ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³ PF ¹	Al ³ Cd ³ Cu ³ Fe ¹ Pb ² Zn ² TKN ³ p ³ TOC ³	Al ³ Cr ³ Cu ¹ TKN ² p ¹ TOC ³		46
PF ²		Al ³ Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ TKN ² p ³ PF ³	Al ³ Cd ³ TKN ² p ² PF	Al ³ Cr ² Fe ³		76
	Cr ¹ Fe ² Pb ¹ Zn ¹	Al ³ Cd ³ Cr ² Cu ³ Fe ² Pb ³ Zn ³ PF ¹		Cr ¹ Fe ³ Al ³ Cr ³ Fe ³		63
PF ²	Cu ² Pb ³ Zn ³	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ TKN ¹ p ² PF ³	Cd ³ Cu ¹ Pb ¹ Zn ¹ TKN ¹ p ² PF ²			105
PF ²	Al ² Cr ² Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ p ¹	Al ³ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³	Al ¹ Cd ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ² TKN ³	Al ³ Cr ³ Cu ¹ Fe ³ Pb ² TKN ² p ¹		101

46	76	62	63	105	101	
b	Al ¹ Cr ³ Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ p ² TOC [?]	Al ³ Cd ³ Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ²	Cd ³ Cr [?] Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ²	Cr ³ Fe ³	Al ²	46
		Al ¹ Cd ³ Cu ¹ Zn ³ TKN ³ p ³ PF ²	Cd ³ Cr ²	Cr ¹ Fe ²		76
	Cr ² Pb ³		Cr [?]	Cr [?] Fe [?]		62
TKN ³ PF ³	Al ¹ Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ TKN ³ TOC ² PF ³	Al ³ Cd ³ Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC [?] PF ³		Fe ³	Al ²	63
TKN ³ TOC ¹ PF ³	Cu ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³ PF ³	Al ² Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³ PF ³	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ²		Al ¹	105
Pb ³ Zn ¹ TKN ³ TOC ¹ PF ³	Cr ³ Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ² TOC ³ PF ³	Cd ³ Cu ³ Fe ¹ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³ PF ³	Cd ³ Cr ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ²	Cr ³ Fe ³ Pb ³ Zn ²		101

46	76	62	63	105	101	
c	Al ² Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³	Al ³ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³	Cd ³ Cr ¹ Cu ³ Pb ³ Zn ³ p ³ TOC ³	Al ³ Cr ³ Fe ³		46
		Al ² Cd ³ TKN ³ p ¹	Cd ³	Fe ³		76
	Cr ³ Pb ³ Zn ¹			Fe ³		62
PF ³	Al ¹ Cr ³ Cu ³ Fe ² Pb ³ Zn ³ TKN ³ TOC ² PF ³	Al ³ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Fe ² Pb ² Zn ³ TKN ³ p ¹ TOC ² PF ³		Al ² Cr ² Fe ³		63
TKN ¹ TOC ² PF ³	Cr [?] Cu ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³ PF ³	Al ¹ Cd ³ Cr ² Cu ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³ PF ³	Cd ³ Cu ³ Pb ³ Zn ³ TOC ³ PF ³			105
Cr [?] Pb ¹ TKN ³ TOC ³ PF ³	Al ² Cr [?] Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³ PF ³	Al ³ Cd ³ Cr ³ Cu ³ Fe ³ Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ¹ TOC ³ PF ³	Al ¹ Cd ³ Cr [?] Cu ³ Fe ² Pb ³ Zn ³ TKN ³ p ³ TOC ³ PF ³	Al ³ Cr ³ Cu ¹ Fe ³ Pb ² TKN ³ TOC ³ PF ³		101

Tableau 34. Résultats des ANOVA à deux voies montrant les effets du type de sédiments et de la période sur les teneurs métalliques et organiques (sites 46, 76, 62, 63, 105, 101, 104). NS: Non significatif ($p > 0.05$), S: Significatif ($p < 0.05$), VS: Très significatif ($p < 0.01$), ES: Extrêmement significatif ($p < 0.001$)

Paramètres	SEDIMENTS		PERIODES		
	Octobre 94	Mars 95	Piégés	Profonds	Fines
Al	NS	NS	ES	NS	S
Cd	ES	VS	VS	ES	VS
Cr	ES	S	S	NS	S
CU	NS	ES	NS	NS	ES
Fe	NS	ES	S	VS	NS
Pb	ES	ES	S	ES	NS
Zn	ES	ES	S	ES	ES
NTK	ES	ES	S	VS	NS
P	ES	ES	S	S	NS
COT	ES	NS	ES	VS	VS
PF	NS	ES	NS	NS	ES

1.2.3.5. Etude des corrélations

Des coefficients de corrélation linéaires de Person (CC) ont été calculés entre les paramètres analysés pour les trois types de sédiments (profonds, fraction fine, piégés). Ils sont présentés dans les tableaux 35 à 37. Tous les coefficients de corrélation significatifs sont positifs.

Près de la moitié des CC calculés pour les sédiments profonds sont très significatifs ($p < 0,01$). Les CC impliquant COT et tous les paramètres, Fe et Cd, Cu, Pb, Zn ou PF, Pb et Al ou PF, Cr et Cd ou PF ne sont pas significatifs.

La plupart des paramètres mesurés dans la Fraction fine des sédiments profonds sont significativement corrélés entre eux excepté ceux impliquant Fe et Cd, Cu, Pb ou Zn, Pb et Al, Cd ou NTK, et Cd et Cr ou PF.

Plus de 70% des CC calculés pour les sédiments piégés sont significatifs. Les paramètres impliquant P (sauf P/Fe-Al), Fe et Cd, Cu, Pb, Zn ou PF, et PF et Al, Cr ou COT ne sont pas significativement corrélés.

1.2.3.6. Analyses en Composantes Principales

Une première ACP a été réalisée avec les données des sédiments profonds des cours d'eau (figure 21). Les deux premiers axes (I et II) donnent 65,9% de l'information totale. Le Cu, le Fe, le Zn et le P ($\sum r^2 > 0,8$ avec r = la corrélation entre les variables et les axes), le NTK, l'Al et le Pb ($0,65 < \sum r^2 < 0,80$), le Cd et le Cr ($0,40 < \sum r^2 < 0,65$), la PF et le COT ($\sum r^2 < 0,4$) sont respectivement très bien, bien, modérément et mal représentés sur le **plan** principal. Les variables Cu, P et Zn contribuent fortement à la formation du premier axe. Le Fe contribue à la formation de l'axe II. L'Al est équitablement corrélé avec les deux premiers axes. La plupart des points sont bien représentés sur le plan principal. Le groupe constitué des sites 101, 46 et 105 et le groupe composé des sites 62 et 76 sont isolés de façon opposée le long du premier axe. Le site 104 est isolé par le deuxième axe du fait de sa forte charge en Al et en Fe. Le site 63a n'est pas bien représenté sur ce plan.

Une deuxième ACP a été réalisée avec les données de la Fraction fine ($< 63\mu\text{m}$) des sédiments du fond des cours d'eau (figure 22). Le plan principal présente 79,2% de l'inertie totale du nuage de points. Les variables Al, Cu, Fe, Zn, P et COT ($\sum r^2 > 0,80$), Pb, Cr et NTK ($0,65 < \sum r^2 < 0,80$), Cd et PF ($0,40 < \sum r^2 < 0,65$) sont respectivement très bien, bien et modérément représentées sur le plan principal. Les variables COT, P, Cu, Cr et Zn contribuent fortement à la formation du premier axe. Le deuxième axe est principalement formé par le Fe. Tous les points sont bien représentés sur le plan principal excepté ceux correspondant au site 63. Les sites 101, 46 et 62 sont bien séparés le long de l'axe I. Le site 62 représenté à l'extrémité positive du premier axe est fortement chargé en Cd et en composés organiques. Les paramètres mesurés ont des teneurs moins importantes dans la fraction fine des sédiments du site 101. Le site 104 est isolé par l'axe II à cause des fortes teneurs en Fe. La fraction fine des sédiments de ce site est également fortement chargée en Al et en NTK. Le site 76 est isolé des autres sites du fait de l'important enrichissement des sédiments en Cu, Zn et Pb.

Tableau 35. Matrices des corrélations entre les différents paramètres des sédiments piégés.

	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	NTK	P	COT	PF
Al	1.000										
Cd	<u>0.477</u>	1.000									
Cr	<u>0.752</u>	<u>0.372</u>	1.000								
Cu	<u>0.598</u>	<u>0.945</u>	<u>0.457</u>	1.000							
Fe	<u>0.863</u>	<u>0.151</u>	<u>0.830</u>	<u>0.298</u>	1.000						
Pb	<u>0.574</u>	<u>0.920</u>	<u>0.466</u>	<u>0.984</u>	<u>0.297</u>	1.000					
Zn	<u>0.535</u>	<u>0.965</u>	<u>0.408</u>	<u>0.983</u>	<u>0.216</u>	<u>0.978</u>	1.000				
NTK	<u>0.572</u>	<u>0.744</u>	<u>0.613</u>	<u>0.742</u>	<u>0.413</u>	<u>0.717</u>	<u>0.705</u>	1.000			
P	<u>0.439</u>	<u>0.168</u>	<u>0.230</u>	<u>0.217</u>	<u>0.448</u>	<u>0.200</u>	<u>0.170</u>	<u>0.239</u>	1.000		
COT	<u>0.564</u>	<u>0.470</u>	<u>0.614</u>	<u>0.594</u>	<u>0.541</u>	<u>0.557</u>	<u>0.506</u>	<u>0.733</u>	<u>0.267</u>	1.000	
PF	<u>0.324</u>	<u>0.706</u>	<u>0.213</u>	<u>0.674</u>	<u>-0.027</u>	<u>0.651</u>	<u>0.669</u>	<u>0.620</u>	<u>0.152</u>	<u>0.299</u>	1.000

" ": valeur significative (P<0.05)" ": Valeur significative (P<0.01)**Tableau 36.** Matrices des corrélations entre les différents paramètres des sédiments profonds.

	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	NTK	P	COT	PF
Al	1.000										
Cd	<u>0.453</u>	1.000									
Cr	<u>0.390</u>	<u>0.355</u>	1.000								
Cu	<u>0.455</u>	<u>0.656</u>	<u>0.524</u>	1.000							
Fe	<u>0.641</u>	<u>0.125</u>	<u>0.528</u>	<u>0.258</u>	1.000						
Pb	<u>0.252</u>	<u>0.361</u>	<u>0.629</u>	<u>0.903</u>	<u>0.235</u>	1.000					
Zn	<u>0.371</u>	<u>0.680</u>	<u>0.674</u>	<u>0.946</u>	<u>0.227</u>	<u>0.917</u>	1.000				
NTK	<u>0.719</u>	<u>0.527</u>	<u>0.271</u>	<u>0.652</u>	<u>0.448</u>	<u>0.443</u>	<u>0.520</u>	1.000			
P	<u>0.609</u>	<u>0.710</u>	<u>0.488</u>	<u>0.856</u>	<u>0.356</u>	<u>0.678</u>	<u>0.771</u>	<u>0.685</u>	1.000		
COT	<u>0.080</u>	<u>0.038</u>	<u>-0.000</u>	<u>0.121</u>	<u>-0.048</u>	<u>0.093</u>	<u>0.090</u>	<u>0.096</u>	<u>0.074</u>	1.000	
PF	<u>0.361</u>	<u>0.375</u>	<u>0.261</u>	<u>0.365</u>	<u>0.181</u>	<u>0.270</u>	<u>0.339</u>	<u>0.506</u>	<u>0.517</u>	<u>-0.003</u>	1.000

" ": valeur significative (P<0.05)" ": Valeur significative (P<0.01)**Tableau 37.** Matrices des corrélations entre les différents paramètres des fractions fines.

	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	NTK	P	COT	PF
Al	1.000										
Cd	<u>0.419</u>	1.000									
Cr	<u>0.697</u>	<u>0.386</u>	1.000								
Cu	<u>0.517</u>	<u>0.594</u>	<u>0.693</u>	1.000							
Fe	<u>0.796</u>	<u>0.087</u>	<u>0.592</u>	<u>0.199</u>	1.000						
Pb	<u>0.295</u>	<u>0.245</u>	<u>0.654</u>	<u>0.903</u>	<u>0.111</u>	1.000					
Zn	<u>0.393</u>	<u>0.636</u>	<u>0.713</u>	<u>0.960</u>	<u>0.107</u>	<u>0.893</u>	1.000				
NTK	<u>0.715</u>	<u>0.581</u>	<u>0.604</u>	<u>0.509</u>	<u>0.552</u>	<u>0.253</u>	<u>0.454</u>	1.000			
P	<u>0.748</u>	<u>0.641</u>	<u>0.794</u>	<u>0.790</u>	<u>0.437</u>	<u>0.587</u>	<u>0.733</u>	<u>0.696</u>	1.000		
CO?	<u>0.676</u>	<u>0.530</u>	<u>0.787</u>	<u>0.857</u>	<u>0.424</u>	<u>0.745</u>	<u>0.803</u>	<u>0.737</u>	<u>0.859</u>	1.000	
PF	<u>0.599</u>	<u>0.290</u>	<u>0.654</u>	<u>0.594</u>	<u>0.402</u>	<u>0.515</u>	<u>0.512</u>	<u>0.728</u>	<u>0.649</u>	<u>0.861</u>	1.000

" ": valeur significative (P<0.05)" ": Valeur significative (P<0.01)

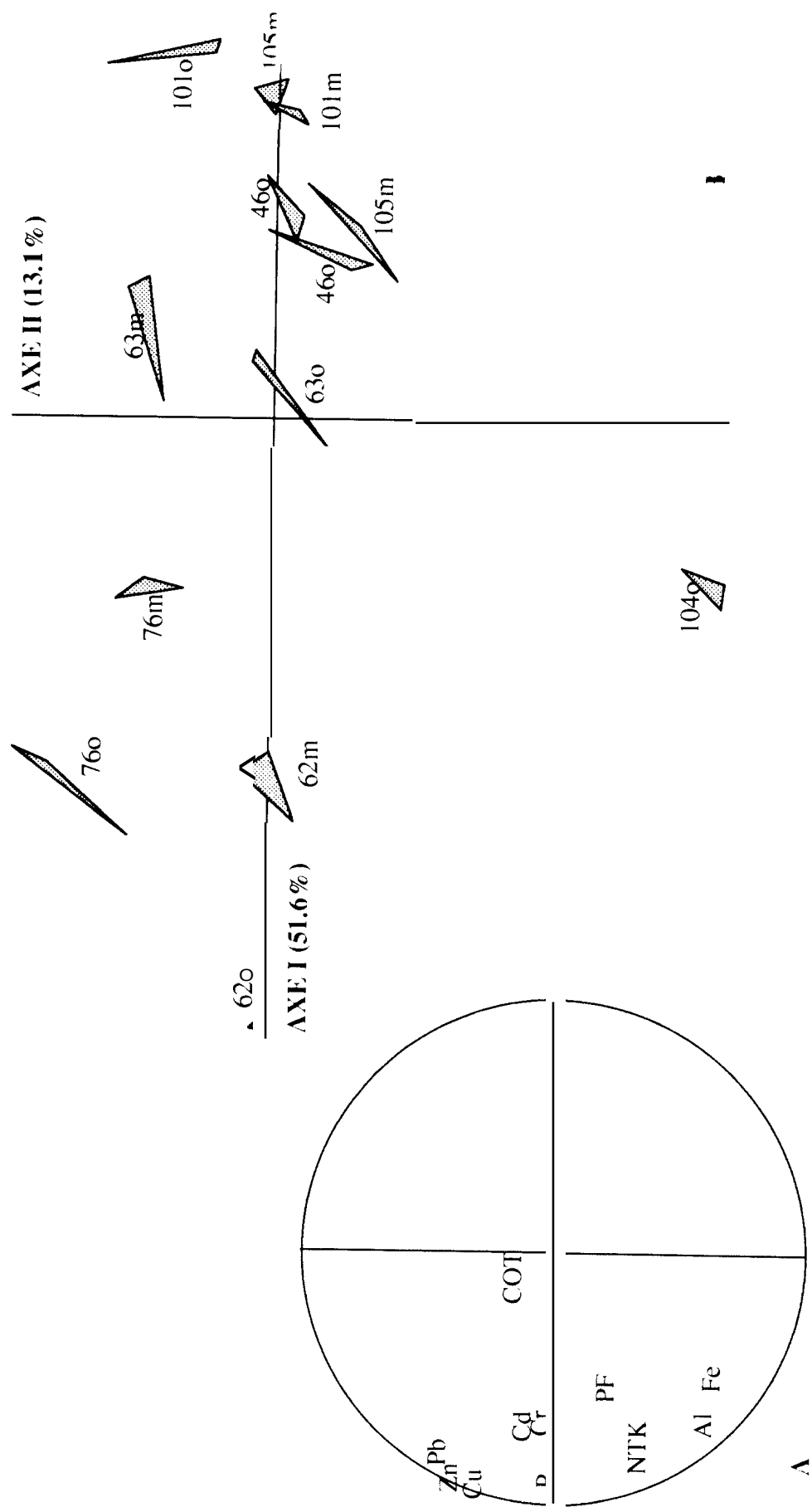


Figure 21. Analyses en Composantes Principales des données centrées et réduites des sédiments profonds.
A: Cercle des corrélations . B: Projection des sites. o: octobre 1994. m: mars 1995.

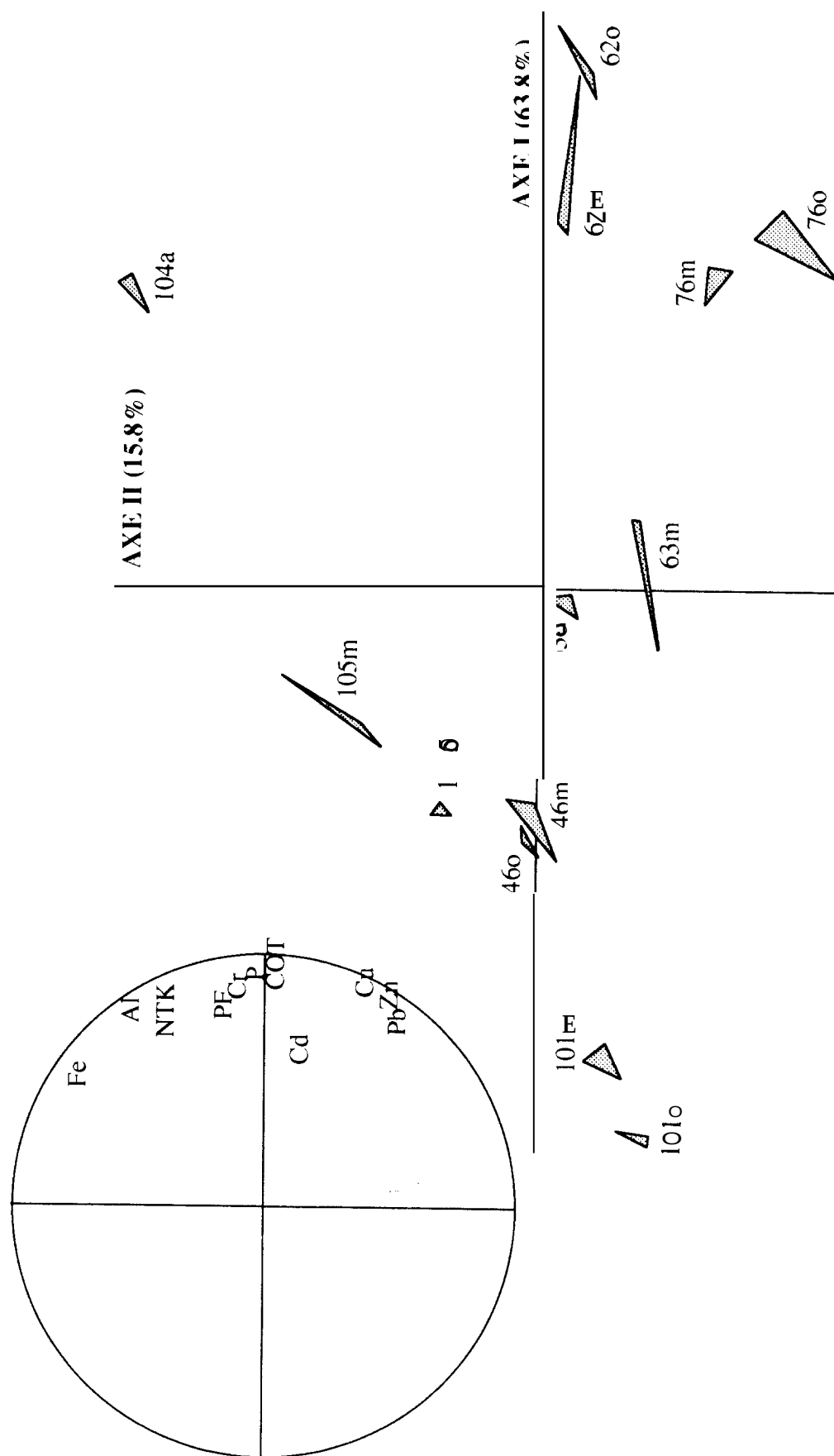


Figure 22. Analyses en Composantes Principales des données centrées et réduites de la fraction fine des sédiments profonds.

A: Cercle des corrélations . B: Projection des sites. o: octobre 1994. m: mars 1995.

Une troisième ACP a été réalisée avec les données des sédiments piégés (figure 23). Le plan principal représente 79,8% de l'information totale. Les variables Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb et Zn ($\sum r^2 > 0,80$), NTK et PF ($0,65 < \sum r^2 < 0,80$), et TOC ($0,40 < \sum r^2 < 0,65$) sont respectivement très bien, bien et modérément représentées sur le plan formé des deux premiers axes. Les variables Cu, Pb, Zn, Cd, TKN contribuent fortement à la formation du premier axe. Le deuxième axe est formé principalement par le Fe. Toutes les surfaces des triangles reliant les trois répliquats sont plus importantes que dans les deux ACP précédentes. Ceci traduit une plus grande variance dans les trois répliquats des sédiments piégés que dans les répliquats des sédiments du fond et de la fraction fine. Les sites **76** et **63** ne sont pas bien représentés sur le plan principal. Les sites 105b et 101a sont isolés respectivement des sites 105a et 101b à cause de leur teneur élevée en Fe, Cr et Al. Le site 62 est isolé à l'extrémité du premier axe à cause des fortes teneurs en Cd, Cu, Pb, Zn, NTK et COT.

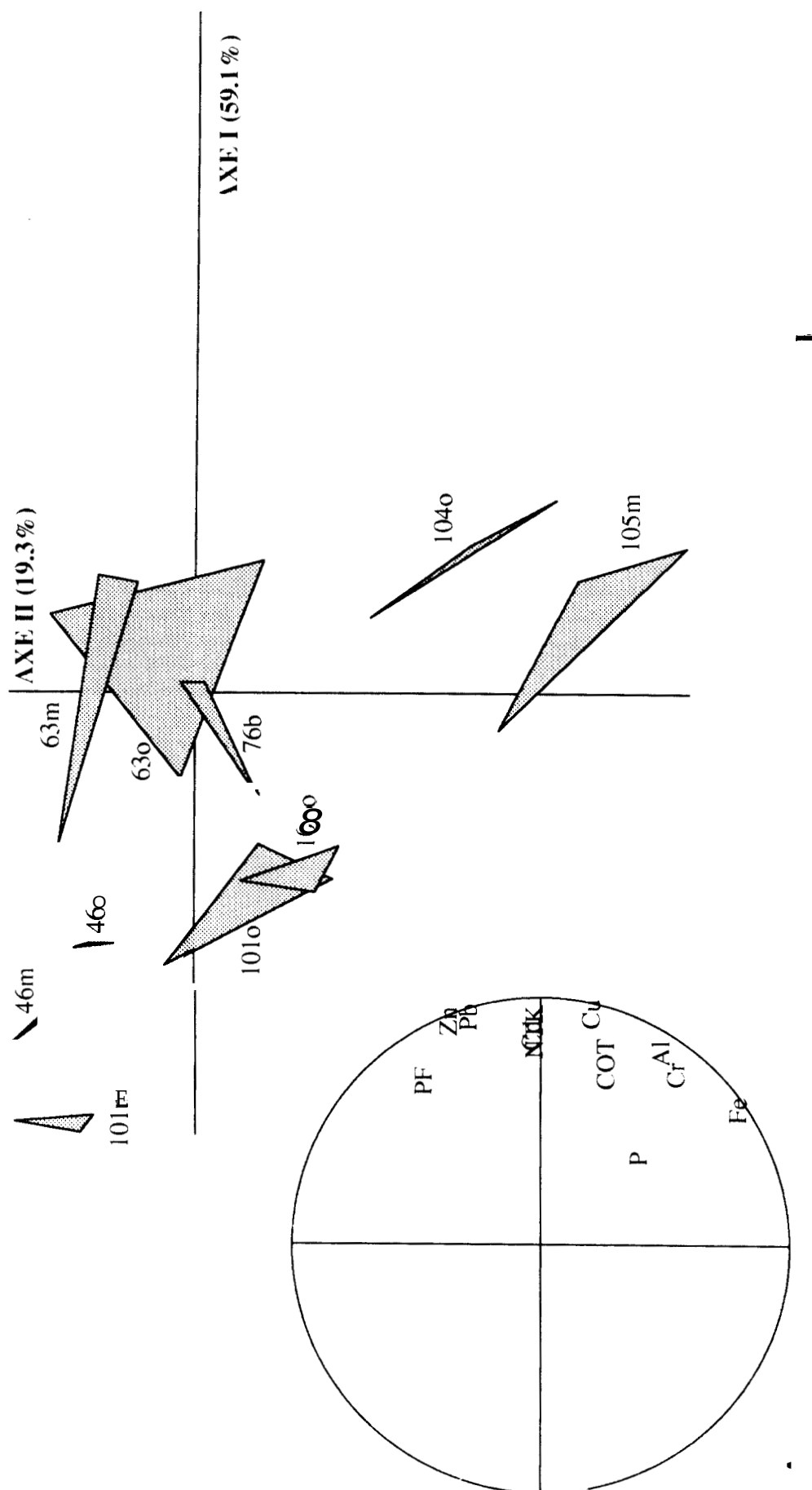


Figure 23. Analyses en Composantes Principales des données centrées et réduites des sédiments piégés.
A: Cercle des corrélations . B: Projection des sites. o: octobre 1994. m: mars 1995.

2. Les macroinvertébrés benthiques

Les piégeages à l'aide de substrats artificiels ont été réalisés en décembre 1991 pour les sites 62 et 63, en février, avril et juin 1992, en octobre 1994 et en mars 1995 pour les sites 46, 76, 62, 63, 105, 101, 104, en mai 1992 pour les sites 105, 101 et 104, en septembre 1994 pour les sites 77, 78, 79, 80, 639, 102 et 103.

2.1. Description des listes taxonomiques

Les listes faunistiques, le dénombrement des taxons et le nombre de pièges retrouvés à chaque site et à chaque période sont présentés dans les tableaux 38 à 45. Dans certains cas, pour des raisons diverses telles que le vandalisme, le vol, le retrait pour gêne, le passage des péniches ou l'entretien des berges, certains substrats artificiels ont été perdus, trouvés en mauvais état ou sortis du cours d'eau. Ainsi en octobre 1994 au niveau du site 76 et en mars 1995 au niveau du site 104, la totalité des substrats artificiels a été perdue. L'ensemble des pièges posés en septembre 1994 au site 639 a également été perdue.

Au cours de cette étude, nous avons recensé 47 familles de macroinvertébrés représentant 16 ordres dans l'ensemble des sites et des périodes de piégeage. Pas plus de 20 familles ont été collectées dans un même prélèvement. Dans le Canal à Grand Gabarit (sites 46, 62, 63, 76, 77, 78, 79, 80, 105), nous avons collecté 31 familles réparties dans 16 ordres. Dans l'Aa canalisé et dans le fleuve Aa, 24 et 29 familles respectivement, sont réparties dans 12 ordres. Dans le Canai à Grand Gabarit, la plus grande richesse taxonomique (17 familles dans 10 ordres) est représentée par le site 46 (canal de la Sensée à Férin) en amont du Bassin Minier en octobre 1994. En février 1992, le site 62 (La Bassée) sur le Canal d'Aire-à-la-Bassée en aval du Bassin Minier présente la plus faible richesse taxonomique (2 familles). Sur le site 101 (fleuve Aa), la plus forte richesse (18 familles) a été remarquée en avril 1995. Sur l'Aa canalisé, 20 familles ont été dénombrées en mars 1992. Toutes périodes confondues, les plus faibles richesses taxonomiques ont été mesurées dans les sites 80 (canai de la Deûle à Haubourdin), 62 et 63 (canal d'Aire à La Bassée et Béthune).

Parmi les 47 familles collectées au cours de l'étude, seules les *Erpobdellidae*, les *Glossiphoniidae*, les *Asellidae* et les *Chironomidae* sont présentes dans au moins 12 sites sur les 13 étudiés. Deux familles de décapodes, les *Aryidae* et les *Astacidae* sont trouvées seulement dans les sites 46 et 76. Sept familles dont les représentants sont essentiellement de type rhéophile, les *Naididae* (certaines espèces), les *Elmidae*, les *Rhyacophilidae*, les *Hydropsychidae*, les *Limnophilidae*, les *Sericostomidae* et les *Simulidae*, ne sont présentes que dans le fleuve Aa (site 101).

F: Février 92; A: Avril 92; J: Juin 92; O: Octobre 94; Ma: Mars 95;
E: Embranchement; F: Famille

	F	A	J	O	Ma
E. PLATHELMINTHES					
Ordre Tricladida					
F. Dugesidae					
<i>Dugesia lugubris</i>	-			5	-
<i>Dugesia gonocephala</i>	-			14	1
F. Dendrocoelidae					
<i>Dendrocoelum lacteum</i>	-	3	-	6	-
E. NEMATHELMINTHES					
Ordre Gordioida					
F. Gordiidae			1	-	-
E. ANNELIDA					
Ordre Tubificida					
F. Tubificidae	2	17	7	9	9
Ordre Hirudinea					
F. Glossiphoniidae					
<i>Hemiclepsis marginata</i>		1	1	1	
<i>Helobdella stagnalis</i>		-		1	-
<i>Glossiphonia complanata</i>	-			1	
F. Erpobdellidae					
<i>Erpobdella octoculata</i>	2	11	21	29	18
E. MOLLUSCA					
Ordre Mesogastropoda					
F. Viviparidae					
<i>Viviparus viviparus</i>	-	6	126	58	17
F. Bithyniidae					
<i>Bithynia tentaculata</i>	3	13	71	56	24
F. Bythinellidae	-	4	7	-	2
Ordre Eulamellibranchia					
F. Dreissenidae					
<i>Dreissena polymorpha</i>	-	-	-	12	3
E. ARTHROPODA					
Ordre Amphipoda					
F. Gammaridae					
<i>Gammarus pulex</i>	31	207	394	210	146
Ordre Isopoda					
F. Asellidae					
<i>Asellus aquaticus</i>	51	163	632	528	91
Ordre Decapoda					
F. Atyidae					
<i>Atyaephyra desmarestii</i>	1	56	30	1873	
F. Astacidae					
<i>Cambarus affinis</i>			2	1	1
Ordre Ephemerida					
F. Baetidae	-		1	-	
Ordre Odonata					
F. Caenagrionidae	1	-			
Ordre Trichoptera					
F. Philopotamidae	1	1		2	3
F. Polycentropodidae		13	11	13	12
Ordre Diptera					
F. Chironomidae	7	47	591	859	30
F. Tipulidae	1	-		6	
Nombre de substrats artificiels	1	4	4	4	4
Nombre total d'individus	100	542	1895	3684	357
Nombre total de familles	10	13	14	17	15

Tableau 39. Distribution des macroinvertébrés dans le site 76

F: Février 92; A: Avril 92; J: Juin 92; Ma: Mars 95;

E: Embranchement; F: Famille

	F	A	J	Ma
E. PLATHELMINTHES				
Ordre Tricladida				
F. Dugesidae				
<i>Dugesia gonocephala</i>	-		-	2
E. ANNELIDA				
Ordre Tubificida				
F. Tubificidae	3	4	35	1
Ordre Hirudinea				
F. Glossiphoniidae				
<i>Helobdella stagnalis</i>	-	2	8	
<i>Glossiphonia complanata</i>	-	1	2	-
F. Piscicolidae				
<i>Piscicola geometra</i>	-	1		-
F. Erpobdellidae				
<i>Erpobdella octoculata</i>	11	31	106	21
E. MOLLUSCA				
Ordre Mesogastropoda				
F. Bithyniidae				
<i>Birhynia tentaculata</i>	1	-	22	27
F. Bythinellidae	-	-	1	-
Ordre Basommatophora				
F. Planorbidae	-	-	-	1
F. Lymnaeidae	-	1		
Ordre Eulamellibranchia				
F. Dreissenidae				
<i>Dreissena polymorpha</i>	-	-	-	1
E. ARTHROPODA				
Ordre Amphipoda				
F. Gammaridae				
<i>Gammarus pulex</i>	-	-		4
Ordre Isopoda				
F. Asellidae				
<i>Asellus aquaticus</i>	34	48	422	99
Ordre Decapoda				
F. Atyidae				
<i>Atyaephyra desmarestii</i>	1	-		
F. Astacidae				
<i>Cambarus affinis</i>	-	5	25	5
Ordre Odonata				
F. Caenagrionidae	-	2	1	-
Ordre Coleoptera				
F. Dysticidae	3			-
Ordre Trichoptera				
F. Polycentropodidae	-	4	1	17
Ordre Diptera				
F. Chironomidae	4	149	236	4
Nombre de substrats artificiels	2	4	4	4
Nombre total d'individus	57	248	859	187
Nombre total de familles	7	10	10	11

Tableau 40. Distribution des macroinvertébrés dans le site 62

D: Décembre 91; F: Février 92; A: Avril 92; J: Juin 92; O: Octobre 94;

Ma: Mars 95;

E: Embranchement; F: Famille

	D	F	A	J	O	Ma
E. ANNELIDA						
Ordre Tubificida						
F. Tubificidae	1468	88	308	274	5	
Ordre Hirudinea						
F. Glossiphoniidae						
<i>Hemiclepsis marginata</i>				1		1
<i>Helobdella stagnalis</i>	2		1			
<i>Glossiphonia complanata</i>	4					
F. Erpobdellidae						
<i>Erpobdella octoculata</i>	1					
E. MOLLUSCA						
Ordre Mesogastropoda						
F. Bithyniidae						
<i>Bithynia tentaculata</i>	2					
P. ARTHROPODA						
Ordre Isopoda						
F. Asellidae						
<i>Asellus aquaticus</i>	3		2	3	149	25
Ordre Diptera						
F. Chironomidae	809	37	10	274	234	55
Nombre de substrats artificiels	3	3	4	4	4	4
Nombre total d'individus	2289	125	321	552	388	81
Nombre total de familles	6	2	4	4	3	3

Tableau 41. Distribution des macroinvertébrés dans le site 63

D: Décembre 91; F: Février 92; A: Avril 92; J: Juin 92; O: Octobre 94;

Ma: Mars 95;

E: Embranchement; F: Famille

	D	F	A	J	O	Ma
E. ANNELIDA						
Ordre Tubificida						
F. Tubificidae	254	6	-	-	-	-
Ordre Hirudinea						
F. Glossiphoniidae						
<i>Hemiclepsis marginata</i>		-	3	11	2	
<i>Helobdella stagnalis</i>	95	1	1	12		
<i>Glossiphonia complanata</i>	160	-	-	3	-	
F. Erpobdellidae						
<i>Erpobdella octoculata</i>	32	3	3	11	-	-
F. Hirudidae						
<i>Hirudo sp.</i>	-	-	-	-	-	1
E. MOLLUSCA						
Ordre Basommatophora						
F. Physidae	82	4	60	14	30	21
E. ARTHROPODA						
Ordre Isopoda						
F. Asellidae						
<i>Asellus aquaticus</i>	1100	350	1712	1250	149	305
Ordre Diptera						
F. Chironomidae	42	6	234	1000	50	25
Nombre de substrats artificiels	3	3	4	4	4	4
Nombre total d'individus	1765	370	2013	2301	231	352
Nombre total de familles	6	6	5	5	4	4

Tableau 42. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans le site 105

F: Février 92; A: Avril 92; M: Mai 92; J: Juin 92; O: Octobre 94; Ma: Mars 95;
E: Embranchement; F: Famille

	F	A	M	J	O	Ma
E. PLATHELMINTHES						
Ordre Tricladida						
F. Dugesidae						
<i>Dugesia gonocephala</i>	-		3	2	-	
E. ANNELIDA						
Ordre Tubificida						
F. Tubificidae	2	3	10	-	3	-
Ordre Hurlidinea						
F. Piscicolidae						
<i>Piscicola geometra</i>	-			-	1	
F. Glossiphoniidae						
<i>Hemiclepsis marginata</i>	-	5	19	25	2	1
<i>Helobdella stagnalis</i>	-	8	5	53		
<i>Glossiphonia complanata</i>	1	5	1	28		1
F. Hirudidae						
<i>Hirudo sp</i>	-			-		1
F. Erpobdellidae						
<i>Erpobdella octoculata</i>		13	6	9	-	2
E. MOLLUSCA						
Ordre Mesogastropoda						
F. Bithyniidae						
<i>Bithynia tentaculata</i>	11	56	66	241	8	8
F. Bythinellidae		-	-	29	-	1
Ordre Hasommatophora						
F. Physidae	-			-	1	-
F. Lymnaeidae						
sp. 1		1	1	7	-	1
Ordre Eulamellibranchia						
F. Sphaendae						
<i>Sphaerium sp.</i>		1	-	6		1
E. ARTHROPODA						
Ordre Amphipoda						
F. Gammaridae						
<i>Gammarus pulex</i>	-	2	5	2	2	3
Ordre Isopoda						
F. Asellidae						
<i>Asellus aquaticus</i>	16	471	99	359	22	10
Ordre Ephemerida						
F. Caenidae	-					1
Ordre Trichoptera						
F. Philopotamidae	-	-			61	-
F. Polycentropodidae		2	-	109	-	9
Ordre Diptera						
F. Chironomidae	-	233	212	801	31	3
F. Ceratopogonidae	-			12		
Ordre Megaloptera						
F. Sialidae	1	1	1	1		-
Nombre de substrats artificiels	4	4	4	4	4	4
Nombre total d'individus	31	801	428	1684	131	42
Nombre total de famille	5	11	10	13	9	12

F: Février 92; A: Avril 92; M: Mai; J: Juin 92; O: Octobre 94; Ma: Mars 95;
E: Embranchement; F: Famille

	F	A	M	J	O	Ma
E. PLATHELMINTHES						
Ordre Tricladida						
F. Planariidae						
<i>Polycelis sp.</i>	-	9	2	28	16	
F. Dendrocoelidae						
<i>Dendrocoelum lacteum</i>		12	5	23	20	2
E. ANNELIDA						
Ordre Tuhificida						
F. Naididae	5	8	168		-	56
Ordre Huridinea						
F. Glossiphoniidae						
<i>Helobdella stagnalis</i>	3	-		2	-	2
<i>Glossiphonia complanata</i>	13	18	60	56	28	78
<i>Theromycon sp.</i>	-	-	-	1	1	
F. Erpobdellidae						
<i>Erpobdella octoculata</i>	48	100	383	617	76	287
E. MOLLUSCA						
Ordre Basommatophora						
F. Physidae		-			3	-
F. Lymnaeidae						
sp. 2	-		1	-		-
Ordre Eulamellibranchia						
F. Sphaeridae						
<i>Sphueriurn sp.</i>	-		1		-	2
E. ARTHROPODA						
Ordre Amphipoda						
F. Gammaridae						
<i>Gammarus pulex</i>	465	2430	910	962	7150	428
Ordre Isopoda						
F. Asellidae						
<i>Asellus aquaticus</i>	26	47	148	192	11	13
Ordre Ephemerida						
F. Ephemerellidae		-	-	27	1	
F. Baetidae	3	-		-		
Ordre Coleoptera						
F. Dysticidae						
<i>Yola bicarinata</i>	-				1	1
Indéterminé	-	2	1	1	-	
F. Gyrinidae	-			-		2
F. Elmidae	-				27	1
Ordre Trichoptera						
F. Rhyacophilidae		2	-	-	25	1
F. Hydropsychidae	178	31	95	2	6	36
F. Limnephilidae						
sp. 1	-	20	64	165	169	21
sp. 2	-	8	8	14	15	-
F. Sencostornatidae	-	18	24	133	2	20
Ordre Diptera						
F. Chironomidae	-	47	3	2	-	2
F. Simuliidae	251		-		-	
F. Tabanidae	-	-	-			1
F. Stratiomyidae	-		-			2
Ordre Megaloptera						
F. Sialidae	-		3		2	8
Nombre de substrats artificiels	4	4	4	4	4	4
Nombre total d'individus	992	2752	1876	2225	7553	963
Nombre total de familles	7	12	14	11	15	18

	F	A	M	J	O
E. PLATHELMINTHES					
Ordre Tricladida					
F. Planariidae					
<i>Polycelis</i> sp.	-	-		i2	7
E. ANNELIDA					
Ordre Tubificida					
F. Tubificidae	6	4		-	18
Ordre Hurlidinea					
F. Glossiphoniidae					
<i>Hemiclepsis marginata</i>	1	2	7	11	2
<i>Helobdella stagnalis</i>	1	-	-	8	1
<i>Glossiphonia complanata</i>	4	8	3	38	2
<i>Theromyzon</i> sp.	-	-		2	-
F. Erpobdellidae					
<i>Erpobdella octoculata</i>		4	38	64	28
E. MOLLUSCA					
Ordre Mesogastropoda					
F. Viviparidae					
<i>Viviparus viviparus</i>	1		5	76	48
F. Bithyniidae					
<i>Bithyniu tentaculata</i>	5	32	85	292	27
F. Hydrobiidae	-		-	-	1
F. Bythinellidae	-	20	232	228	-
Ordre Basomrnatophora					
F. Planorbidae	-	-	-	-	2
F. Physidae	-	-		-	15
F. Lymnaeidae					
sp. 1	-	3	-	180	-
sp. 2	-	-	-	-	3
Ordre Eulamellibranchia					
F. Dreissenidae					
<i>Dreissena polymorpha</i>		-	-		4
F. Sphaendae					
<i>Sphaerium</i> sp.		1		35	
<i>Pisidium</i> sp.		-	-		6
E. ARTHROPODA					
Ordre Amphipoda					
F. Gammaridae					
<i>Gammarus pulex</i>		1			17
Ordre Isopoda					
F. Asellidae					
<i>Asellus aquaticus</i>	264	442	486	785	232
Ordre Odonata					
F. Platycnemididae	-	3	11	31	22
Ordre Coleoptera					
F. Dysticidae					
<i>Platembus maculatus</i>					27
Indéterminé	1	1	1	1	
Ordre Trichoptera					
F. Philopotamidae			-		137
F. Polycentropodidae		12		184	
F. Phryganidae					1
Ordre Diptera					
F. Chironomidae	27	193	399	1422	49
F. Ceratopogonidae			-	12	-
ordre Megaloptera					
F. Sialidae					1
Nombre de substrats artificiels	4	4	4	4	4
Nombre total d'individus	310	726	1267	3381	650
Nombre total de familles	7	14	10	16	20

Tableau 45. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans différents sites 77, 78, 79, 80, 102 et 103

S: Septembre94; E: Embranchement ; F: Famille

	77	78	79	80	102	103
E. ANNELIDA						
Ordre Tubificida						
F. Tubificidae	3	-	-	411	-	1
Ordre Hirudinea						
F. Glossiphoniidae						
<i>Hemiclepsis marginata</i>		1	4	-	33	
<i>Helobdella stagnalis</i>	104	212	82	48	-	1
<i>Glossiphonia complanata</i>	19	12	5	1		
F. Erpobdellidae						
<i>Erpobdella octoculata</i>	86	56	59	6	3	1
F. Hirudidae						
<i>Hirudo sp.</i>		-		-	-	1
E. MOLLUSCA						
Ordre Mesogastropoda						
F. Viviparidae						
<i>Viviparus viviparus</i>	-	-	-	-	-	158
F. Valvatidae	-	-	1	-	3	
F. Bithyniidae						
<i>Bithyniu tentaculata</i>	7	-		-	23	53
F. Bythinellidae	1	-		-	26	
F. Hydrobiidae		-	-	-	1	
Ordre Rasommatophora						
F. Acroloxidae		-	-	-	-	1
F. Planorbidae		-	1	-	3	
F. Physidae	205	94	3	-	-	-
F. Lymnaeidae Sp. 1	-	-		-	16	2
Ordre Eulamellibranchia						
F. Dreissenidae						
<i>Dreissena polymorpha</i>	2718	178	904	-	-	7
F. Sphaendae						
<i>Sphaerium sp.</i>	-	-		-	3	10
E. ARTHROPODA						
Ordre Amphidoda						
F. Gammaridae						
<i>Gammarus pulex</i>	-	-		-		13
Ordre Isopoda						
F. Asellidae						
<i>Asellus aquaticus</i>	2701	1492	1124	-	27	55
Ordre Diptera						
F. Chironomidae	10	-	342	31	60	145
Ordre Ephemera						
F. Ephemerellidae	-	-		-	1	
Ordre Odonata						
F. Platycnemididae		-	-	-	-	2
Ordre Coleoptera						
F. Dysticidae						
<i>Yola bicarinata</i>		-	-	-	1	
Ordre Trichoptera						
F. Polycentropodidae		-	-	-	36	43
F. Limnephilidae Spp. 1		-	-	-	-	1
Ordre Megaloptera						
F. Sialidae	-	-	-	-		2
Nombre de substrats artificiels	3	3	4	2	1	2
Nombre total d'individus	5854	2045	2525	497	216	496
Nombre total de familles	9	5	8	3	14	17

Les *Asellidae* et les *Gammaridae* sont les taxons les plus abondants, représentant respectivement 28,7% (16138 individus) et 23,8% (13382 individus) de l'ensemble des individus collectés. Les *Chironomidae* sont également abondants (15,5%). Les insectes et les mollusques sont les groupes les plus diversifiés avec respectivement 22 et 11 familles. Les *Asellidae* dominent généralement les échantillons quelle que soit la période de piégeage, sauf dans le site 62 où cette famille est faiblement représentée, et dans le site 101 où les *Gammaridae* sont dominants. Les *Gammaridae* n'ont été collectés en grand nombre que sur les sites 101 et 46 et notamment en octobre 94 dans le site 101 qui présentait un pullulement de jeunes individus (plus de 7000) dont la taille était inférieure à 4 mm.

2.2. Structure des communautés

L'étude de la structure des communautés de macroinvertébrés benthiques des différents sites a été envisagée en élaborant des chaînes alimentaires et en calculant les abondances relatives en fonction des modes de nutrition, sur la base d'une hypothèse d'attractivité équivalente du substrat vis-à-vis des différents taxons.

2.2.1. Construction des réseaux trophiques de macroinvertébrés

Les chaînes alimentaires ont été élaborées à partir des relevés de piégeage que nous considérons potentiellement représentatifs des communautés réelles et à partir de données trouvées dans la littérature concernant les liens consommateur-proie. Pour chaque site, nous avons relevé la totalité des taxons en compilant toutes les périodes de piégeage. La numérotation des taxons est donnée dans le tableau 46. Le chiffre 0 regroupe les végétaux, la matière organique, les détritiques, les microorganismes. Ces réseaux construits pour chaque site (figure 24 à 36) sont donc potentiels. Ils permettent de visualiser la complexité ou la simplicité des relations trophiques.

Les longueurs des réseaux de macroinvertébrés (nombre de maillons) sont comprises entre 2 et 5. D'une manière générale, le premier niveau des réseaux est constitué des consommateurs I (herbivores) et des détritivores, le deuxième est composé de consommateurs II, le troisième, de consommateurs II et III, le quatrième, de consommateurs II, III et IV. Les chaînes les plus longues (5) correspondent au fleuve Aa (site 101) et à l'Aa canalisé (104). Les chaînes du canal de la Sensée (46), de la Deûle (76), du canal d'Aire-à-La Bassée (105), et du site 103 de l'Aa canalisé ont une longueur de 4. Les longueurs des chaînes des sites 77, 78 et 79 du canal de la Deûle et du site 103 de l'Aa canalisé sont de 3. Les chaînes les plus courtes (2) représentatives d'un milieu très perturbé sont notées **pour** les sites 62 et 63 du canal d'Aire à La Bassée et le site 80 du canal de la Deûle. Au niveau du canal à grand gabarit, les chaînes alimentaires de macroinvertébrés benthiques possèdent 4 maillons dans les sites les moins perturbés (sites 46 et 76 par exemple, figures 24 et 25). Leur base

Tableau 46. Numérotation des taxons dans les réseaux trophiques (figures 24 à 36)

N°	Taxons	N°	Taxons
1	<i>Polycelis sp.</i>	30	<i>Aryaephyra desmarestii</i>
2	<i>Dugesia lugubris</i>	31	<i>Cambarus affinis</i>
3	<i>Dugesia gonocephala</i>	32	F. Baetidae
4	<i>Dendrocoelum lacteum</i>	33	F. Ephemerellidae
5	F. Gordiidae	34	F. Caenidae
6	F. Tubificidae	35	F. Caenagrionidae
7	F. Naididae	36	F. Platycnemididae
8	<i>Piscicola geometra</i>	37	F. Dysticidae (indéterminé)
9	<i>Hemiclepsis marginata</i>	38	<i>Platembus maculatus</i>
10	<i>Helobdella stagnalis</i>	39	<i>Yola bicarinata</i>
11	<i>Glossiphonia complanata</i>	40	F. Gyrinidae
12	<i>Theromyzon sp.</i>	41	F. Elmidae
13	<i>Erpobdella octoculata</i>	42	F. Philopotamidae
14	<i>Hirudo sp.</i>	43	F. Polycentropodidae
15	<i>Viviparus viviparus</i>	44	F. Rhyacophilidae
16	F. Valvatidae	45	F. Hydropsychidae
17	<i>Birhyniu tentaculata</i>		F. Limnephilidae
18	F. Bythinellidae	46	spp. 1
19	F. Hydrobiidae	47	spp.2
20	F. Acroloxidae	48	F. Sericostomatidae
21	F. Planorbidae	49	F. Phryganidae
22	F. Physidae	50	F. Chironomidae
23-24	F. Lymnaeidae	51	F. Tipuiidae
25	<i>Dreissena polymorpha</i>	52	F. Simuliidae
26	<i>Sphaerium sp.</i>	53	F. Tabanidae
27	<i>Pisidium sp.</i>	54	F. Stratiomyidae
28	<i>Gammarus pulex</i>	55	F. Ceratopogonidae
29	<i>Asellus aquaticus</i>	56	F. Sialidae

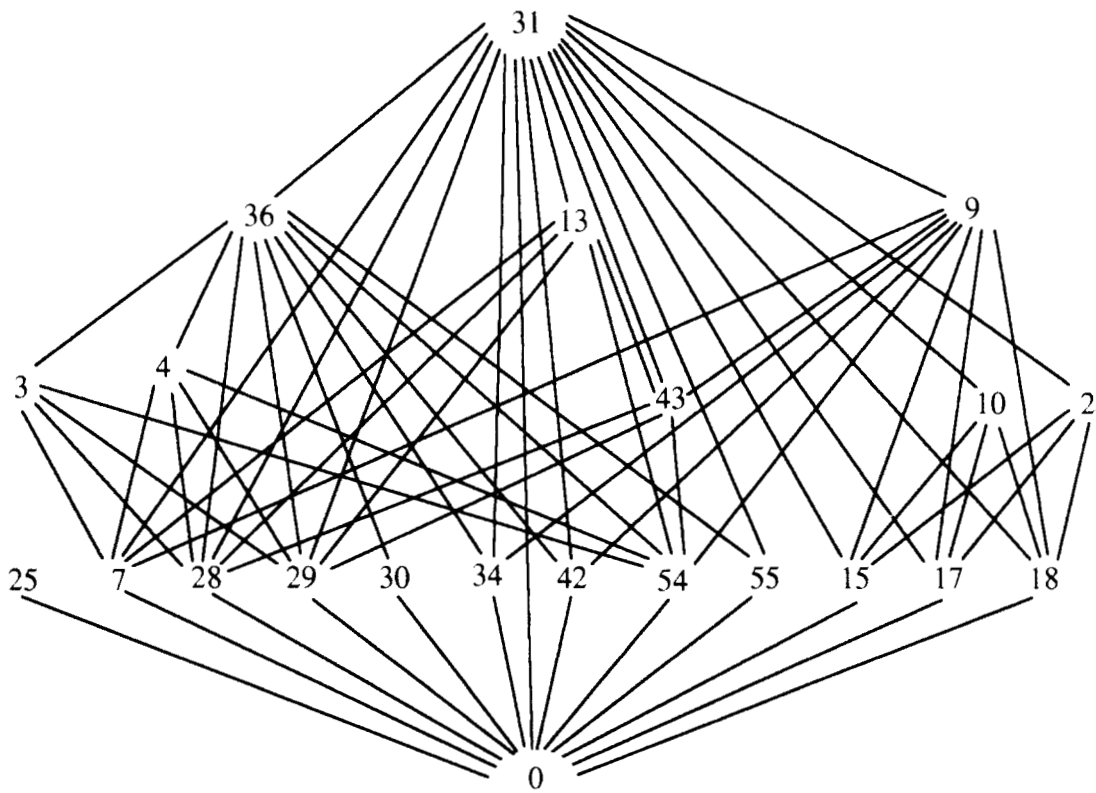


Figure 24. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 46000

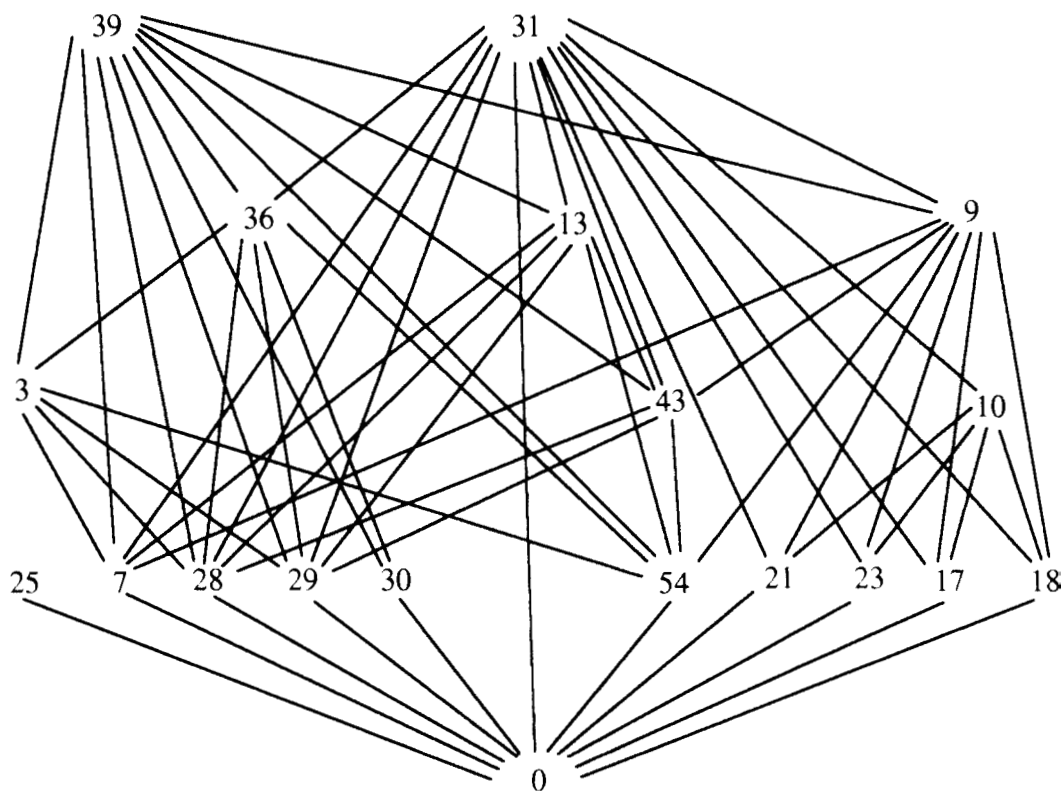


Figure 25. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 76000

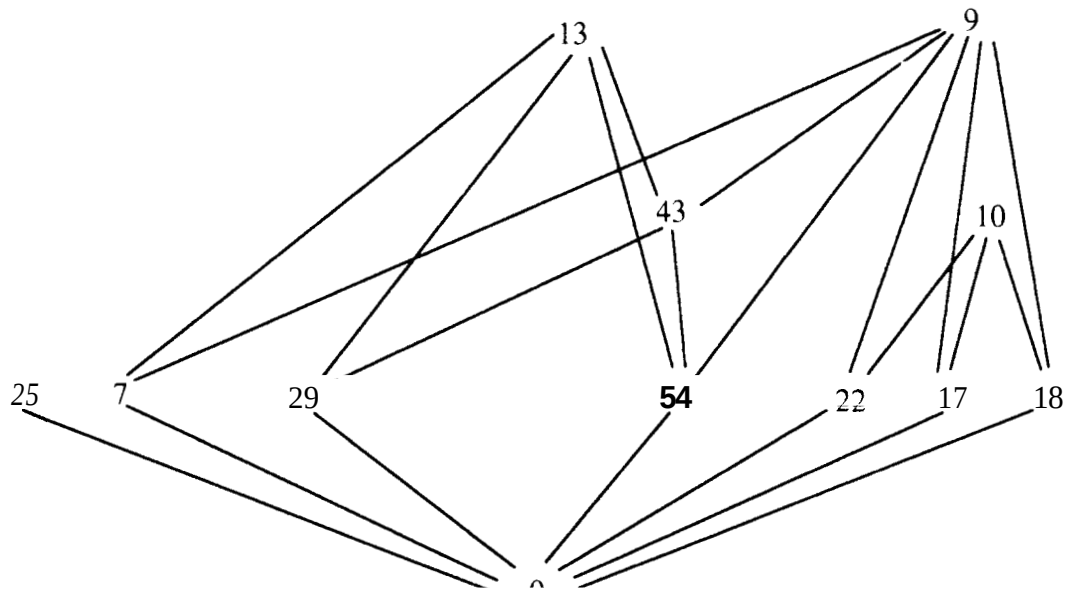


Figure 26. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 77000

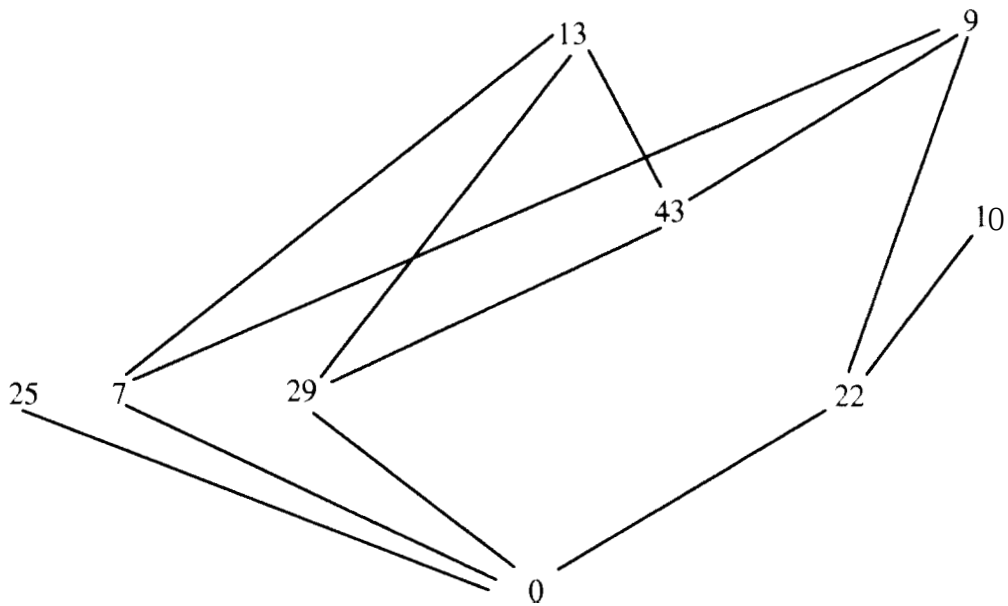


Figure 27. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 78000

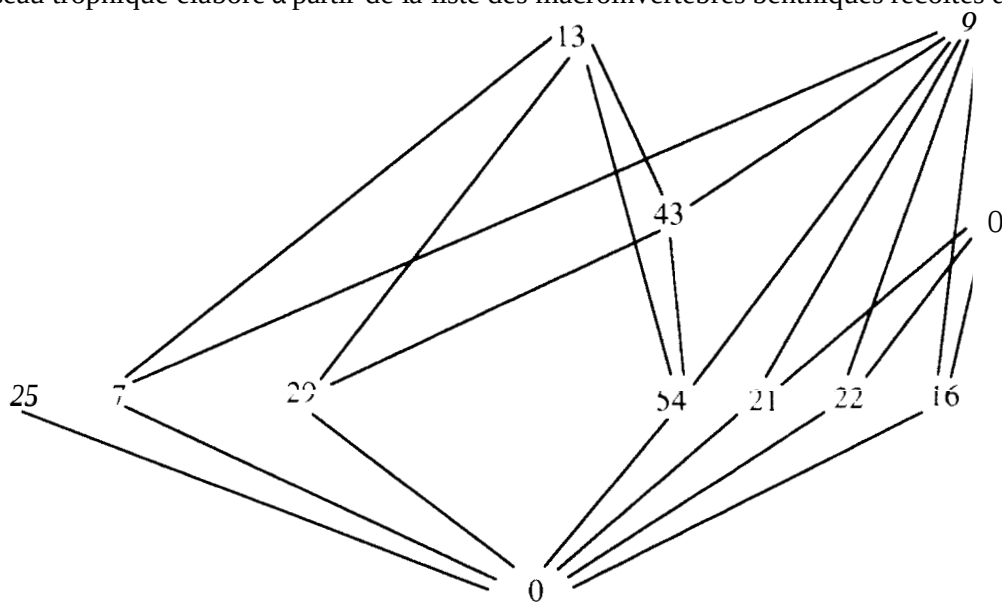


Figure 28. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 79000

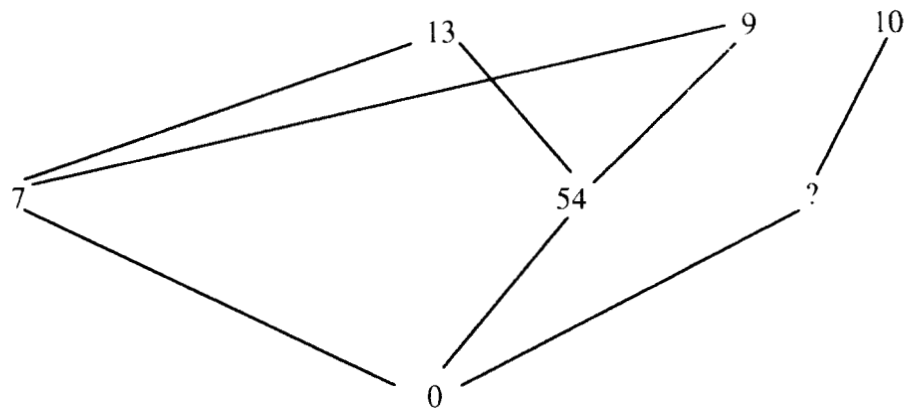


Figure 29. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 80000

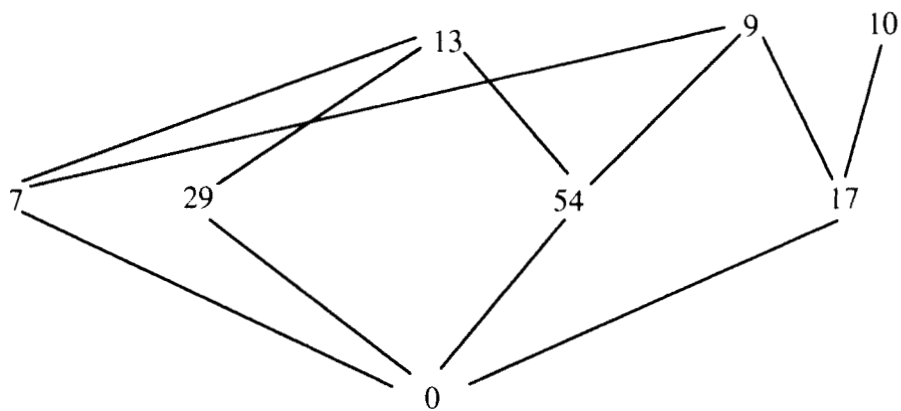


Figure 30. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 62000

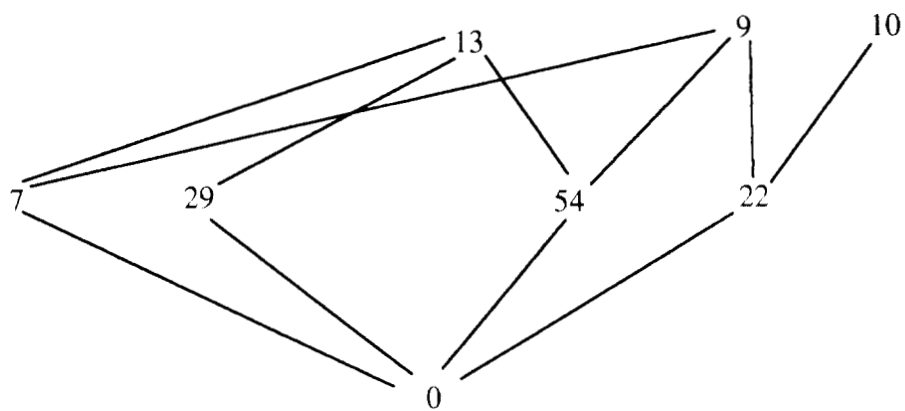


Figure 31. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 63000

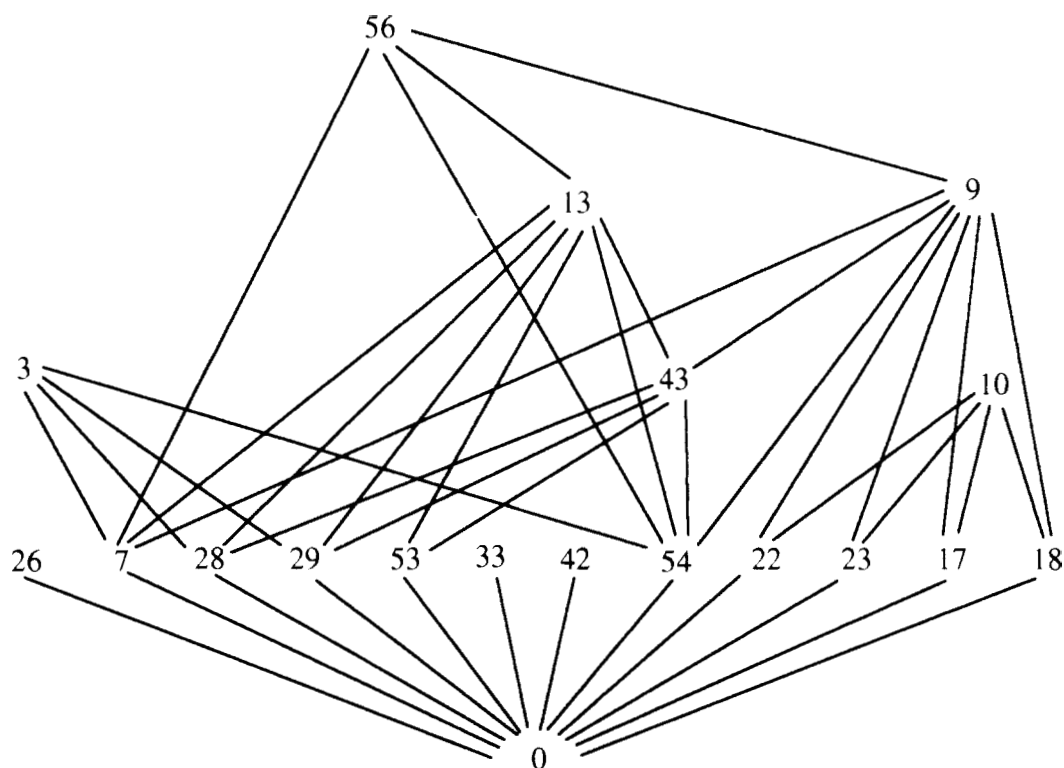


Figure 32. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 105000

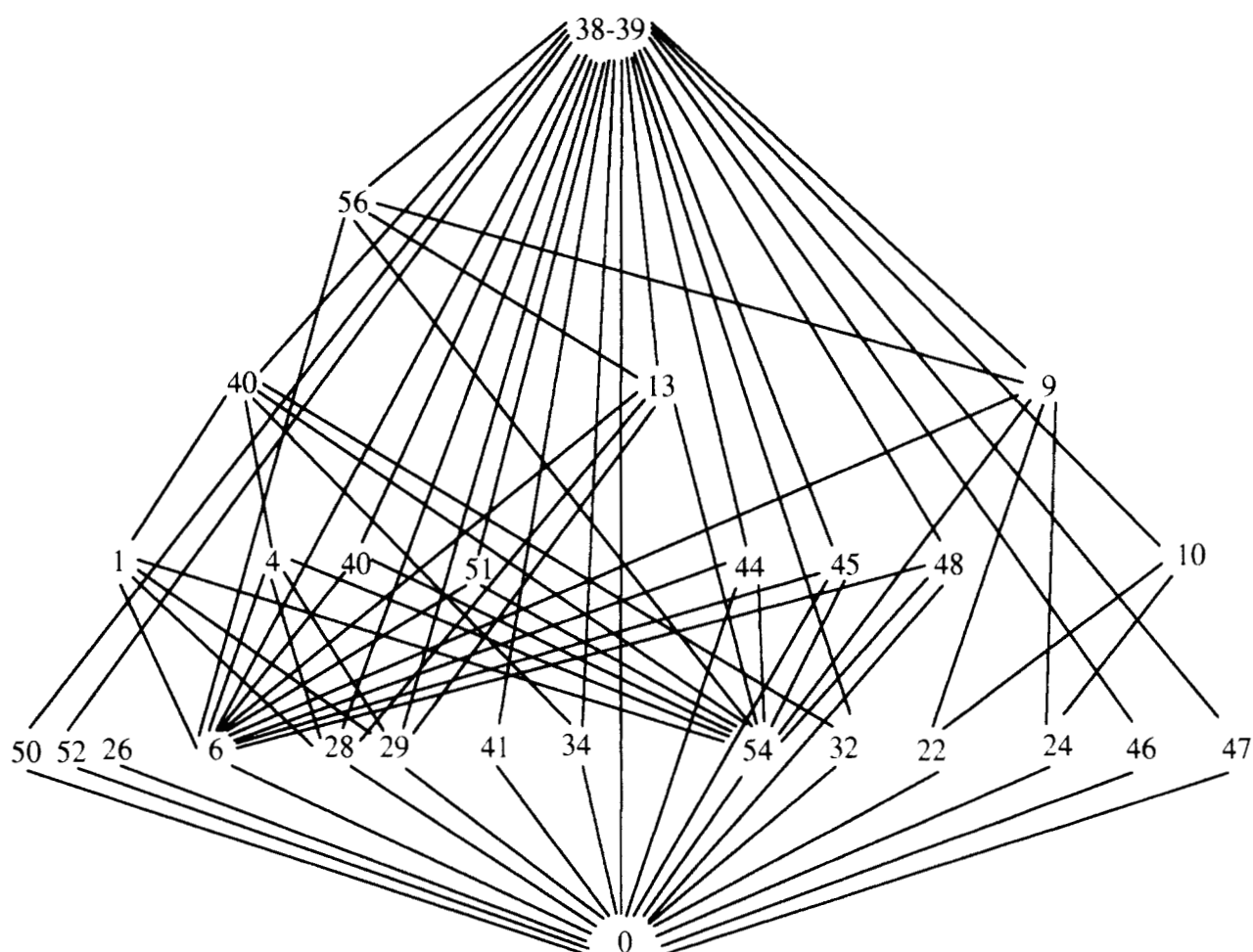


Figure 33. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 101000

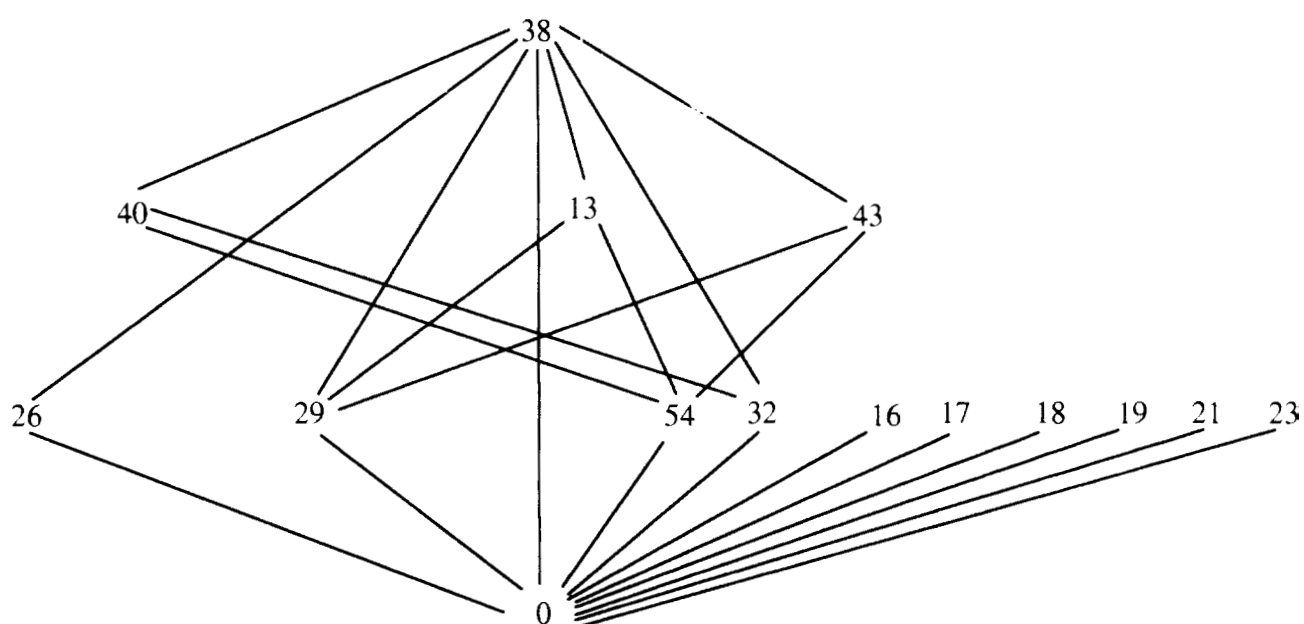


Figure 34. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 102000

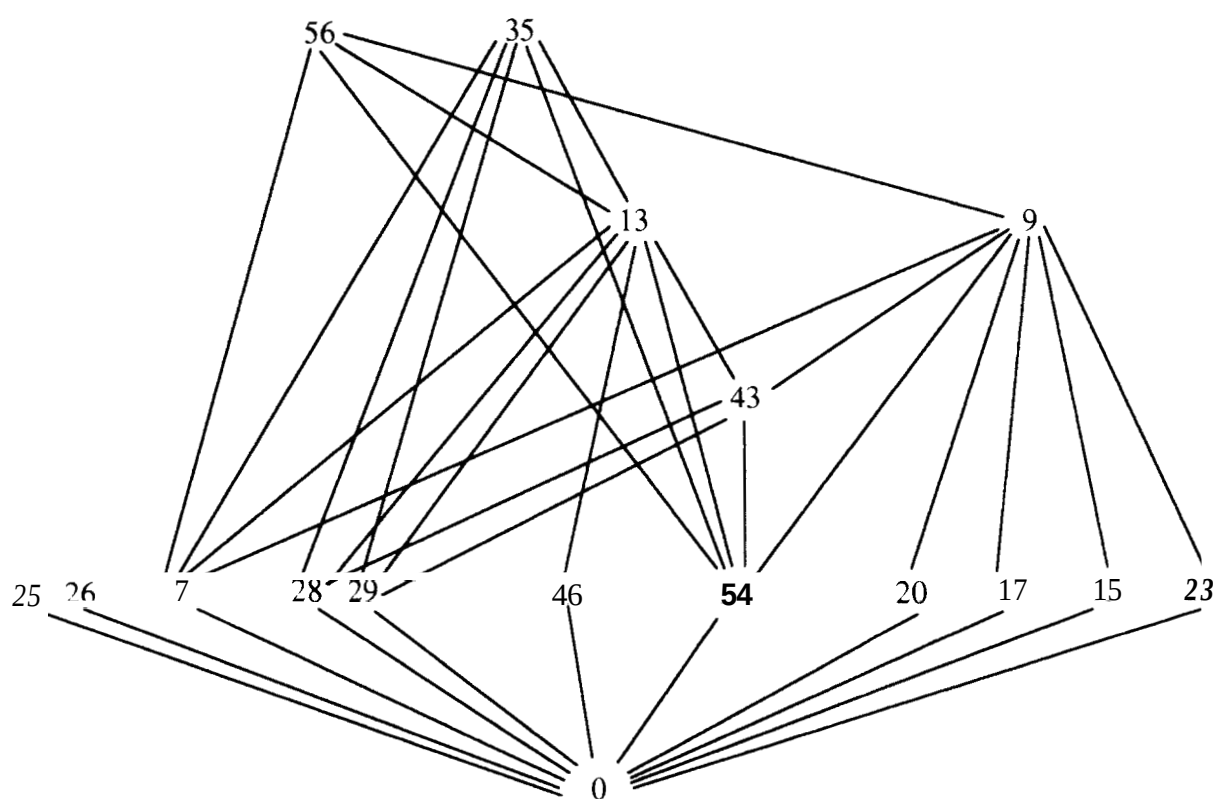


Figure 35. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 1030

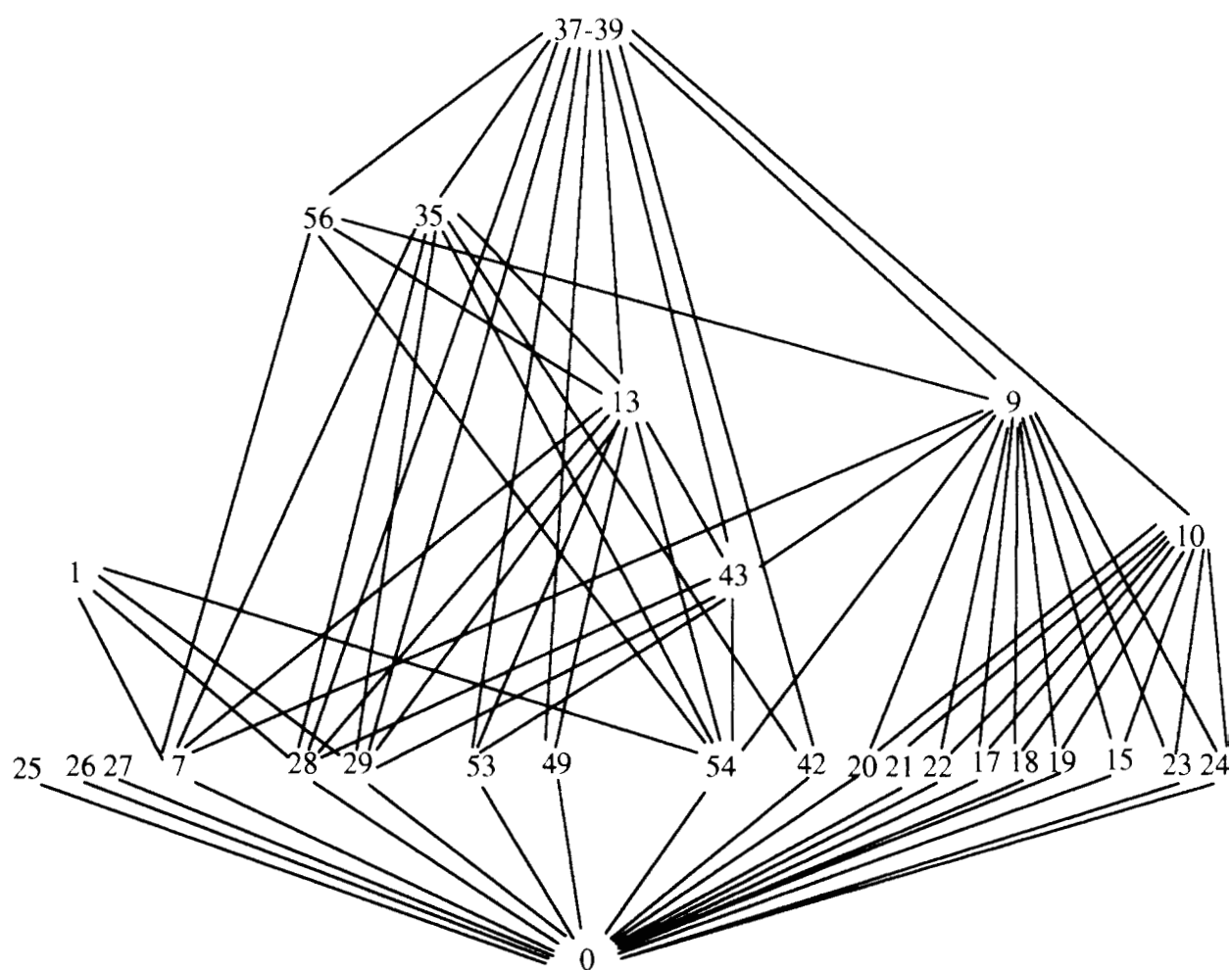


Figure 36. Réseau trophique élaboré à partir de la liste **des** macroinvertébrés benthiques récoltés **dans** le site 104000

réduite est due à la faible diversité des herbivores et des détritivores. Ces chaînes s'effondrent au niveau du canal de la Deûle et du canal d'Aire à La Bassée qui sont réputés pour leur mauvaise qualité. Les prélèvements réalisés dans le site 101 permettent de montrer à travers la construction du réseau de macroinvertébrés correspondant, la complexité des relations trophiques dans ce site. Cette complexité diminue lorsque le cours devient canalisé au niveau des sites 102, 103 et 104 à cause notamment de la disparition de prédateurs rhéophiles (trichoptères par exemple).

2.2.2. Répartition en fonction des modes de nutrition

Les abondances relatives des macroinvertébrés ont été calculées en fonction des six modes de nutrition (décrits dans Tachet *et al.*, 1984)

- les broyeurs qui constituent le groupe le moins spécialisé sur le plan anatomique. Dans ce groupe nous avons considéré les broyeurs herbivores, détritivores et omnivores.
- les brouteurs qui décapent la couche biologique vivante (microflore, microphytes et macroinvertébrés) qui recouvre les macrophytes, arrachant en même temps une partie du support végétal.
- les racleurs de substrat qui raclent la couche biologique vivante qui recouvre les macrophytes et les pierres.
- les limivores qui vivent dans le substrat meuble; ils avalent les sédiments fins qui renferment une quantité plus ou moins importante de débris organiques, de microflore et de microfaune.
- les filtreurs qui capturent les fins débris organiques. la microflore et la microfaune entraînés par le courant;
- les piqueurs-suceurs qui possèdent un appareil buccal modifié pour transpercer les tissus animaux ou végétaux et absorber de la nourriture liquide.

La composition des groupes en fonction des modes de nutrition présente une variation spatiale et temporelle (figures 37 à 44). Les broyeurs sont généralement dominants dans les prélèvements quelle que soit la période de prélèvement. Les limivores sont dominants dans le site 62 quelle que soit la période, et dans les sites 76 en avril, 105 en mai et juin et 80 en septembre. Les filtreurs sont dominants en octobre dans le site 105, les brouteurs et les prédateurs en septembre dans les sites 103 et 102 respectivement. Les abondances relatives de chaque groupe fonctionnel sont en général mieux réparties dans les sites 102, 103 et 104 de l'Aa canalisé, que dans les autres sites, notamment dans les sites 62, 63, 80 où il existe un fort déséquilibre entre les différents groupes.

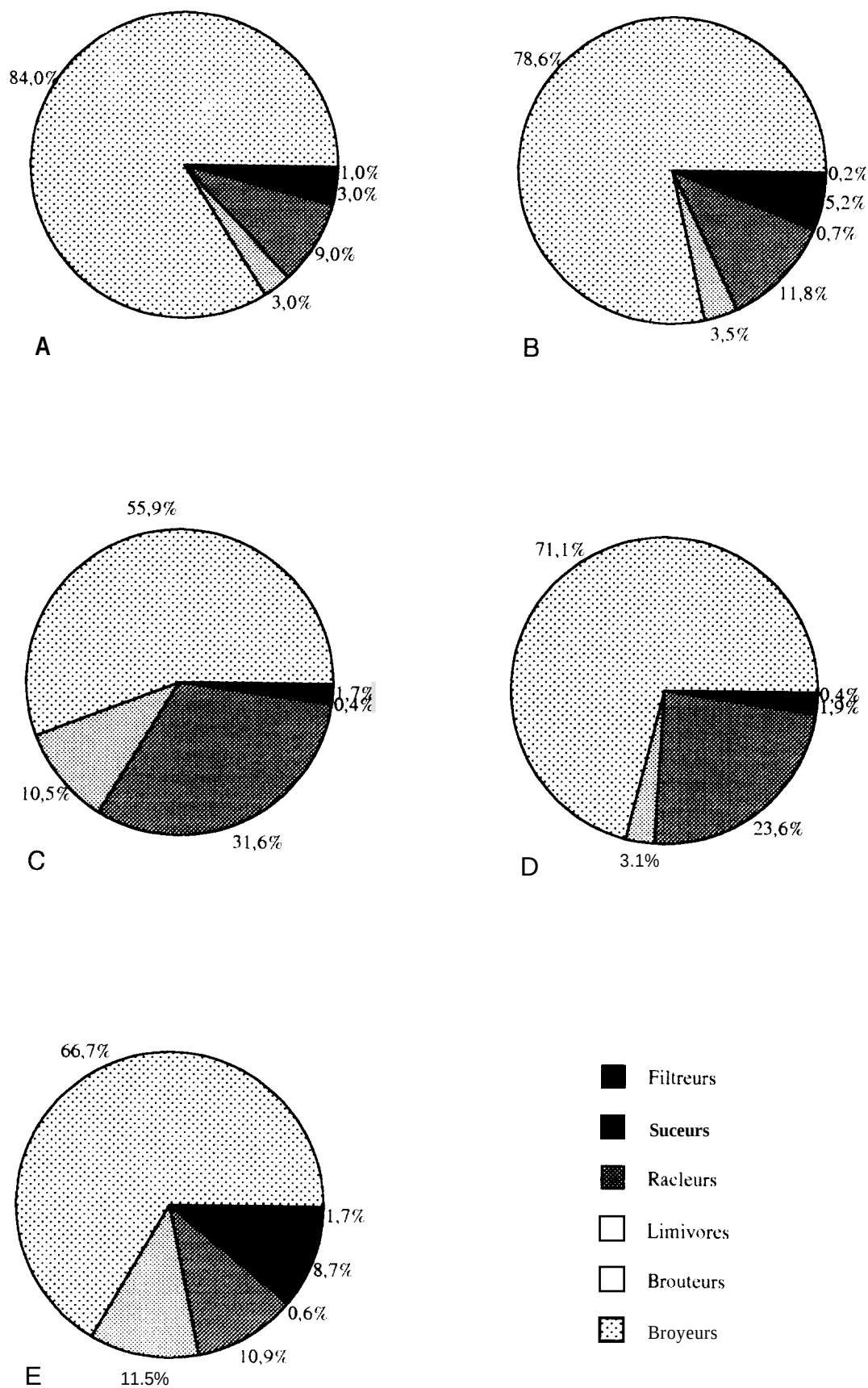


Figure 37 . Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 46000 (Férin). A: février 1992; B: avril 1992; C: Juin 1992; D: octobre 1992; E: mars 1995.

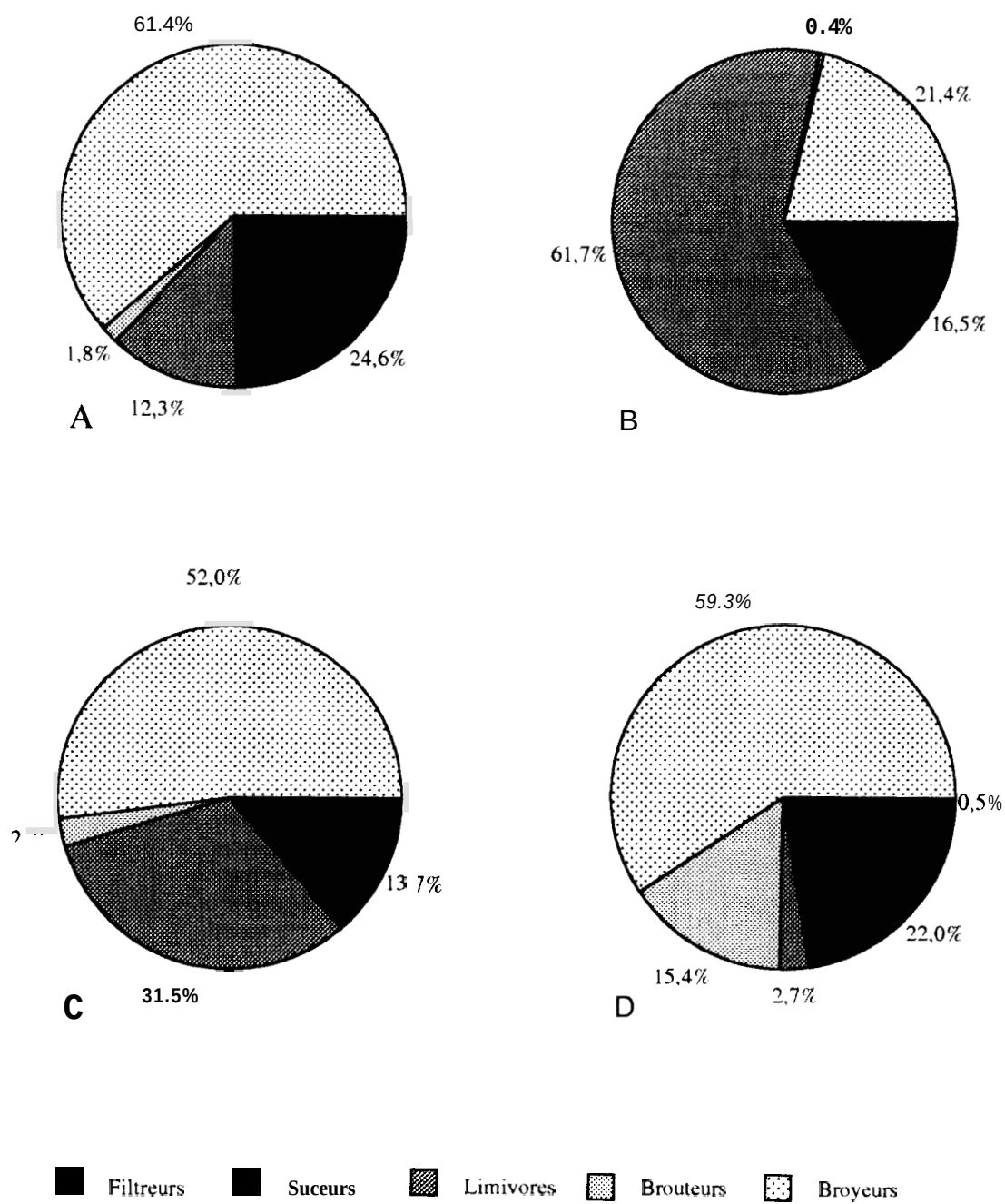


Figure 38 . Abondance relative des macroinvertébrés repartis selon leur mode de nutrition dans le site 76000 (Flers-en-Escrebieux). **A:** février 1992; **B:** avril 1992; **C:** Juin 1992; **D:** mars 1995.

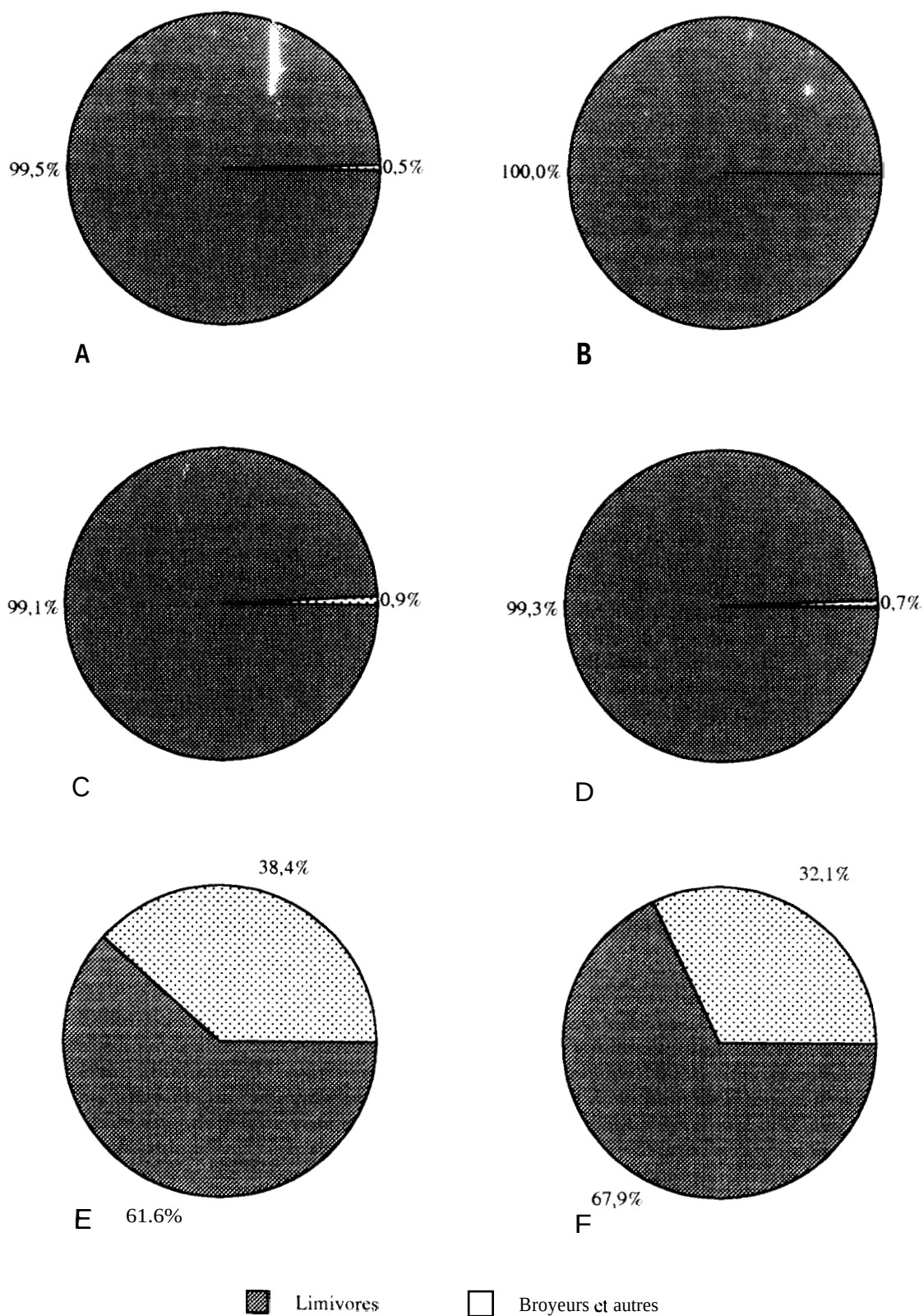


Figure 39 . Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 62000 (La Bassée). **A**: décembre; **B**: février 1992; **C**: avril 1992; **D**: Juin 1992; **E**: octobre 1992; **F**: mars 1995.

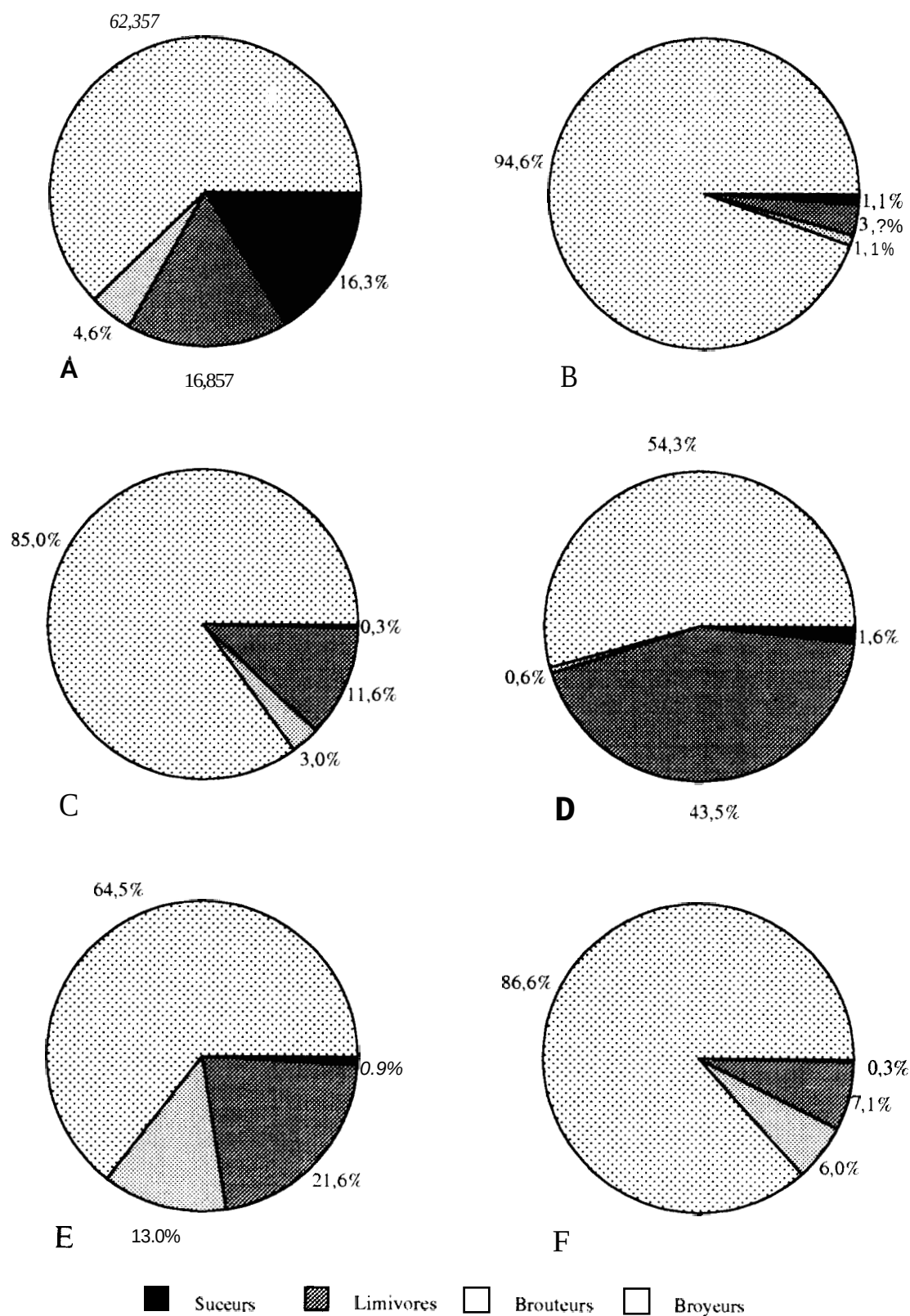


Figure 40 . Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 63000 (Béthune). **A**: décembre; **B**: février 1992; **C**: avril 1992; **D**: Juin 1992; **E**: octobre 1992; **F**: mars 1995.

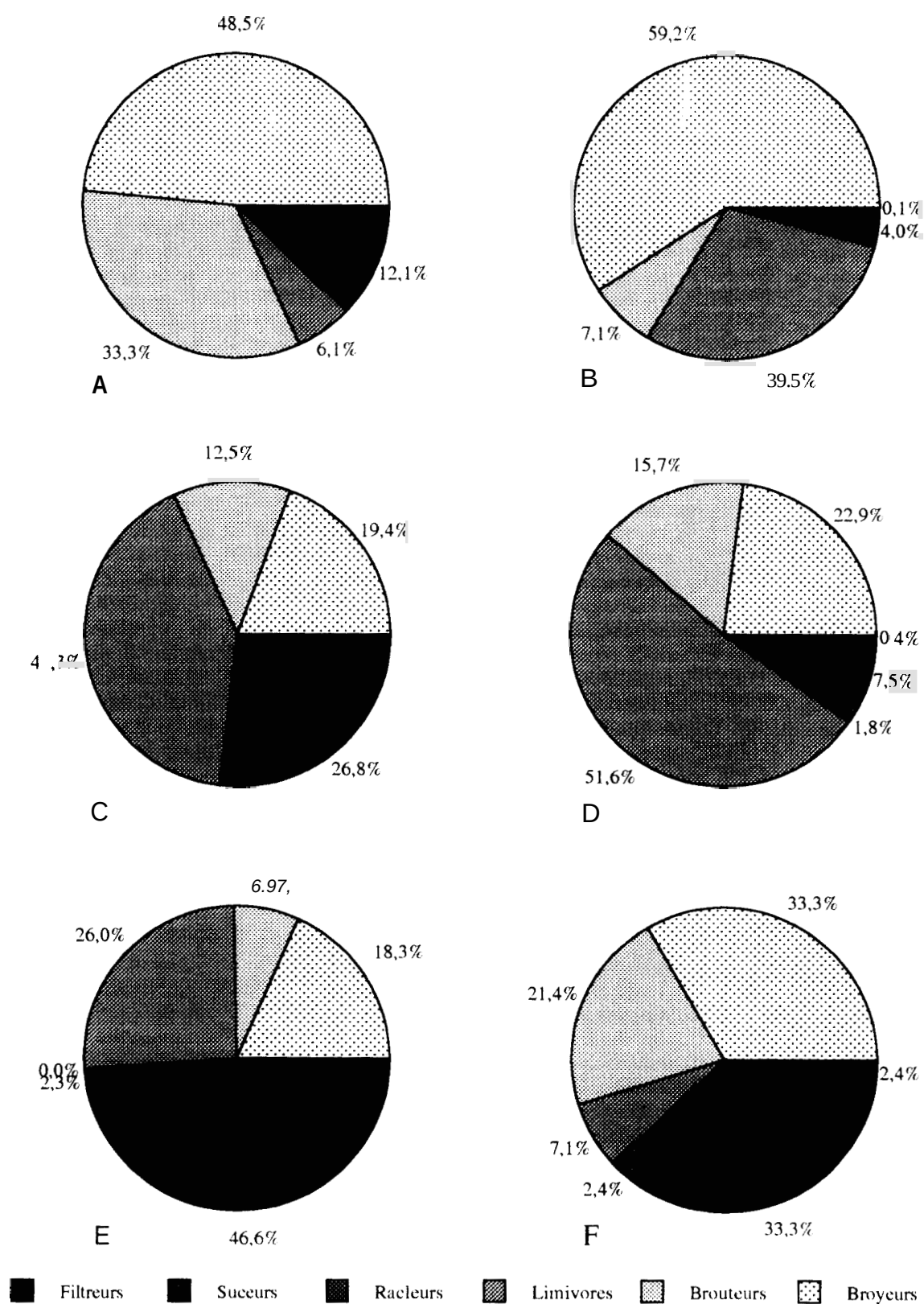


Figure 41 . Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 105000 (Arques). A: février 1992; B: avril 1992; C: mai 1992; D: Juin 1992; E: octobre 1994; F: mars 1995.

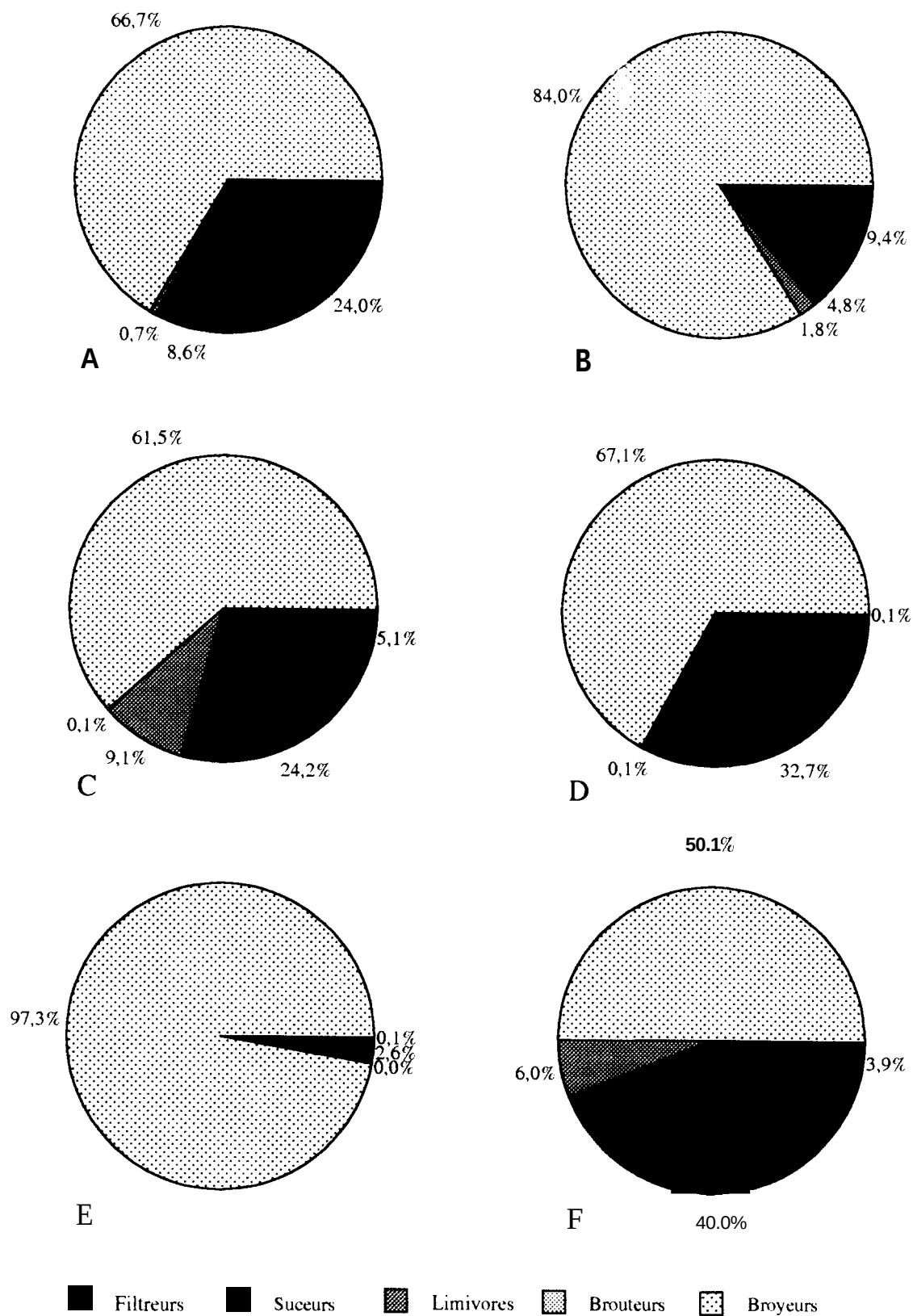


Figure 42 . Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 101000 (Ouve-Wirquin). **A**: février 1992; **B**: avril 1992; **C**: mai 1992; **D**: Jilin 1992; **E**: octobre 1994; **F**: mars 1995.

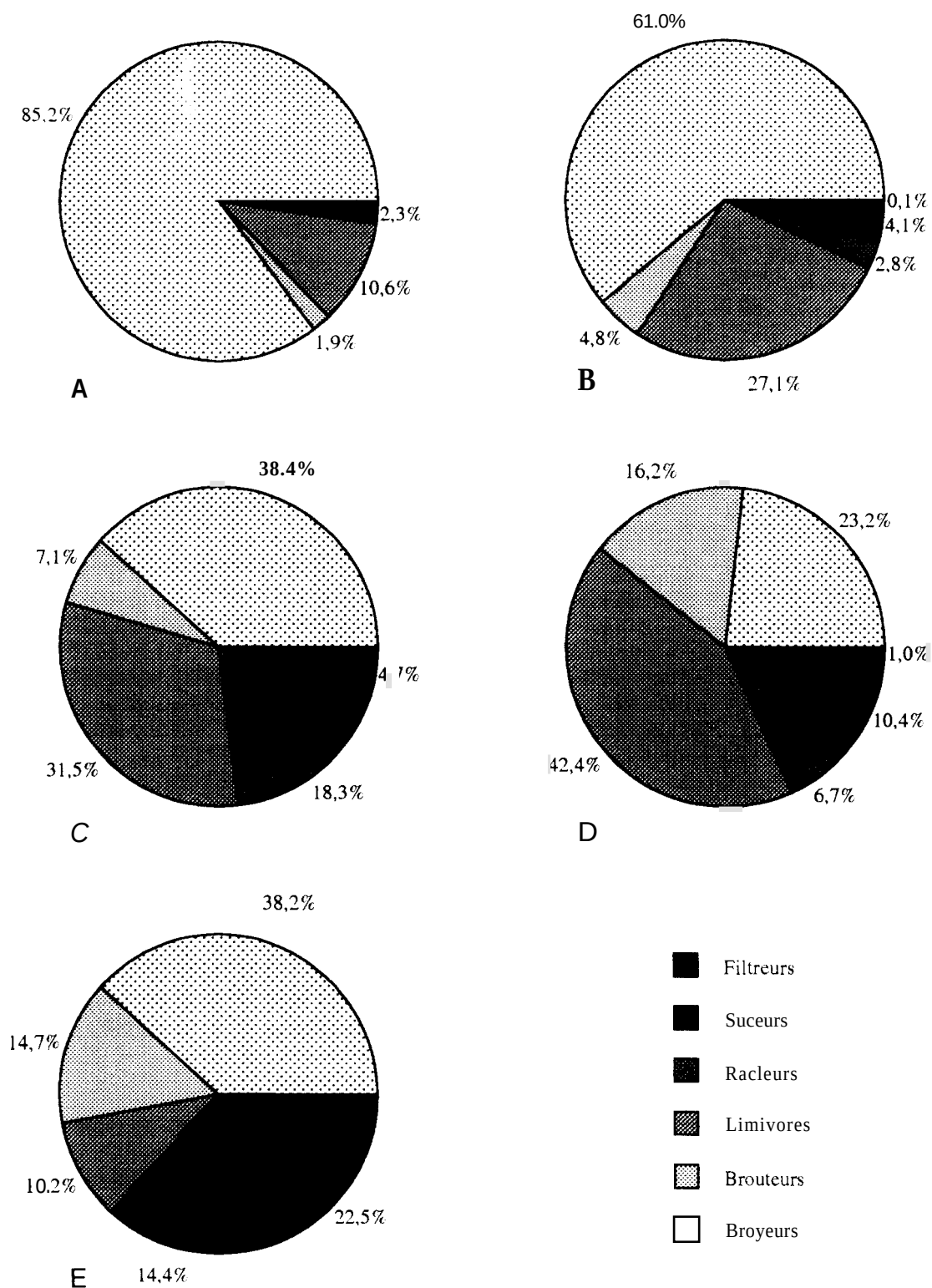


Figure 43 . Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 104000 (Le Guindal). A: février 1992; B: avril 1992; C: mai 1992; D: Juin 1992; E: octobre 1994.

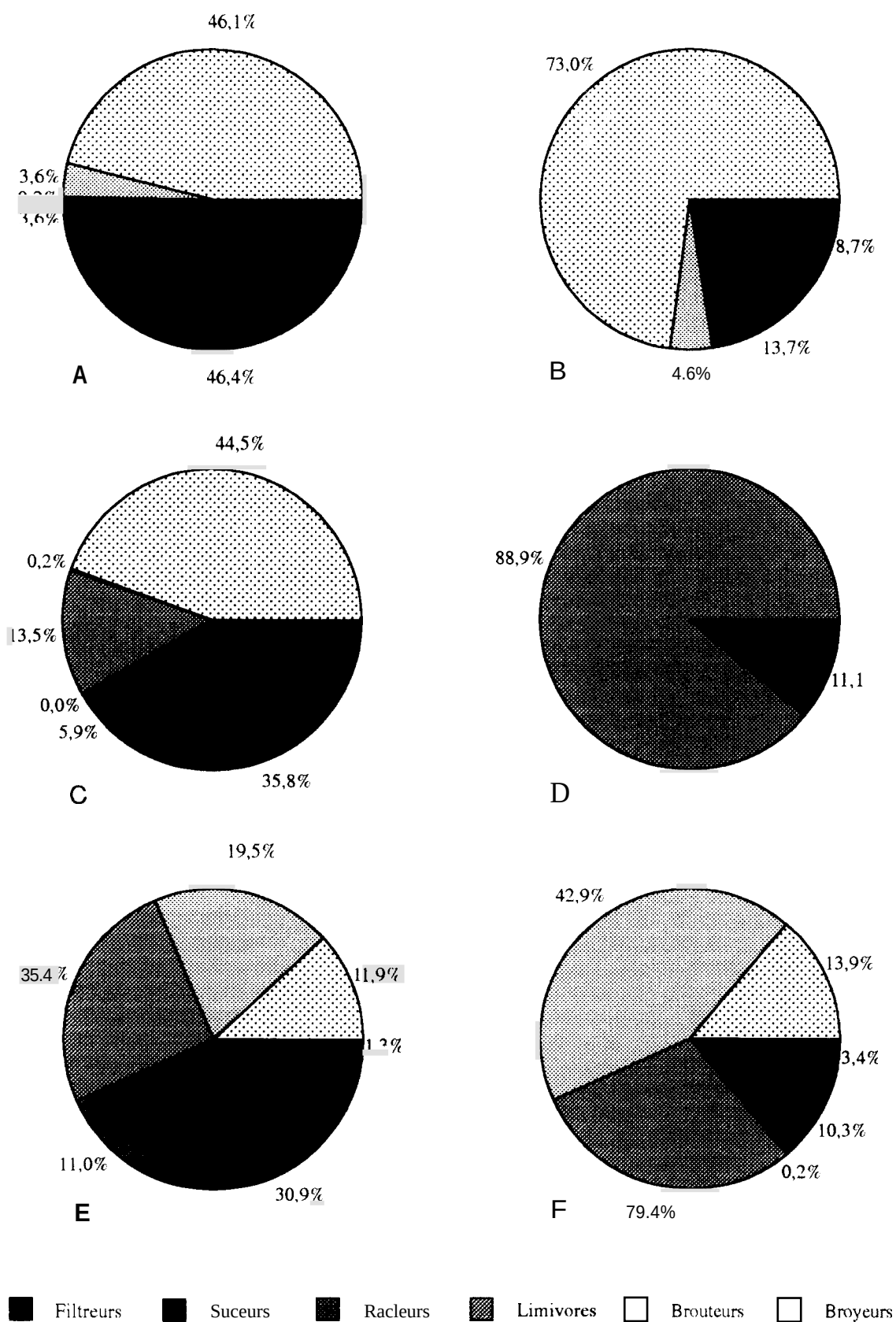


Figure 44 . Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans les sites échantillonnés en septembre 1995. A: 77000; B:78000; C: 79000; D: 80000; E: 102000; F: 103000.

2.3. Les Diagrammes Rangs-Fréquences

Les DRF ont été appliquées à des taxons supra-spécifiques car dans la majeure partie des cas, une famille n'était représentée que par une seule espèce. Dans le cas de famille pluri-spécifique nous avons considéré les différentes espèces sans les déterminer. Deux séries de DRF sont présentées. Le premier concerne les macroinvertébrés collectés en juin 1992 dans les sept principaux sites. Le second concerne les échantillons collectés en septembre et octobre 1994 dans 12 sites (aucun piège n'a été trouvé dans les sites 76 et 639).

Les DRF de juin sont présentés sur la figure 45. Nous pouvons distinguer un groupe de 5 sites (46, 76, 105, 101 et 104) dont la forme générale de la courbe est convexe, et un groupe de 2 sites (62 et 63) avec une allure générale concave, due à la dominance des *Tubificidae* et des *Chironomidae* d'une part et des *Asellidae* et des *Chironomidae* d'autre part. Ces deux derniers sites sont également caractérisés par une faible diversité.

Les DRF de septembre-octobre 1994 (figure 46) montrent trois groupes de sites selon la forme générale des courbes. Le premier groupe est composé de trois sites (102, 103, 104) correspondant à l'Aa canalisé qui est un canal à moyen gabarit. L'allure des DRF de ce groupe est convexe indiquant une distribution régulière des espèces. L'allure des DRF du deuxième groupe composé de 5 sites du canal à grand gabarit (46, 77, 78, 79 et 105) est moins convexe que celle du premier groupe et montre qu'une ou deux espèces sont fortement dominantes. Le troisième groupe est composé de trois sites du canal à grand gabarit (62, 63 et 80), et montre une faible diversité et une forte dominance d'une ou deux espèces. Le DRF particulier du site 101 (fleuve Aa) montre une courbe d'allure sinusoïdale indiquant que seule une espèce est extrêmement dominante (*Gammarus pulex*: 94,75%, figure 48).

En regardant plus précisément la composition spécifique et le rang des espèces, nous pouvons remarquer que les communautés des différents sites étudiés ne sont pas dominées par les mêmes espèces (tableau 47). Les *Asellidae* et les *Chironomidae* sont souvent dans les trois premiers rangs. Concernant les sites localisés sur le canal de la Deûle (sauf le site 80), il faut remarquer la présence de la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) dans les trois premiers rangs. Les figures 47 et 48 caractérisent la composition taxonomique et la composition en fonction des modes de nutrition des communautés des groupes de sites déterminés par les DRF de septembre/octobre 1994. En plus d'une distribution régulière des taxons, nous constatons que l'Aa canalisé (sites 102, 103 et 104) montre une distribution quasi-égale des modes de nutrition avec une légère prédominance des brouteurs. Concernant le canal à grand gabarit, le groupe 2 (sites 46, 76, 77, 78, 79, 105) est caractérisé par une dominance des broyeurs dont les représentants sont essentiellement des *Asellidae*, mais nous notons aussi la présence des *Athyridae* et des *Gammaridae* (figure 48). Les communautés des sites du groupe 3 (sites 62, 63, 80) sont dominées par les limivores représentés essentiellement par les *Tubificidae* et les *Chironomidae* (figure 48).

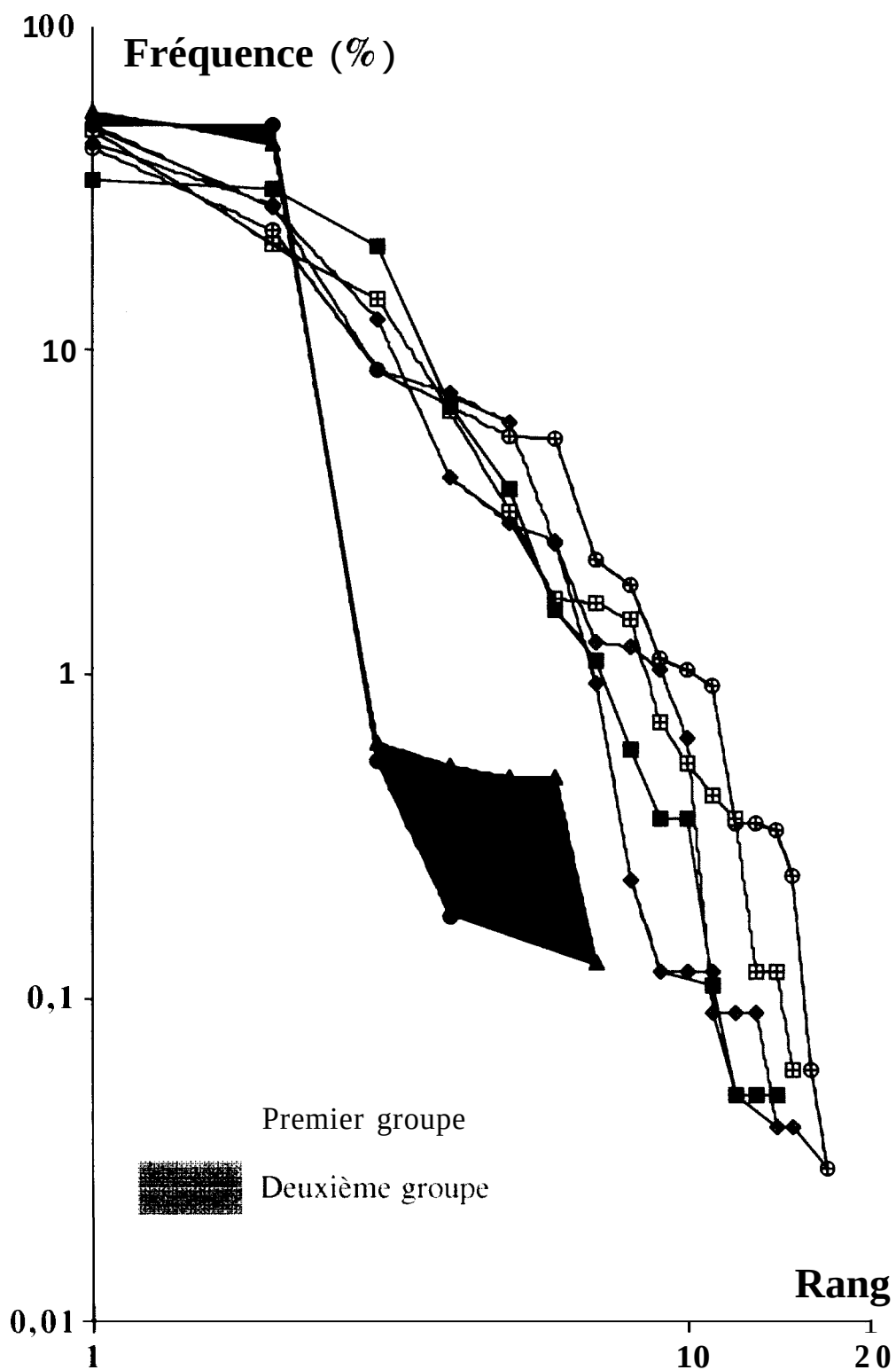


Figure 45. Diagrammes rangfréquence des sites étudiés en juin 1992.

—■— 46000	—◆— 76000	—●— 62000	—▲— 63000
—□— 105000	—◇— 101000	—⊕— 104000	

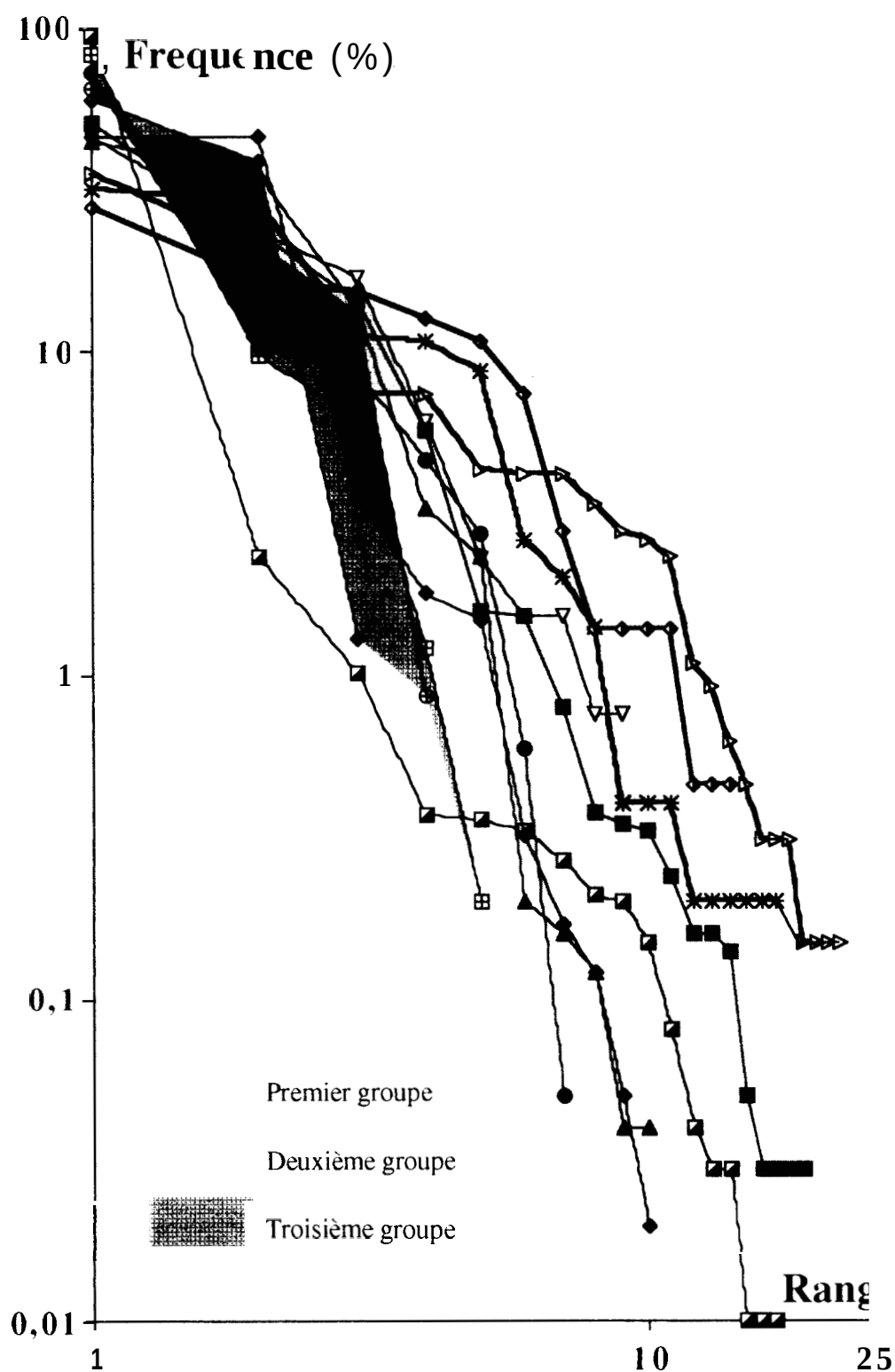


Figure 46. Diagrammes rang/fréquence des sites étudiés en septembre et octobre 1994

—■— 46000 —◆— 77000 —●— 78000 —▲— 79000
 —□— 80000 —◆— 62000 —○— 63000 —▽— 105000
 —■— 101000 —◆— 102000 —*— 103000 —▷— 104000

Tableau 47. Familles ou genres occupant les trois premiers rangs des DRF de juin 1992 et de septembre-octobre 1994

Sites-périodes	Kang 1	Rang 2	Kang 3
46 - Juin	<i>Asellidae</i>	<i>Chironomidae</i>	<i>Gammaridae</i>
46 - Octobre	<i>Atyidae</i>	<i>Chironomidae</i>	<i>Asellidae</i>
76 - Juin	<i>Asellidae</i>	<i>Chironomidae</i>	<i>Erpobdellidae</i>
77 - Septembre	<i>Dreissenidae</i>	<i>Asellidae</i>	<i>Physidae</i>
78 - Septembre	<i>Asellidae</i>	<i>Helobdella</i>	<i>Dreissenidae</i>
79 - Septembre	<i>Asellidae</i>	<i>Dreissenidae</i>	<i>Chironomidae</i>
80 - Septembre	<i>Tubificidae</i>	<i>Helobdella</i>	<i>Chironomidae</i>
62 - Juin	<i>Tubificidae</i>	<i>Chironomidae</i>	<i>Asellidae</i>
62 - Octobre	<i>Chironomidae</i>	<i>Asellidae</i>	<i>Tubificidae</i>
63 - Juin	<i>Asellidae</i>	<i>Chironomidae</i>	<i>Physidae</i>
63 - Octobre	<i>Asellidae</i>	<i>Chironomidae</i>	<i>Physidae</i>
105 - Juin	<i>Chironomidae</i>	<i>Asellidae</i>	<i>Bithynellidae</i>
105 - Octobre	<i>Philopotamidae</i>	<i>Chironomidae</i>	<i>Asellidae</i>
101 - Juin	<i>Gammaridae</i>	<i>Erpobdellidae</i>	<i>Asellidae</i>
101 - Octobre	<i>Gammaridae</i>	<i>Limnephilidae</i>	<i>Erpobdellidae</i>
102 - Septembre	<i>Chironomidae</i>	<i>Polycentropodidae</i>	<i>Hemiclepsis</i>
103 - Septembre	<i>Vivipandae</i>	<i>Chironomidae</i>	<i>Asellidae</i>
104 - Juin	<i>Chironomidae</i>	<i>Asellidae</i>	<i>Bithynellidae</i>
104 - Octobre	<i>Asellidae</i>	<i>Philopotamidae</i>	<i>Chironomidae</i>

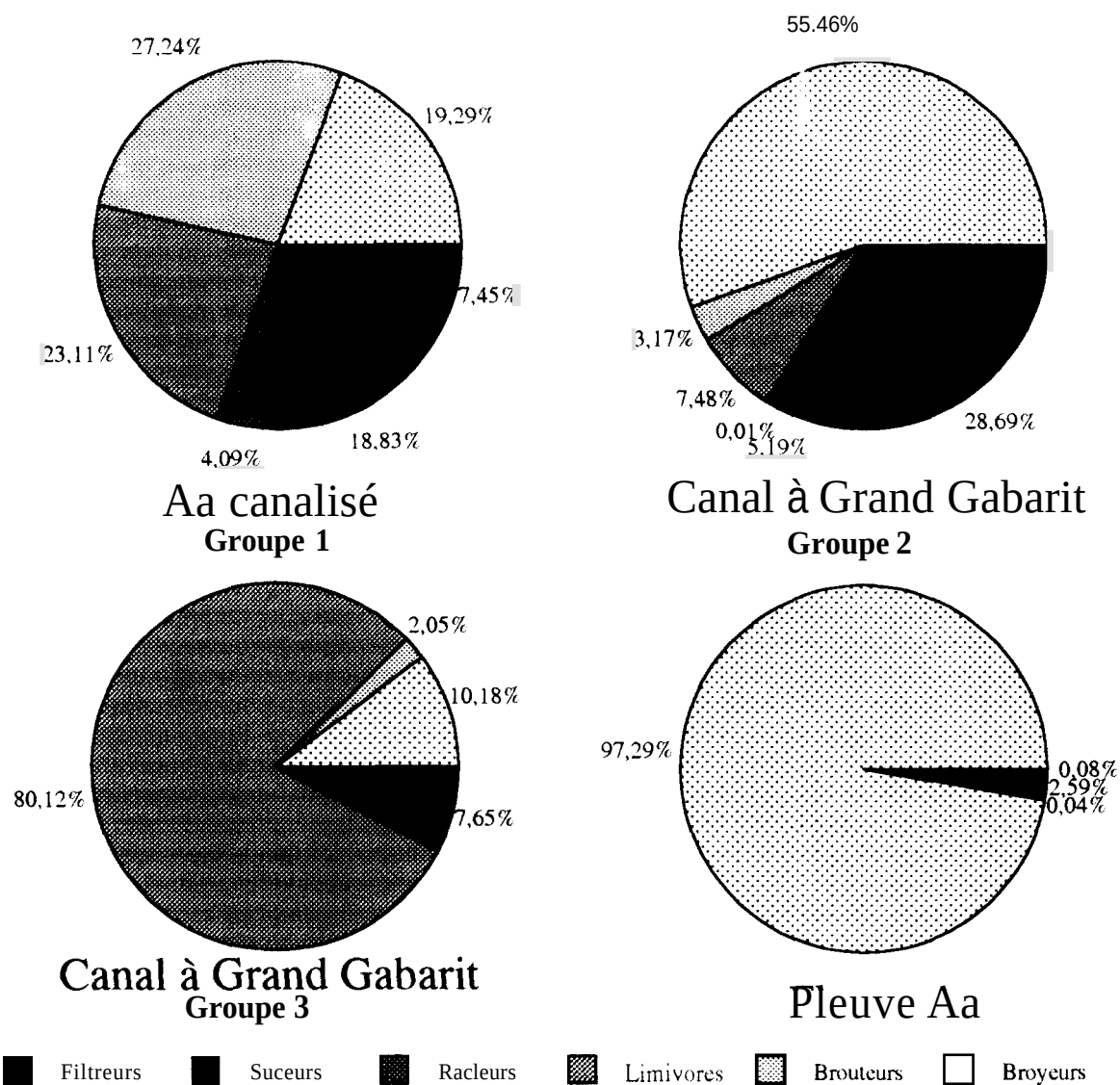


Figure 47. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition. Caractérisation des trois groupes et du site 101 définis par les DRF de sept./oct. 94.

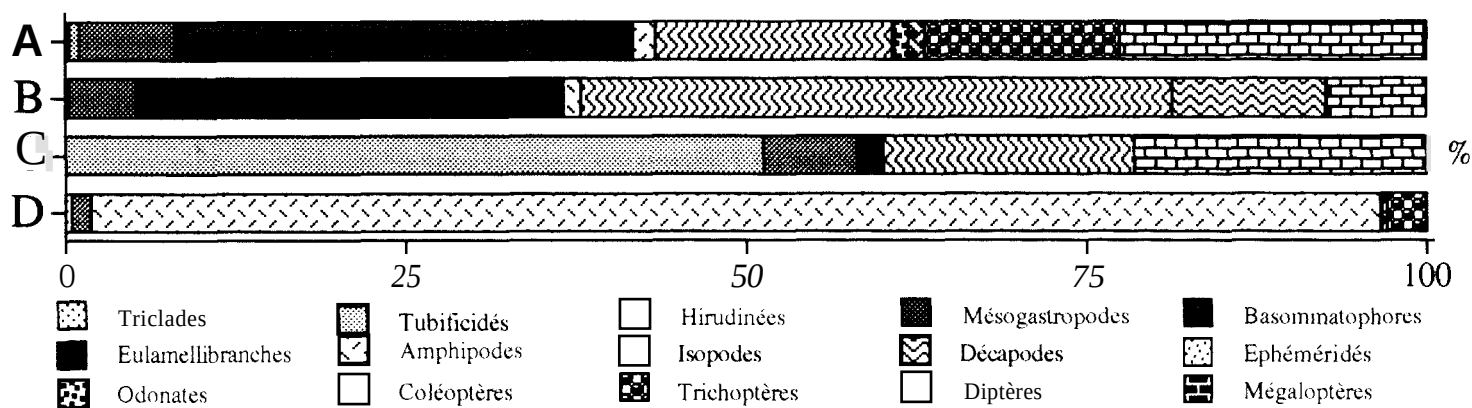


Figure 48. Composition taxonomique des trois groupes et du site 101 définis par les DRF de sept./oct. 94. A: groupe 1, B: groupe 2, C: groupe 3, D: site 101.

2.4. Analyse Factorielle des Correspondances

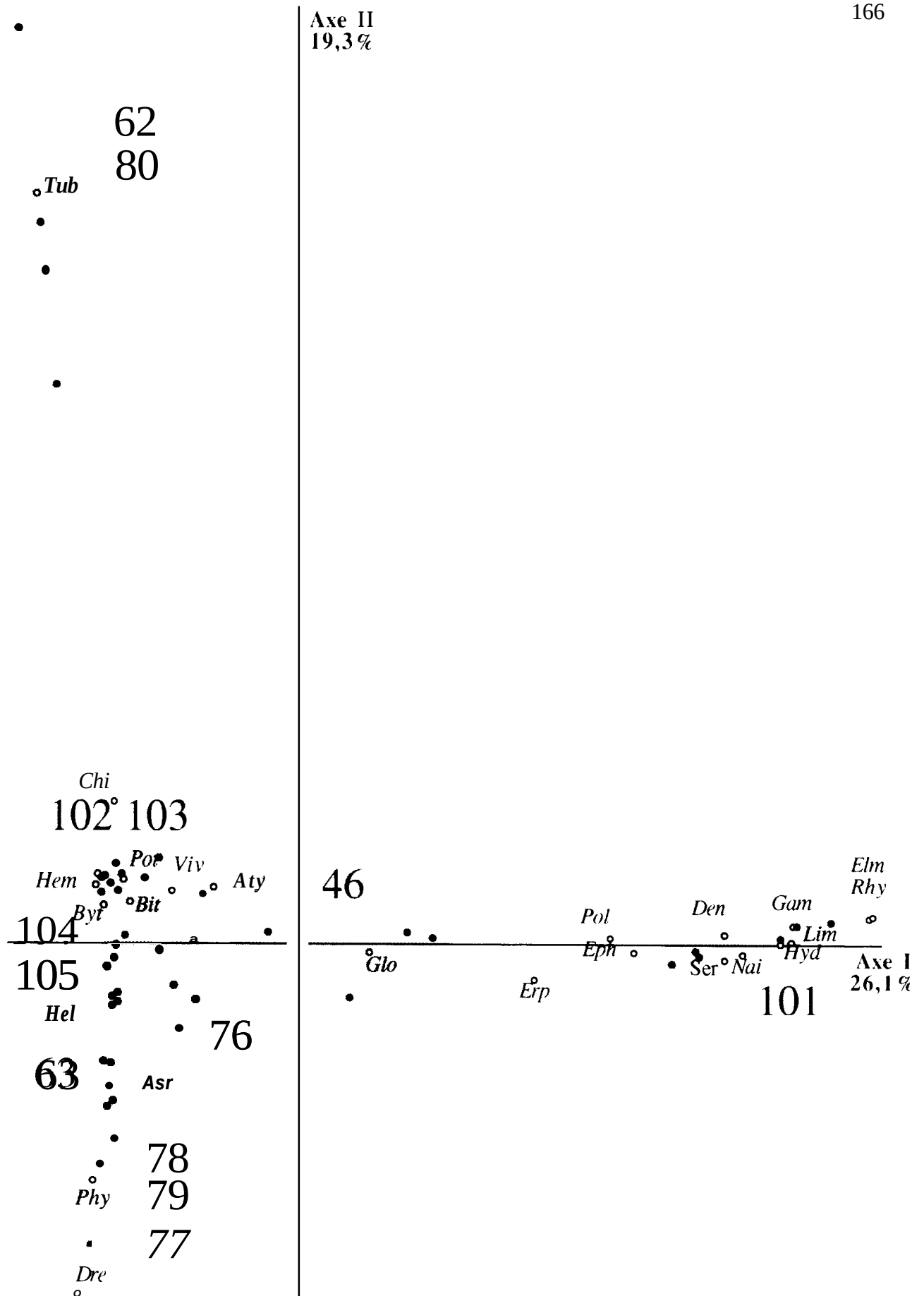
Après avoir éliminé les espèces rares (fréquence par substrat inférieure à 1, pour chaque période d'échantillonnage, ou trouvées dans deux échantillonnages), une AFC a été réalisée sur une matrice de 26 familles x 44 relevés (figure 49). Cinq familles ont une contribution relative supérieure à 3,9 % ($=100/26$) pour le premier axe et sont utilisées par la suite pour l'interprétation. Les deux premiers axes décrivent 45,4% de l'inertie totale du nuage de points. L'axe I isole six relevés correspondant au site d'Ouve-Wirquin (101) ($\sum CR > 70,6\%$) associé aux *Gammaridae* ($CR = 62,3\%$; $\cos^2 = 0,947$) qui sont très abondants dans ce site. Les *Gammaridae* sont indicateurs d'une eau de bonne qualité, riche en oxygène et peu chargée en matière organique (Caractéristiques des zones de β -mesosaprobie). Les sites 62 (sauf pour octobre 94 et mars 1995) et 80 ($\sum CR = 67,8\%$; $\cos^2 = 0,566$ à $0,786$) sont séparés par l'axe II. L'axe II est essentiellement expliqué par la présence de *Tubificidae* ($CR = 62,5\%$, $\cos^2 = 0,733$) qui sont des indicateurs d'une eau de mauvaise qualité, riche en matière organique et pauvre en oxygène. Ce deuxième axe est également expliqué par la présence de *Dreissenidae* et d'*Asellidae* ($\sum CR = 29,6\%$; $\cos^2 = 0,332$ et $0,331$ respectivement). Ces deux familles sont opposées aux *Tubificidae* sur l'axe II et associées aux sites 77, 78 et 79.

L'AFC montre que nous pouvons distinguer cinq groupes de sites. Un groupe correspondant au site du fleuve Aa (101) qui est différent des autres par la présence de macroinvertébrés typiques d'un cours d'eau rapide de bonne qualité. Un second groupe correspond aux sites 62 et 80 caractéristiques d'un canal de mauvaise qualité. Un troisième groupe composé des sites 77, 78 et 79 (le canal de la Deûle) est associé essentiellement aux *Dreissenidae*. Le site 46 (quatrième groupe) est mal représenté sur le plan principal. Le cinquième groupe est composé des sites restants.

2.5. Les indices de diversité, d'abondance-dominance et de régularité

Les indices de diversité, d'abondance-dominance et de régularité (équitabilité) calculés pour chaque site et chaque période sont présentés dans le tableau 48.

Les valeurs de l'indice de Shannon-Weaver pour le Canal à Grand Gabarit, le fleuve Aa et l'Aa canalisé varient respectivement de 0,29 à 3,08, de 0,45 à 2,31 et de 0,90 à 3,06. Cet indice de diversité excède 1,5 dans les sites étudiés, excepté pour les sites 77, 78, 80, 62, 63 (pour toutes les périodes), 101 en avril 1992 et octobre 1995) et 104 (en février 1992). Pour ces deux derniers sites, les communautés étaient fortement dominées respectivement par les *Gammaridae* et les *Asellidae*. Les indices de diversité les plus élevés sont notés pour l'Aa canalisé en octobre 1994 et avril 1995 ($H' > 2,5$) et pour le site 105 en avril 1995. Les valeurs les plus faibles sont mesurées pour les sites 62 et 63 du Canal à Grand Gabarit ($H' < 0,5$) attestant d'une importante altération de la structure des communautés.



blanc. Les sites sont représentés par un disque noir. Les zones grises correspondent à des groupes de sites ou des sites isolés désignés par leur code.

Tableau 48. Indices d'abondance-dominance? de diversité et d'équitabilité calculés à partir des relevés de piégeage pour chaque site et pour chaque période

SITES	DATE	Simpson	Shannon	Pielou
46000	février 1992	0,36	1,93	0,58
	avril 1992	0,26	2,42	0,66
	juin 1992	0,26	2,26	0,59
	octobre 1994	0,34	2,03	0,48
	mars 1995	0,25	2,52	0,68
76000	février 1992	0,40	1,82	0,65
	avril 1992	0,42	1,79	0,52
	juin 1992	0,34	1,98	0,57
	mars 1995	0,34	2,15	0,62
77000	septembre 1994	0,43	1,45	0,44
78000	septembre 1994	0,55	1,37	0,49
79000	septembre 1994	0,35	1,78	0,54
80000	septembre 1994	0,70	0,90	0,39
62000	décembre 1991	0,54	0,99	0,35
	février 1992	0,58	0,88	0,88
	avril 1992	0,92	0,29	0,14
	juin 1992	0,49	1,06	0,53
	octobre 1994	0,51	1,05	0,66
	mars 1995	0,56	0,98	0,62
63000	décembre 1991	0,42	1,81	0,64
	février 1992	0,90	0,42	0,16
	avril 1992	0,74	0,76	0,29
	juin 1992	0,48	1,17	0,42
	octobre 1994	0,48	1,33	0,66
	mars 1995	0,76	0,72	0,36
105000	février 1992	0,40	1,60	0,69
	avril 1992	0,44	1,60	0,43
	mai 1992	0,33	2,08	0,58
	juin 1992	0,30	2,27	0,58
	octobre 1994	0,31	2,10	0,66
	mars 1995	0,16	3,08	0,83
101000	février 1992	0,32	1,98	0,62
	avril 1992	0,78	0,87	0,24
	mai 1992	0,30	2,31	0,59
	juin 1992	0,28	2,30	0,59
	octobre 1994	0,90	0,45	0,11
	mars 1995	0,30	2,28	0,54
102000	septembre 1994	0,16	2,95	0,78
103000	septembre 1994	0,22	2,59	0,63
104000	février 1992	0,73	0,90	0,28
	avril 1992	0,45	1,67	0,44
	mai 1992	0,29	2,08	0,63
	juin 1992	0,25	2,59	0,63
	octobre 1994	0,19	3,06	0,69

L'indice de Simpson nous apporte des informations concernant la dominance dans les communautés étudiées. Les valeurs de l'indice de Simpson pour le Canal à Grand Gabarit, le fleuve Aa et l'Aa canalisé varient respectivement de 0,26 à 0,92, de 0,28 à 0,90 et de 0,16 à 0,73. Les valeurs généralement supérieures à 0,3 révèlent que les communautés sont essentiellement dominées par 1 à 3 espèces. Ceci est vrai pour la plupart des sites et des périodes sauf pour l'Aa canalisé en mai, juin et octobre, et pour le site 46 en avril et en juin où les individus collectés présentaient une meilleure distribution parmi les espèces.

L'indice d'équitabilité de Pielou pour le Canal à Grand Gabarit, le fleuve Aa et l'Aa canalisé varie respectivement de 0,14 à 0,88, de 0,11 à 0,62 et de 0,28 à 0,78. La faible valeur de cet indice au site 101 en octobre 95 est expliquée par la forte dominance des *Gammaridae*.

2.6. Les indices biocénotiques et les "scores"

L'expression de l'état biologique des cours d'eau à l'aide d'indices biologiques a été appliquée avec succès à de nombreuses rivières de petite et moyenne importance. Pour des raisons techniques (mode de prélèvement) et biologiques, leur application directe à des cours d'eau tels que les canaux ne peut être effectuée qu'avec une grande prudence. Cependant, nous avons vu précédemment que des biologistes belges ont créé un Indice Biotique Belge (IBB) en utilisant la grille de l'Indice Biotique de Tuffery et Verneaux (1968). Cette grille est à l'origine adaptée à des cours d'eau qui présentent des faciès lotiques et lentiques et qui permettent l'utilisation de filet de Surber ou de troubleau. Dans le cas de canaux, le calcul de l'IBB est réalisé à l'aide d'inventaires obtenus par piégeage avec des substrats artificiels. Nous avons utilisé des grilles existantes pour déterminer la qualité des sites étudiés et pour vérifier quelle méthode serait la plus adaptée aux canaux et à notre technique de prélèvements. Nous avons alors calculé des indices à partir des grilles de l'Indice Biotique (IB) de Tuffery et Verneaux (1968), de l'Indice de Qualité Biologique Potentielle (IQBP) de Verneaux et Faessel (1976) et de l'Indice Biotique Global Normalisé (IBGN). La grille de l'IBGN n'est normalement pas utilisable pour les cours d'eau atypiques tels que les canaux. Cependant nous l'avons utilisée dans notre étude parce que cette grille est en vigueur en France actuellement.

Les indices ainsi calculés sont notés IB*, IQBP* et IBGN* respectivement pour ne pas donner les noms réels des indices à nos calculs car nos méthodes de prélèvement diffèrent de celles préconisées par les auteurs. De même, des scores ont également été calculés selon la méthode décrite par le BMWP britannique (1979). Ces scores sont notés BMWP". La moyenne des scores BMWP" est calculée en divisant le score BMWP" par le nombre de taxons ayant un score (taxons ayant servi à calculer le BMWP*). Cette moyenne est notée ASPT*.

Les indices biologiques et les scores calculés sont donnés dans le tableau 49. Comme les amplitudes des valeurs des indices et des scores étaient peu importantes pour la plupart des sites et malgré le fait que le nombre de prélèvements n'ait pas toujours été le même, nous avons calculé des moyennes pour chaque indice sur toutes les périodes de prélèvement. Ces moyennes sont présentées graphiquement sur les figures 50 à 53. L'utilisation de diagramme en 3 dimensions permet de visualiser l'emplacement des sites entre eux, en fonction du réseau hydrographique. Les valeurs moyennes des indices et du score présentent sensiblement les mêmes fluctuations mais de façon plus ou moins marquée selon la grille utilisée. Les trois indices calculés expriment une baisse de la qualité biologique du canal à Grand Gabarit du site **46** (canal de La Sensée) au site 62 (canal d'Aire à La Bassée) pour lequel les indices et les scores sont les plus faibles. La situation s'améliore ensuite jusqu'à l'Aa canalisé. La qualité biologique du canal de La Deûle déjà médiocre au site 76 diminue jusqu'au site 80 à Haubourdin en amont de Lille. Les indices et les scores les plus élevés sont obtenus pour le site 101 sur le fleuve Aa. Cependant les valeurs n'atteignent que 10 et 11 (sur 20) pour l'IQBP* et l'IBGN* respectivement et 9 (sur 10) pour l'IB*. La grille de l'Indice Biotique est moins sévère que les autres grilles. La grille de l'Indice de Qualité Biologique Potentielle permet de montrer une plus grande différence de qualité entre le site de l'Aa à Ouve-Wirquin (site 101) et les autres sites. Cet indice montre une différence de qualité biologique entre le site 101 et le site 46 du canal à grand gabarit, alors que le biotope est semblable d'un point de vue charge en métaux et en matières organiques. il permet également de montrer une différence de qualité entre la partie naturelle et la partie canalisée de l'Aa, différence qui est moins perçue par les autres indices ou **par** l'ASPT*.

Tableau 49. Indices hiocénotiques calculés à partir des relevés de piégeage pour chaque site et pour chaque période

SITES	DATES	IB*	IQBP*	IBGN*	BMWP*	ASPT*
46000	février 1992	5	3	5	28	4,0
	avril 1992	6	6	8	44	4,4
	juin 1992	6	6	8	40	4,4
	octobre 1994	6	6	9	59	4,9
	mars 1995	6	6	8	44	4,9
76000	février 1992	4	3	3	14	2,8
	avril 1992	4	5	7	34	3,8
	juin 1992	6	3	4	27	3,9
	mars 1995	6	5	7	33	4,1
77000	septembre 1994	5	3	5	15	2,5
78000	septembre 1994	5	3	4	12	3,0
79000	septembre 1994	5	3	5	20	2,9
80000	septembre 1994	3	2	2	9	2,3
62000	décembre 1991	5	2	3	12	2,4
	février 1992	2	1	1	3	1,5
	avril 1992	3	2	2	9	2,3
	juin 1992	3	2	2	9	2,3
	octobre 1994	3	2	1	6	2,0
	mars 1995	3	2	1	8	2,7
63000	décembre 1991	5	3	4	15	2,5
	février 1992	5	3	3	15	2,5
	avril 1992	5	3	3	14	2,8
	juin 1992	5	3	4	14	2,8
	octobre 1994	4	3	3	11	2,8
	mars 1995	4	3	3	11	2,8
105000	février 1992	4	3	3	11	2,8
	avril 1992	6	5	6	35	3,5
	mai 1992	6	3	5	25	3,1
	juin 1992	6	6	8	34	3,8
	octobre 1994	5	5	10	30	3,8
	mars 1995	6	6	8	40	4,0
101000	février 1992	7	9	5	20	3,3
	avril 1992	8	10	9	57	4,8
	mai 1992	8	10	10	60	4,3
	juin 1992	8	10	9	59	5,4
	octobre 1994	9	10	10	71	5,5
	mars 1995	9	10	11	64	4,6
102000	septembre 1994	6	6	8	48	4,0
103000	septembre 1994	7	6	9	57	4,1
104000	février 1992	5	3	4	20	3,3
	avril 1992	6	6	8	42	3,8
	mai 1992	5	3	5	28	4,0
	juin 1992	7	6	9	46	4,2
	octobre 1994	7	7	13	77	4.3

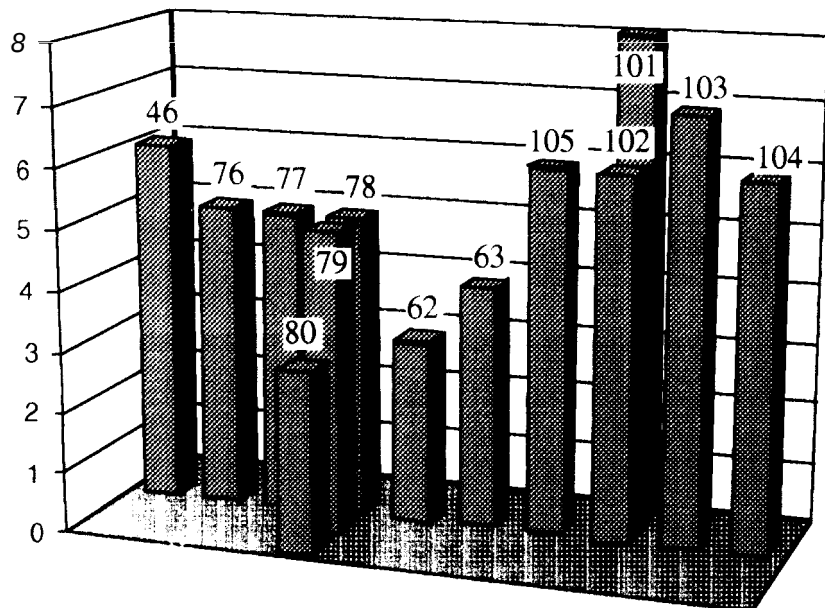


Figure 50. Moyennes des IB* calculés à l'aide de la grille de l'Indice Biotique

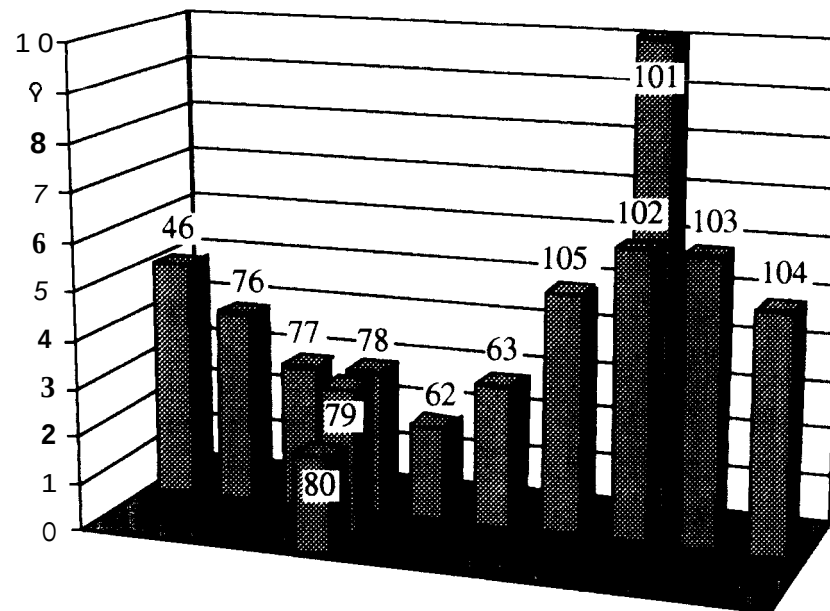


Figure 51. Moyennes des IQBP* calculés à l'aide de la grille de l'Indice de Qualité Biologique Potentielle

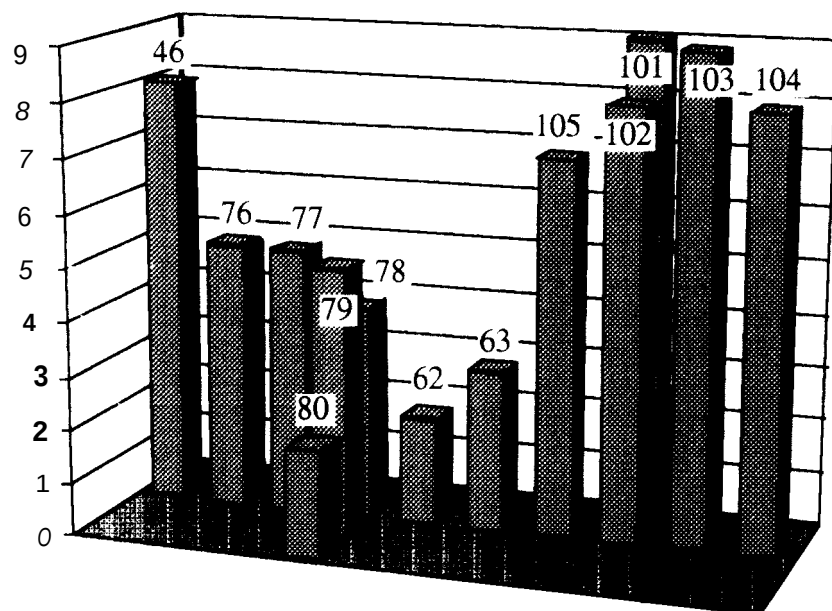


Figure 52. Moyennes des IBGN* calculés à l'aide de la grille de l'Indice Biologique Global Normalisé

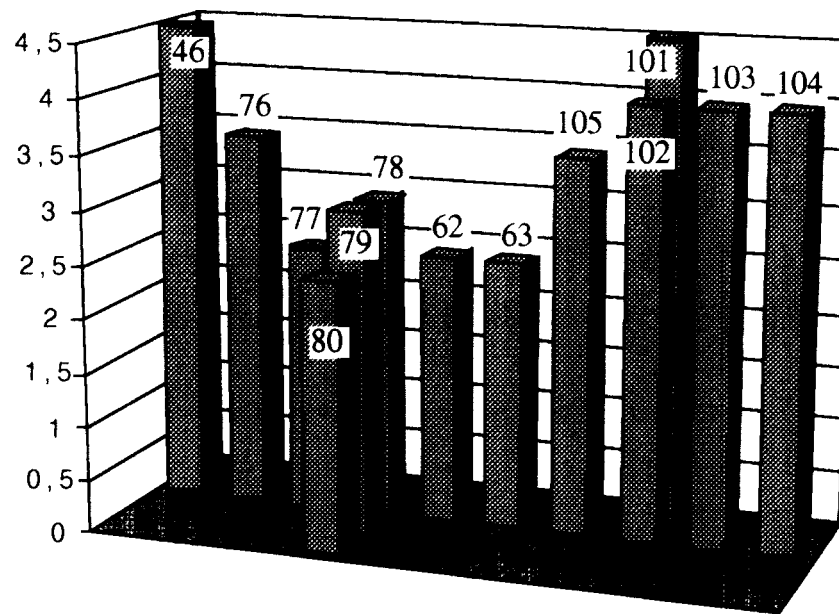


Figure 53. Moyennes des ASPT* calculés à l'aide de la méthode britannique des scores

3. Relation entre les données chimiques et biologiques

3.1. Relations entre les indices biologiques et les paramètres chimiques des sédiments

L'Analyse en Composantes Principales a été utilisée ici dans le but de décrire la nature des interrelations entre les descripteurs biologiques (indices) et les descripteurs chimiques des sédiments.

3.1.1. Relations entre les indices et les variables métalliques

Nous avons réalisé une première ACP sur les données centrées et réduites d'un tableau de 38 observations x 14 paramètres (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn, IB*, IQBP*, IBGN*, ASPT*, S, H', E).

Si nous considérons le plan principal (axes F1 et F2 représentant 73,65% de l'inertie totale), le cercle des corrélations (figure 54) visualise une structure dominée par un antagonisme entre quatre variables globales, les indices IBGN*, IQBP*, IB* et le score ASPT* et quatre variables décrivant la qualité des sédiments, le Cd, le Cu, le Pb et le Zn.

Nous pouvons donc schématiquement distinguer plusieurs groupes de variables dont le coefficient de corrélation sur l'axe F1 ou F2 est supérieur à 0,33 (seuil théorique de signification du coefficient linéaire pour $p=0,05$ et $N-2=36$ degrés de liberté).

Le premier groupe englobe les indices biocénétiques, l'IBGN*, l'IB*, l'IQBP* et l'ASPT* très bien corrélés entre eux. Ils tendent à s'opposer à toutes les variables métalliques et se projettent négativement sur l'axe F1 à l'opposé des variables Pb, Cd, Zn et Cu avec lesquels ils présentent une corrélation négative.

Le deuxième groupe renferme les quatre variables métalliques Cd, Cu, Pb et Zn fortement corrélées entre elles. Ces variables se projettent positivement sur l'axe F1.

Le troisième groupe comprend les trois variables métalliques Fe, Cr et Al qui vont dans le même sens que les autres variables métalliques.

Les variables S, H' et E sont considérées à part. Les variables H' et S s'opposent du fait du principe même de leur calcul. Les trois variables ont des directions quasiment perpendiculaires à celles prises par les variables métalliques. Ceci tendrait à montrer que ces trois indices (abondance, diversité et équitabilité) ne sont pas influencés par ces paramètres métalliques.

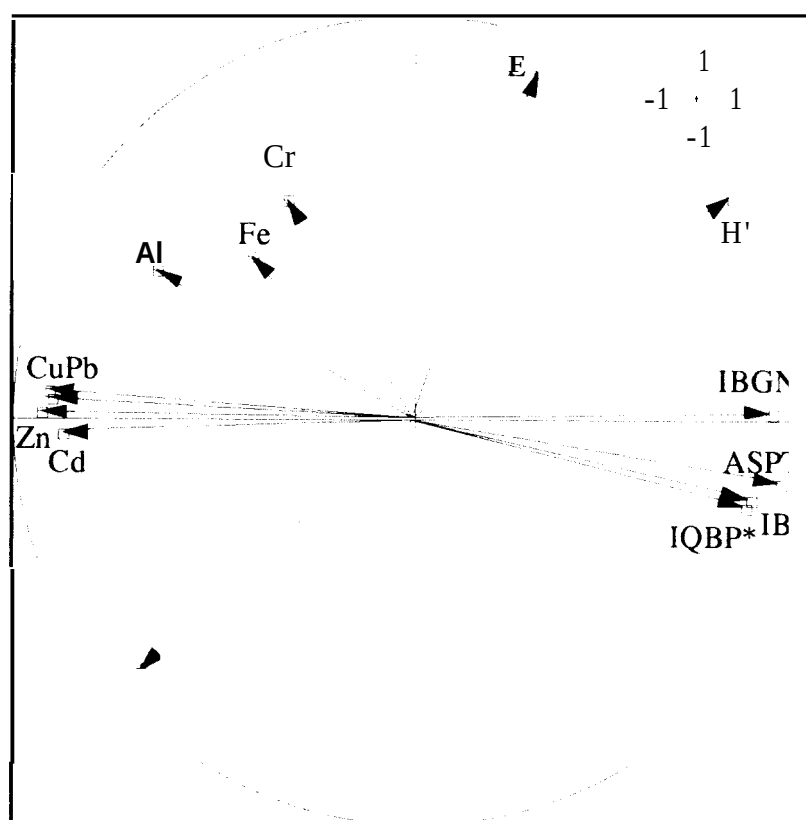


Figure 54. Cercle des corrélations entre les variables métalliques et biologiques et les deux premiers facteurs de l'ACP centrée réduite

3.1.2. Relations entre les indices et les variables métalliques et organiques

Une deuxième ACP centrée et réduite permet de visualiser les relations entre les indices calculés (descripteurs de diversité et indices biocénotiques) et les variables métalliques et organiques. Les mesures des paramètres NTK, COT, P et PF n'ayant été réalisées seulement qu'en septembre 1994, octobre 1994 et mars 1995, nous ne prendrons en compte que 18 observations.

De la même manière que précédemment, le plan principal de l'ACP (axes F1 et F2 représentant 65,72% de l'inertie totale) visualise un antagonisme entre les paramètres globaux IB*, IQBP*, IBGN*, ASPT* et les paramètres métalliques Cd, Cu, Pb et Zn (figure 55). La direction que prennent les paramètres NTK, COT, P et PF s'oppose de façon moins marquée à celle des indices biocénotiques mais est perpendiculaire à celle des indices d'abondance (S) et de diversité (H'). Les variations de ces deux derniers indices ne semblent donc pas influencées par les teneurs en paramètres organiques dans les sédiments. Le Fe et l'équitabilité ont une direction perpendiculaire à celle des paramètres métalliques Cd, Cu, Pb et Zn. Le calcul de l'équitabilité ne semble donc apporter aucun élément quant à la toxicité des sédiments par les métaux toxiques.

3.2. Analyses de co-inertie

Nous avons réalisé deux analyses de co-inertie. L'une prend en compte l'ensemble des relevés faunistiques et les paramètres métalliques des sédiments, la seconde, les relevés d'octobre 94 et mars 95 ainsi que les paramètres métalliques et organiques des sédiments. Pour simplifier les figures, nous avons utilisé des abréviations et des numérotations. Les correspondances entre les taxons et leurs abréviations et leurs numérotations sont données dans le tableau 50. Les correspondances entre les sites et leurs numérotations sont données dans le tableau 51.

3.2.1. Effet des paramètres métalliques sur la macrofaune benthique

Nous avons tenté de mettre en évidence un effet de la contamination métallique des sédiments sur la macrofaune benthique des sites étudiés en utilisant l'ensemble des relevés faunistiques auxquels sont associées les mesures de métaux dans les sédiments. Avant de rechercher une co-inertie entre les deux tableaux de données, nous avons réalisé une ACP sur chacun des tableaux.

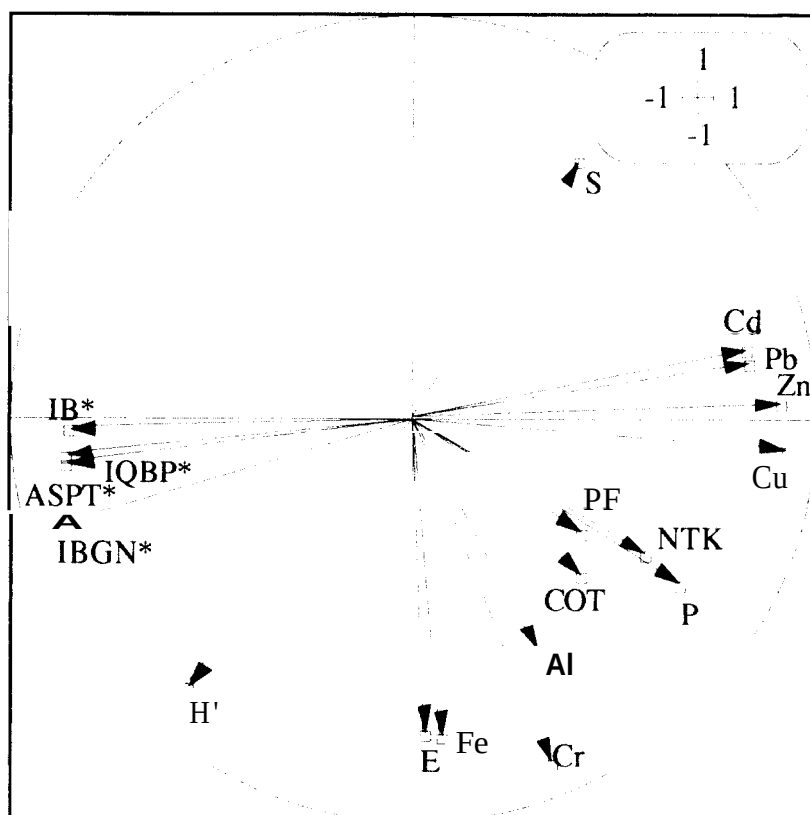


Figure 55. Cercle des corrélations entre les variables métalliques, organiques et biologiques et les deux premiers facteurs de l'ACY centrée réduite

Tableau 50. Abréviations et numkrotations des taxons dans les analyses de co-inertie.

Tableau général	Taxons	Abréviation	Co-inertie 1	Co-inertie 2
1	<i>Polycelis</i> sp.	Pol sp	1	1
2	<i>Dugesia lugubris</i>	Dug lug	2	2
3	<i>Dugesia gonocephala</i>			
4	<i>Dendrocoelum lacteum</i>	Den lac	3	3
5	F. Gordiidae			
6	F. Tubificidae	Tub	4	4
7	F. Naididae	Nai	5	
8	<i>Piscicola geometra</i>			
9	<i>Hemiclepsis marginata</i>	Hem mar	6	5
10	<i>Helobdella stagnalis</i>	Hel sta	7	6
11	<i>Glossiphonia complanata</i>	Glo com	8	7
12	<i>Theromyzon</i> sp.			
13	<i>Erpobdella octoculata</i>	Erp oct	9	8
14	<i>Hirudo</i> sp.			
15	<i>Viviparus viviparus</i>	Viv viv	10	9
16	F. Valvatidae			
17	<i>Bithyniu tentaculata</i>	Bit ten	11	10
18	F. Bythinellidae	Byt	12	11
19	F. Hydrobiidae			
20	F. Acroloxidae			
21	F. Planorbidae	Pla	13	12
22	F. Physidae	Phy	14	13
23-24	F. Lymnaeidae	Lym	15	14
25	<i>Dreissena polymorpha</i>	Dre pol	16	15
26	<i>Sphaerium</i> sp.	Sph	17	16
27	<i>Pisidium</i> sp.			
28	<i>Gammarus pulex</i>	Gam pul	18	17
29	<i>Asellus aquaticus</i>	Ase aqu	19	18
30	<i>Aryaephyra desmarestii</i>	Ath des	20	
31	<i>Cambarus affinis</i>	Cam aff	21	
32	F. Baetidae			
33	F. Ephemerellidae	Eph	22	
34	F. Caenidae			
35	F. Caenagrionidae			
36	F. Platycnemididae	Pla	23	19
37	F. Dysticidae (indéterminé)	Dys	24	
38	<i>Platembus maculatus</i>			
39	<i>Yola bicarinata</i>			
40	F. Gyrinidae			
41	F. Elmidae			
42	F. Philopotamidae	Phi	25	20
43	F. Polycentropodidae	Pol	26	21
44	F. Rhyacophilidae	Rhy	27	22
45	F. Hydropsychidae	Hyd	28	23
	F. Limnephilidae			
46	spp. 1	Lim spl	29	24
47	spp. 2	Lim sp2	30	
48	F. Sericostomatidae	Ser	31	25
49	F. Phryganidae			
50	F. Chironomidae	Chi	32	26
51	F. Tipulidae			
52	F. Simuliidae			
53	F. Tabanidae			
54	F. Stratiomyidae			
55	F. Ceratopogonidae			
56	F. Sialidae	Sia	33	27

Tableau 51. Numérotations des prélèvements dans les analyses de co-inertie.

Sites et dates	Co-inertie 1	Co-inertie 2
46 fév 92	1	
46 avr 92	2	
46 jui 92	3	
46 oct 94	4	1
46 mar 95	5	2
76 fév 92	6	
76 avr 92	7	
76 jui 92	8	
76 mar 95	9	3
77 sep 94	10	4
78 sep 94	11	5
79 sep 94	12	6
80 sep 94	13	7
62 déc 91	14	
62 fév 92	15	
62 avr 92	16	
62 jui 92	17	
62 oct 94	18	8
62 mar 95	19	9
63 déc 91	20	
63 fév 92	21	
63 avr 92	22	
63 jui 92	23	
63 oct 94	24	10
63 mar 95	25	11
105 mai 92	26	
105 jui 92	27	
105 oct 94	28	12
105 mar 95	29	13
101 mai 92	30	
101 jui 92	31	
101 oct 94	32	14
101 mar 95	33	15
102 sep 94	34	16
103 sep 94	35	17
104 mai 92	36	
104 jui 92	37	
104 oct 94	38	18

3.2.1.1. Analyse en composantes principales du tableau milieu

Les données métalliques des sédiments ont été analysées par une ACP centrée et réduite afin de diminuer le poids de l'Al et du Fe. L'ACP a été réalisée sur un tableau de 38 observations x 7 paramètres (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn). Le diagramme des valeurs propres (figure 56A) montre qu'une seule composante explique la majeure partie du nuage de points (63,81%). Les quatre premières composantes expliquent 95,97% de l'inertie totale du nuage. Nous avons utilisé les deux premiers axes (plan principal) pour projeter le nuage de points. Le cercle des corrélations (figure 56B) montre que les paramètres Zn, Cd, Cu, et Pb sont très bien corrélés entre eux (voir le tableau des corrélations, tableau 52). Ces quatre éléments contribuent également fortement à la formation du premier axe F1. L'Al participe plus faiblement à la formation de cette première composante. Le Cr participe à la formation de l'axe F2 tandis que le Fe contribue à part égale à la formation des deux axes. Tous les paramètres sont placés du côté positif de l'axe F1. Par conséquent, le plan principal de l'ACP (figure 56C) ordonne les points selon un gradient de contamination des sédiments par l'Al, le Cd, le Pb, le Zn et le Cu sur l'axe F1 et un gradient de teneurs en Cr et Fe sur l'axe F2. La correspondance entre la numérotation utilisée et les différentes observations est donnée dans le tableau 51. Les sites dont les sédiments sont fortement chargés par les métaux lourds (sites 62 et 63) sont placés du côté positif de l'axe F1 tandis les sites dont les sédiments sont moins chargés se trouvent du côté négatif de l'axe (exemple du site 101).

3.2.1.2. Analyse en Composantes Principales du tableau faune

Après l'élimination des taxons rares (taxons représentés seulement deux fois dans l'ensemble des relevés ou dont l'abondance par piège est inférieure à 1), nous avons réalisé une ACP centrée sur un tableau de contingence composé de 38 observations x 33 taxons. La transformation des abondances en $\log(x+1)$ a permis de diminuer le poids des taxons très fortement représentés tels que les gammares tout en conservant une image de l'abondance des taxons. La correspondance entre les abréviations utilisées, la numérotation et les taxons se réfère au tableau 50. Le diagramme des valeurs propres (figure 57A) montre l'utilité de trois composantes qui expliquent 62,18% de l'inertie totale du nuage de points. Le premier axe de la carte factorielle (figure 57B) sépare nettement le site 101 des autres. Les sites restants sont séparés le long de l'axe F2 du plan principal avec un isolement des sites 62 et 80. La répartition de l'abondance relative des taxons est montrée sur la figure 58. Les sangsues *Erpobdella octoculata*, *Glossiphonia complanata*, *Helobdella stagnalis* sont rencontrées dans pratiquement tous les sites alors que *Hemiclepsis marginata* est inféodée aux canaux. Les aselles et les chironomes sont des taxons ubiquistes rencontrés dans tous les sites. Nous pouvons également visualiser sur cette figure l'appartenance de certains taxons de macroinvertébrés

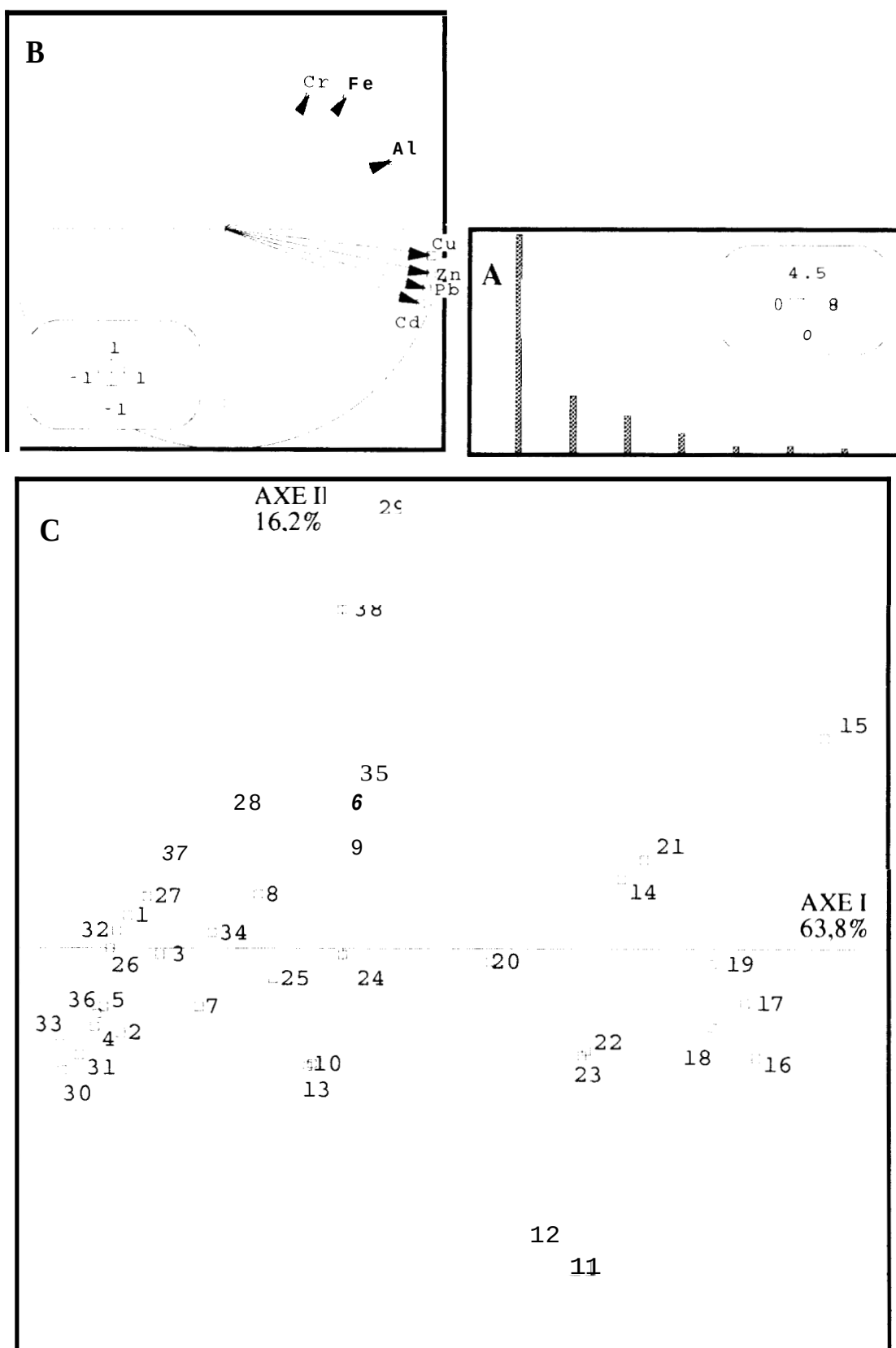


Figure 56. ACP centrée et réduite du tableau des teneurs métalliques des sédiments.
A: valeurs propres. **B:** cercle des corrélations. **C:** projection dans le plan principal.
 La correspondance entre les sites et les numéros est donnée dans le tableau 51.

Tableau 52. Matrices des corrélations entre les différents métaux dosés dans les sédiments.

	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn
Al	1.000						
Cd	0,506**	1.000					
Cr	0,322*	0,205	1.000				
Cu	0,597**	0,855**	0,302	1.000			
Fe	0,593**	0,286	0,315	0,478**	1.000		
Yb	0,634**	0,896**	0,230	0,877**	0,300	1.000	
Zn	0,615**	0,890**	0,256	0,905**	0,403*	0,895**	1.000

" * ": valeur significative (P<0.05)

" ** ": Valeur significative (P<0.01)

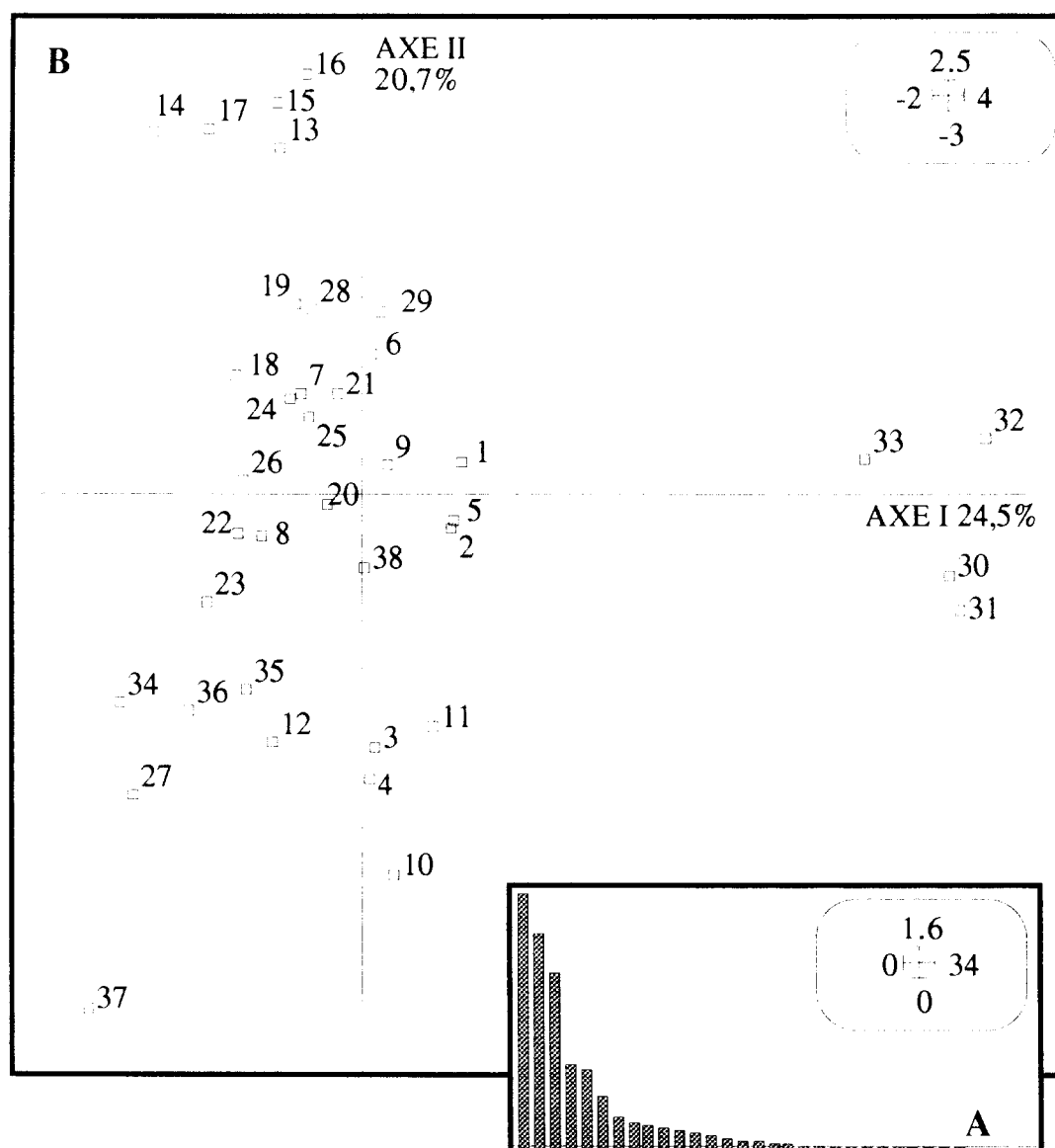


Figure 57. ACP centrée et réduite du tableau faunistique.

A: valeurs propres. B: projection dans le plan principal.

La correspondance entre les sites et les numéros est donnée dans le tableau 51.

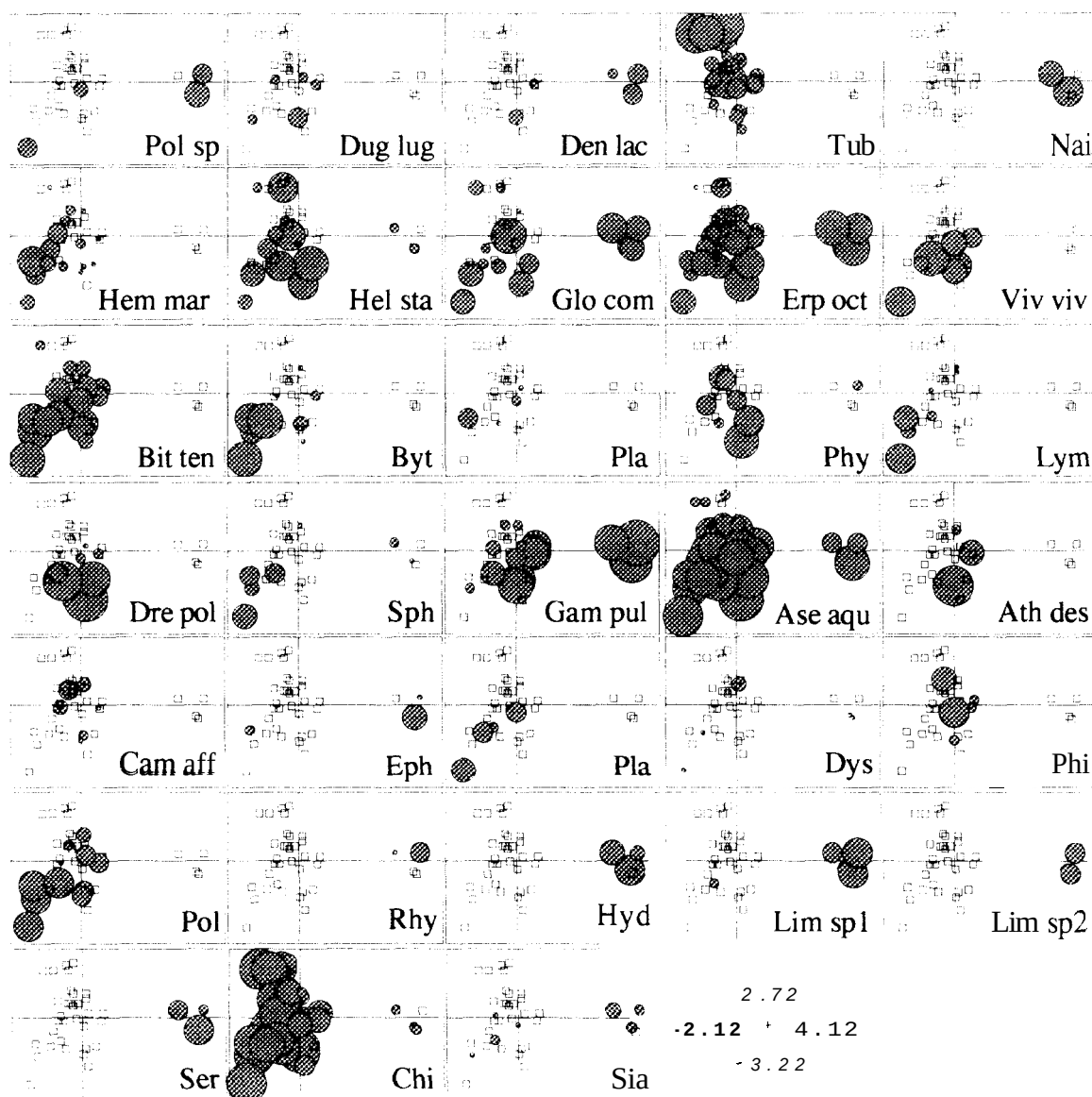


Figure 58. Distribution d'abondance des 33 taxons faunistiques sur la carte factorielle de l'ACP (Figure 57).

La correspondance entre les abréviations et les taxons est donnée dans le tableau 50. Les carrés blancs correspondent aux sites (voir la correspondance avec la figure 57). Les ronds grisés représentent l'abondance relative de chaque taxon.

rhéophiles tels que les trichoptères à fourreau (*Rhyacophilidae*, *Hydropsychidae*, *Limnephilidae* et *Sericostomatidae*) et les *Naididae* au site situé sur le fleuve Aa (site 101). Il semble exister le long de l'axe F2 une opposition entre l'abondance des *tubificidae* et celle des autres taxons, en particulier *Hemiclepsis*, *Bythinia* et les *Polycentropodidae*.

3.2.1.3. Recherche d'une Co-inertie

L'analyse de Co-inertie est exécutée sur le tableau croisé constitué des covariances entre l'abondance des taxons et la valeur des mesures des sept paramètres métalliques des sédiments. Le test de permutation (test de Monte-Carlo) montre l'existence d'un lien significatif ($p < 0,001$) entre les deux structures (existence d'une Co-structure) (figure 59). Sur les mille permutations réalisées, aucune analyse de Co-inertie n'a une valeur supérieure à celle observée (4,30). Le diagramme des valeurs propres de l'analyse de Co-inertie (figure 60) révèle l'importance du premier axe. Cependant, nous avons retenu les deux premiers axes pour l'élaboration des cartes factorielles. La projection des axes d'inertie de l'ACP du milieu sur les axes de Co-inertie (figure 61a) montre qu'ils ne diffèrent que par une symétrie et une rotation simples. La carte des relevés positionnés par les teneurs métalliques dans les sédiments (figure 61b) est obtenue par symétrie et rotation de la carte d'ACP simple. Nous ne détaillerons donc pas l'explication de cette carte car elle est sensiblement identique à celle de la carte obtenue par l'ACP simple (voir § 3.1.1.). La projection des axes d'inertie de l'ACP réalisée avec la faune sur les axes de Co-inertie indique un changement de plan radical. De ce fait, la carte factorielle réalisée avec les données de la faune (figure 63b) est très différente de celle de l'ACP simple. Par contre cette carte se rapproche de celle faite avec les données du milieu (figure 62b).

Les directions prises par les variables métalliques vont du côté positif du premier axe de l'analyse de Co-inertie (figure 62a). Les variables Pb, Cd et Zn se dirigent vers le côté négatif et les variables Fe, Cr et Al vers le côté positif du deuxième axe. La plupart des variables représentant les différents taxons sont orientées vers le côté négatif du premier axe de Co-inertie (figure 63a) et s'oppose à un seul taxon, les *Tubificidae*. Les sites sont alors ordonnés selon un gradient croissant d'abondance des individus de la majeure partie des taxons vers le côté négatif de l'axe. **Par** contre, il y existe une augmentation de l'abondance des *Tubificidae* vers le côté positif de l'axe. De la mise en relation des projections des variables et des taxons sur le plan principal de l'analyse de Co-inertie, plusieurs constatations émergent:

- il existe une opposition entre l'abondance des individus dans la plupart des taxons et l'augmentation de la charge métallique des sédiments.
- les abondances des *Gammaridae* et des *Bithyniidae* sont opposées de façon flagrante à la charge en **Cd**, Cu, Pb et Zn sur l'axe F1.
- l'abondance des sangsues *Erpobdella*, *Glossiphonia* et *Helobdella*, des aselles et des *Dreissenidae* est opposée à la charge en Al, Cr et Fe.
- l'abondance des *Tubificidae* est corrélée avec l'augmentation des charges métalliques.

Nombre de permutations effectuées: 1000 Inertie observée: 4.308968
 Histogramme: minimum = 0.487029, maximum = 4.308968
 nombre de simulations $X < \text{Obs}$: 1000 (fréquence: 1.000000)
 nombre de simulations $X \geq \text{Obs}$: 0 (fréquence: 0.000000)

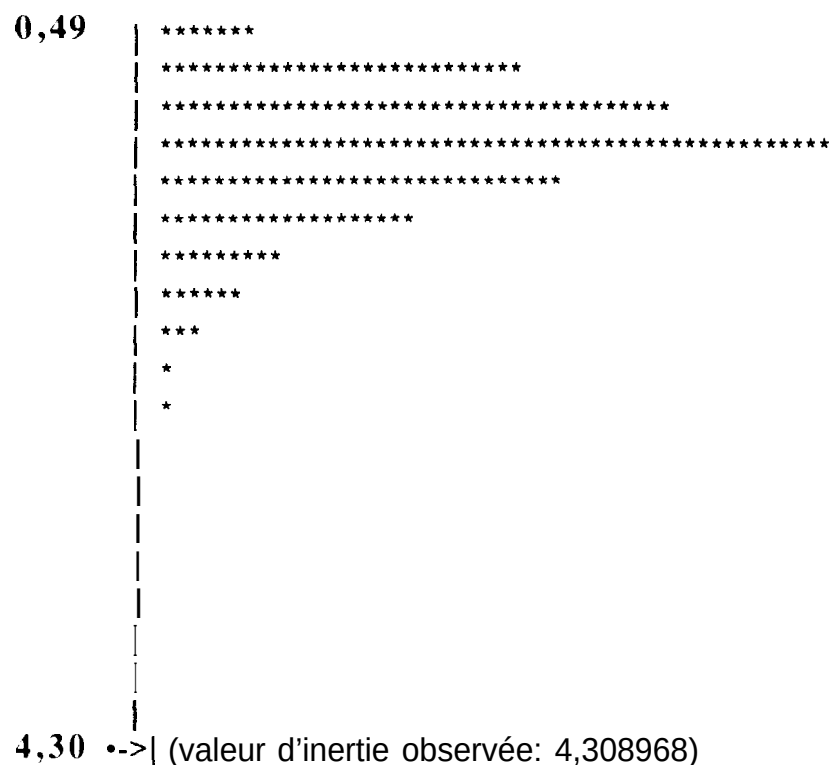


Figure 59. Résultat du test de Monte Carlo réalisé pour l'analyse de co-inertie I.
 Ce diagramme montre que la valeur d'inertie observée dans notre étude (4,3) est nettement supérieure à celles obtenues par des permutations aléatoires (représentées par des étoiles).

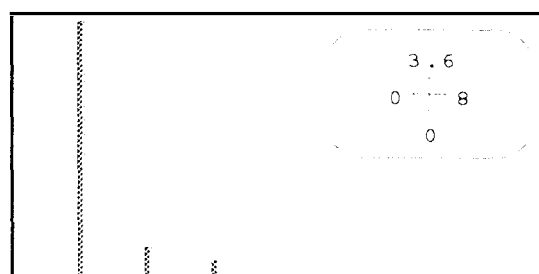


Figure 60. Diagramme des valeurs propres de l'analyse de co-inertie I.
 Ce diagramme montre l'importance du premier axe dans l'analyse de Co-inertie. Cet axe explique la majeure partie des informations.

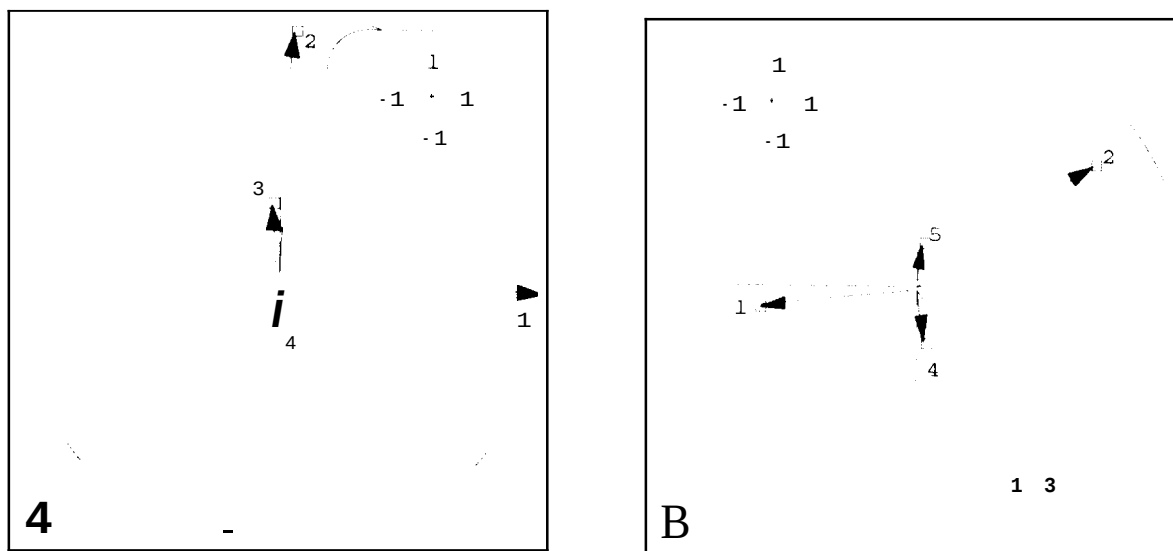


Figure 61. Projection des axes d'inertie des analyses séparées sur les axes de co-inertie.
A: sédiments. B: faune

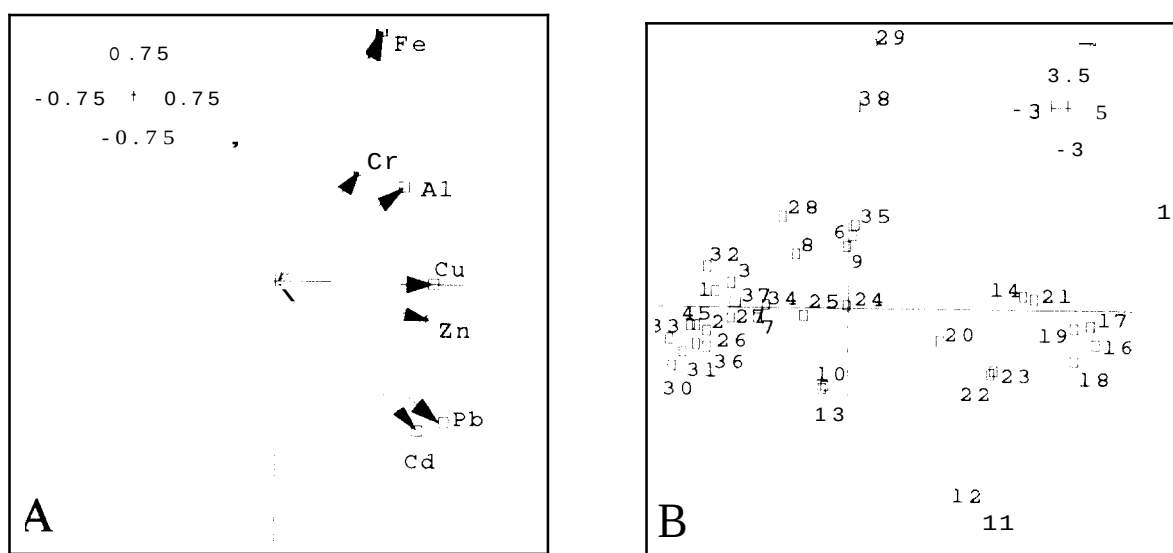


Figure 62. Projection du nuage de 44 points à 7 composantes dans l'analyse de co-inertie.
A: représentation de la base canonique. B: nuage des relevés associés (voir tableau 51 pour la correspondance entre la numérotation et les sites).

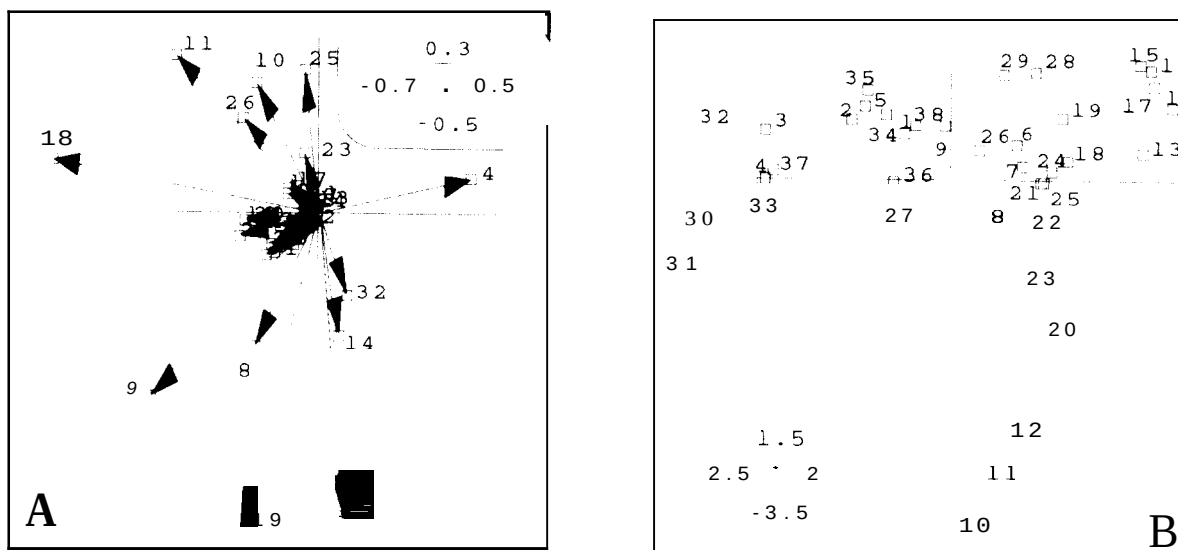


Figure 63. Projection du nuage de 44 points à 33 composantes dans l'analyse de co-inertie.
A: représentation de la base canonique (voir tableau 50 pour la numérotation des taxons). B: nuage des relevés associés (voir tableau 51 pour la correspondance).

Une autre voie de comparaison des deux ensembles de données est de projeter les coordonnées standardisées des sites obtenues à partir des données de la faune et du milieu sur un même plan (figure 64). Sur cette projection dans le plan principal de l'analyse de co-inertie, la position des sites obtenue par les données du milieu est entourée d'une étiquette, et leur position obtenue par les données de la faune est indiquée par la pointe de la flèche. Les flèches en général relativement courtes, montrent qu'il n'existe pas une grande différence entre l'ordre des sites obtenu par le milieu et celui obtenu par la faune. Les sites 77 (n°10) et 80 (n°13) ont des teneurs métalliques dans les sédiments très semblables. Ils sont donc représentés de façon très proche l'un de l'autre. Par contre, la faune de ces deux sites est très différente, les flèches indiquant des zones dissemblables. Les moules zébrées dominent la communauté du site 77 alors que la faune du site 80 se rapproche de celles des sites 62 et 63 avec une dominance des *Tubificidae*. En ce qui concerne le site 105 (n°26 à 29), une forte variation de la qualité des sédiments est notée au cours des différentes périodes étudiées, les points formés par les données du milieu sont alors relativement éloignés les uns des autres. Par contre, les flèches tendent à s'orienter vers une même zone (pour les prélèvements de mai 92, octobre 94 et mars 95), ce qui tendrait à montrer que la faune est restée semblable.

3.2.2. Effet des paramètres métalliques et organiques sur la macrofaune

Nous avons envisagé une deuxième analyse de Co-inertie en tenant compte des teneurs en NTK, COT, P et de la perte au feu dans les sédiments. Seules les observations effectuées en septembre et octobre 1994 et en mars 1995 ont donc été prises en considération. Le nombre d'observations (18) étant faible, il ne s'agit ici que de mettre en évidence des tendances et non pas de tirer des conclusions définitives.

3.2.2.1. Analyse en composantes principales du tableau milieu

Nous avons utilisé un tableau de 18 observations x 11 paramètres (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn, NTK, COT, P et PF) pour réaliser l'ACP des données centrées et réduites. La figure 65 illustre le diagramme des valeurs propres (65A), le cercle des corrélations (65B) ainsi que la projection des points (65C). L'analyse du diagramme des valeurs propres nous indique que les deux premiers axes sont suffisants pour expliquer la majeure partie des données. Si nous considérons le plan principal de l'ACP qui explique 71,35% de l'inertie totale, le cercle des corrélations nous indique l'existence de deux grands groupes de paramètres. Le premier est constitué des variables Cd, Cu, Pb et Zn très bien corrélées entre elles (voir le tableau 53). Elles sont projetées vers le côté positif du premier axe et du côté négatif du deuxième. Le deuxième groupe est constitué des variables Fe, Cr, COT, NTK et P projetées des côtés positifs des axes I et II. L'A1 n'est pas bien représenté dans ce plan. La projection des observations dans le plan principal montre donc globalement une répartition des sites selon un gradient de contamination des sédiments dans le sens positif de l'axe F1. Le premier axe sépare nettement le site de La Bassée (62) dont les sédiments sont fortement chargés pour les différents paramètres mesurés.

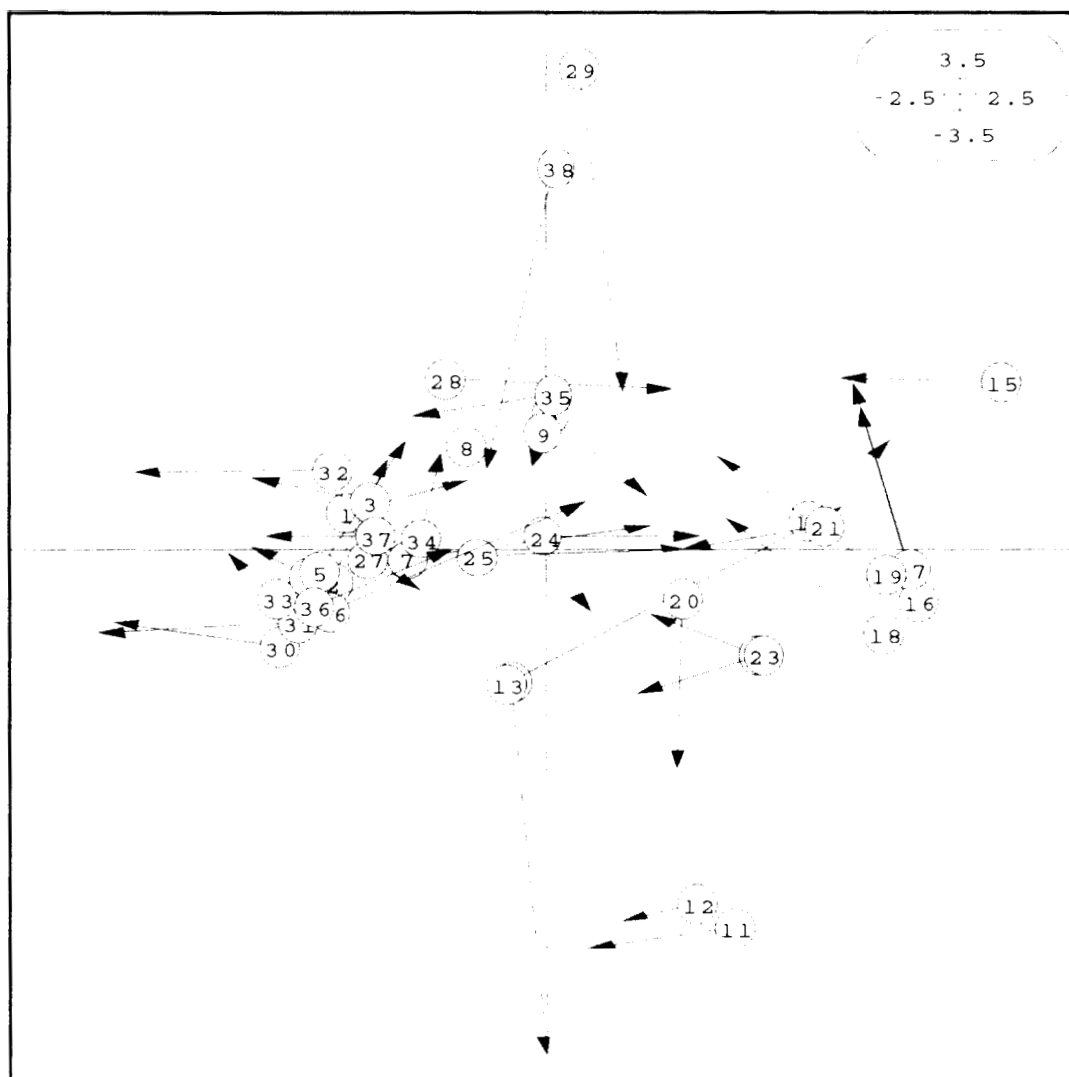


Figure 64. Projection simultanée dans le plan principal de l'analyse de co-inertie.

Le point portant une étiquette donne la position des sites vue **par** les données multiparamétriques du milieu.

Le point à l'extrémité de la flèche donne la position des sites vue **par** les données faunistiques.

La correspondance entre les sites et les numéros est donnée dans le tableau 51.

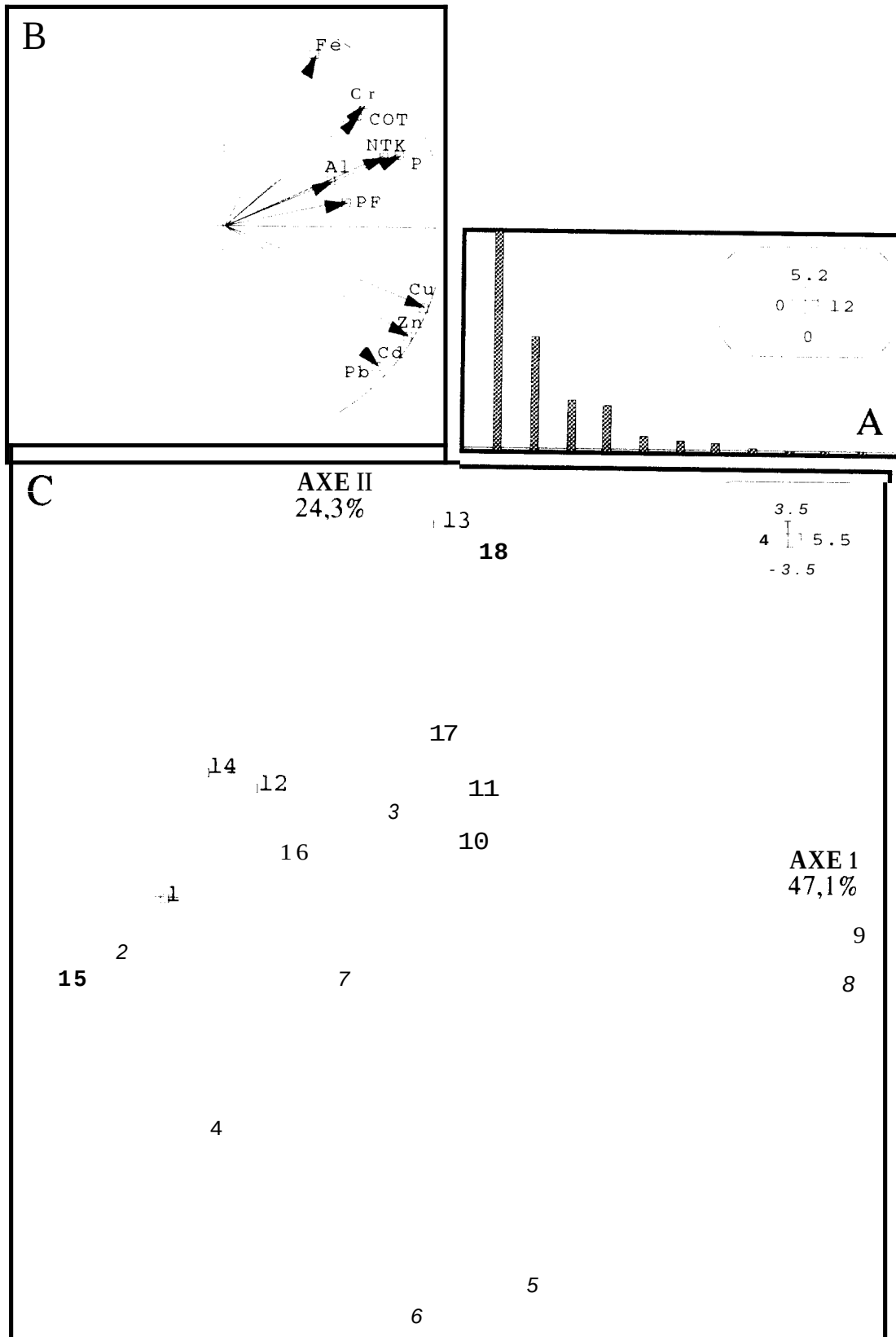


Figure 65. ACP centrée et réduite du tableau des teneurs métalliques et organiques des sédiments.
A: valeurs propres. **B:** cercle des corrélations. **C:** projection dans le plan principal.
 La correspondance entre les sites et les numéros est donnée dans le tableau 51.

Tableau 53. Matrices des corrélations entre les différents paramètres des sédiments.

	Al	Cd	Cr	Cu	Fe	Pb	Zn	NTK	P	COT	PF
Al	1.000										
Cd	0,182	1.000									
Cr	0,689**	0,116	1.000								
Cu	0,331	0,866**	0,389	1.000							
Fe	0,243	-0,151	0,807**	0,106	1.000						
Pb	0,319	0,870**	0,182	0,885**	-0,204	1.000					
Zn	0,233	0,918**	0,272	0,974**	0,011	0,892**	1.000				
NTK	0,058	0,361	0,456	0,537*	0,626**	0,185	0,500*	1.000			
P	0,297	0,354	0,583*	0,601**	0,515*	0,263	0,493*	0,743**	1.000		
COT	0,348	0,045	0,507*	0,360	0,494*	0,142	0,200	0,567*	0,615**	1.000	
PF	0,305	0,187	0,173	0,432	0,071	0,277	0,318	0,377	0,490*	0,591**	1.000

" * ": valeur significative (P<0.05)

" ** ": Valeur significative (P<0.01)

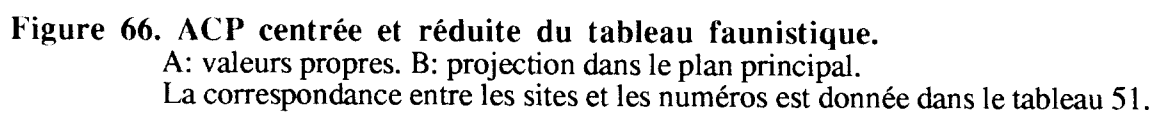
3.2.2.2. Analyse en Composantes Principales du tableau faune

L'ACP des données de macroinvertébrés benthiques a été réalisée sur un tableau de contingence de 18 observations x 27 taxons. Le diagramme des valeurs propres (figure 66A) montre l'importance de trois composantes. Le premier axe sépare les sites 77, 78 et 79 du canal de la Deûle dont les communautés benthiques sont fortement dominées par les moules zébrées (voir figure 66B) des autres sites. Le deuxième axe a tendance à séparer les sites canalisés du site 101 notamment du fait de la présence des taxons rhéophiles. La distribution d'abondance des 27 taxons sur la carte factorielle de l'ACP est présentée sur la figure 67.

3.2.2.3. Recherche d'une Co-inertie

L'analyse de co-inertie est exécutée sur le tableau croisé constitué des covariances entre l'abondance des taxons et la valeur des mesures des onze paramètres métalliques et organiques des sédiments. Le test de permutation (test de Monte-Carlo) montre que sur mille permutations aléatoires, 12 analyses de co-inertie (1,2%) donnent une inertie supérieure ou égale à celle mesurée qui a pour valeur 6,68 (figure 68). Ceci montre l'existence d'un lien entre les deux structures (existence d'une Co-structure) dont la signification est plus faible que celle décrite précédemment. Le diagramme des valeurs propres de l'analyse de Co-inertie (figure 69) révèle l'importance des deux premiers axes. La projection des axes d'inertie des ACP du milieu et de la faune sur les axes de co-inertie (figure 70A et B) montre **qu'ils** ne diffèrent que par une symétrie et une rotation simples. La carte des relevés positionnés par les teneurs métalliques dans les sédiments (figure 71B) est obtenue par symétrie et rotation de la carte d'ACP simple. Il en est de même pour la carte des relevés positionnés par la faune (figure 72B).

La direction que prennent les variables métalliques va du côté négatif du deuxième axe de l'analyse de Co-inertie (figure 71A). Les variables Pb, Cd, Cu et **Zn** se dirigent vers le côté négatif et les variables Fe, Cr et Al vers le côté positif du premier axe. La plupart des variables représentant les différents taxons sont orientées vers le côté positif du deuxième axe de co-inertie (figure 72A) et s'opposent aux *Chironomidae* (famille n°26). Les sites sont alors ordonnés selon un gradient croissant d'abondance des individus de la majeure partie des taxons vers le côté positif de l'axe II. Par contre, il existe une augmentation de l'abondance des *Chironomidae* vers le côté négatif de l'axe II. De la mise en relation des projections des variables et des taxons sur le plan principal de l'analyse de Co-inertie, plusieurs constatations émergent:



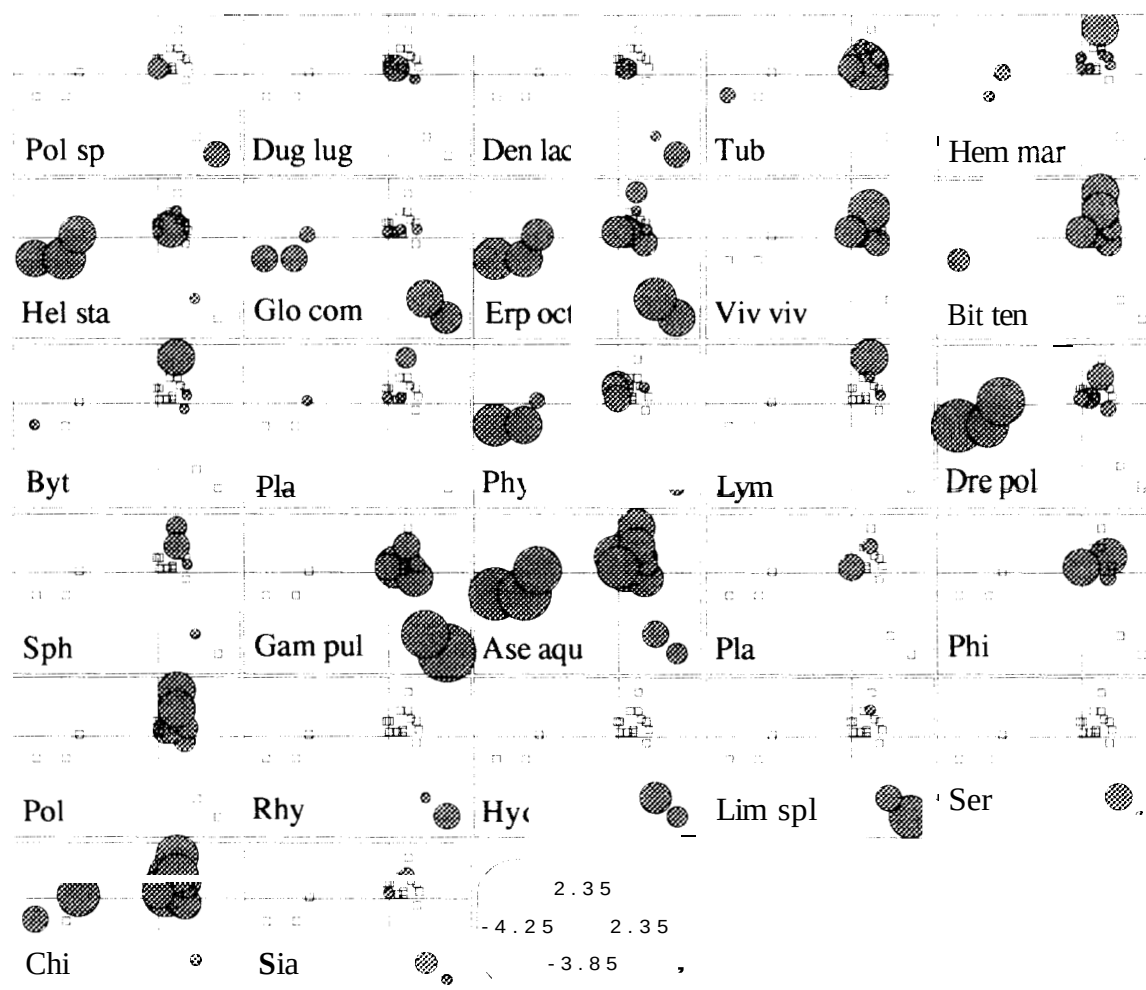


Figure 67. Distribution d'abondance des 27 taxons faunistiques sur la carte factorielle de l'ACP (Figure 66).

La correspondance entre les abréviations et les taxons est donnée dans le tableau 50.
Les carrés blancs correspondent aux sites (voir la correspondance avec la figure 57).
Les ronds *grisés* représentent l'abondance relative de chaque taxon.

Nombre de permutations effectuées: 1000 Inertie observée: 6.681173
 Histogramme: minimum = 1.916064, maximum = 7.999126
 nombre de simulations $X < \text{Obs}$: 988 (fréquence: 0.988000)
 nombre de simulations $X \geq \text{Obs}$: 12 (fréquence: 0.012000)

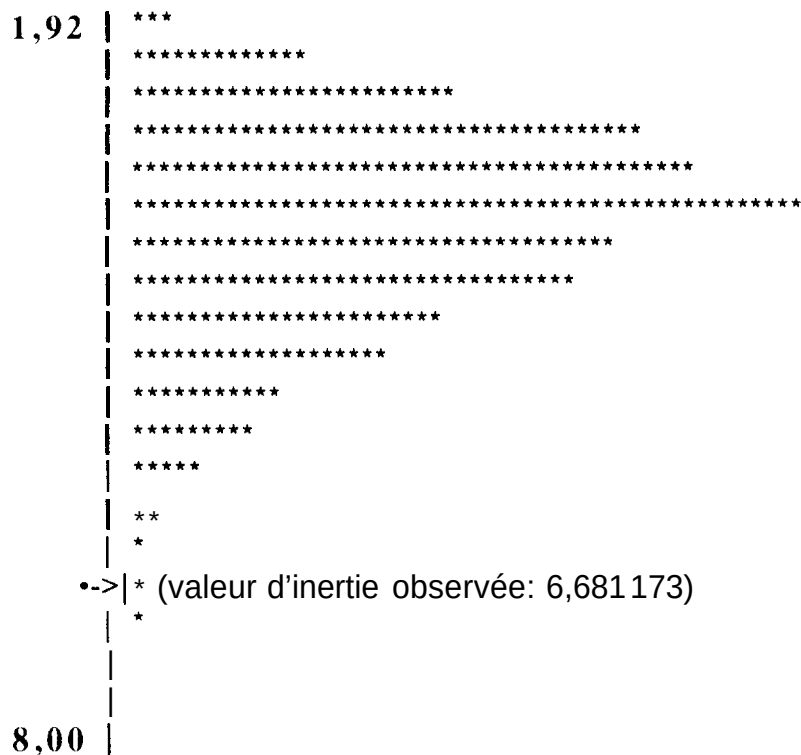


Figure 68. Résultat du test de Monte Carlo réalisé pour l'analyse de co-inertie II.
 Ce diagramme montre que la valeur d'inertie observée dans notre étude (6,68) est supérieure à celles obtenues par des permutations aléatoires (représentées par des étoiles) dans 98,8 % des cas.

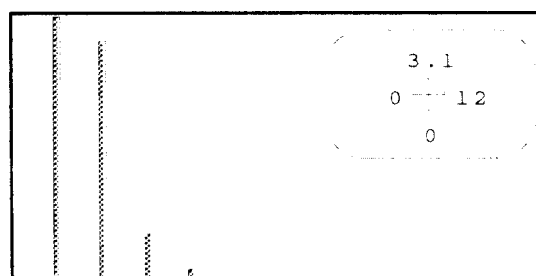


Figure 69. Diagramme des valeurs propres de l'analyse de co-inertie II.
 Ce diagramme montre l'importance des deux premiers axes dans l'analyse de Co-inertie. Ces axes expliquent la majeure partie des informations.

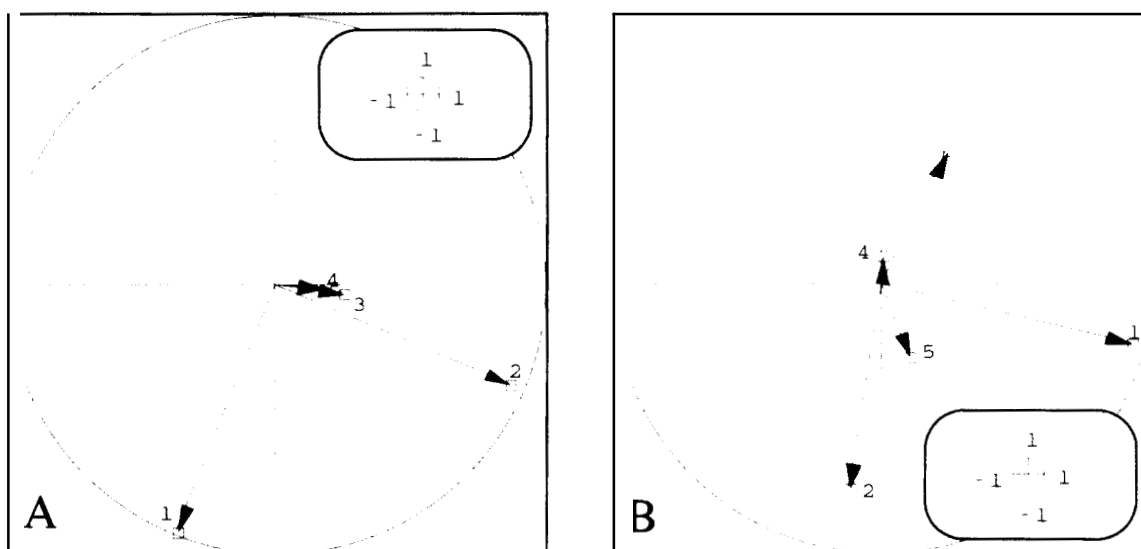


Figure 70. Projection des axes d'inertie des analyses séparées sur les axes de co-inertie. A: sédiments. B: faune

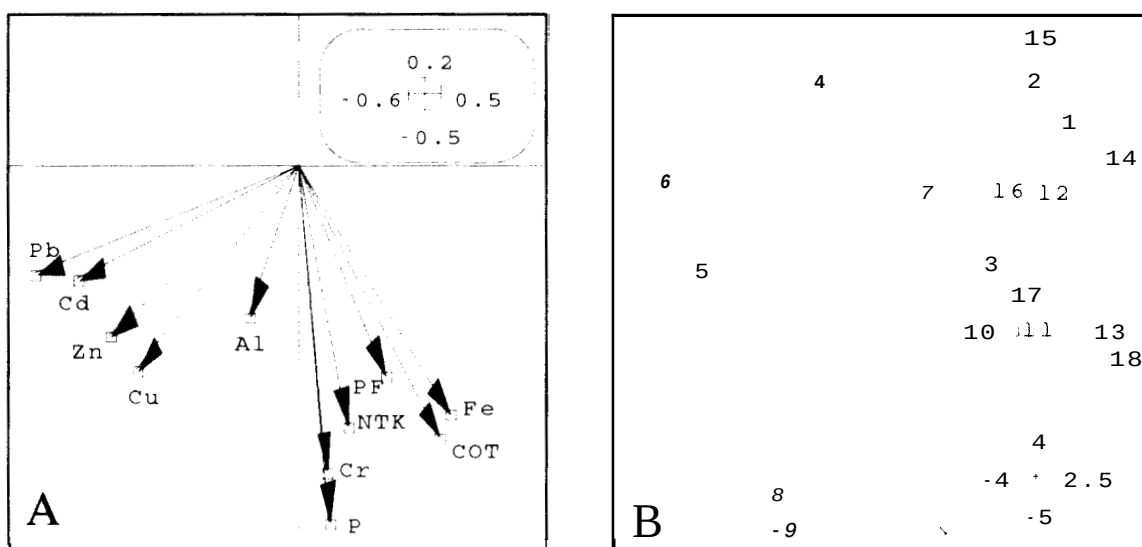


Figure 71. Projection du nuage de 18 points à 11 composantes dans l'analyse de co-inertie. A: représentation de la base canonique. B: nuage des relevés associés (voir tableau 51 pour la correspondance entre la numérotation et les sites).

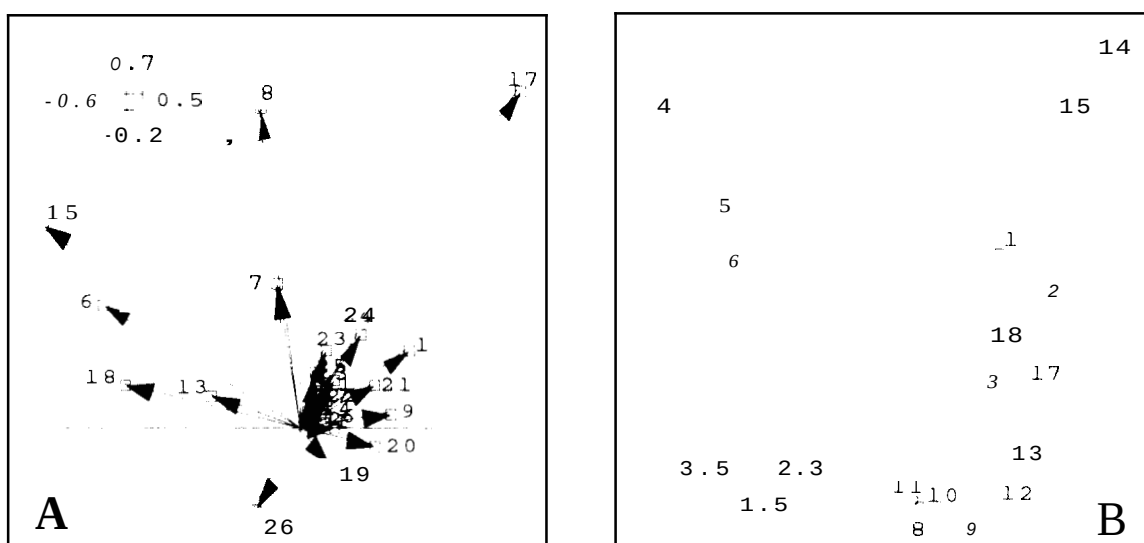


Figure 72. Projection du nuage de 18 points à 27 composantes dans l'analyse de co-inertie. A: représentation de la base canonique (voir tableau 50 pour la numérotation des taxons). B: nuage des relevés associés (voir tableau 51 pour la correspondance).

- il existe une opposition entre l'abondance des individus dans la plupart des taxons et l'augmentation de la charge métallique et organiques des sédiments.
- les abondances des *Gammaridae* (n°17) et des *Bithyniidae* (n°10) sont opposées de façon flagrante à la charge en Cd, Cu, Pb et Zn.
- l'abondance des sangsues *Erpobdella*, *Glossiphoni* et *Helobdella* (n°8, 7, 6), des aselles (n°18) et des *Dreissenidae* (n°15) sont opposées à la charge en Al, Cr Fe, TKN, COT et P.
- les *Chironomidae* (n°26) semblent être polluo-résistants, leur abondance semble augmenter avec une élévation des charges de composés métalliques et organiques dans les sédiments.

La projection des coordonnées standardisées des sites dues aux données de la faune et du milieu sur le même plan formé des axes I et II de co-inertie est présentée sur la figure 73. Sur cette projection dans le plan principal de l'analyse de co-inertie (figure 73), la position des sites obtenue par les données du milieu est entourée d'une étiquette, et leur position obtenue par les données de la faune est indiquée par la pointe de la flèche. Les flèches en général relativement courtes, montrent qu'il n'existe pas une grande différence entre l'ordre des sites dû aux données du milieu est celui dû aux données de la faune. Les sites 62 et 63 (n°8-9 et 10-11) **séparés** selon la qualité des sédiments sont semblables du point de vue des communautés de macroinvertébrés, les flèches sont dirigées vers la même zone. En général, cette carte factorielle nous montre plus de variations dues à la qualité des sédiments qu'à la composition des communautés de macroinvertébrés.

L'approche de l'effet de la qualité du milieu sur les communautés de macroinvertébrés benthiques par les analyses de Co-inertie démontre que les variables chimiques des sédiments et la composition faunistique des différents site étudiés sont significativement liées si nous considérons la Co-structure spatiale.

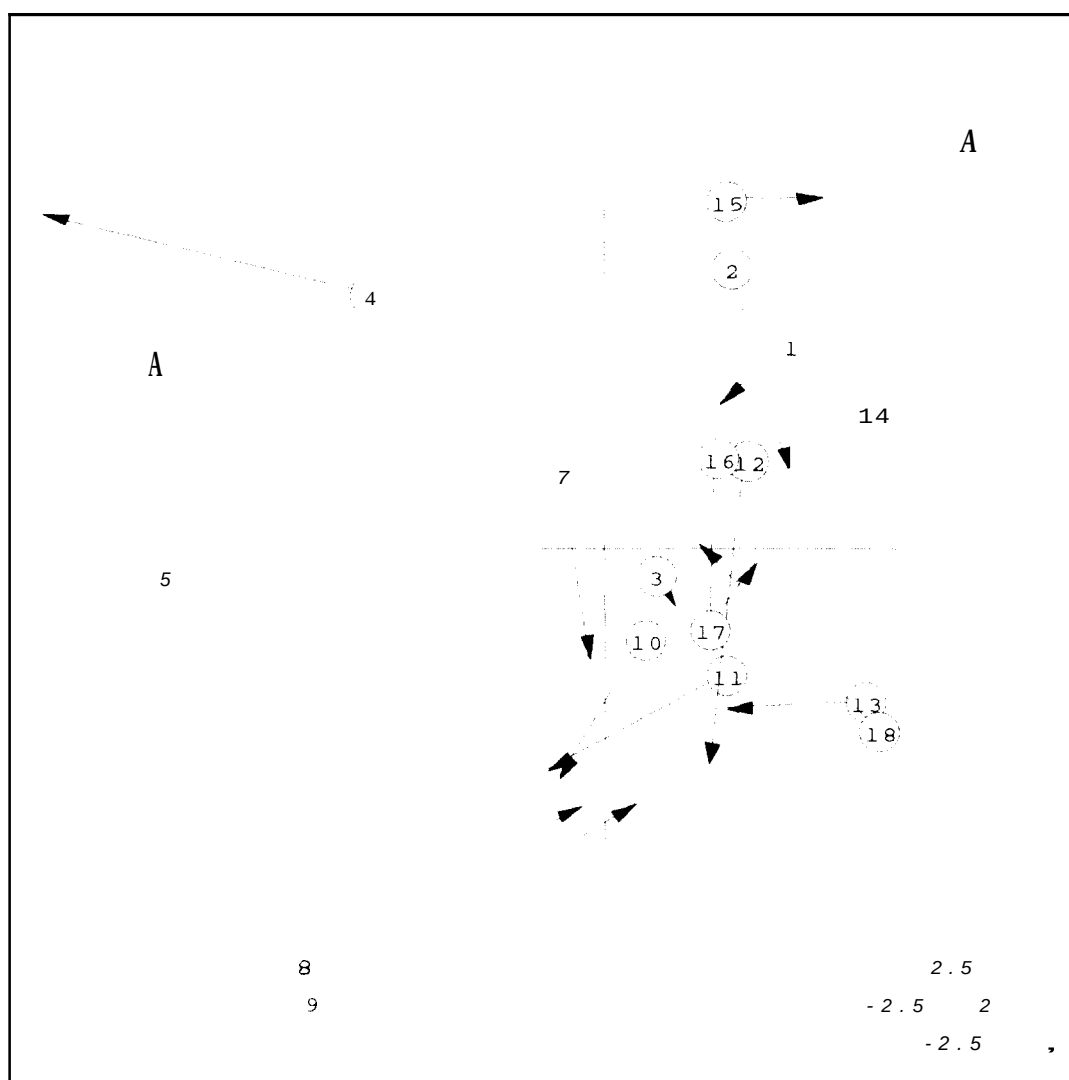


Figure 73. Projection simultanée dans le plan principal de l'analyse de Co-inertie.

Le point portant une étiquette donne la position des sites vue **par** les données multiparamétriques du milieu.

Le point à l'extrémité de la flèche donne la position des sites vue **par** les données faunistiques.

La correspondance entre les sites et les numéros est donnée dans le tableau 51.

4. Discussion et conclusion sur les études de terrain

Pour les raisons énoncées en tête de ce chapitre, la comparaison entre nos propres données et celles de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie, du Ministère de l'Environnement et, plus globalement, des normes actuellement en vigueur, a été réalisée immédiatement après la présentation de nos différents résultats. De même, la recherche d'éventuelles corrélations entre les résultats des analyses chimique et biologique a déjà été effectuée.

Nous n'insisterons donc ici que sur quelques faits marquants concernant les sites étudiés.

D'après les résultats obtenus par les dosages dans l'eau de métaux lourds, d'hydrocarbures et de PCB, et par la mesure des teneurs en métaux (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb et Zn) dans les sédiments, il apparaît que les sites présentent des teneurs métalliques très supérieures aux valeurs naturelles pour le Cd, Cr, Pb et Zn, ce qui traduit une contamination des sédiments.

Cette contamination est considérée comme significative **pour** l'ensemble des sites sauf ceux d'Ouve-Wirquin et de Férin (valeurs en deça de 5 fois les valeurs naturelles). La comparaison avec les normes d'épandage (AFNOR 44041) révèle qu'ils sont cependant tous impropres à l'épandage sur les terres riveraines.

Le long des différents cours d'eau étudiés, on constate que la pollution inégalement, notamment en Cd, Pb et Cu, augmente de Férin (46) à la Bassée (62) et Béthune (63). Ces deux derniers points représentent les sites les plus touchés par la contamination métallique d'après la comparaison aux valeurs naturelles des sédiments, aux normes limites d'épandage et aux valeurs de référence du Ministère de l'Environnement (1993). Les teneurs diminuent ensuite, au-delà de ces sites, mais restent cependant supérieures à celles des sites d'Ouve-Wirquin (101) et de Férin (46), considérés comme témoins relatifs dans le cadre de cette étude. A ce titre, selon les critères du Ministère de l'Environnement, les sédiments de Férin (46), Flers-en-Escrebieux (76), Ouve-Wirquin (101) et Le Guindal (104) sont classés en niveau 2 et les sédiments de La Bassée (62), Béthune (63) et Arques (105) en niveau 3.

Notons que pour une étude réalisée pour l'Agence de l'Eau Artois-Picardie (Grumiaux *et al.*, 1992), un test "Microtox" a été réalisé sur les sédiments des sites 46, 76, 62, 63, 105, 101 et 104. Ce test renforce les résultats obtenus par les précédentes analyses pour les sites de La Bassée et Béthune et prouve la forte toxicité de ces sédiments. Ajoutons que dans le cadre de la même étude, des teneurs d'hydrocarbures très élevées ont été mesurées dans ces deux mêmes sites (62 et 63).

En comparant des données obtenues sur les eaux, ces résultats révèlent que les sites d'Ouve-Wirquin, Férin, Flers-en-Escrebieux, Arques et Le Guindal, pourtant classés de très bonne qualité d'eau, (sur la base des teneurs en polluants métalliques uniquement) sont de qualité moindre pour les sédiments (cf. ci-dessus). Ce résultat tend à démontrer que le transfert des polluants métalliques et autres contenus dans les sédiments vers les eaux superficielles ne se fait que faiblement. Mais il ne faut pas oublier que les polluants adsorbés sur les particules sédimentaires peuvent être relargués dans les eaux lors d'une modification des paramètres physico-chimiques de l'eau (température, pH, dureté, salinité...) . Il est alors prudent de considérer les sédiments comme des polluants potentiels de l'eau. Il apparaît de ce fait indispensable de surveiller les deux compartiments eaux et sédiments pour une bonne appréciation de la qualité des sites.

L'analyse des métaux traces et des paramètres organiques des sédiments piégés, des sédiments prélevés au fond des cours d'eau ou de la fraction fine de ces derniers, a montré que, quel que soit le type de sédiment étudié, les conclusions sur le classement des sites en fonction de l'enrichissement et de la contamination des sédiments. Ces résultats montrent que les sédiments piégés peuvent, tout aussi bien que les sédiments profonds, être utilisés pour évaluer la qualité du milieu. Ils ont l'avantage de correspondre à une sédimentation récente, naturelle ou due à une remobilisation de sédiments anciens. En tout état de cause, ces sédiments représentent la couche superficielle sur laquelle vivent les macroinvertébrés benthiques. De plus, ils forment un échantillon moyen correspondant à toute la durée de piégeage de ces animaux.

A notre connaissance, une seule étude sur les communautés benthiques du Canal à Grand Gabarit du Nord de la France a été publiée à ce jour (Grumiaux et Dhainaut-Courtois, 1996). Notre étude donne une image caractéristique de la vie benthique de ce cours d'eau artificiel.

Lorsque, dans un cours d'eau, la collecte des macroinvertébrés benthiques est impossible à l'aide d'un filet à main pour des raisons de profondeur en particulier, les substrats artificiels offrent une méthode d'échantillonnage alternative (Rosenberg et Resh, 1982). C'est le cas dans les canaux du Nord de la France. Au cours de notre étude, nous avons perdu des substrats artificiels pour des raisons diverses (vandalisme, effet du passage des péniches...). La diminution de ce risque nécessite d'accrocher discrètement les substrats à la berge et d'en utiliser plusieurs (quatre dans notre étude). De plus, le nombre de pièges va permettre de récolter un nombre suffisant d'animaux dans le but de réaliser des études statistiques. Les substrats artificiels doivent être faciles à manipuler, peu coûteux mais efficaces. Les sédiments se déposent rapidement dans les logettes des substrats artificiels submergés. Ainsi les substrats contenant du sédiment, des tiges de phragmites, des surfaces solides lisses et rugueuses (plastique et béton) offrent aux invertébrés un excellent abri contre le courant et un bon habitat qui est rapidement colonisé lors de la période de piégeage. Nos substrats artificiels nous

ont permis de collecter des animaux endobenthiques (vers et chironomides), épibenthiques (asellidés ou gammaridés), pélagiques (amphipodes) ou vivant sur les plantes (gastéropodes).

A l'issue des inventaires faunistiques réalisés sur 9 points appartenant au canal à grand gabarit, 1 point du fleuve Aa et 3 points sur l'Aa canalisé, certaines constatations émergent :

- Les peuplements d'invertébrés reflètent le type de cours d'eau dans lequel ils s'établissent. En effet, à Ouve-Wirquin, de nombreuses espèces de trichoptères et des larves de simuliidés, espèces vivant dans les eaux claires et courantes, ont été capturées. Ces espèces sont absentes dans les canaux qui abritent plutôt des espèces de cours lent telles que les limnées, les planorbes, les chironomides, les aselles.
- Certaines espèces, dites indicatrices, vont refléter, **par** leur présence ou leur absence, la qualité du biotope. La notion d'espèce indicatrice est surtout utilisée pour la pollution de type organique.
 - Le crustacé amphipode *Gammarus pulex*, espèce saproxyène (vivant en milieu pauvre en matière organique), fréquente surtout les eaux claires et bien oxygénées (zones de B-mésosaprobie). Il est rencontré en abondance sur les sites de Férin et d'Ouve-Wirquin qui sont peu ou pas contaminés par les métaux lourds mais dont les eaux présentent les plus fortes teneurs en oxygène dissous et les plus fortes saturations en oxygène des sept sites étudiés (tableau 12). Ces crustacés, plus sensibles que les aselles notamment au zinc et à l'acidité du milieu (Naylor *et al.*, 1990), disparaissent sur les autres sites alors que les aselles sont encore présentes.
 - Le crustacé isopode *Asellus aquaticus*, espèce saprophile, est rencontré dans les eaux calmes riches en matières organiques dont il se nourrit. Cette espèce, relativement tolérante à la pollution, se trouve généralement dans les eaux de qualité médiocre (mésosaprobies α et β). Il est présent dans tous les sites en plus ou moins grande abondance. A La Bassée (site 62), les aselles, bien que tolérantes, sont en très faible quantité, ce qui traduit la très mauvaise qualité de ce site (biotope toxique).
 - Le mollusque gastéropode *Bithynia tentaculata* (saproxyène à saprophile) est présent dans des eaux oligosaprobies et mésosaprobies α . Ce gastéropode a été rencontré en abondance dans les eaux d'Arques et du Guindal qui présentent une faible pollution organique. Il est également présent à Béthune, Flers-en-Escrebieux et Fénin mais en plus faible abondance, fait certainement dû à une plus forte teneur en matière organique que dans les deux sites précédents.

- *Birhynia tentaculata* est absent sur le site d'Ouve-Wirquin. **Par** contre, quelques trichoptères saproxènes (*Anabolia sp.*, *Hydropsychidae*, *Limnephilidae* et *Rhyacophilidae*) présents dans les eaux de ce site montrent que la pollution organique y est faible.
- De nombreux oligochètes tels que les *Tubifex* et les *Limnodrilus* sont polluo-résistants. Leur prolifération peut parfois être attribuée à un type particulier de pollution. Cependant, le **type** de substrat est également un facteur important quant à la colonisation par ces annélides (Lafont, 1989). Certaines espèces sont très résistantes aux pollutions causées par les eaux usées urbaines et leur présence va de pair avec la disparition d'autres espèces aquatiques. En ce sens, dans le cas de La Bassée, le peuplement est composé essentiellement d'oligochètes de la famille des *Tubificidae* (oligochètes saprophiles ou saprobiontes), témoins d'un milieu riche en matière organique (mésosaprobe à polysaprobe).
- Les larves de chironomes affectionnent les eaux calmes, souvent riches en matières organiques. Ce groupe n'est pratiquement pas représenté à Ouve-Wirquin (101) qui est non seulement un site à cours rapide, mais qui présente également les plus faibles taux de matières organiques. Par contre, dans les canaux où les teneurs en matières organiques augmentent, ce taxon (en particulier l'espèce saprophile *Chironomus plumosus*) apparaît et prolifère sur les sites de La Bassée et de Béthune qui possèdent les plus fortes teneurs en NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , NTK et PO_4^{3-} (Tableau 12).
- La diversité et la densité du peuplement sont en relation avec la qualité du biotope. Quand cette qualité est mauvaise, la diversité est moins grande et quelques espèces résistantes qui n'entrent plus en compétition avec d'autres espèces sensibles vont proliférer. C'est le cas du site de La Bassée (site dont les sédiments ont les plus fortes teneurs en métaux, en hydrocarbures et en pesticides, et dont les eaux sont de mauvaise qualité) où l'on rencontre principalement 2 groupes taxonomiques: les chironomes et les oligochètes. Le nombre d'individus totaux capturés à La Bassée et Béthune est plus faible que sur les autres sites. En ce sens, Occhiogrosso *et al.* (1979) ont montré qu'il existerait une relation de cause à effet entre les concentrations métalliques dans les sédiments et la densité de population. Cependant, il faut souligner que la pollution métallique ne peut être mise seule en cause dans la perturbation des populations d'invertébrés benthiques car nous avons vu qu'il y avait aussi une forte contamination par les hydrocarbures, les PCB et les pesticides (Grumiaux *et al.*, 1992). D'autres pollutions (organiques, chimiques, thermiques...) jouent également des rôles non négligeables sur l'équilibre des peuplements dulçaquicoles.

Brownlow et Bolan (1994) ont conclu que l'absence d'éléments structuraux tels que des macrophytes ou des branches d'arbres submergées dans les cours d'eau alluviaux de la Caroline du

Nord limite la diversité des niches pour de nombreux types de macroinvertébrés. Dans notre étude, la richesse spécifique des mollusques est faible (quatre espèces) dans le site de bonne qualité de Férin (46) et dans la plupart des sites du Canal à Grand Gabarit. Cette richesse est plus élevée (treize espèces) dans les sites de moins bonne qualité de l'Aa canalisé mais où nous avons noté la présence de macrophytes (*Phragmites australis*, *Acorus calamus*, *Sagittaria sagittifolia*, *Nuphar lutea*, *Lemna sp.*) (Thieffry, 1992) qui sont absentes dans le Canal à Grand Gabarit. L'absence de végétation macrophytique est certainement en partie responsable de la diminution des diversités des macroinvertébrés et en particulier des herbivores.

Les fonds des bords des canaux sont composés de sédiments meubles ou compacts, de pierres plus ou moins grosses et sont pauvres en habitats. Mais l'absence de niches et de végétation supérieure ne sont pas responsables en totalité des variations de la diversité le long du canal. Occhiogrosso *et al.* (1979) ont remarqué que la densité en macroinvertébrés diminuait dans une crique qui recevait les effluents d'une fonderie dans la rivière Hudson aux USA et dont les sédiments étaient fortement chargés en cadmium et en nickel. Rutherford and Mellow (1994) ont conclu qu'un site minier abandonné en Ontario (Canada) continuait à avoir des effets marqués dûs aux effluents acides et métalliques. Bournaud *et al.* (1984) ont montré que la perturbation due à la pollution organique dans un cours d'eau à proximité de Lyon provoquait une diminution de la diversité et une augmentation de la dérive des insectes émergents. Ainsi les polluants organiques et métalliques pourraient être impliqués dans le changement des communautés benthiques le long du canal. Nous pouvons noter également que la régulation et la canalisation des cours d'eau sont bien connus pour affecter sévèrement la composition spécifique des communautés d'invertébrés (Jespersen, 1990). Au cours de cette étude, nous avons également mesuré les polluants organiques et métalliques dans les sédiments. Il semble que les sites dans lesquels la diversité est la plus faible et le réseau trophique des macroinvertébrés très altéré présentent les plus fortes contaminations. Ceci est particulièrement vrai pour les sites situés dans le bassin minier et spécialement au niveau de La Bassée (site 62) où les sédiments présentent une sérieuse contamination (métaux traces, polluants organiques, hydrocarbures).

Les gammares, bien représentés dans les sites 46 et 101 disparaissent dans les autres sites, tandis que les aselles sont observées dans tous les sites. Bij de Vaate (1995) a conclu que l'absence de gammaridés dans la rivière Meuse n'était pas due à l'absence d'habitat souhaitable, mais que la matière organique pouvait être un facteur important auquel ces crustacés sont sensibles. Les gammares sont également sensibles au cadmium (Brown et Pascoe, 1988). Les habitats étant relativement analogues le long du canal à Grand Gabarit, la disparition des gammares est certainement causée par la pollution environnementale. Les aselles étant plus tolérantes aux toxiques que les gammares (Naylor *et al.*, 1990) peuvent être trouvées dans les sites pollués (ex. sites 62 et 63).

L'approche de l'évaluation de la qualité des cours d'eau à l'aide des indices biocénétiques a montré que la qualité du canal d'Aire (sites 62 et 63) et du canal de la Deûle (sites 77-78-79-80) était médiocre. Les valeurs des IQBP* obtenues d'après les collections réalisées avec nos substrats artificiels sont semblables à celles données par le SEMA (voir Introduction). Les indices des IB*, des IQBP*, des IBGN* et des scores ASPT* sont corrélés négativement aux valeurs des teneurs en Cd, Cu, Zn et Pb. Les charges en COT, NTK et P semblent n'avoir aucune influence sur les valeurs de ces indices. Dans la région Nordpas-de-Calais, la contamination métallique est tellement importante qu'elle pourrait alors masquer l'effet des paramètres organiques des sédiments sur la macrofaune benthique. Il ne faut cependant pas oublier que la qualité de l'eau est également un facteur important.

Les analyses de Co-inertie nous ont montré qu'il existait une Co-structure entre la répartition des macroinvertébrés et les teneurs en métaux, en carbone, en azote et en P des sédiments. La présence et la répartition des macroinvertébrés semblent fortement influencées par la qualité des sédiments. Les Gammaridés et les Bithyniids semblent sensibles aux fortes teneurs en Cd, Cu, Pb et Zn. Les sangsues *Erpobdella*, *Glossiphoni* et *Helobdella*, ainsi que les aselles et les moules zébrées semblent sensibles aux fortes teneurs en Al, Cr et Fe mais aussi aux fortes charges en NTK, COT et P, mais seraient peu affectées par les teneurs en Cd, Cu, Pb et Zn. Les abondances des Tubificidés et des Chironomidés semblent croître avec l'augmentation des charges métalliques et organiques dans les sédiments. Concernant les métaux, nos observations sont en accord avec les données bibliographiques sur la polluosensibilité des macroinvertébrés regroupées par l'Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse (1987).

Nous notons l'absence ou la rareté des macroinvertébrés sensibles à la qualité de l'eau (éphémères, trichoptères, dysticidés, odonates et plécoptères) surtout au niveau du Canal à Grand Gabarit. Les plécoptères qui sont présents au niveau de la source non polluée de la rivière Souchez dans le Nord de la France (Dehay *et al.*, 1994), et également dans des mares du Valenciennois (Demuynck, communication personnelle), sont absents des sites étudiés.

II. LA METALLOTHIONEINE DE GARDON

Nous avons vu dans la première partie de ce chapitre que la qualité des cours d'eau pouvait être déduite d'analyses physico-chimiques des eaux et des sédiments et également des structures des communautés de macroinvertébrés benthiques. Nous avons exposé au cours de l'introduction de ce travail qu'une autre grande voie de la détermination de cette qualité est l'utilisation de marqueurs biochimiques d'exposition. Pour des raisons expliquées antérieurement (voir introduction), nous avons choisi d'étudier la métallothionéine en tant que biomarqueur de la pollution par certains métaux traces. L'espèce retenue est le gardon (*Rutilus rutilus*) car il est abondant dans les cours d'eau lents de la région et notamment dans les canaux. Nous avons caractérisé cette protéine d'un point de vue biochimique afin de permettre son utilisation ultérieure en tant qu'indicateur de contamination.

Les travaux antérieurs réalisés dans le Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie par Benounna (1990) et Roig (1991) ont montré qu'à la suite d'injections intrapéritonéales de solution de chlorure de cadmium chez le gardon, le métal était principalement associé à un ou plusieurs composés de masse moléculaire moyenne (10 à 15 kDa) lors d'une analyse par chromatographie de filtration sur gel en basse pression d'extraits solubles de foie.

Lorsque nous avons repris les travaux, nous nous sommes aperçus que dans le cas des doses de cadmium utilisées par ces auteurs, l'accumulation du métal dans l'animal était faible et difficilement détectable par **SAAF**. Nous avons donc décidé d'intoxiquer les gardons avec des doses plus élevées et en combinant deux métaux: le zinc et le cadmium.

D'après les données exposées dans l'introduction, le cadmium déplacerait le zinc au niveau des métallothionéines. Le zinc ainsi libéré et le cadmium induiraient la synthèse des métallothionéines. Nous avons utilisé un mélange de zinc et de cadmium pour plusieurs raisons:

- le zinc et le cadmium vont induire la synthèse des métallothionéines,
- le cadmium va permettre de détecter la présence de protéines capables de fixer ce métal non essentiel,
- la présence de protéines fixant à la fois le zinc (métal essentiel) et le cadmium (métal toxique) va nous permettre de confirmer l'existence de protéines de détoxication.

1. Préparation de la métallothionéine hépatique

Comme nous l'avons précisé dans le chapitre "matériels et méthodes", la préparation de la métallothionéine a été réalisée à partir de foies de gardons intoxiqués expérimentalement par des injections de Cd et de Zn selon un protocole dérivé de celui utilisé par Hamilton et Mehrle (1987) pour

induire la métallothionéine de truite et par Hogstrand et Haux (1990) pour induire la métallothionéine de perche. Les gardons ont été intoxiqués par des injections dans la cavité intrapéritonéale de solutions de concentrations croissantes de Cd et de Zn (dose totale de 3mg de Cd et 30 mg de Zn / kg de poids frais). Ces doses utilisées étaient des doses maximales permettant de détecter facilement les protéines fixatrices du Cd et du Zn et d'induire une quantité élevée de protéines tout en ayant un pourcentage de survie des gardons supérieur à 70% lors de l'intoxication.

1.1. Fractionnement de l'extrait hépatique soluble de gardon

Les foies des gardons ont été prélevés trois jours après la dernière injection et broyés au Polytron en présence de deux volumes de tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8,6. Le surnageant obtenu par centrifugation, chauffage et ultracentrifugation, filtré sur un support 0,22 μ m a été soumis à une chromatographie de filtration sur gel sur une colonne Superdex 75. Deux ml d'extrait hépatique sont séparés à chaque chromatographie. Le résultat de cette séparation est illustré par la figure 74. Le profil d'élution des fractions chromatographiées à 254 nm révèle 5 pics protéiques majeurs notés I, II, III, IV et V. Le profil donné par la lecture à 280 nm ne montre que 4 pics majeurs correspondant aux pics I, II, IV et V précédemment cités. Nous notons donc l'existence d'un pic protéique (pic III) ayant une forte absorbance à 254 nm et une faible absorbance à 280 nm. Les composés constituant ce pic ont des comportements spectrométriques semblables à ceux décrits pour les métallothionéines. Le premier pic (1), relativement fin, comportant des composés de masse moléculaire élevée (supérieure à 67 kDa), correspond à la limite supérieure d'exclusion du gel utilisé. Les pics II et III sont constitués de molécules de masse moléculaire comprise entre 25 et 13,7 kDa d'après une droite de calibration obtenue par passage de témoins de masse moléculaire connue. Les pics IV et V sont composés de molécules de masse moléculaire faible et très faible (< 8 kDa).

Le dosage des métaux révèle la présence de pics de zinc de faible importance au niveau des pics protéiques I et II. Les pics majeurs de Zn et de Cd coïncident avec le pic III qui contient des molécules absorbant à la longueur d'onde de 254 nm mais non à 280 nm. Un pic de cuivre de très faible amplitude coïncide également avec le pic III. Ces molécules associées à du Zn, du Cd, et du Cu, sont éluées à un volume d'élution voisin de celui du standard de masse moléculaire 13,7 kDa.

Le dosage des groupements sulfhydryles à l'aide du réactif DTNB a montré la présence de cinq pics. Les deux premiers et les deux derniers pics correspondent aux molécules éluées au niveau des pics I, II, IV et V. Le pic majeur de SH coïncide avec le pic III.

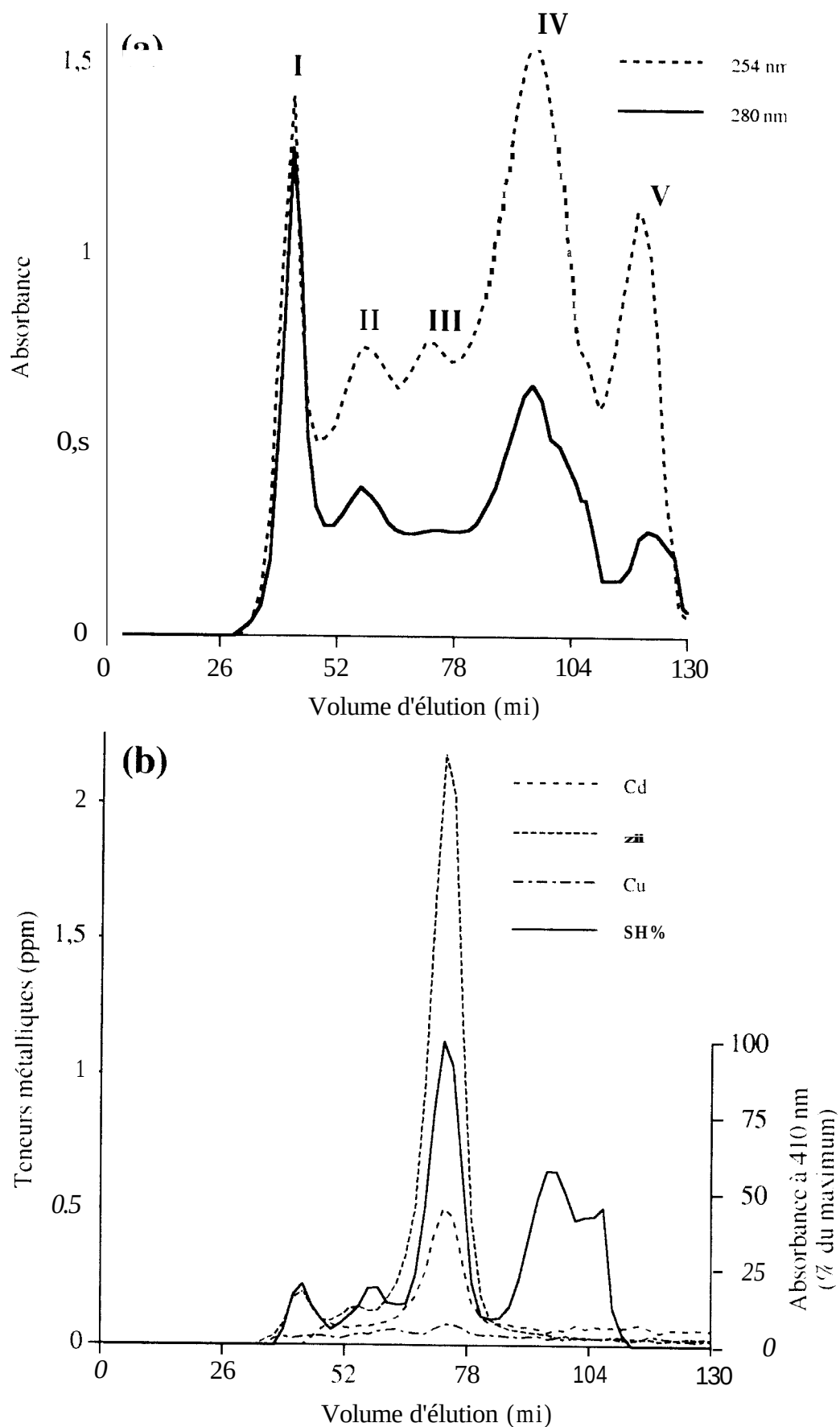


Figure 74 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons (*Rutilus rutilus*) intoxiqués au cadmium et au zinc par injection intrapéritonéale. Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8.6; débit 1 ml/min. (a):profil d'absorbance, (b):profil d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

Les principales caractéristiques spectrométriques des métallothionéines est la forte absorbance à 254 nm de la Cd-thionéine (due à la liaison Cd-SH) et la faible absorbance à 280 nm (due à l'absence d'acides aminés aromatiques). De plus, sachant que la liaison métal-thionéine est réversible (Kagi et Norberg, 1979), nous avons utilisé ces propriétés pour vérifier la présence de métallothionéines dans les fractions correspondant au pic III. Trois aliquotes du pic III ont été réalisées. Du Cd en solution a été ajouté dans la première afin de saturer les MT. La deuxième a été acidifiée (pH 2 environ) par de l'acide chlorhydrique. Du tampon Tris/HCl a été additionné au troisième. Les volumes ajoutés aux trois aliquotes étaient équivalents pour conserver les mêmes concentrations protéiques. Afin d'étudier le comportement spectrométrique des protéines du pic III dans l'IV, l'absorbance de 190 à 300 nm des trois aliquotes a été mesurée au spectrophotomètre. Les spectres sont présentés sur la figure 75. Nous observons une augmentation de l'absorbance à 254 nm après ajout de Cd et une diminution après ajout d'acide par rapport à l'absorbance du produit natif. Ces observations reflètent donc la présence de métallothionéine au niveau du pic III.

Le pic III correspond alors à des molécules riches en groupements sulfhydriles, possédant une forte teneur en Zn et Cd, absorbant à la longueur d'onde de 254 nm mais pas à 280 nm et ayant une masse moléculaire apparente proche de 13,7 kDa. L'ensemble de ces faits font partie des caractéristiques propres aux métallothionéines. Seule la masse moléculaire apparente élevée pourrait mettre en doute l'existence de métallothionéine mais nous avons vu dans l'introduction que ces protéines pouvaient avoir une masse moléculaire apparente plus élevée que la masse moléculaire réelle à cause de leur structure tertiaire particulière.

La séparation d'un extrait hépatique de gardons non-intoxiqués par chromatographie de filtration sur gel ne révèle aucun pic de protéines riches en résidus sulfhydriles et en métaux dans la zone d'élution correspondant au pic III (figure 92). Ce résultat montre donc que les protéines riches en -SH associées au Cd et au Zn sont induites par ces métaux.

L'addition de β -mercaptoéthanol (agent réducteur rompant les ponts disulfures) dans le tampon d'élution a été essayée dans le but de vérifier si les protéines fixatrices des métaux étaient polymérisées. Aucun effet sur la position d'élution de ces protéines n'a été constaté (résultats non-présentés), ce qui semble indiquer que la masse moléculaire apparente n'est pas due à une polymérisation par la formation de ponts disulfures.

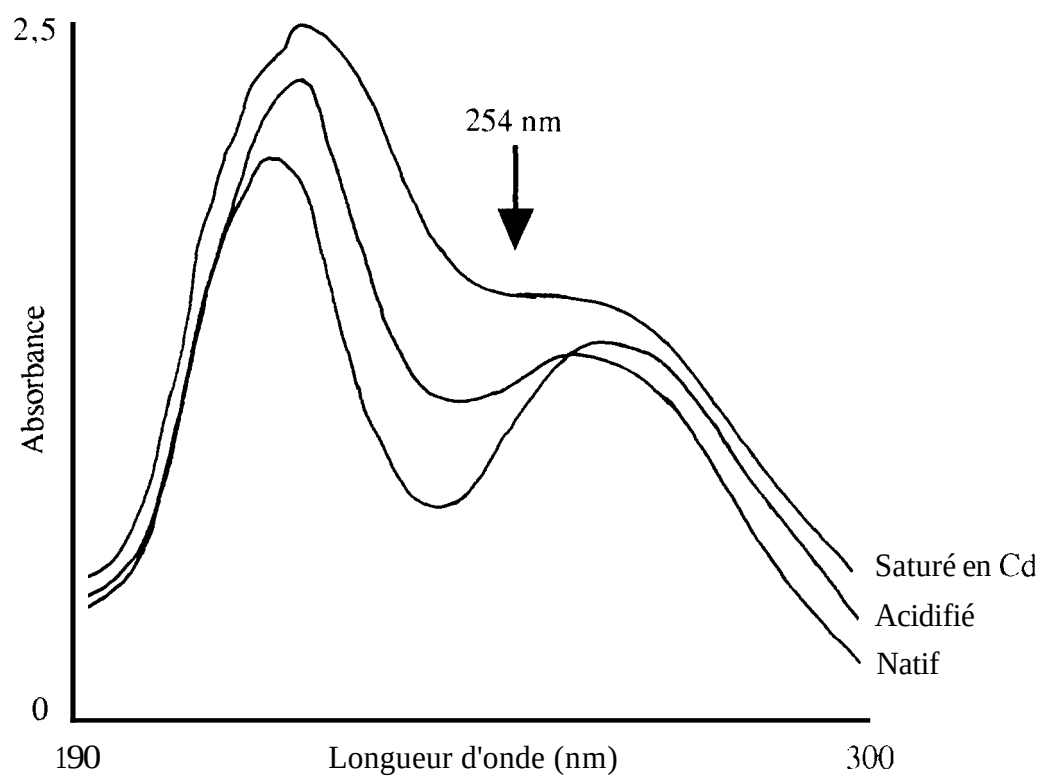


Figure 75. Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre de 190 à 300 nm des fractions contenant les protéines fixatrices de métaux (pic III) obtenues par chromatographie de filtration sur gel. La lecture a été réalisée sur le matériel natif, acidifié et saturé en Cd.

1.2. Fractionnement du pic III

Les fractions riches en Cd, Zn, et **SH** du pic III (fractions 17 à 21) provenant soit de deux soit de quatre chromatographies de filtration sur gel ont été regroupées et déposées sur une colonne échangeuse d'ions (Mono-Q) équilibrée avec le tampon des échantillons (Tris/HCl 10 mM, pH 8,6). La colonne a ensuite été élue par un gradient discontinu de NaCl dans le tampon. Le résultat de cette séparation, illustré par la figure 76, montre la présence de 3 pics majeurs absorbant à 254 nm (IIIA, IIIB, IIIC). Les deux premiers pics sont nettement séparés lors de l'isocratie à 0,03 M de NaCl dans le tampon. Le pic IIIA qui présente une absorbance forte à 254 nm mais faible à 280 nm coïncide avec des pics importants de Zn, de Cd, et de **SH**. Du cuivre est également détecté au niveau du pic IIIA. Les protéines du pic IIIC sont décrochées par le tampon contenant 1 M de NaCl. Ces molécules sont associées à une faible quantité de Zn et de groupements sulfhydriles. Le sommet de ce pic correspond à des molécules pigmentées. Les protéines du pic IIIB ne sont **pas** associées aux métaux.

1.3. Fractionnement du pic IIIA

Après avoir séparé la métalloprotéine par sa masse et par sa charge ionique, nous avons effectué une dernière étape de purification en HPLC sur colonne de phase inverse. Cette étape permet d'éliminer les derniers contaminants et de séparer les isoformes éventuelles par leur différence d'hydrophobicité. La colonne de chromatographie de type C8 utilisée est équilibrée avec de l'eau acidifiée à l'acide trifluoroacétique. Les fractions riches en Cd, Zn, et **SH** (pic IIIA), provenant du fractionnement par échange d'anions sont regroupées et déposées sur la colonne. Celle-ci a ensuite été élue avec un gradient continu d'acétonitrile. Du fait de l'environnement acide qui favorise le décrochement des métaux, les concentrations métalliques n'ont pu être déterminées dans les fractions. Les métallothionéines ont été détectées par la mesure des groupements sulfhydriles après concentration des échantillons au Speed Vack afin d'éliminer le TFA et l'acétonitrile.

La figure 77 montre un profil d'élution typique du pic III **A**. Deux pics protéiques majeurs sont détectés. Ces deux pics nommés MTG1 et MTG2 (MTG pour MétalloThionéine de Gardon) sont élués respectivement à 28,8 et 30,9 % d'acétonitrile et ne présentent pas d'absorbance à 254 nm. L'utilisation du DTNB permet de révéler que ces protéines pures possèdent des groupements sulfhydriles. Il semblerait que ces deux protéines soient deux isoformes de la métallothionéine hépatique de gardon. Une caractérisation plus approfondie devrait permettre de vérifier cette hypothèse. Des pics mineurs élués avant les pics MTG1 et MTG2 présentent une absorbance à 254 nm. Les protéines associées à ces pics possèdent également des groupements sulfhydriles. Il semble **que** plus le stockage (-20°C) des fractions obtenues par échange d'ions est long, plus ces pics deviennent importants **ai** détriment des pics MTG 1 et MTG2. Ces protéines pourraient donc être des produits de dégradation ou d'oxydation des protéines MTG1 et MTG2.

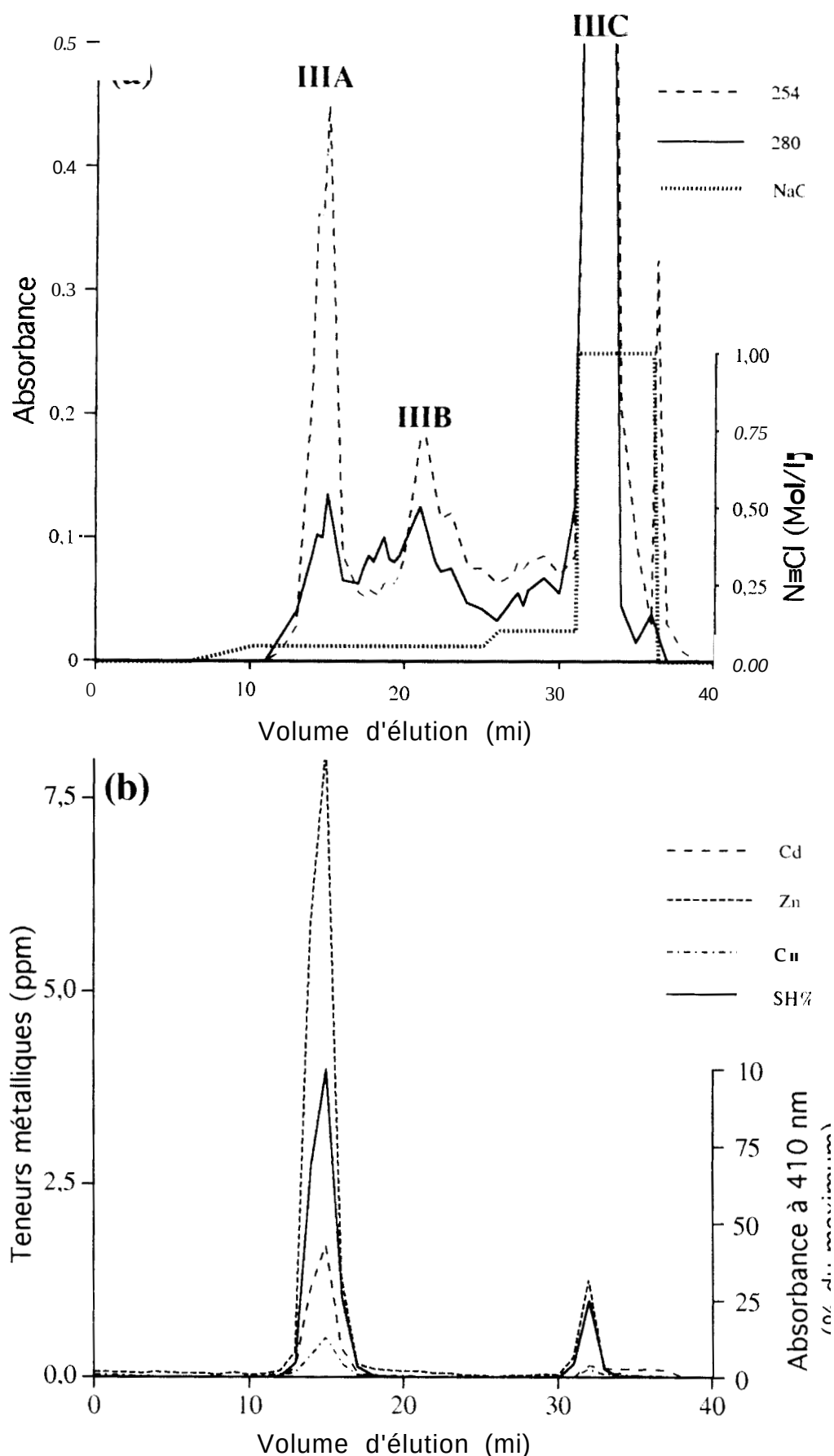


Figure 76 . Chromatographie échangeuse d'ions des fractions contenant les protéines fixatrices de métaux, riches en groupements SH, obtenues après la chromatographie de filtration sur gel. Les fractions du pic III ont été rassemblées et chromatographiées sur une colonne Morio-Q en FPLC. Les protéines ont été éluées par un gradient discontinu de NaCl. (a): profils d'absorbance, (b): profils d'élution du Cd, du Zn, du Cu et des -SH.

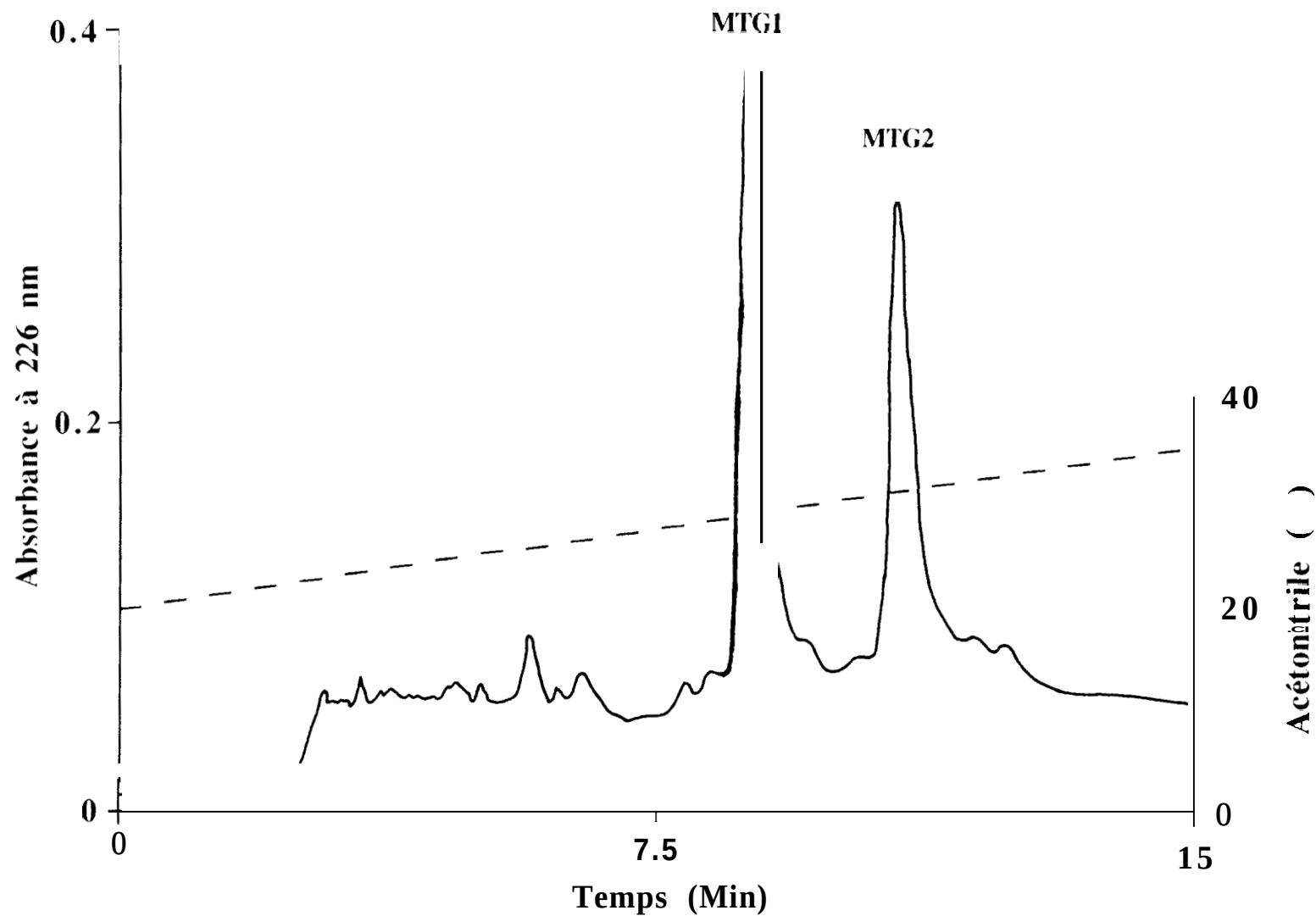


figure 77. Séparation par RP-HPLC des fractions contenant les métalloprotéines obtenues après la chromatographie d'échange d'anions. Les fractions du pic IIIA ont été rassemblées et chromatographiées sur une colonne C8 de phase-inverse équilibrée dans de l'eau/TFA. Les protéines ont été éluées par un gradient linéaire d'acétonitrile (20 - 35%) à 1ml/min.

D'après les différentes étapes de purification, les caractéristiques des métallothionéines peuvent se résumer aux points suivants:

- elles sont inductibles par le Cd et le Zn,
- elles fixent le Cd et le Zn,
- elles possèdent de fortes teneurs en groupements sulfhydriles,
- elles présentent une absorbance à 254 nm caractéristique des liaisons métalliques avec les SH,
- en milieu acide, elles ne présentent plus d'absorbance à 254 nm du fait du décrochement des métaux

2. Caractérisation de la métallothionéine hépatique

Nous avons caractérisé la métallothionéine hépatique du gardon en étudiant les formes oxydées de MTG1 et MTG2, leurs comportements électrophorétiques ainsi que leur point isoélectrique. Une caractérisation plus approfondie de MTG1 a été réalisée en déterminant sa masse moléculaire et sa structure primaire.

2.1. Etude des formes oxydées de MTG1 et MTG2.

L'oxydation de MTG1 et MTG2 a été réalisée en utilisant du peroxyde d'hydrogène (30%) à raison de 60 μ l / ml d'échantillon pendant 15 min. Juste après l'oxydation, les formes oxydées ont été séparées par chromatographie de phase inverse sous les conditions utilisées précédemment. Dans le but de comparer les temps de rétention entre les formes oxydées et les formes natives, MTG1 et MTG2 non oxydées ont également été séparées selon les mêmes conditions. Les profils d'élution sont présentés sur les figures 78 et 79. La forme native de MTG1 est éluée à 9 min, ce qui correspond à 29% d'acétonitrile (figure 78a), alors que la forme oxydée est éluée à 7,7 min (27,7 % d'acétonitrile). La différence d'hydrophobicité est beaucoup plus importante entre la forme native (figure 79a) et la forme oxydée de MTG2 (figure 79b). MTG2 native est éluée à 10,9 min (30,9 % d'acétonitrile) alors que MTG2 oxydée est éluée nettement plus tôt à 4,82 min (24,82 % d'acétonitrile). Cette étude de l'oxydation de MTG1 et MTG2 a permis de montrer que ces deux protéines sont différentes et que l'une n'est pas le produit de l'oxydation de l'autre.

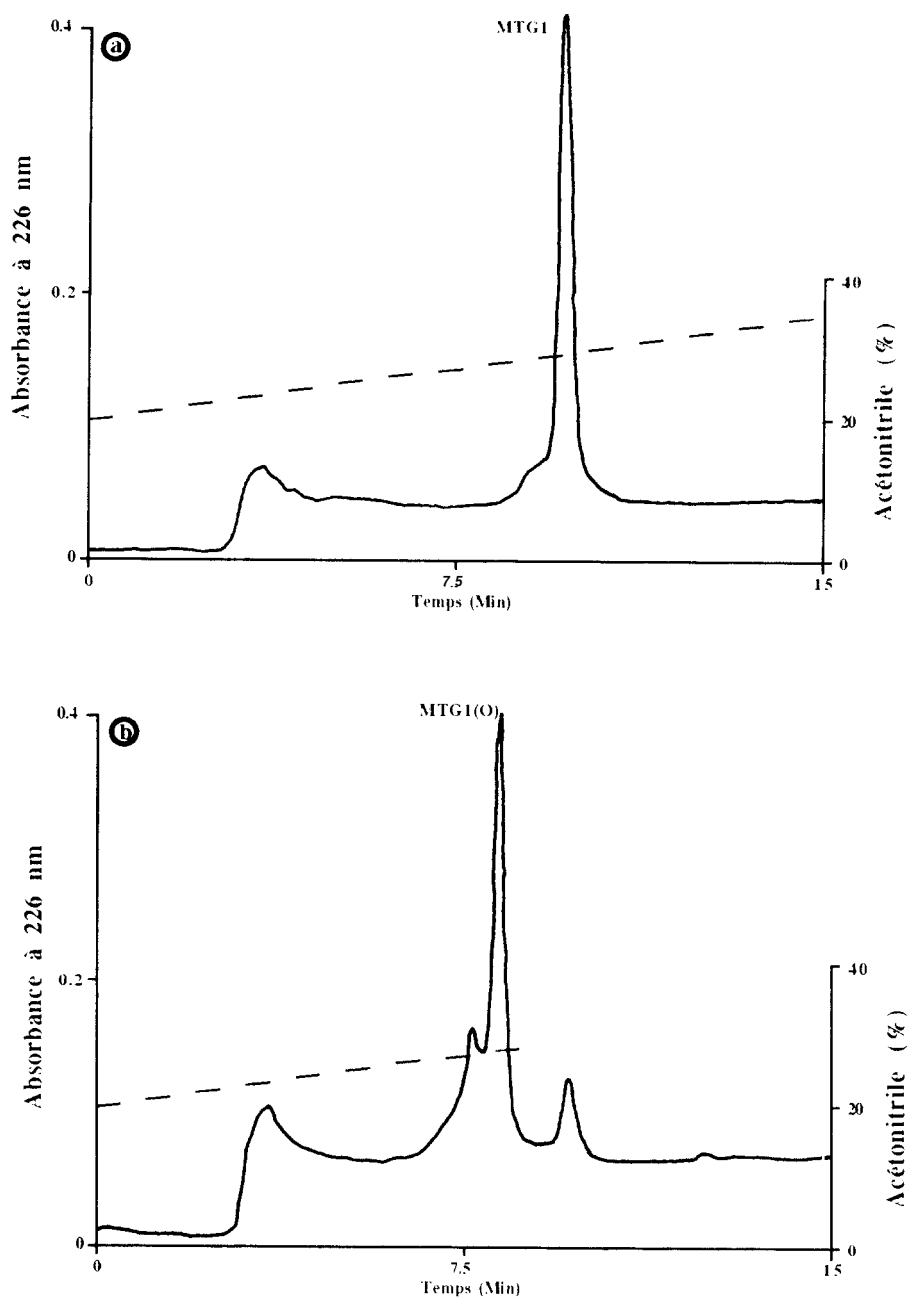


Figure 78. Chromatographies de MTG 1 (a) et MTG 1(O) (b) en phase inverse sur colonne C8 équilibrée dans de l'eau/TFA. Les protéines ont été éluées par un gradient linéaire d'acétonitrile (20- 35%) à 1ml/min. MTG 1 est élue à 9 min correspondant à 29% d'acétonitrile dans l'eau/TFA. MTG 1 a été oxydée en présence de d'H₂O₂ (30%) à 60 µl / ml pendant 15 min à température ambiante. MTG 1(O) est élue à 7.7 min correspondant à 27.7 % d'acétonitrile dans l'eau/TFA

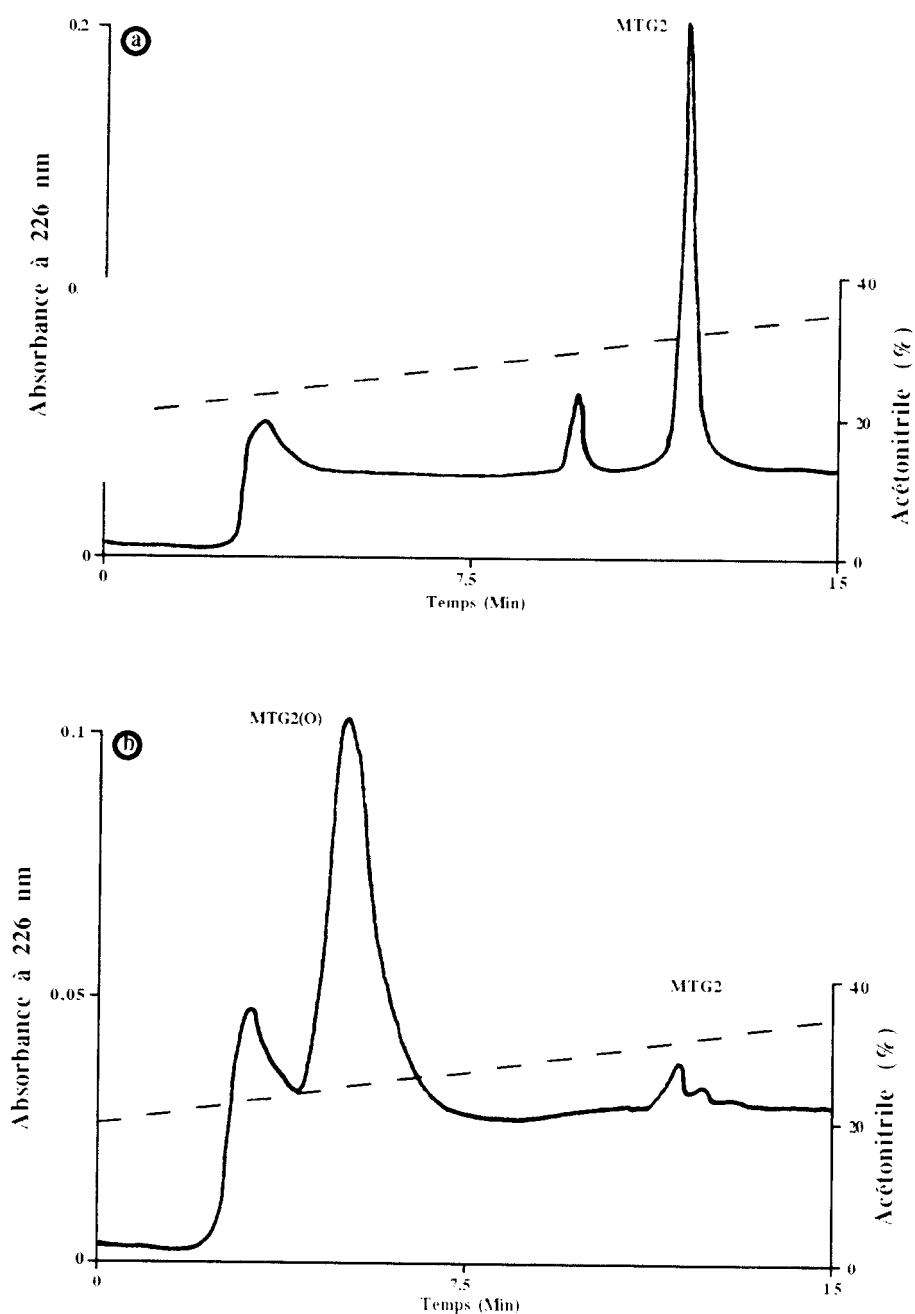


Figure 79. Chromatographies de MTG2 (a) et MTG2(O) (b) en phase inverse sur colonne C8 équilibrée dans de l'eau/TFA. Les protéines ont été éluées par un gradient linéaire d'acétonitrile (20- 35%) à 1ml/min. MTG2 est éluée à 11 min correspondant à 31 % d'acétonitrile dans l'eau/TFA. MTG2 a été oxydée en présence de d'H₂O₂ (30%) à 60 µl / ml pendant 15 min à température ambiante. MTG2(O) est éluée à 4,8 min correspondant à 24,8 % d'acétonitrile dans l'eau/TFA.

2.2. Comportement électrophorétique et point isoélectrique.

2.2.1. Comportement électrophorétique

Les métallothionéines ont des comportements particuliers en électrophorèse qui rend leur migration difficilement interprétable. L'affinité des métallothionéines pour les colorants spécifiques des protéines est faible. Il est néanmoins possible de les repérer après une électrophorèse en gel de polyacrylamide en les colorant par le bleu de Coomassie ou à l'argent.

L'extrait hépatique brut, le pic III du fractionnement ~~par~~ chromatographie de filtration sur gel (G-75), le pic IIIA du fractionnement par chromatographie d'échange d'anions et les protéines MTG1 et MTG2 obtenues après chromatographie en phase inverse ont été analysés en présence de SDS sur gel de polyacrylamide (14%) en absence et en présence de B-mercaptoéthanol et sur gel de polyacrylamide en gradient (5-25%) en présence de B-mercaptoéthanol.

Gel homogène SDS avec β -mercaptoéthanol (figure 80 a et b)

Après coloration par le bleu de Coomassie, l'étude électrophorétique des échantillons provenant des différentes étapes de purification réalisée en présence de B-mercaptoéthanol montre des bandes correspondant à la métallothionéine à partir du fractionnement de Mono-Q. Les bandes correspondant aux métallothionéines bien visibles pour les protéines pures sont très larges. **Des** bandes semblables ne sont pas détectées pour l'extrait brut et le fractionnement en G-75. Ces larges bandes s'étaient entre deux points de migration correspondant approximativement à la migration des standards de 20 et 30 kDa.

Après coloration à l'argent qui est une technique plus sensible, des bandes larges sont également révélées au niveau de l'extrait brut et du fractionnement en G-75. Cette technique révèle des bandes plus larges que la technique au bleu de Coomassie.

Gel homogène SDS sans β -mercaptoéthanol (figure 81 a et b)

En absence de B-mercaptoéthanol, toute la longueur des pistes de migration des métallothionéines pures (MTG1 et MTG2) est colorée par le bleu de Coomassie. La coloration à l'argent permet de visualiser une coloration des pistes de migration de l'extrait brut et du pic III qui n'est **pas** visible au bleu.

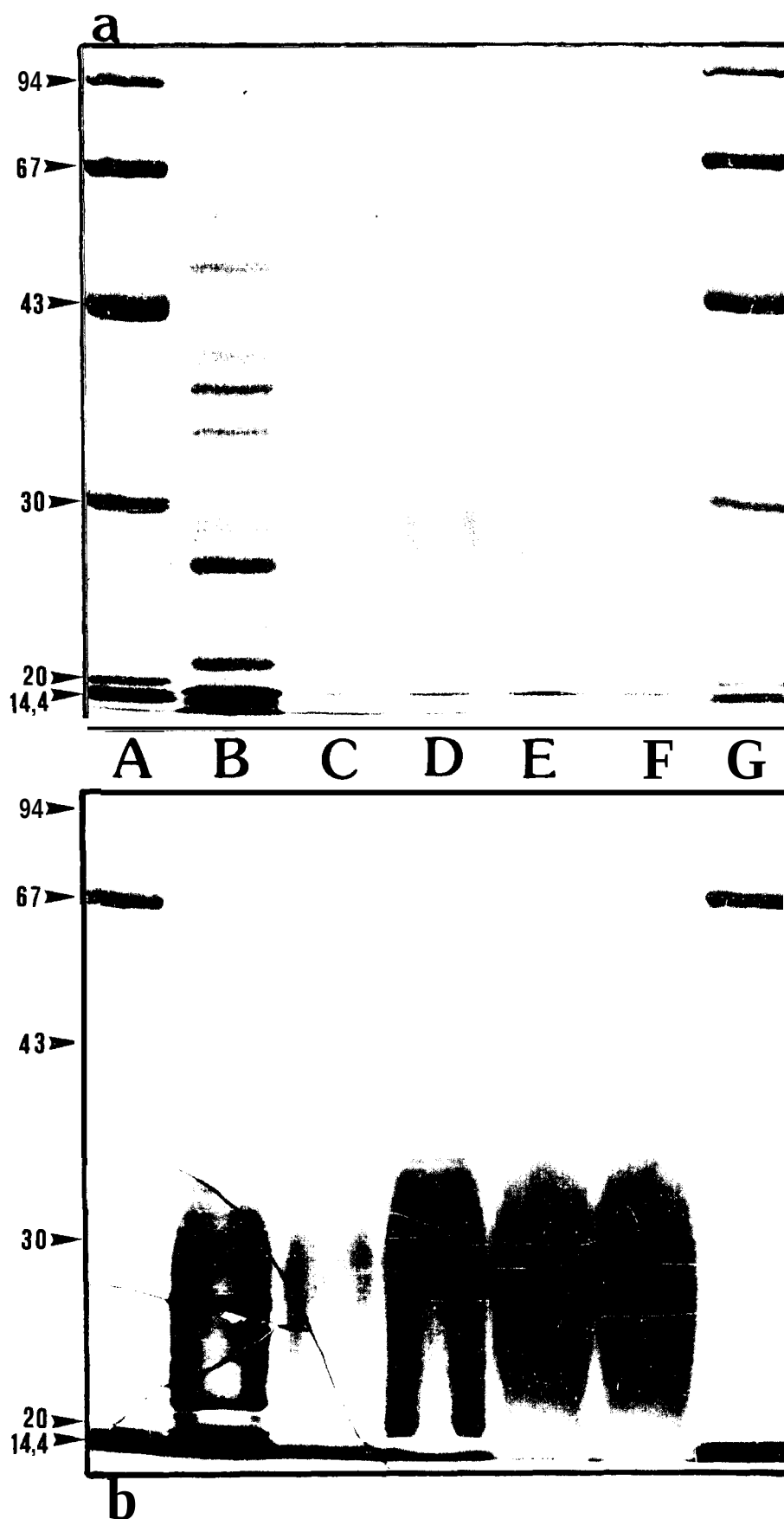


Figure 80. Analyse électrophorétique (SDS-PAGE 14% en présence de B-mercaptoéthanol). Pistes A et G: standards de masse moléculaire, B: extrait hépatique, C: pic III issu de la chromatographie de filtration sur gel, D: pic IIIA issu de la chromatographie d'échange d'anions, E et F: MTGI et MTG2 issues de la chromatographie en phase inverse. a: gel coloré au bleu de Coomassie, b: gel coloré à l'argent.

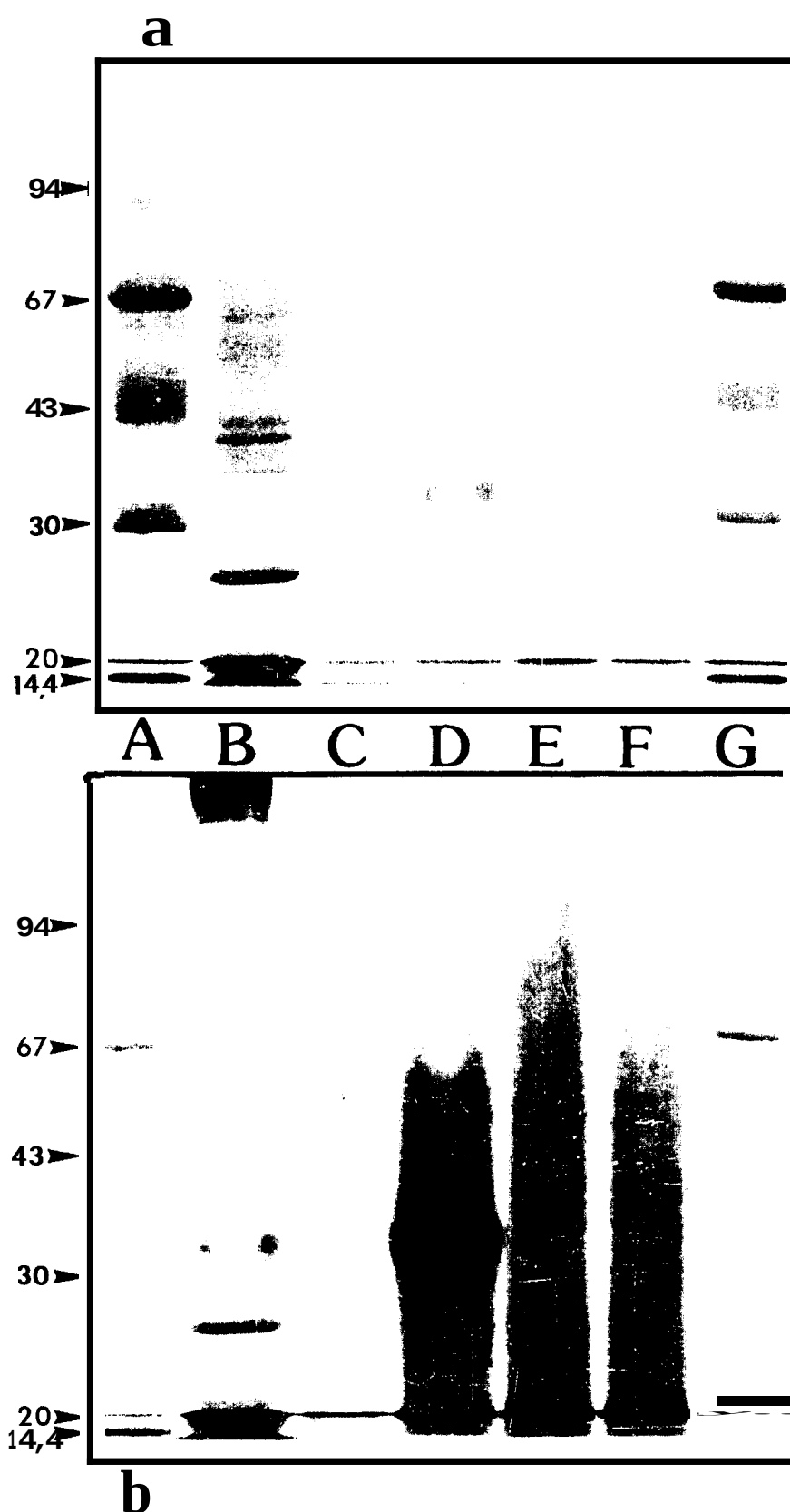


Figure 81. Analyse électrophorétique (SDS-PAGE 14% en absence de B-mercaptoéthanol). Pistes A et G: standards de masse moléculaire, B: extrait hépatique, C: pic III issu de la chromatographie de filtration sur gel, D: pic IIIA issu de la chromatographie d'échange d'anions, E et F: MTG1 et MTG2 issues de la chromatographie en phase inverse. a: gel coloré au bleu de Coomassie, b: gel coloré à l'argent.

Gel en gradient continu SDS avec β -mercaptoéthanol (figure 82 a et b)

L'électrophorèse sur gel en gradient d'acrylamide (5-25%) en présence de B-mercaptoéthanol montre les mêmes types de bandes qu'en gel homogène.

Effet du β -mercaptoéthanol (figure 83 a et b)

L'effet du β -mercaptoéthanol sur le comportement électrophorétique de MTG1 a été étudié sur gel en gradient d'acrylamide. Les pistes A, D et J de l'électrophorèse présentée sur la figure 83, correspondent aux témoins de masse moléculaire, analysés respectivement sans O-mercaptoéthanol, avec 2,5% et 20% de β -mercaptoéthanol dans le tampon de reprise. La piste C ne contient pas d'échantillon. La piste B correspond à MTG1 en absence de β -mercaptoéthanol; l'ensemble de la piste est coloré. Les pistes E et I, correspondent à MTG1 analysée avec du tampon de reprise contenant respectivement 2,5, 5, 10, 15 et 20 % de β -mercaptoéthanol. Les bandes de MTG1 semblent moins larges en présence d'une forte concentration de β -mercaptoéthanol, effet bien visible sur le gel coloré au bleu de Coomassie (figure 83a).

2.2.2. Détermination du point isoélectrique (Pi)

Une électrofocalisation a été réalisée (figure 84) pour les deux protéines MTG1 et MTG2 séparées par chromatographie à haute pression sur une colonne de phase inverse. Cette analyse révèle l'existence de deux bandes protéiques larges ayant des points isoélectriques très proches. Nous avons considéré le centre de la bande de chaque protéine pour calculer le point isoélectrique. A chaque P_i calculé, nous avons affecté une erreur correspondant à la demi-largeur de chaque bande. Les P_i de MTG1 et de MTG2 calculés à partir de la droite de calibration (figure 85) sont respectivement $7,95 \pm 0,18$ et $7,83 \pm 0,18$.

2.3. Caractérisation de MTG1

2.3.1. Electrophorèse capillaire

L'électrophorèse capillaire faite en utilisant un tube capillaire de silice de 72 cm en présence de tampon de citrate de Na, 40 mM, pH 2,5 (figure 86a), révèle que MTG1 en sortie de chromatographie en phase-inverse (HPLC) est majoritairement présente. Après réduction et alkylation de MTG1, l'électrophorèse capillaire réalisée dans les mêmes conditions (figure 86b) révèle un pic protéique unique qui démontre la pureté de la protéine préparée avant la détermination de sa masse et de sa séquence.

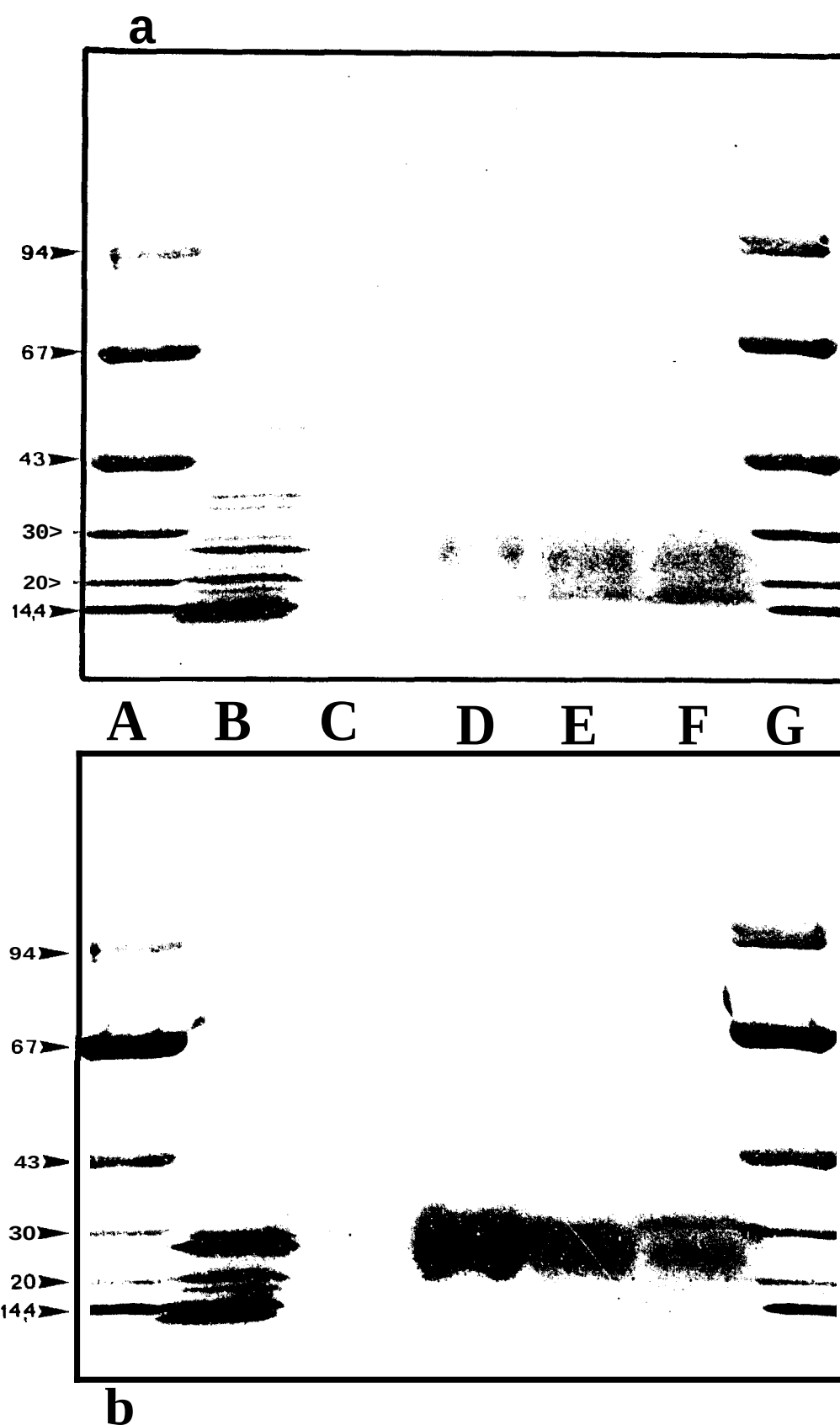


Figure 82. Analyse électrophorétique (SDS-PAGE 5-25% en présence de R-mercaptoéthanol). Pistes A et G: standards de masse moléculaire, B: extrait hépatique, C: pic III issu de la chromatographie de filtration sur gel, D: pic IIIA issu de la chromatographie d'échange d'anions, E et F: MTG1 et MTG2 issues de la chromatographie en phase inverse. a: gel coloré au bleu de Coomassie, b: gel coloré à l'argent.

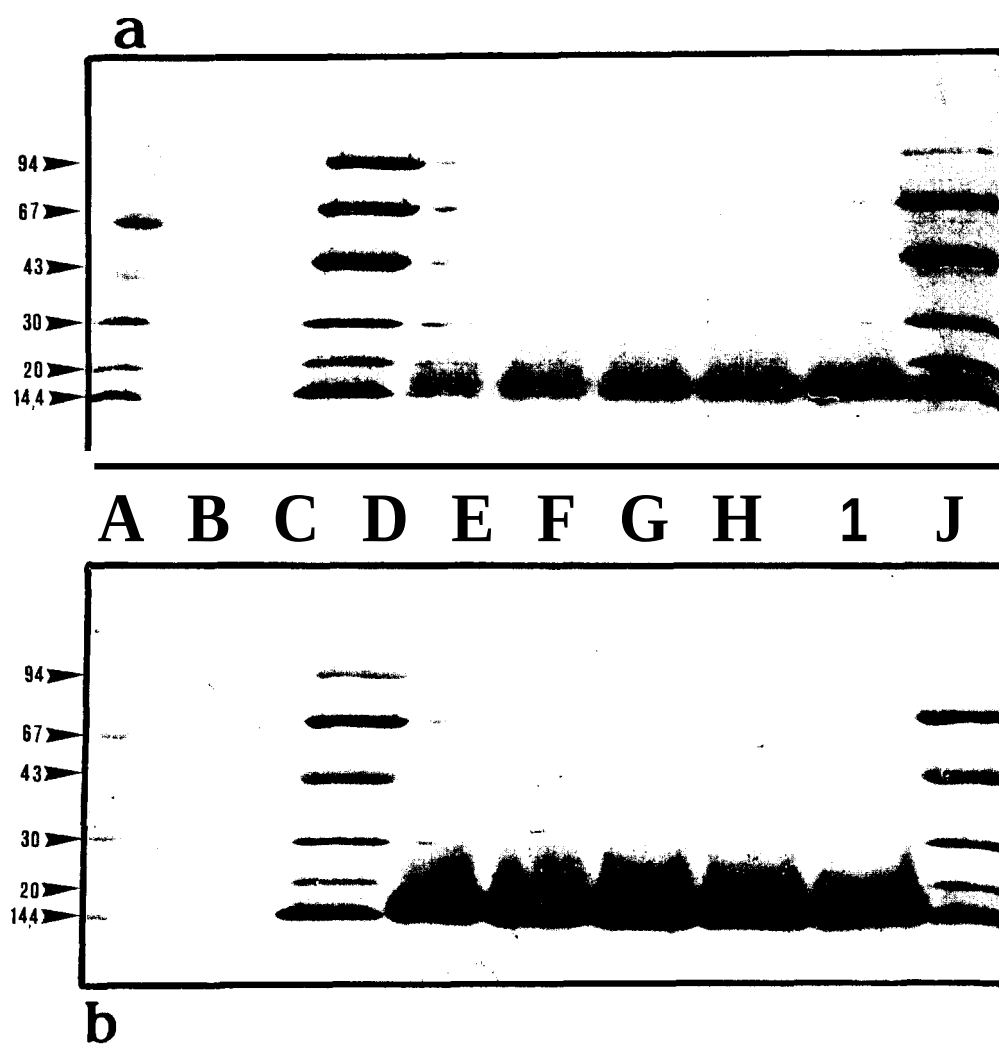


Figure 83. Effet de différentes concentrations de B-mercaptoéthanol en analyse électrophorétique de MTG1 (SDS-PAGE 5-25%). A, D, J: standards de masses moléculaires connues (A: 0%; D: 2,5% et J: 20% de B-mercaptoéthanol), B, E, F, G, H, I, étude de MTG1 avec 0; 2,5; 5; 10; 15 et 20 % de B-mercaptoéthanol. a: gel coloré au bleu de Coomassie, b: gel coloré à l'argent.

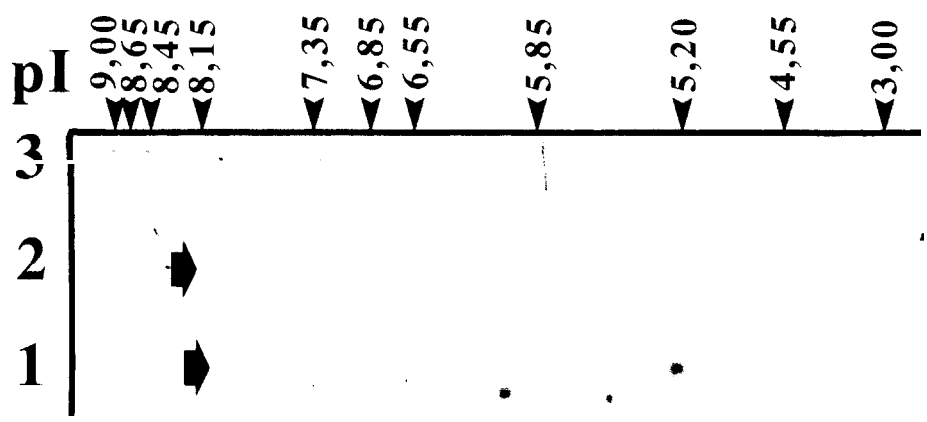


Figure 84. Electrofocalisation de MTG1 et MTG2 provenant de chromatographie en phase inverse. Le gel (Phast-gel IEF 3-9) a été utilisé avec le Phast-gel System (Pharmacia) dans les conditions prescrites par la firme.
Piste 1: MTG2; Piste 2: MTG1; Piste 3: substances de point isolélectrique (pI) déterminé.

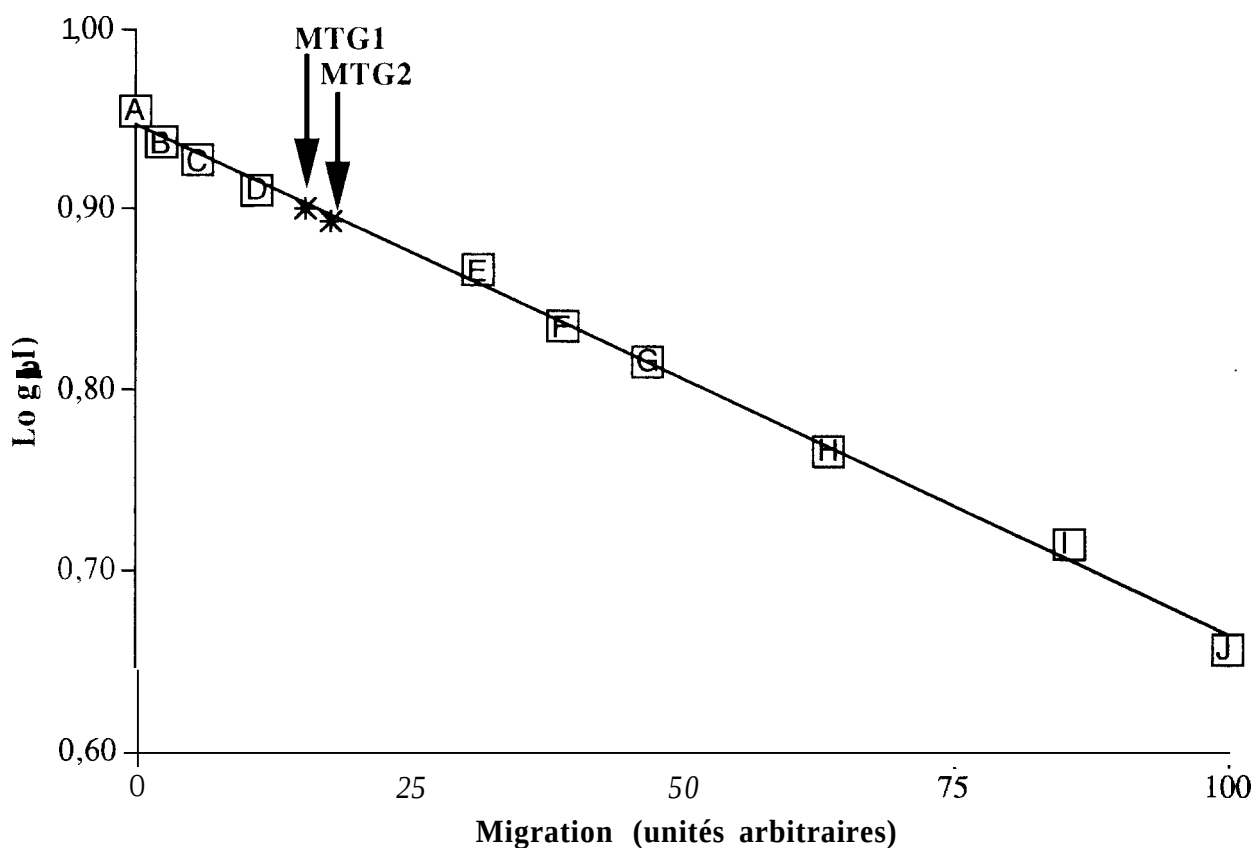


Figure 85. Droite de calibration de l'électrofocalisation calculée à partir des distances de migration des témoins de pI connus: A: 9,00; B: 8,65; C: 8,45; D: 8,15; E: 7,35; F: 6,85; G: 6,55; H: 5,85; I: 5,20; J: 4,55.

Equation de la droite: $pI = -0,003x + 0,947$ ($r^2 = 0,997$).

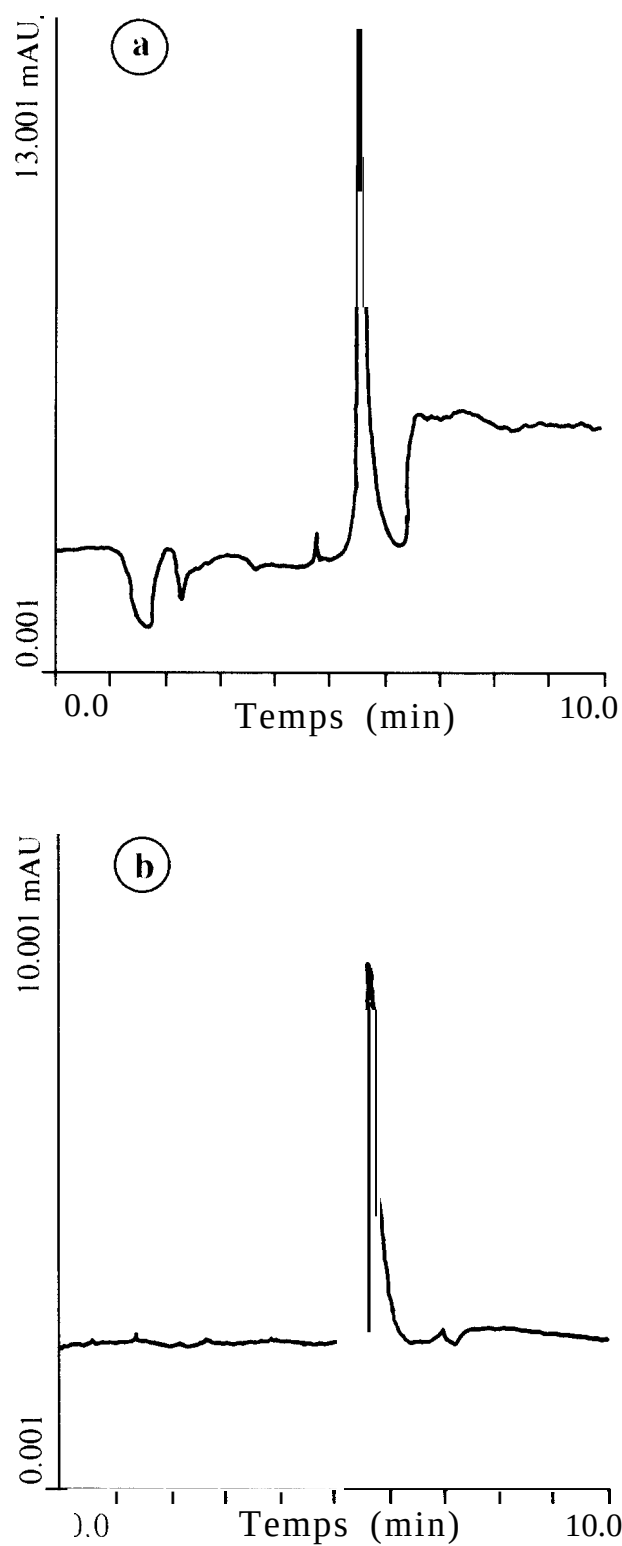


Figure 86. Electrophorèse capillaire de MTG1 native (a) et réduite et alkylée (b). L'analyse a été réalisée avec un capillaire de silice de 72 cm de longueur. La séparation d'un échantillon de 2nl est effectuée de l'anode à la cathode dans un tampon citrate (20mM) à pH 2.5 à 30°C. La détection est faite à 200 nm.

2.3.2. Détermination de la masse moléculaire

La masse moléculaire de la MTG1 a été précisée par spectrométrie de masse. La MTG1 native, après chromatographie en phase-inverse par HPLC, a une masse de $5975,51 \pm 0,16$ Da en ES-MS (figure 87a). Un composé mineur d'une masse de 6770,42 Da était également présent. Après réduction-alkylation, la masse moléculaire de MTG1 réduite et alkylée a été déterminée à 8082,1 Da en MALDI-TOF (figure 87b). L'alkylation est faite sur les cystéines contenues dans la protéine. La différence de masse entre la MTG1 native et la MTG1 réduite alkylée révèle alors le nombre de groupements alkyls fixés à la protéine et ainsi le nombre de cystéines. La différence de masse de 2106,6 Da correspond à 19,8 groupements alkyls. MTG1 possède donc 20 cystéines. La masse et le nombre de cystéines correspondent parfaitement aux caractéristiques des métallothionéines (Kagi et Nordberg, 1979).

2.3.3. Détermination de la structure primaire de MTG1

La détermination de la séquence en acides aminés s'est déroulée en deux temps. Dans un premier temps, le séquençage de la région N-terminale de MTG1 réduite et alkylée a été effectué. Une coupure enzymatique a été pratiquée dans un second temps pour déterminer la séquence de la région C-terminale.

2.3.3.1. Détermination de la séquence N-terminale

La séquence de l'extrémité N-terminale de MTG1 a été déterminée par dégradation d'Edman automatisée sur séquenceur en phase liquide. Les 43 premiers acides aminés ont été identifiés. La séquence N-terminale est la suivante:

M-D-P-C-D-C-A-K-T-G-T-C-N-T-C-K-C-T-N-C-Q-C-T-T-C-K-K-S-C-C-T-C-C-P-S-G-C-S-K-C

Le séquençage de la partie N-terminale a pu être réalisé directement, la protéine MTG1 n'étant pas bloquée (N-acétylée) au niveau de la méthionéine N-terminale, contrairement à certaines métallothionéines de mammifères ou d'autres poissons.

2.3.3.2. Clivage enzymatique

Le choix d'une endoprotéinase Lys-C spécifique a été basé sur la connaissance de la structure N-terminale de MTG1 (5 résidus de lysine présents en position 8, 19, 29, 30 et 42) et sur les séquences de métallothionéines d'autres espèces de poissons (ces résidus de lysine et deux autres en position 50 et 52).

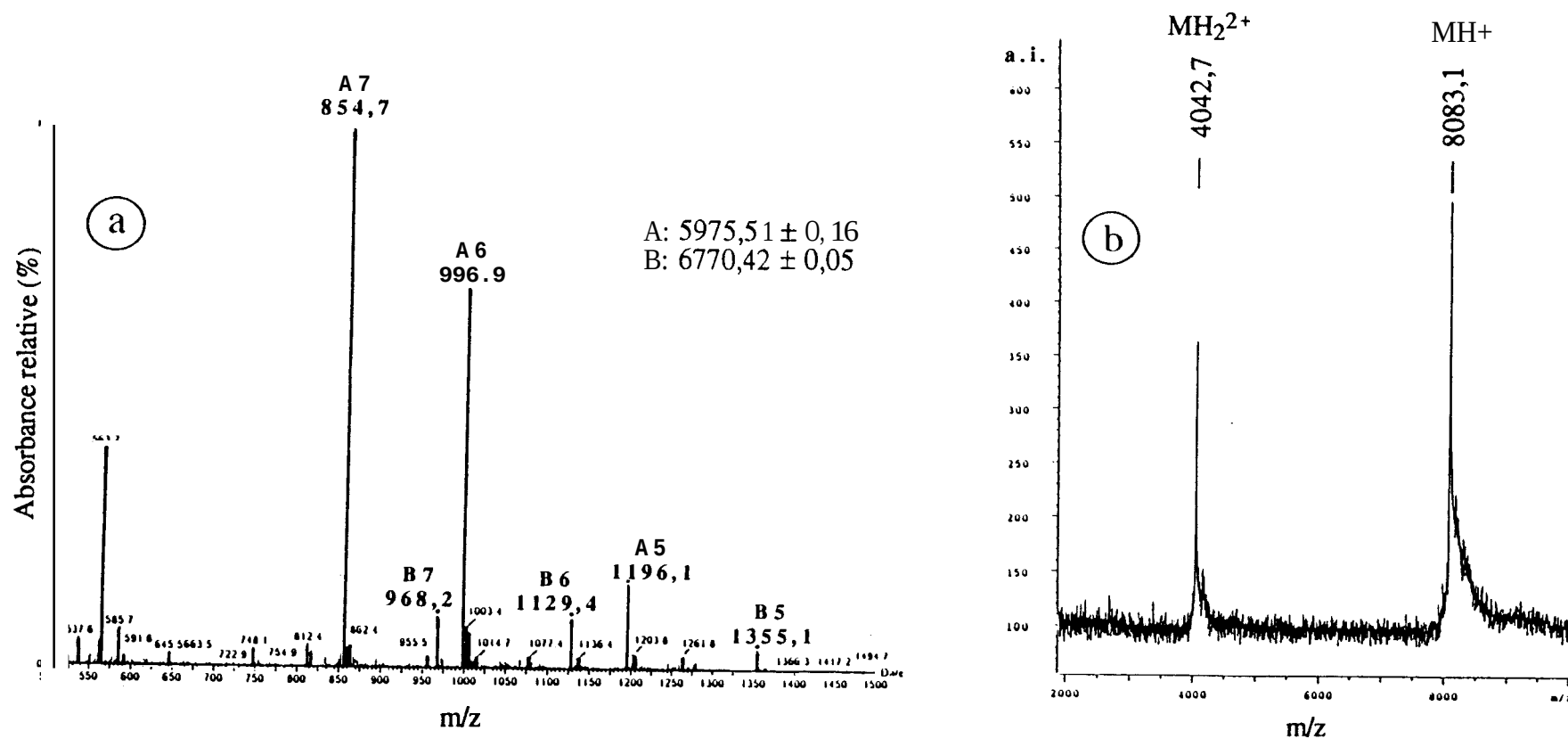


Figure 87. Spectromètre de masse de MTG 1 native par obtenu spectrométrie par electrospray (ES-MS) (a) et de MTG 1 réduite et alkylée obtenu par spectrométrie laser (MALDI-TOF) (b). La masse de MTG1 native (**A**) a été déduite de la moyenne réalisée entre A7, A6 et **AS**. B est une molécule minoritaire dans la préparation, sa masse a été déduite de la moyenne entre B7, B6 et BS.

La protéine (3µg) a été incubée pendant 18h à 37°C avec 5 pmol d'endoprotéinase Lys-C hautement purifiée (Takura). La séparation des peptides a été faite par HPLC sur une colonne de phase reverse C-18 (Aquapore, 250x4,8 mm, Browlee) avec un gradient d'acétonitrile 2-70 % de tampon B (acétonitrile/TFA). Le profil d'élution de la protéine clivée est illustré par la figure 88.

L'examen du profil révèle que la protéine MTG1 traitée par l'enzyme a été clivée en plusieurs peptides. Cinq pics peptidiques principaux notés Ka, Kb, Kc, Kd, Ke, et trois pics de moindre importance notés Kf, Kg et Kh ont été obtenus. Les spectres de masse des peptides sont présentés sur la figure 89. La masse moléculaire des peptides de chacun des pics a été déterminée par spectrométrie de masse (MALDI-TOF). La somme des masses moléculaires des peptides (Ka), (Kb), (Kc1), (Kc2), (Kd) et (Ke) à laquelle est ajoutée la masse moléculaire de la lysine (résidu 20) et est ôtée la masse de 6 molécules d'eau (liaisons peptidiques entre les différents peptides), est égale à une masse de 8085,4 Da qui correspond à la masse de MTG1 alkylée.

- La masse du peptide (Ka) est de 1261,5 Da. Sa séquence est **G-N-S-C-G-S-S-C-Q**. La masse déduite de la composition en acides aminés est de 1260 Da.
- La masse du peptide (Kb) est de 1374,4 Da. Sa séquence est **T-G-T-C-N-C-G-A-T-C-K**. La masse déduite de la composition en acides aminés est de 1374,2 Da.
- Le pic (Kc) contient deux peptides (Kc1) et (Kc2) de masse moléculaire 1526,3 et 1086,2 Da. La séquence de (Kc1) est **C-T-N-C-Q-C-T-T-C-K**, celle de (Kc2) est **C-A-S-G-C-V-C-K**. Les masses déduites des compositions en acides aminés sont respectivement 1525,3 et 1085,9 Da pour les peptides (Kc1) et (Kc2).
- Le peptide (Kd) a une masse de 1705,8 Da. Sa séquence est **S-C-C-T-C-C-P-S-G-C-S-K**. La masse moléculaire déduite de sa composition en acides aminés est de 1705,3 Da.
- Le peptide (Ke) a une masse de 1093 Da. Sa séquence est **M-D-P-C-C-A-K**. La masse déduite de la composition en acides aminés est de 1093,01 Da.
- Le pic Kf contient plusieurs composés de masses moléculaires différentes (2554,6; 2878,6; 4017,4 et 4697,7 Da). Ces composés correspondant à des fragments partiellement clivés n'ont pas été séquencés.
- Le peptide (Kg) a une masse moléculaire de 7011,8 Da. Il n'a pas été séquencé. Sa masse correspond à celle de MTG1 diminuée de la masse du peptide (Ke)
- La masse du peptide (Kh) est de 8088,2 Da. Cette masse correspond à celle de la MTG1 réduite et alkylée.

Si nous comparons les séquences des peptides à celle de la partie N-terminale (voir figure 90), nous nous apercevons que le peptide (Ke) correspond aux résidus 1 à 8, le peptide (Kb) aux résidus 9 à 19, le peptide (Kc1) aux résidus 21 à 30 et le peptide (Kd) aux résidus 31 à 42. **Par** comparaison avec les séquences des métallothionéines de poissons et notamment celle de la loche franche, le peptide (Kc2) correspond aux résidus 43 à 50, et le peptide (Ka) à la partie C-terminale.

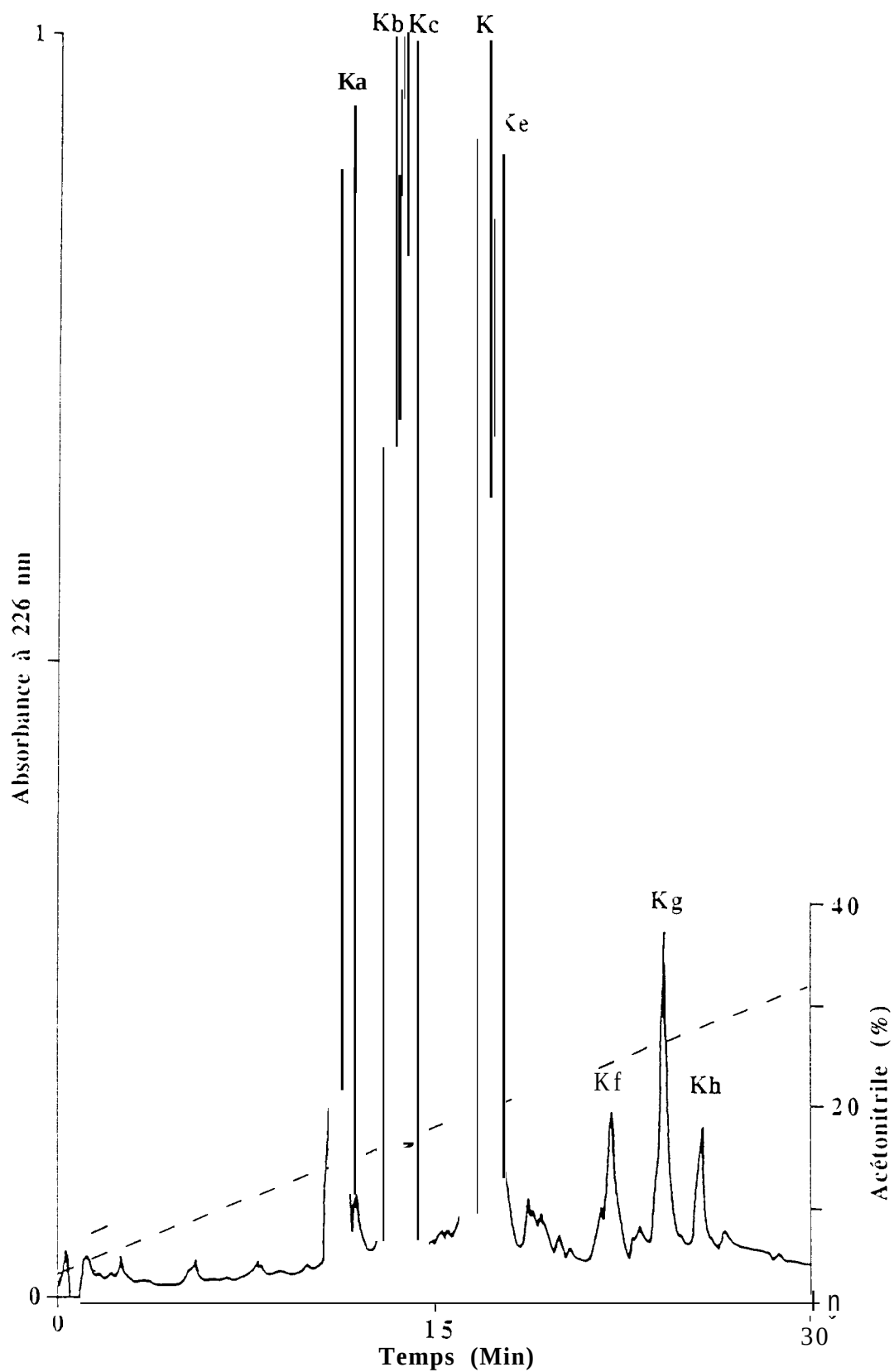


Figure 88. Séparation par RP-HPLC des peptides de la coupure de MTG1 par l'endoprotéinase Lys-c.
Colonne utilisée: colonne C 18 (Aquapore, 250x4,8 mm, Browlee). Tampon d'élution A: eau/TFA, B: acétonitrile/TFA; gradient : 2-32% de tampon B en 30 min.

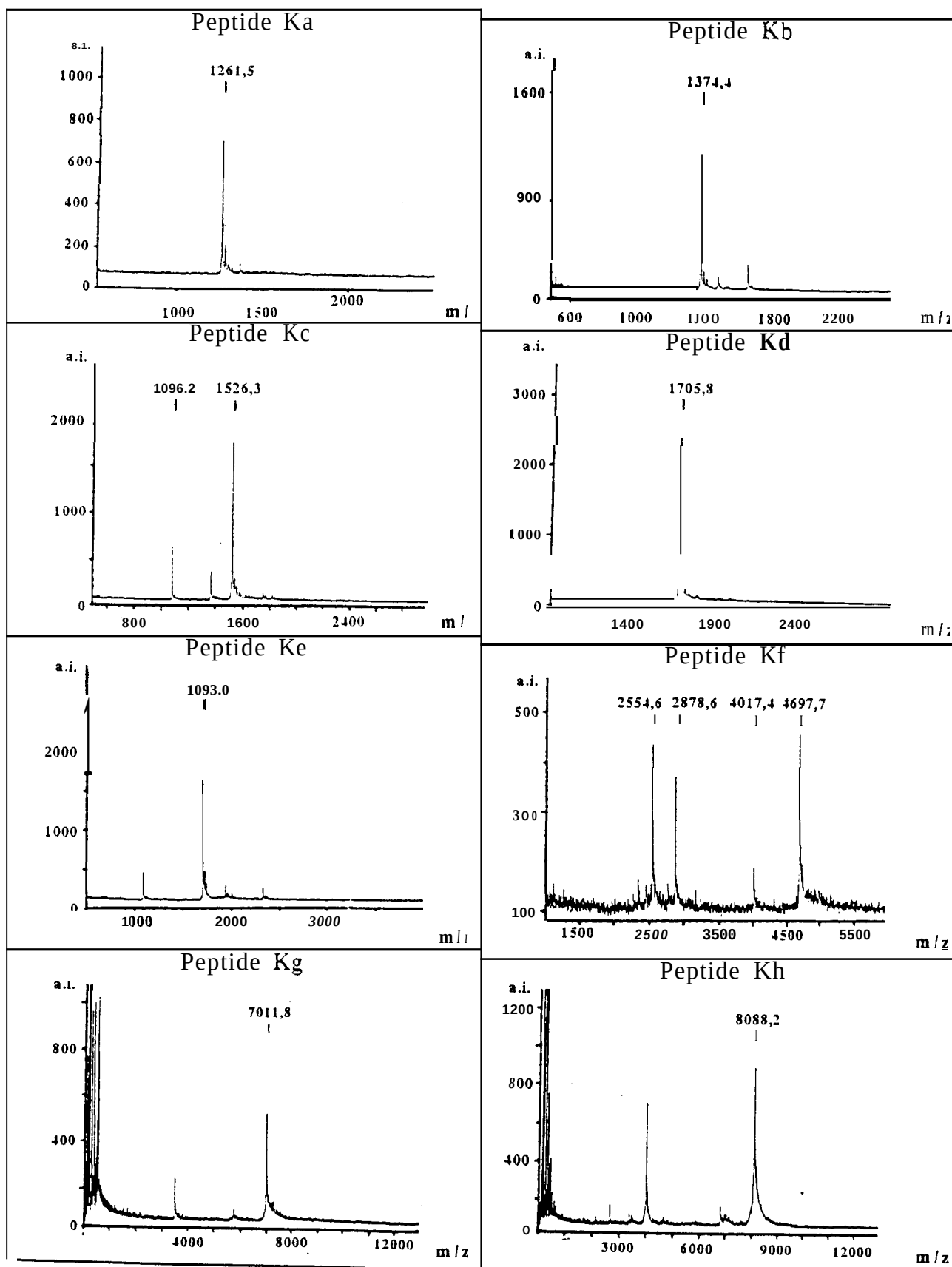


Figure 89. Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) des peptides Ka, Kb, Kc, Kd, Ke, Kf, Kg et Kh obtenues par coupure de MTG 1 avec l'endoprotéinase Lys-C.

Par le séquençage des différents peptides de coupure par l'enzyme Lys-C et le séquençage du fragment N-terminal de MTG1, il s'avère que la protéine est composée de 60 acides aminés. La séquence complète est présentée sur la carte des peptides de coupure (figure 90). MTG1 est composée de 60 acides aminés dont 20 résidus cystéiques, ce qui représente un pourcentage de 33,33% de cystéine. Les résidus cystéiques sont placés selon des motifs C-x-C, C-C, C-C-x-C-C ou C-x-x-c à l'image des motifs rencontrés dans la métallothionéine de cheval. Les positions des résidus cystéiques de MTG1 et de la MT de cheval (MT de référence) sont identiques sauf pour le résidu 54 (voir tableau 54). Nous notons l'absence de résidus d'acides aminés aromatiques et d'histidine et également de leucine, d'isoleucine, d'acide aspartique, d'arginine et de tryptophane.

De l'ensemble des résultats obtenus, nous pouvons résumer les caractéristiques de MTG1 de la façon suivante:

- elle est inductible par le Cd et le Zn,
- elle fixe le Cd et le Zn,
- elle possède une forte teneur en groupements sulfhydriles, due à la présence de 20 cystéines,
- elle présente une absorbance à 254 nm, caractéristique des liaisons métalliques avec les SH,
- en milieu acide, elle est dépourvue de métal et n'absorbe plus à 254 nm,
- elle est thermorésistante,
- elle est constituée d'un enchaînement de soixante acides aminés,
- sa partie N-terminale n'est pas bloquée,
- les acides aminés aromatiques et l'histidine sont absents,
- elle a une distribution des résidus cystéiques proche de celle de la MT de cheval.
- sa masse moléculaire est de 5975,5 Da,
- son point isoélectrique est 7,95.

L'ensemble de ces caractéristiques nous permet de classer la MTG1 dans le groupe des métallothionéines de classe I selon la classification de Kagi *et al* (1984, voir § 4.2 de l'introduction), c'est-à-dire dans le groupe des métallothionéines *sensu stricto*.

3. Homologies avec d'autres métallothionéines

3.1. Homologie avec les MT en général

Le premier fait marquant, nous l'avons déjà souligné au paragraphe précédent, est la parfaite homologie des positions des cystéines dans les différentes métallothionéines de poissons et de mammifères. Les trois premiers résidus d'acides aminés (MDP) sont toujours identiques. La MTG1, comme les six autres métallothionéines de poissons séquencées, ne possède que trois résidus d'acides aminés avant le premier résidu cystéique, alors que celles de mammifères en possèdent quatre.

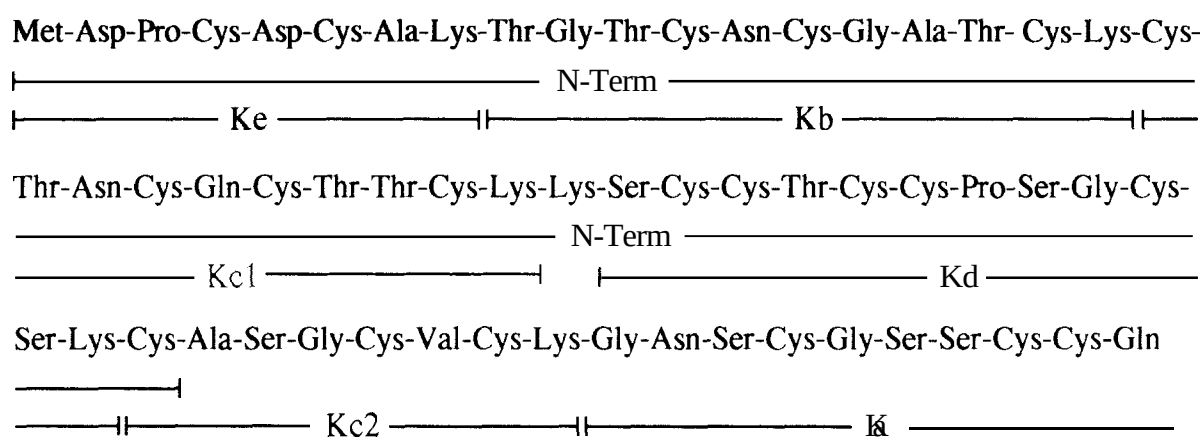


Figure 90. Séquence en acides aminés de la métallothionéine hépatique du gardon (*Rutilus rutilus*). La détermination de la séquence en acides aminés a été effectuée par dégradation d'Edman automatisée sur séquenceur en phase liquide. N-term.: fragment obtenu par le séquençage N-terminal de MTG1. Ka à Ke: fragments obtenus après clivage de la protéine par l'endoprotéinase Lys-C et séparés par HPLC sur colonne de phase-inverse C-18.

Tableau 54. Alignement des séquences d'acides aminés des métallothionéines de gardon (MTG1), de truite (KTMTA et B), de brochet, de loche franche, de flet, de plie, de cheval (MTI-A) et d'humain (MTI-A). La séquence de MTG1 est donnée en entier. La numérotation est basée sur la séquence de MTG1. Lorsqu'aucun résidu n'est noté, ceci signifie qu'il existe une identité de séquence avec MTG1. - indique l'absence de résidu. *: nos données, a: Kille *et al.*, 1991, b: Chan *et al.*, 1989, c: George *et al.*, 1990, d: Kojima *et al.*, 1979. e: Richards *et al.*, 1984.

	I															15															30														
Gardon MTG1 *	M	D	P	-	C	D	C	A	K	T	G	T	C	N	C	G	A	T	C	K	C	T	N	C	Q	C	T	T	C	K	K														
Loche franche (a)								S																																					
RTMTA(b)								S				S					G	S				S			A			S																	
RTMTB (b)								S				S					G	S				S			A			S																	
Brochet (c)								S				S					G	S				S			A			S																	
Flet (c)								S									G	S		T		K			S					N															
Plie (c)								S									G	S		T		K			S					N															
Cheval (d)				N		S		P	T	G		S		T		A	G	S				K	E		R			S																	
Humain] (e)				N		S			T	G		S		T		T	G	S				K	E		K		N	S																	

	- 31															45															60														
Gardon MTG1 *	-	S	C	C	T	C	C	P	S	G	C	S	K	C	A	S	G	C	V	C	K	G	N	S	C	G	S	S	C	C	Q														
Loche franche (a)					S																				D																				
RTMTA(b)	A				D																			K	T	D	T																		
RTMTB (b)					P				D															K	T	D	T																		
Brochet (c)					S														I					K	T	D	T																		
Flet (c)					P						P													K	T	D	T	T																	
Plie (c)					P						P													K	T	D	T																		
Cheval (d)					S				G		A	R				Q							A		D	K	C			A															
Humain] (e)					S				M	S	A					Q		I					A		E	K	C			A															

L'interrogation d'une banque de données (Blitz) sur Internet, nous a permis de comparer la séquence de la MTG1 à d'autres métallothionéines. Les pourcentages d'homologie sont présentés dans le tableau 55. La séquence de la MTG1 présente une forte homologie avec les métallothionéines de poissons (76,7 à 95%). 65,1 % des acides aminés de MTG1 sont communs à la métallothionéine MT-1 du pigeon. La MTG1 présente un pourcentage d'homologie de séquence compris entre 50 et 65 % avec la majeure partie des MTs de mammifères.

3.2. Homologie avec les MT de poissons

A l'heure actuelle, seules 7 séquences de MT de poissons, y compris celle de MTG1, sont connues. Les 7 MT séquencées proviennent de 6 poissons téléostéens appartenant à 3 ordres différents selon la classification de Berg (1940): l'ordre des Salmoniformes (truite et brochet), l'ordre des Cypriniformes (loche et gardon) et l'ordre des Pleuronectiformes (plie et flet), ces deux derniers poissons appartenant au même genre *Pleuronectes*. Peu de séquences de MT sont donc connues et il ne faut tirer des conclusions trop hâtives sur les rapports qui existent entre les homologies de séquence des MTs et la classification des poissons. Nous pouvons toutefois remarquer quelques faits intéressants. Le tableau 56 montre le pourcentage d'homologie entre les séquences de MT de poissons prises 2 à 2. Les plus fortes homologies de séquences protéiques sont calculées entre les MT de plie (*Pleuronectes platessa*) et de flet (*Pleuronectes flesus*) (98,3%) qui appartiennent au même genre, entre les MT de gardon (*Rutilus rutilus*) et de loche (*Noemacheilus barbatulus*) (95%) qui appartiennent au même ordre (Cypriniformes) et au même sous-ordre des Cyprinoïdes et entre les MT de truite (*Onchorhynchus mykiss*) et de brochet (*Esox lucius*) (95%) qui appartiennent au même ordre (Salmoniformes) et au même sous-ordre des Salmonoïdes. Les homologies sont plus importantes entre les MT des Salmoniformes et des Pleuronectiformes (83,3 à 85,2%) qu'entre ces deux ordres et celui des Cypriniformes (76,7 à 83,3%).

Concernant les séquences en acides aminés, il apparaît que les résidus 7 - 34 et 55 sont particuliers à MTG1 et les résidus 16, 17, 21, 24, 52, 53 et 56 sont particuliers aux 2 MT de Cypriniformes. Les résidus 39, 48 et 57 sont respectivement particuliers aux MT de truite, de brochet et de flet. Les résidus 11, 21, 24 et 27 sont propres aux MT des deux Salmoniformes (truite et brochet) et les résidus 19, 21, 24, 29 et 41 propres aux 2 Pleuronectiformes.

Tableau 55. Homologie entre la séquence en acides aminés de la métallothionéine hépatique de gardon, MTG1, et celles de quelques autres organismes. Le pourcentage d'homologie entre deux protéines a été calculé selon la formule: $(T-n)/T \times 100(\%)$, où T est le nombre total de résidus et n le nombre de résidus non-homologues. (données obtenues par interrogation de BLITZ sur Internet)

Organismes	Nom	%	Organismes	Nom	%
<i>Noemacheilus barbatulus</i>		95	<i>Bos taurus</i>	MT-1A	58,3
<i>Oncorhynchus tnykiss</i>	MT-B	80	<i>Bos taurus</i>	MT-II	58,3
<i>Onchorhynchus tnykiss</i>	MT-A	78,7	<i>Cercopithecus uethiops</i>	MT-II	58,3
<i>Pleuronectes platessa</i>		78,3	<i>Ovis aries</i>	MT-1B	58,3
<i>Esox lucius</i>		78,3	<i>Homo sapiens</i>	MT-1B	58,3
<i>Columba livia</i>	MT-1	65,1	<i>Rwus ratus</i>	MT-II	58,3
<i>Homo sapiens</i>	MT-1E	63,9	<i>Mus musculus</i>	MT-II	58,3
<i>Hotno sapiens</i>	MT-1F	63,3	<i>Stenella caeruleoalba</i>	MT-II	58,3
<i>Hotno sapiens</i>	MT-1H	61,7	<i>Hotno sapiens</i>	MT-1L	58,3
<i>Hotno sapiens</i>	MT-II	61,7	<i>Xenopus laevis</i>		56,7
<i>Mesocricetus auratus</i>	MT-II	61,7	<i>Oryctolagus</i>	MT-2C	56,7
<i>Cricetulus griseus</i>	MT-II	61,7	<i>Oryctolagus</i>	MT-2A	56,7
<i>Rwus ratus</i>	MT-1	61,7	<i>Equus</i>	MT-1A	56,7
<i>Hotno sapiens</i>	MT-IV	60,7	<i>Sus scrofa</i>	MT-I	56,7
<i>Mus musculus</i>	MT-IV	60,7	<i>Oryctolagus</i>	MT-2E	56,7
<i>Cercopithecus aethiops</i>	MT-I	60	<i>Gallus domesticus</i>		56,5
<i>Hotno sapiens</i>	MT-1A	60	<i>Eyuus</i>	MT-1B	55
<i>Hotno sapiens</i>	MT-11	60	<i>Ovis aries</i>	MT-1C	55
<i>Hotno sapiens</i>	MT-1G	60	<i>Collumba livia</i>	MT-2	53,2
<i>Cricetulus griseus</i>	MT-I	60	<i>Hotno sapiens</i>	MT-III	51,7
<i>Hotno sapiens</i>	MT-1K	60	<i>Mirs musculus</i>	MT-III	48,3
<i>Mus musculus</i>	MT-1	60	<i>Rwus ratus</i>	MT-III	48,3
<i>Oryctolagus</i>	MT-2D	60	<i>Eyuus</i>	MT-III	46,7
<i>Oryctolagus</i>	MT-2B	60	<i>Bos taurus</i>	MT-III	45
<i>Oryctolagus</i>	MT-1A	60	<i>Colinus variegatus</i>	MTA	40

Tableau 56. Homologie de séquence en acides aminés des métallothionéines de poisson. Le pourcentage d'homologie entre deux protéines a été calculé selon la formule: $(T-n)/T \times 100(\%)$, où T est le nombre total de résidus et n le nombre de résidus non-homologues.

*: nos données, a: Kille *et al.*, 1991, b: Chan *et al.*, 1989, c: George *et al.*, 1990.

	MTG1	Loche	RTMTA	RTMTB	Brochet	Flet	Plie
	*	(a)	(b)	(b)	(c)	(c)	(c)
MTG1	100						
Loche	95,0	100					
KTMTA	78,7	83,3	100				
RTMTB	80,0	81,7	95,1	100			
Brochet	78,3	83,3	95,1	95,0	100		
Flet	76,7	80,0	83,6	85,0	83,3	100	
Plie	78,3	81,7	85,2	86,7	85,0	98,3	100

4. Etude des effets du Cd et du Zn et de combinaisons des deux éléments en injections intrapéritonéales

Nous avons intoxiqué des gardons par des injections intrapéritonéales de Cd, de Zn ou des deux métaux en utilisant des doses faibles, fortes ou des combinaisons des deux doses. Les effets des intoxications sur l'accumulation des métaux dans la fraction hépatique soluble chauffée et sur l'induction de MTs ont été étudiés par dosage du Cd, du Zn et des groupements sulfhydriles ainsi que par chromatographie. Neuf combinaisons (Témoin, Cd-, Cd-Zn-, Cd-Zn+, Cd+, Cd+Zn-, Cd+Zn+, Zn- et Zn+) ont été testées sur 5 lots de 5 gardons. Les gardons constituant le lot témoin ont reçu des injections d'eau salée (0,9% NaCl). Nous rappelons que les doses totales administrées en trois injections équivalentes sont:

Cd⁻: 1,5 mg/kg de poids frais

Cd⁺: 3,0 mg/kg de poids frais

Zn⁻: 15 mg/kg de poids frais

Zn⁺: 30 mg/kg de poids frais

Les doses les plus élevées (Cd⁺ et Zn⁺) sont équivalentes à celles qui ont été utilisées pour induire la métallothionéine hépatique des gardons afin de la purifier. Les doses les plus faibles (Cd⁻ et Zn⁻) correspondent à la moitié des doses fortes.

4.1. Dosages du Zn, du Cd et des SH dans l'extrait brut chauffé

Le zinc et le cadmium ont été dosés **par** spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme dans la fraction soluble chauffée de foies de gardon. Les groupements sulfhydriles ont été **dosés** par la technique d'Ellman en présence d'EDTA. Pour chaque essai, nous avons calculé la moyenne des teneurs en Cd, en Zn et en **SH** rapportée à la quantité de protéines sur les 5 lots de 5 foies. Les résultats sont présentés en μg de **métal** par mg de protéines et en nmol de **SH** par mg de protéines.

4.1.1. Le zinc

Les moyennes des teneurs en zinc rapportées à la quantité de protéines dans la fraction soluble chauffée de foie de gardon des 8 essais et du témoin ainsi que les écarts-types correspondants ($n=5$) sont présentés sous forme de diagramme dans la figure 9 la. L'analyse de variance révèle qu'il existe une différence extrêmement significative entre les essais pour la teneur en zinc des extraits hépatiques chauffés ($F=8,02$; $p<0,0001$ pour **44** ddl). Les moyennes ont été ensuite comparées à l'aide d'un test **SNK** (tableau 57a). Il apparaît que:

1- La teneur en zinc dans les extraits de foie de tous les poissons ayant reçu du zinc est significativement supérieure à celle du témoin et des animaux intoxiqués par Cd⁺ et Cd⁻, sauf dans le cas des gardons intoxiqués par Zn⁻. Lors d'expositions au Zn, ce métal s'accumule donc au niveau du foie des gardons.

2- Les teneurs en zinc dans les extraits hépatiques des animaux intoxiqués par du Zn seul ou combiné avec du Cd, ne sont pas significativement différentes entre elles. Cependant, il semblerait qu'il y ait une tendance à une augmentation du contenu en Zn des extraits en fonction de la dose de Zn administrée (essais Zn⁻ et Zn⁺) ainsi qu'en fonction de l'environnement métallique (essais Cd-Zn⁻, Cd⁺Zn⁻ et Zn⁻). Le Cd pourrait ainsi exercer un effet positif sur l'incorporation du zinc exogène.

3- La teneur en Zn dans les extraits hépatiques provenant de gardons intoxiqués par Cd⁺ et Cd⁻ n'est pas significativement différente de celle des animaux témoins. Ceci suggère que l'exposition au Cd n'affecte pas la teneur en Zn hépatique endogène des animaux.

4- Les doses Cd⁻ ou Cd⁺ administrées en présence de doses faibles ou fortes de Zn n'empêchent pas l'accumulation du Zn; les essais Cd⁻(Zn⁻ ou Zn⁺) et Cd⁺(Zn⁻ ou Zn⁺) étant significativement différents des témoins.

5- Les teneurs en Zn dans les extraits de foie des gardons intoxiqués par Zn⁺ ou par Zn⁻ ne sont pas significativement différentes. Ceci est certainement dû aux doses choisies, car le Zn ne semble pas s'accumuler de manière différente selon la dose administrée.

4.1.2. Le cadmium

Les diagrammes en barre de la figure 91b présentent les moyennes des teneurs en cadmium rapportées à la quantité de protéines dans la fraction soluble chauffée de foie de gardon des 8 essais et du témoin ainsi que les écarts-types correspondants ($n=5$). L'analyse de variance révèle qu'il existe une différence très significative entre les essais concernant la teneur en Cd des extraits ($F=44,81$; $p<0,0001$ pour 44 ddl). Les moyennes comparées à l'aide d'un test SNK (tableau 57b), révèlent que:

1- La teneur en Cd des extraits de foie des animaux intoxiqués par du Zn (dose faible Zn⁻ et forte Zn⁺) n'est pas significativement différente de celle du témoin.

2- La teneur en Cd des extraits hépatiques des poissons intoxiqués par le Cd (dose faible Cd- ou forte Cd+) est significativement supérieure à celle du témoin, ainsi qu'à celle des animaux intoxiqués par Zn- ou Zn+. Ceci indique une accumulation du Cd dans le foie des animaux.

3- La teneur moyenne en Cd des extraits de foie d'animaux soumis à une intoxication par une dose forte (Cd+) de Cd est significativement supérieure à celle des animaux exposés à une dose faible (Cd-). Ceci suggère qu'il existe une accumulation de Cd en fonction de la dose administrée.

4- L'ajout de Zn+ ou de Zn- au Cd administré en forte dose diminue l'accumulation de ce dernier, de même pour le Cd administré en faible dose. Par contre, vis-à-vis d'une même dose de Cd administrée (Cd+ ou Cd-), l'effet protecteur du Zn n'apparaît pas significativement différent selon que l'on emploie une dose faible ou forte de ce métal.

4.1.3. Les groupements sulfhydriles

Pour les 8 essais et les animaux témoins, les moyennes des teneurs en groupements sulfhydriles (rapportées à la quantité de protéines) des extraits hépatiques ainsi que les écarts-types correspondants ($n=5$) sont présentés sous forme de diagramme dans la figure 91c. L'analyse de variance révèle que les teneurs en -SH des extraits sont significativement différentes entre les essais ($F=2,81$; $p=0,0158$ pour 44 ddl). Les moyennes comparées à l'aide d'un test SNK (tableau 57c) montrent que:

1- La teneur moyenne en groupements sulfhydriles rapportée à celle des protéines hépatiques (nmol de SH/mg de protéine) des différents essais est supérieure à celle des foies des animaux témoins. Cependant, seuls les essais Cd+, Zn+, Cd-Zn-, Cd+Zn- sont significativement supérieurs aux témoins ($p<0,05$).

2- Il n'existe pas de différence significative entre les teneurs en groupements sulfhydriles des différents essais (animaux exposés expérimentalement au Cd, au Zn ou à leurs combinaisons).

3- Cependant, nous pouvons noter une tendance à l'augmentation des teneurs en -SH, à la fois pour Cd et pour Zn, entre les doses faibles et les doses fortes. Dans le cas de l'administration combinée de Cd et de Zn, on peut noter une diminution de la teneur en -SH par rapport aux témoins.

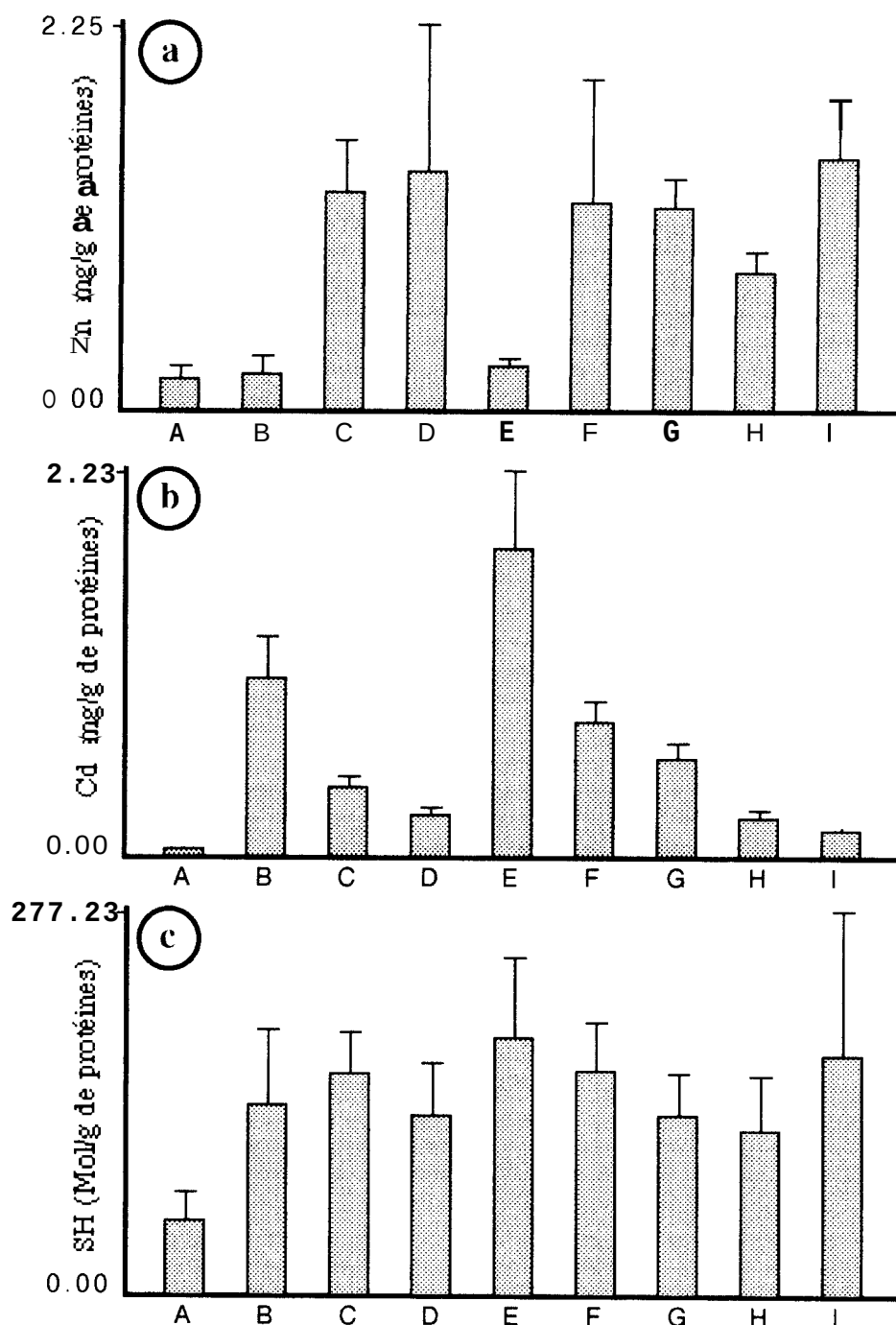


Figure 91. Teneurs moyennes en Zn (a) et Cd (b) (mg/g de protéines) et en SH (c) (Mol/g de protéines) et écarts-types correspondants (n=5) dans les extraits hépatiques chauffés de gardons intoxiqués par différentes combinaisons de Zn et de Cd en injections intrapéritonéales.

A: essai témoin

B: essai Cd- (1,5 mg de Cd / kg de poids frais)

C: essai Cd-Zn- (1,5 mg de Cd et 15 mg de Zn / kg de poids frais)

D: essai Cd-Zn+ (1,5 mg de Cd et 30 mg de Zn / kg de poids frais)

E: essai Cd+ (3mg de Cd / kg de poids frais)

F: essai Cd+Zn- (3mg de Cd et 15 mg de Zn / kg de poids frais)

G: essai Cd+Zn+ (3mg de Cd et 30 mg de Zn / kg de poids frais)

H: essai Zn- (15 mg de Zn / kg de poids frais)

I: essai Zn+ (30 mg de Zn / kg de poids frais)

Tableau 57. Comparaison par un test SNK des teneurs moyennes en Zn (a), Cd (b) et SH (c) dans les extraits hépatiques de gardons intoxiqués par injection intrapéritonéale de différentes combinaisons de Zn et de Cd.

Seuils de signification: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

Cd-	Cd-Zn-	Cd-Zn+	Cd+	Cd+Zn-	Cd+Zn+	Zn-	Zn+	
	**	**		**	**		***	Témoin
	**	**		**	**		***	Cd-
a			**					Cd-Zn-
			**					Cd-Zn+
				**	**		**	Cd+
								Cd+Zn-
								Cd+Zn+
								Zn-

Cd-	Cd-Zn-	Cd-Zn+	Cd+	Cd+Zn-	Cd+Zn+	Zn-	Zn+	
***	*		***	***	***			Témoin
	***	***	***	*	***	***	***	Cd-
b			***	**				Cd-Zn-
			***	***	*			Cd-Zn+
				***	***	***	***	Cd+
						***	***	Cd+Zn-
						*	**	Cd+Zn+
								Zn-

Cd-	Cd-Zn-	Cd-Zn+	Cd+	Cd+Zn-	Cd+Zn+	Zn-	Zn+	
	*		**	*			*	Témoin
								Cd-
c								Cd-Zn-
								Cd-Zn+
								Cd+
								Cd+Zn-
								Cd+Zn+
								Zn-

4.2. Etude chromatographique

Pour chaque essai, nous avons constitué un échantillon moyen composé de 400 μ l de la fraction soluble chauffée de chaque lot. Neuf échantillons de 2ml correspondant aux huit essais et au témoin ont été obtenus. Après un dosage protéique des échantillons, un ajustement de la concentration en protéines des différents échantillons a été réalisé par une dilution des échantillons les plus riches. Chaque échantillon a ensuite été analysé par chromatographie de filtration sur gel. Le Cd, le Zn et les groupements sulfhydriles ont été dosés dans les différentes fractions d'élution issues de la séparation chromatographique. Les profils d'élution et les profils de dosage sont présentés sur les figures 92 à 100. Pour plus de clarté dans l'exposé des résultats, les profils sont identifiés **par** l'intitulé des essais réalisés: Témoin, Cd-, Cd-Zn-, Cd-Zn+, Cd+Zn-, Cd+, Cd+Zn+, Zn- et Zn+.

Concernant l'absorbance, pour chaque profil chromatographique, nous retrouvons les pics I, II, IV et V définis dans le paragraphe 2.1.1.. Le pic III, quand il existe, est souvent masqué par le pic II, lequel est généralement important. Nous rappelons que le pic protéique III contient la métallothionéine. Il est à noter que chaque profil montre la présence de Zn lié à des composés de masse moléculaire élevée (pics I et II) dépourvus de groupements sulfhydriles. Au niveau du pic IV, la teneur en groupements sulfhydriles est élevée. Les composés élués à ce niveau sont dépourvus de Zn ou de Cd.

1- Le profil témoin (figure 92) présente des pics protéiques I et II de faibles amplitudes et ne possède pas de pic III net. Les teneurs en cadmium sont sous la limite de détection du spectrophotomètre utilisé pour toutes les Fractions. Le profil des teneurs en zinc présente trois pics de très faibles amplitudes au niveau des pics I et II ainsi qu'au niveau des fractions dans lesquelles est élue la métallothionéine (pic III).

2- Le profil Cd- (figure 93) présente les **4** pics protéiques I, II, IV et V à 280 nm. A 254 nm, un épaulement (pic III) est visible après le pic II. Cet épaulement est associé à un pic élevé de Cd. Un pic de **SH** est également noté à ce niveau. Enfin, on observe également un léger pic de Zn associé au pic III.

3- Le profil Cd+ (figure 94), correspondant à l'administration d'une dose élevée de Cd, présente les 5 pics protéiques de façon très nette. Le pic de Cd correspondant au pic III est très important. C'est le pic de Cd le plus élevé des 9 chromatographies effectuées. La teneur en Zn au niveau du pic III est plus importante que pour l'essai Cd-.

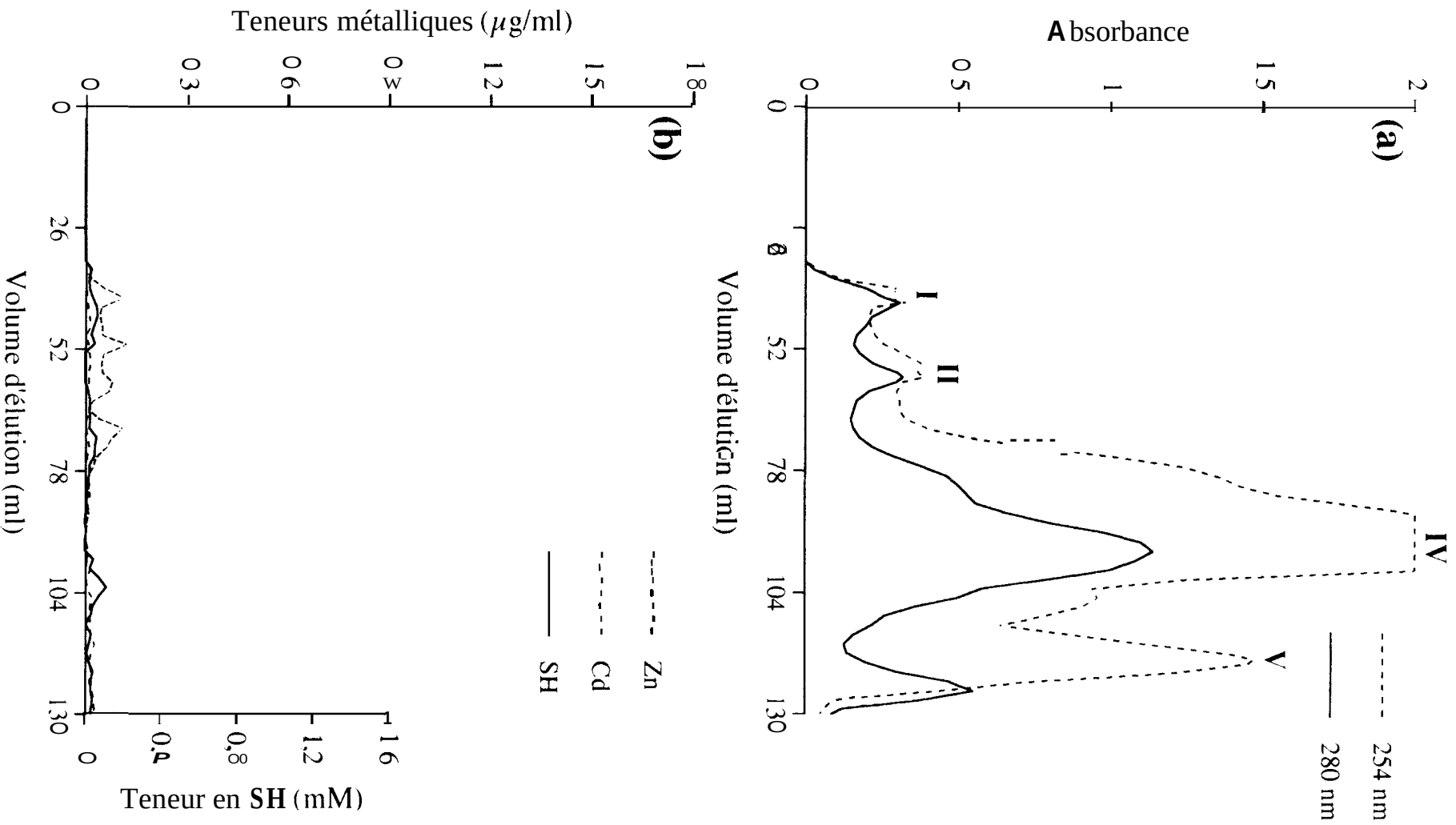


Figure 92 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons non intoxiqués. Profil témoin.
Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8,6; débit 1 ml/min.
(a): profils d'absorbance. (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

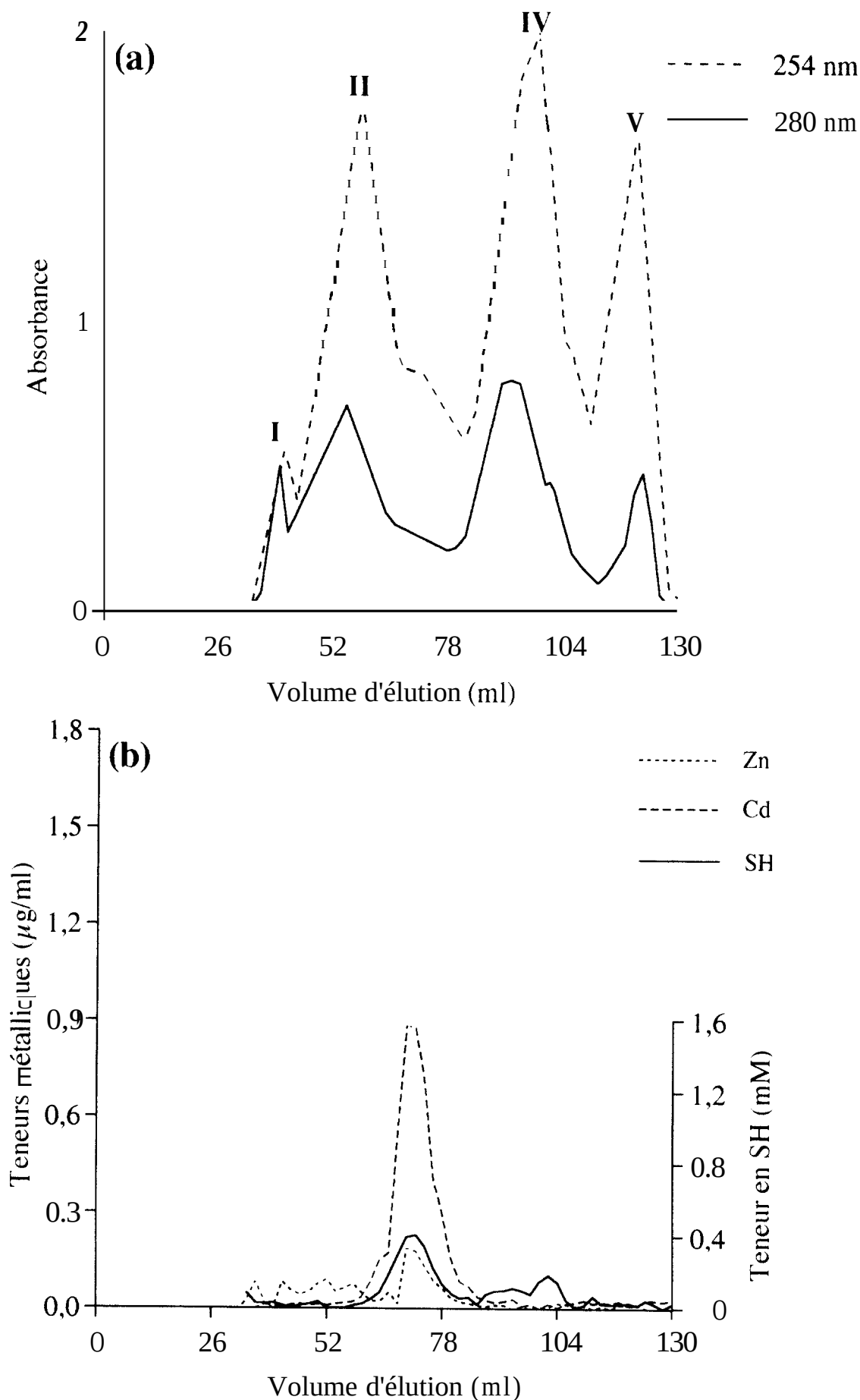


Figure 93 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués (Cd: 1.5mg/kg). Profil Cd-.

Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8.6; débit 1 ml/min. (a): profils d'absorbance, (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

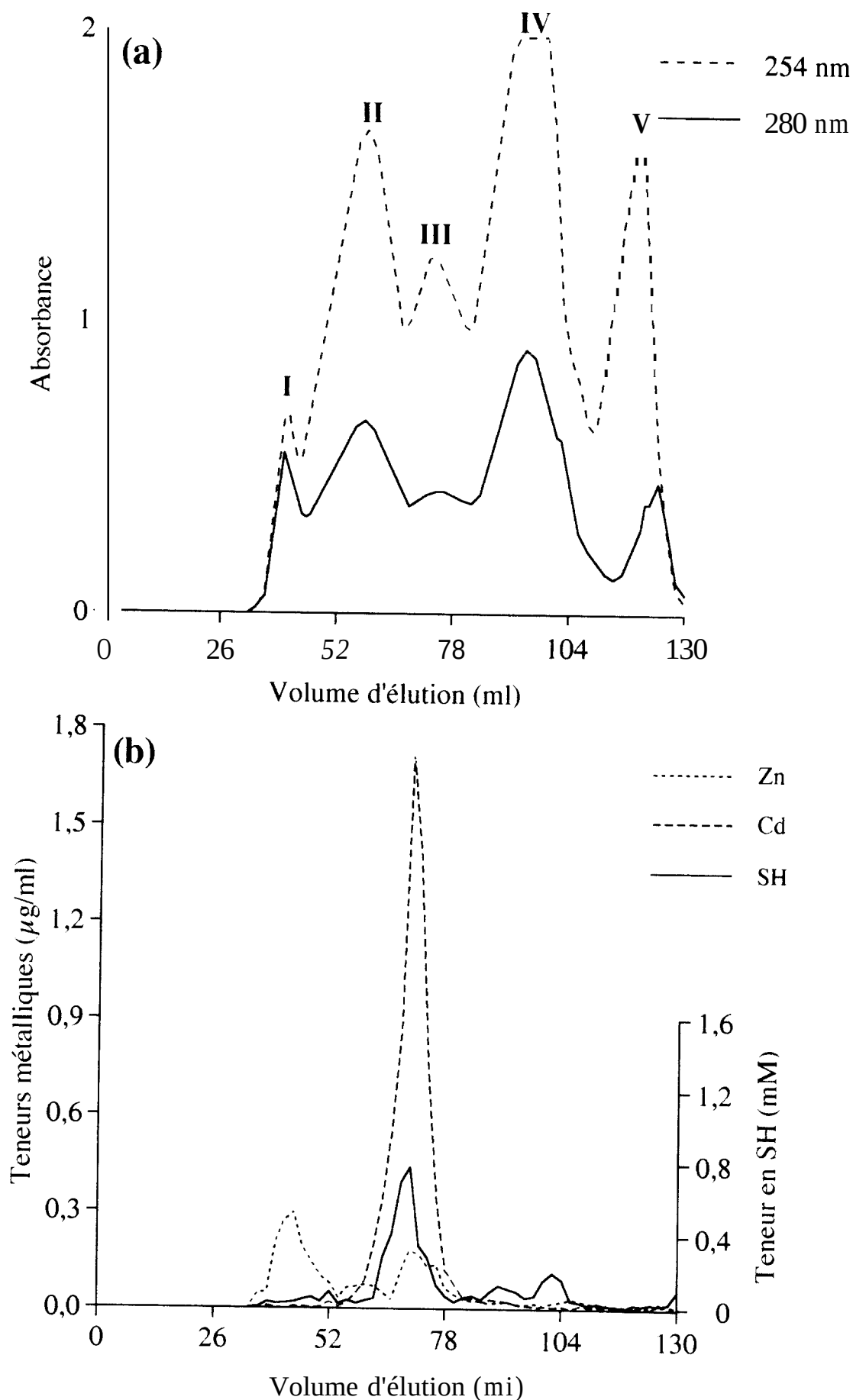


Figure 94 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués (Cd: 3 mg/kg). Profil Cd⁺. Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8,6; débit 1 ml/min. (a): profils d'absorbance, (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

4- Les profils Zn⁻ (figure 95) et Zn⁺ (figure 96) montrent des pics de Zn très importants atteignant 2,4 et 3,4 µg/ml respectivement au niveau du pic protéique III. L'augmentation de l'importance du pic de Zn pour le profil Zn⁺ par rapport au profil Zn⁻ est accompagnée d'une croissance de la teneur en groupements sulfhydriles au niveau du pic III.

5- Le profil Cd-Zn⁻ (figure 97) montre un pic II à 254 nm relativement large qui englobe le pic III. Le profil des teneurs métalliques présente, au niveau du pic III, un important pic de Zn coïncidant avec un pic de Cd plus faible que celui de la chromatographie précédente. Le pic de groupements sulfhydriles correspondant est également plus élevé.

6- Le profil Cd-Zn⁺ (figure 98) montre les 5 pics protéiques à 254 nm. Le pic III coïncide avec un pic de Zn (moins élevé que précédemment), un pic de Cd (plus faible que pour la chromatographie Cd⁻) et un pic de SH.

7- Les profils Cd+Zn⁻ (figure 99) et Cd+Zn⁺ (figure 100) révèlent des pics importants de zinc au volume d'élution de la métallothionéine. Par rapport à l'essai Cd⁺ (figure 94), les pics de Cd sont nettement plus faibles. Le profil Cd+Zn⁺ montre un pic de Zn correspondant à des protéines de masse moléculaire élevée.

Ces études chromatographiques indiquent que la majeure partie du Cd et des groupements sulfhydriles mesurée dans les fractions hépatiques solubles chauffées est présente au niveau de protéines correspondant à la métallothionéine. Le zinc est également associé aux mêmes protéines, mais est souvent associé aussi (en plus faible proportion) à des protéines de masses moléculaires élevées.

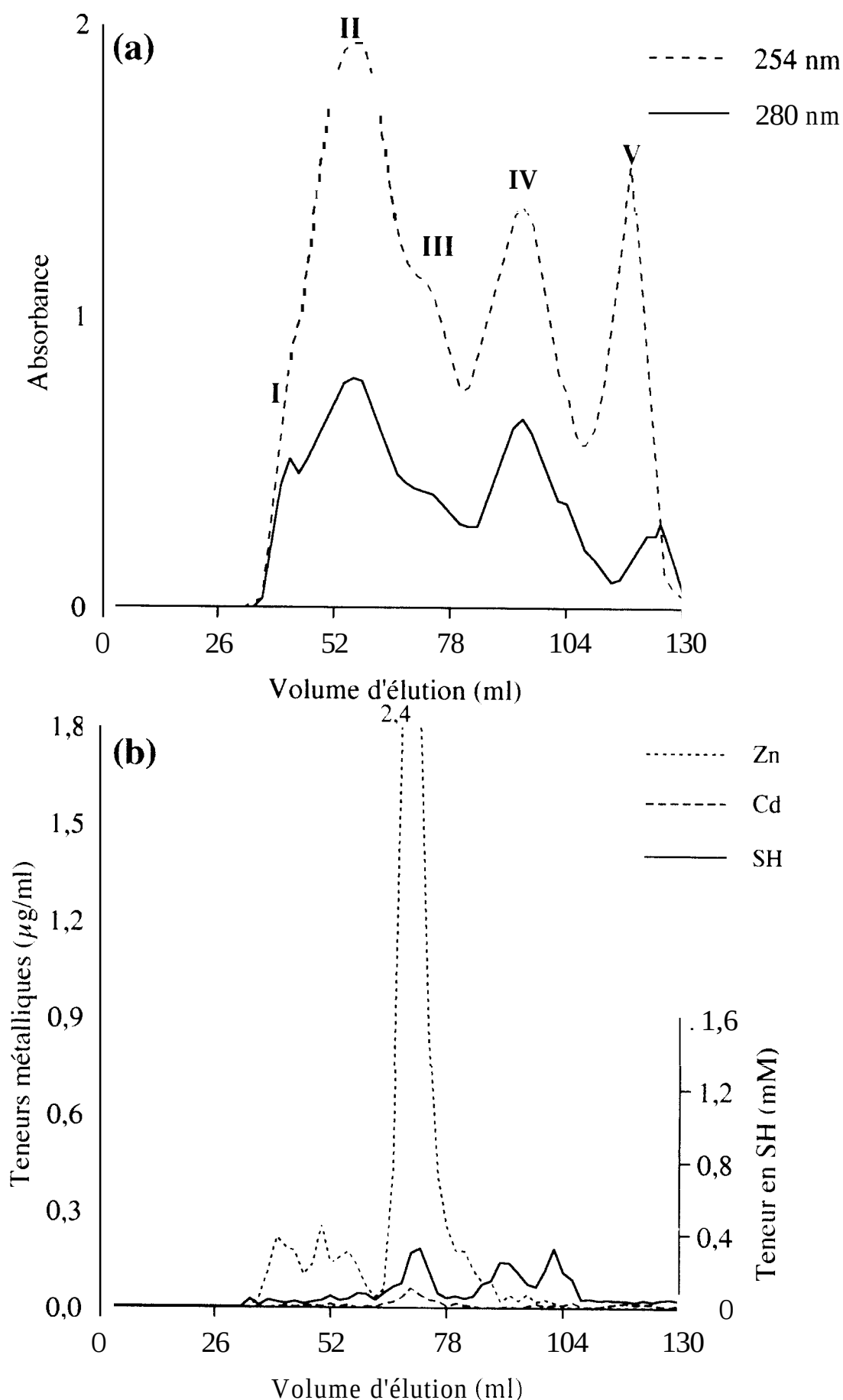


figure 95 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués (Zn: 15 mg/kg). Profil Zn-. Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10mM, pH 8,6; débit 1 ml/min. (a): profils d'absorbance, (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

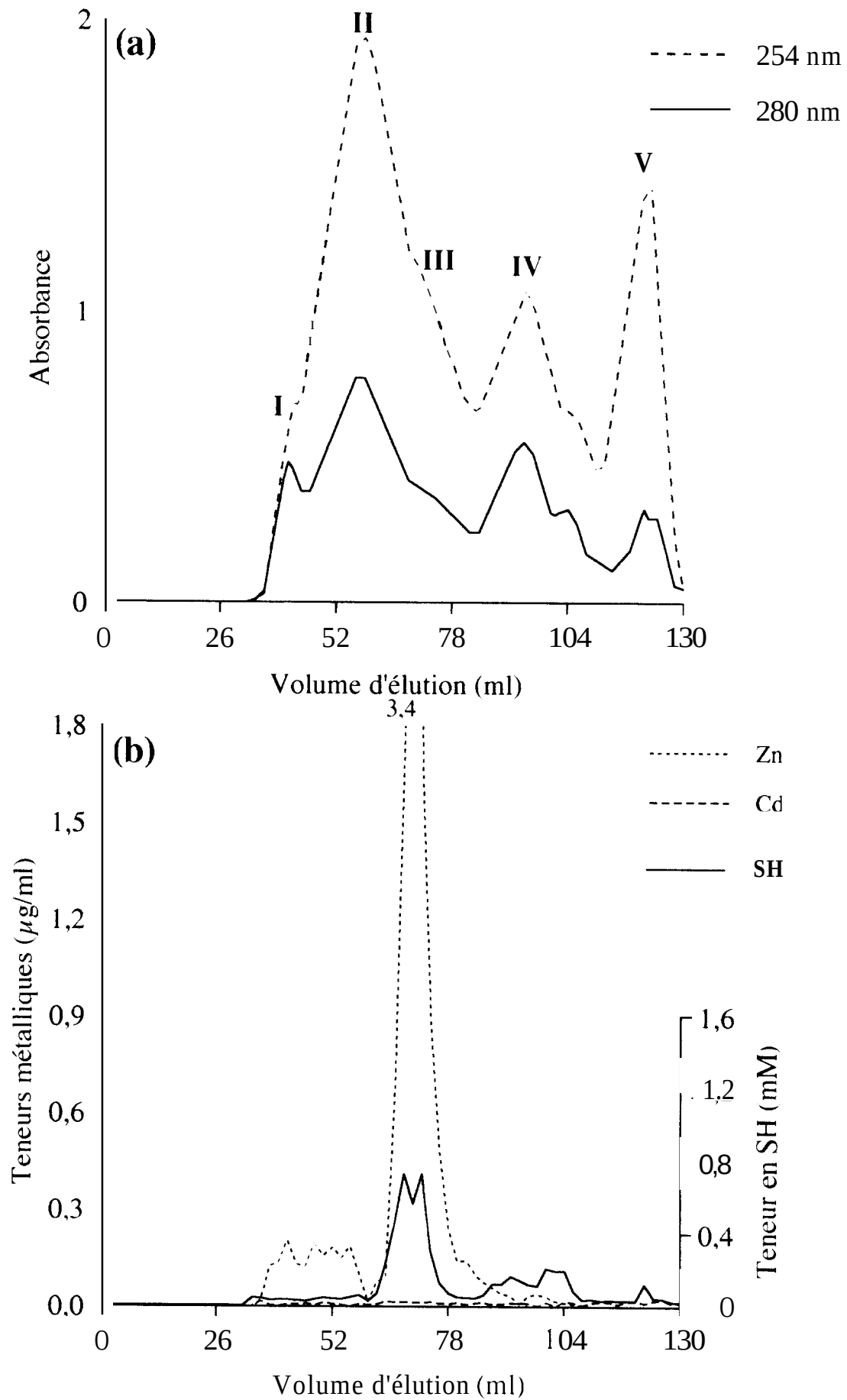


Figure 96 . Chromatographie de gel filtration **par** FPLC de la fraction hépatique soluble de gardsons intoxiqués (Zn: 30 mg/kg). Profil Zn⁺.
 Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8,6; débit 1 ml/min.
 (a): profils d'absorbance, (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

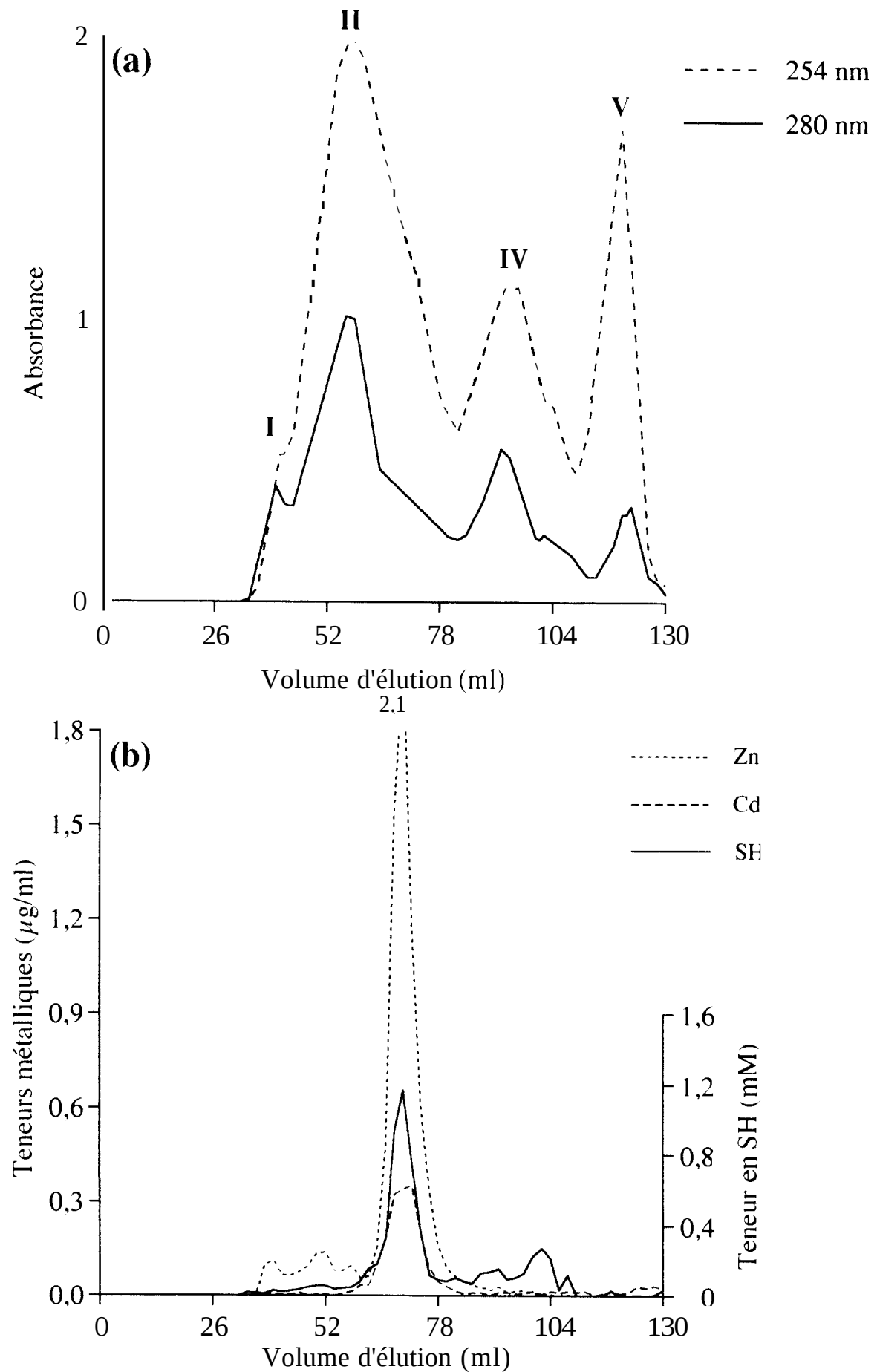


Figure 97 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués (Cd: 1,5 mg/kg, Zn: 15 mg/kg). Profil Cd-Zn-. Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8.6; débit 1 ml/min. (a): profils d'absorbance, (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

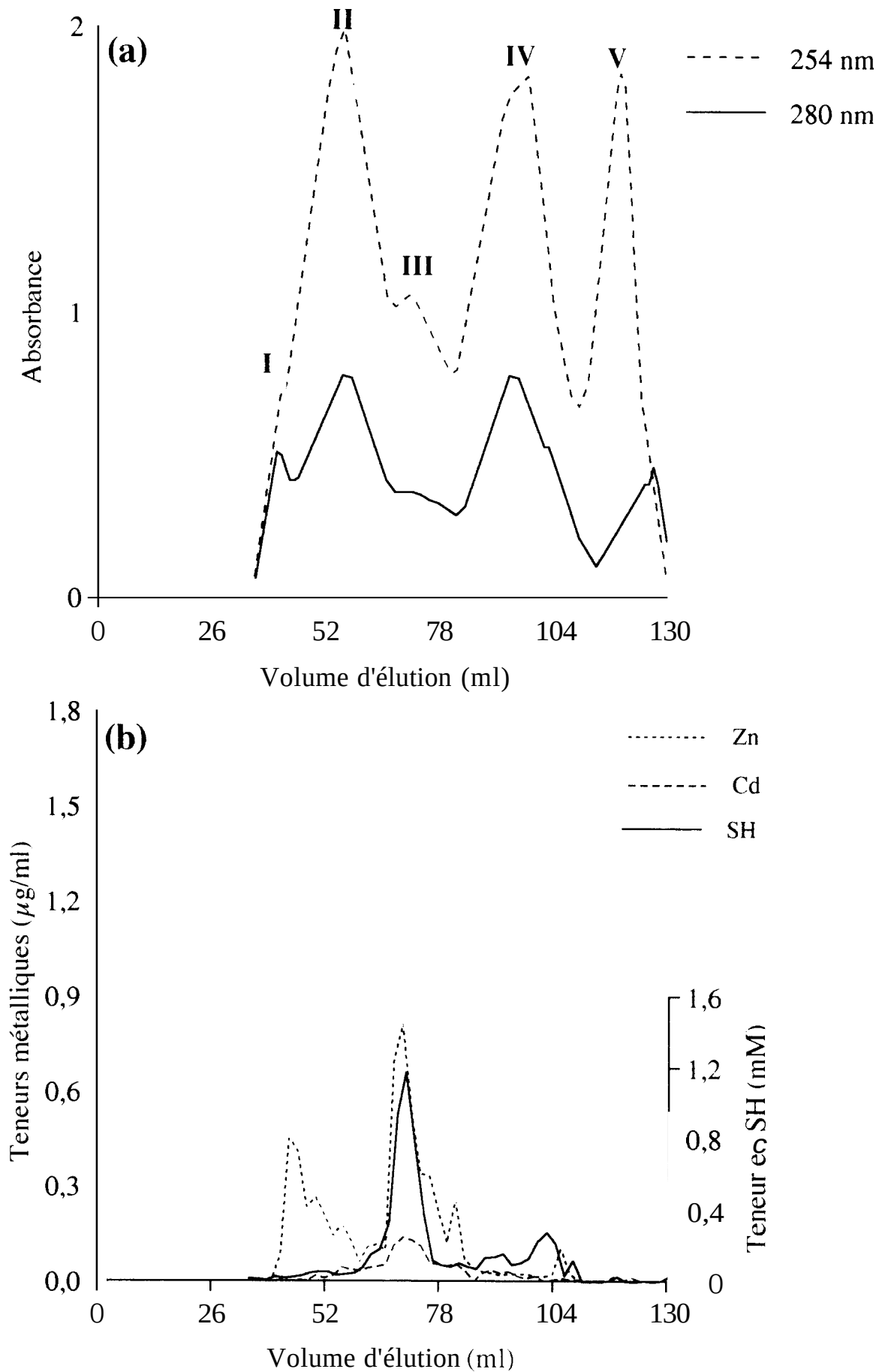


Figure 98 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardsons intoxiqués (Cd: 1.5 mg/kg, Zn: 30 mg/kg). Profil Cd-Zn+. Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8,6; débit 1 ml/min. (a): profils d'absorbance, (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

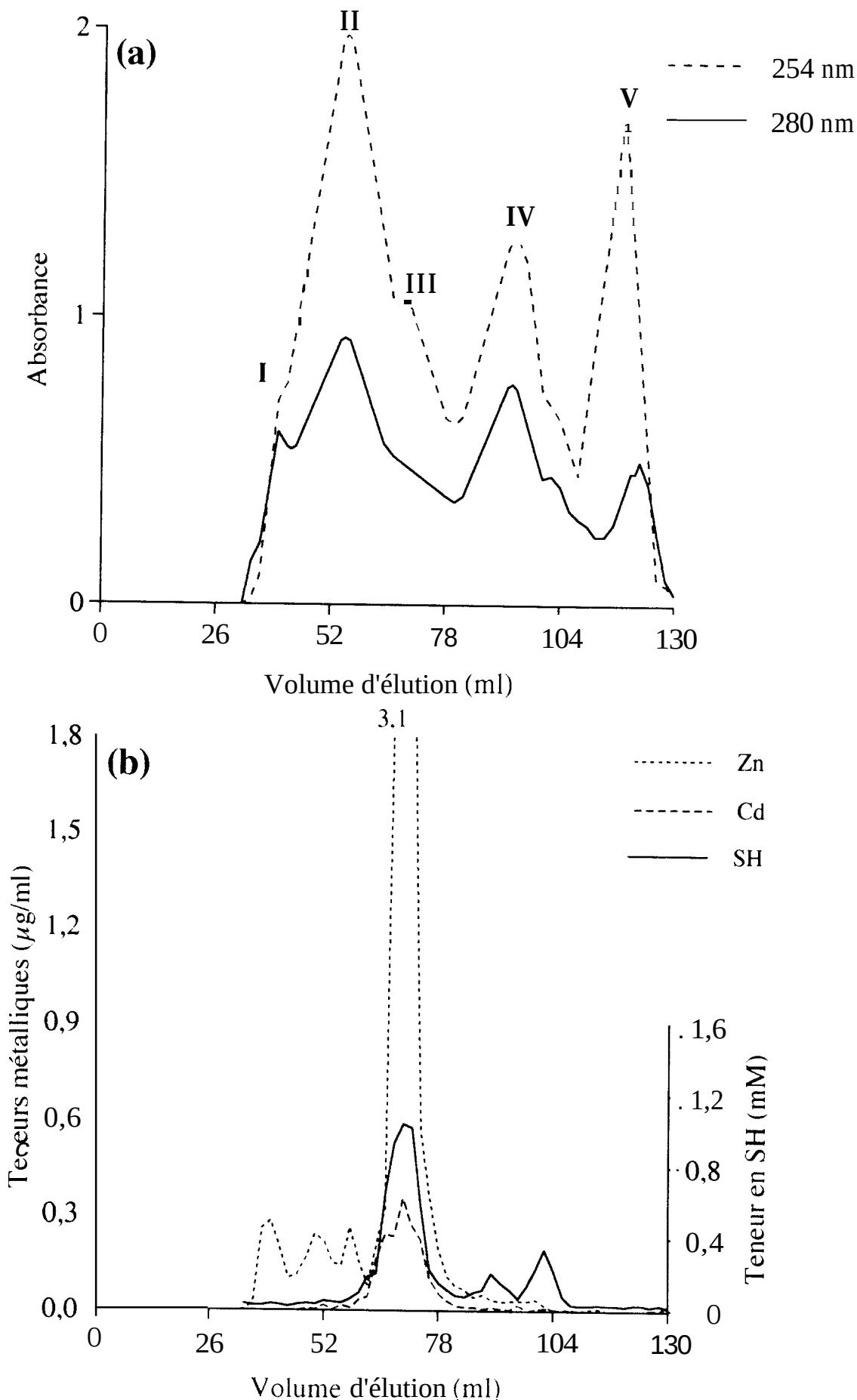


Figure 99 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de rats intoxiqués (Cd: 3 mg/kg, Zn: 15 mg/kg). Profil Cd+Zn-. Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8,6; débit 1 ml/min. (a): profils d'absorbance. (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

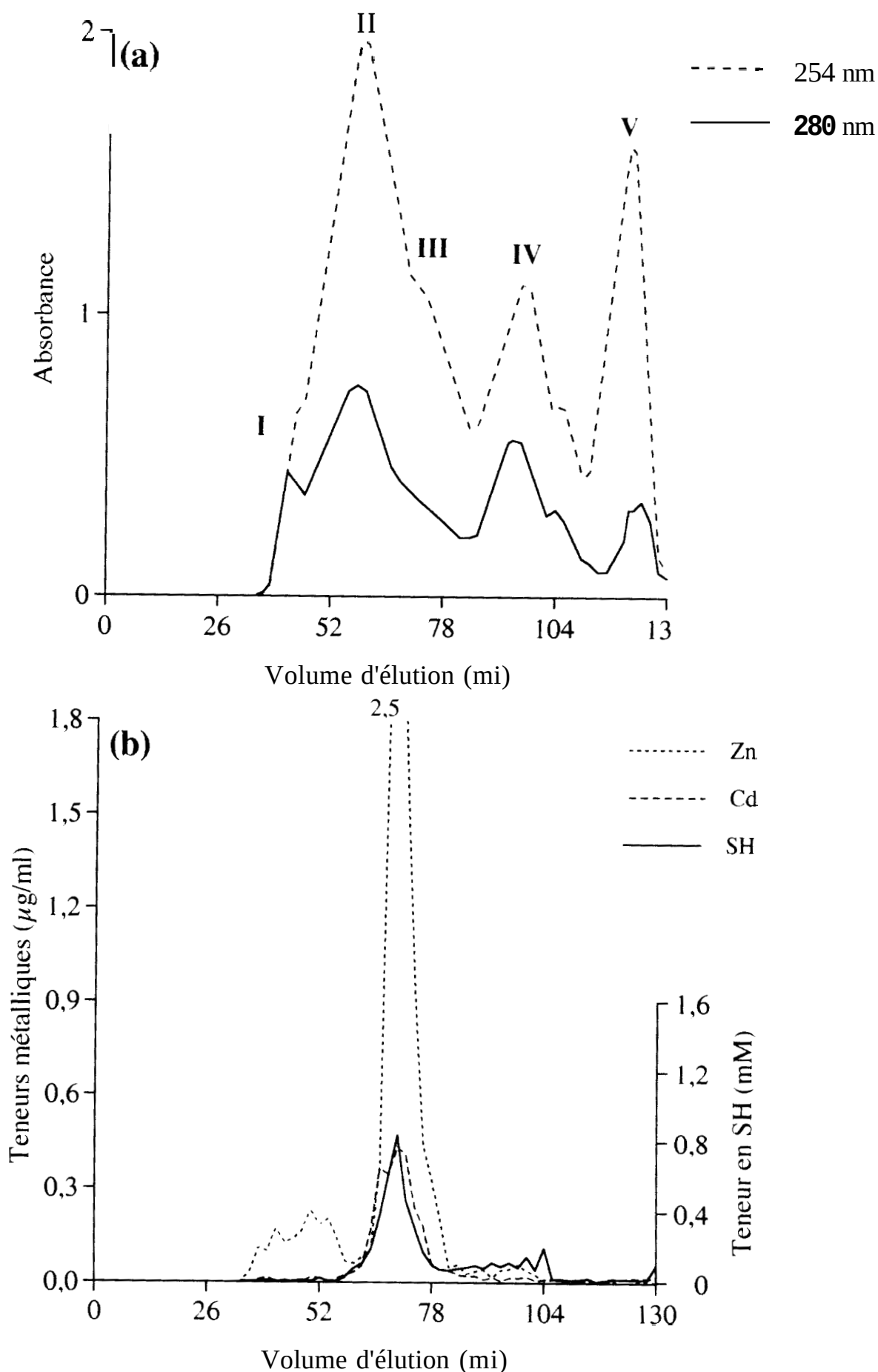


Figure 100 . Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de rats intoxiqués (Cd: 3 mg/kg, Zn: 30 mg/kg). Profil Cd+Zn+. Colonne utilisée: Superdex 75 (1,6 x 60 cm); tampon Tris/HCl 10 mM, pH 8.6; débit 1 ml/min. (a): profils d'absorbance, (b): profils d'élution du Cd, du Zn et des -SH.

5. Production d'anticorps monoclonaux anti-métallothionéine de gardon.

La production d'anticorps monoclonaux dirigés contre la métallothionéine hépatique de gardon a été menée par immunisation de souris balb/c et fusion des cellules spléniques avec des cellules myélomateuses de la lignée SP2O. La détection des hybridomes positifs a été réalisée en ELISA.

5.1. Réponse des souris immunisées

Le sérum de deux souris immunisées présentait une réactivité avec MTG1. La figure 101 présente la réaction des sérums avec MTG1 transférée sur une membrane d'Immobilion après électrophorèse en gel homogène (14%) en conditions dénaturantes. La bande immunoréactive se situe au niveau d'une protéine ayant une masse moléculaire apparente située entre 15,1 et 17,9 kDa. Le sérum, également testé en DIA, a montré une immunoréactivité avec MTG1 et MTG2.

5.2. Fusions et rendement des fusions

Quatre semaines après la dernière immunisation avec MTG1, la souris balb/c dont le sérum présentait l'immunoréactivité la plus élevée vis-à-vis de l'antigène a subi un rappel pour amplifier la réponse immunitaire. Quatre jours après le rappel, la souris a été sacrifiée et la rate prélevée. Le nombre de lymphoblastes obtenus a permis, après fusion (1 cellule myélomateuse / 5 lymphoblastes), la mise en culture 10 plaques de 24 puits et 9 plaques de 96 alvéoles contenant des cellules nourricières (macrophages issus d'un lavage péritonéal de souris balb/c) et 3 plaques de 24 puits sans cellules nourricières. Sur 1076 puits ainsi obtenus, des multiplications d'hybridomes ont été observées dans 170 puits (soit 14,5% des puits). Les surnageants de culture ont été testés par la méthode ELISA lorsque les cultures d'hybridomes présentaient un tapis monocellulaire uniforme. Sur les 170 puits testés, seuls les surnageants de culture de 5 puits nommés 51, 73, 94, 113 et HDS possédaient des anticorps dirigés contre la MTG1 et la MTG2 (tableau 58), ce qui représente 0,5% de la totalité des puits de culture ou 3% des hybridomes. Ces mêmes surnageants présentaient également une immunoréactivité par la méthode de DIA vis-à-vis des protéines.

5.3. Détermination des isotypes

Les anticorps dirigés contre la MT produits par les hybridomes ont été caractérisés par la technique ELISA. Les anticorps fixés à la MT ont été identifiés en utilisant des réactifs reconnaissant spécifiquement les IgG1, les IgG2a, les IgG2b, les IgG3, les IgM ou reconnaissant toutes les Ig de souris (tableau 59).

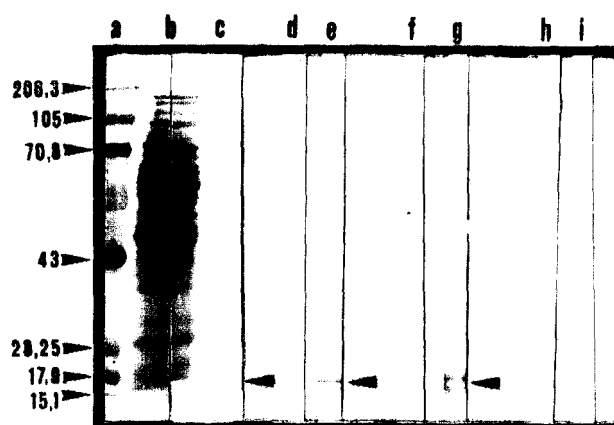


Figure 101. Immunodétection de la métallothionéine hépatique de gardon.

Les protéines **thermorésistantes** extraites à partir de foies de **gardons** intoxiqués **et** la métallothionéine **purifiée** ont été soumises à une électrophorèse **en gel** de polyacrylamide (14%) en conditions dénaturantes, puis électro-transférées sur une membrane d'Immobilion.

a: standards de masse moléculaire connue.

b: extrait hépatique.

c: MTG1 purifiée

d: étude de la spécificité du **sérum** de la **souris 1** sur l'extrait hépatique

e: étude de la spécificité du **sérum** de la **souris 1** sur MTG1 purifiée

f: étude de la spécificité du **sérum** de la **souris 2** sur l'extrait hépatique

g: étude de la spécificité du **sérum** de la **souris 2** sur MTG1 purifiée

h et i: contrôles avec le **sérum** d'une **souris saine** sur l'extrait hépatique et MTG1 purifiée

La fixation des anticorps du **sérum** sur les **préparations** a été révélée par un anticorps de lapin anti-IgG de souris marqué à la peroxydase.

Les flèches indiquent la position de la métallothionéine MTG1 purifiée (piste c) et les zones d'immunoréactivité obtenues avec le **sérum** de la **souris 1** (piste e) et de la **souris 2** (piste g).

Tableau 58. Criblage des hybridomes producteurs d'anticorps spécifiques de la métallothionéine de gardon par la méthode ELISA.

L'antigène a été **déposé** à raison de 500ng/puits. Les surnageants de culture ont été utilisés purs. La révélation est effectuée par un réactif anti-Ig totales marqué à la peroxydase. Les mesures sont exprimées en DO (mesure de l'absorbance à 492 nm). Deux préparations de MTG1 ont été utilisées.

Hybridomes	Reconnaissance de l'antigène		
	MTG1 (12/3/95)	MTG1 (30/3/95)	MTG2
51	0,156	1,070	1,358
73	0,154	1,270	1,116
94	1,034		-
113	1,159	1,042	1,042
HD5	1,262	1,070	1,358
SP2O	0,150	0,142	0,133

Tableau 59. Détermination de l'isotype des anticorps anti-métallothionéine de gardon produits par les hybridomes 51, 73, 94, 113 et HD5.

L'antigène (MTG1 ou MTG2) a été **fixé** sur le support à raison de 500ng/puits. La détection des isotypes a été réalisée avec des réactifs spécifiques et totaux marqués à la peroxydase. Les mesures sont exprimées en DO (mesure de l'absorbance à 492 nm). Les valeurs significatives sont en caractères gras.

Antigène	Hybridomes	Anti IgG1 1/10000°	Anti IgG2a 1/10000°	Anti IgG2b 1/12000°	Anti IgG3 1/10000°	Anti IgM 1/15000°	Anti Ig totales 1/15000°
M	51	0,063	0,064	0,090	0,059	0,109	0,172
	73	0,054	0,058	0,047	0,049	0,102	0,166
	94	0,049	0,051	0,052	0,047	1,035	0,993
	113	0,068	0,070	0,063	0,063	1,344	0,859
	HD5	0,054	0,055	0,046	0,041	1,335	0,862
	SP20	0,057	0,057	0,048	0,038	0,053	0,078
	PBS	0,062	0,055	0,037	0,042	0,044	0,060
M	51	0,060	0,059	0,049	0,048	0,054	0,114
	73	0,055	0,057	0,050	0,045	0,048	0,124
	94	0,052	0,053	0,045	0,044	0,740	0,438
	113	0,073	0,068	0,060	0,059	1,311	0,965
	HD5	0,056	0,057	0,049	0,051	1,150	0,915
	SP20	0,060	0,062	0,051	0,056	0,108	0,231
	PBS	0,054	0,059	0,040	0,045	0,052	0,061

Ces résultats montrent clairement que les hybridomes **MTG01-113**, **MTG01-94** et **MTG01HD5** produisent des anticorps d'isotype **IgM**.

La réponse des anticorps produits par les hybridomes MTG01-73 et MTG01-51 est nettement plus faible que les précédents (MTG01-113, -94, -HD5) aussi bien en présence d'anticorps secondaires reconnaissant les IgM qu'en présence de ceux reconnaissant toutes les Ig de souris. Lors de cette détermination des isotypes, les anticorps produits par les hybridomes MTG01-73 et MTG01-51 ne reconnaissent plus la protéine MTG2 (les valeurs de DO sont inférieures à celle obtenues avec le surnageant SP2O témoin). (voir paragraphe suivant).

5.4. Analyse de la stabilité des hybridomes

Les hybridomes MTG01-51 et MTG01-73 ont montré des variations de réponse selon les préparations des protéines ayant servi aux ELISA. Ainsi les hybridomes MTG01-51 et MTG01-73 étaient négatifs pour la préparation de la MTG1 du 12/3/95 alors qu'ils étaient positifs pour la préparation de la MTG1 du 30/3/95 (tableau 58). Les hybridomes MTG01-51, MTG01-73 et MTG01-94 se sont avérés perdre leur capacité de synthèse d'anticorps spécifiques dans les semaines suivant leur détection.

Les hybridomes MTG01-113 et MTG01-HD5 ne présentaient, quant à eux, aucune variation de réponse vis-à-vis des différentes préparations.

La croissance de certains hybridomes étant importante, ces derniers ont été mis en suspension afin de mettre d'autres puits en culture. Ainsi, nous avons obtenu les cultures 73a et b, 113 a et b et HD5 a et b. Le tableau 60 donne un récapitulatif des réponses en ELISA des différents surnageants de culture d'hybridomes prélevés à plusieurs dates. Les études ont été réalisées sur la MTG1 ou sur la MTG2. Au cours de ce contrôle, il s'est avéré que seuls les hybridomes MTG01-113 et MTG01-HD5 réagissaient positivement contre la MTG1 et la MTG2, quelle que soit la date de prélèvement des surnageants de culture.

La production d'anticorps monoclonaux étant destinée à la réalisation d'une méthode immunologique d'évaluation de la contamination des gardons, nous avons testé les hybridomes sur des extraits hépatiques bruts de gardons intoxiqués. En effet, le test devrait nous permettre de détecter la métallothionéine dans les foies de gardons sans effectuer préalablement des étapes de purification. Le tableau 61 regroupe les résultats de cette expérience. Seuls les hybridomes MTG01-113 et MTG01-HD5 ont des réponses positives avec l'extrait brut dilué au 30^{ème}. Ces résultats montrent des valeurs comparables à celles obtenues pour les antigènes purifiés MTG1 et MTG2.

Tableau 60. Analyse de la stabilité des souches hybrides sélectionnées. Les résultats sont exprimés en valeur de D₅₀. Les valeurs significatives sont en caractères gras. Les réponses sont comparées à la réponse obtenue avec le sérum de la souris immunisée (SS+). **SS-**: sérum de souris saine.

Hybridomes	MTG1 (250ng/puits)	MTG2 (250ng/puits)
51 7/4/95	0,198	0,258
51 10/4/95	0,173	0,217
51 13/4/95	0,176	0,207
51 8/12/95	0,084	0,169
73 a 10/4/95	0,225	0,316
73 b 13/4/95	0,131	0,390
73 13/4/95	0,160	0,202
73 20/4/95	0,202	0,213
73 8/12/95	0,095	0,121
94 14/4/95	0,173	0,251
94 20/4/95	0,111	0,125
94 8/12/95	0,088	0,072
113b 10/4/95	1,277	1,303
113 10/4/95	1,169	1,175
113 13/4/95	1,206	1,125
113 14/4/95	1,299	1,347
113 8/12/95	1,457	1,297
HD5 10/4/95	1,141	1,162
HD5 13/4/95	1,260	1,302
HD5 20/4/95	1,227	1,255
HD5 8/12/95	1,292	1,231
SP2O	0,193	0,188
PBS Tween	0,126	0,169
SS+ (10 ⁻³)	1,143	1,895
SS- (10 ⁻³)	0,407	1,006

Tableau 61. Réponses en ELISA sur un extrait hépatique brut des surnageants de culture des hybridomes. Les résultats sont exprimés en valeur de DO. Les valeurs significatives sont en caractères gras.

Hybridomes	Réponse
51 8/12/95	0,041
73 8/12/95	0,036
94 8/12/95	0,041
113 8/12/95	0,679
HD5 8/12/95	0,781
SP2O	0,043
PBS	0,042

5.5. Clonage

Certains hybridomes sélectionnés ont été clonés afin de s'assurer de leur caractère monoclonal et de leur stabilité. Seuls les hybridomes MTG01-113, MTG01-HD5 et MTG1-51 ont été clonés selon la méthode de dilution limite. Bien que MTG01-51 n'ait plus donné de réponse positive, il a quand même été cloné afin d'essayer de retrouver le clone qui donnait une forte réponse lors de sa détection. Ce clonage nous a permis d'obtenir 14 clones: 6 pour l'hybridome MTG01-113 (A2; D4; F2; G2; G5; H8), 6 pour MTG01-HD5 (AC7; AE6; AE8; C11; F12; H2) et 2 pour MTG01-51 (F7; H4). Les surnageants de culture des clones obtenus ont été testés en ELISA sur la MTG1, la MTG2 ou sur des extraits hépatiques bruts (tableau 62).

Les clones MTG01-51 (F7 et H4) ne produisent pas d'anticorps dirigé contre MTG1, MTG2 et le contenu de l'extrait hépatique. Les clones provenant de l'hybridome MTG01-113 sont tous positifs vis-à-vis des antigènes MTG1 et MTG2. Cependant, seuls MTG01-113 (G2 et F2) donnent des réponses positives sur l'extrait hépatique. Ceci pourrait suggérer que l'hybridome MTG01-113 était constitué de plusieurs souches (deux cellules hybridomes différentes ou plus se sont développées dans la même alvéole). Les six clones de l'hybridome MTG01-HD5 n'ont été testés que sur l'extrait hépatique (les préparations de MTG1 et MTG2 étant épuisées). Les réponses montrent que les surnageants des six clones contiennent des anticorps qui réagissent avec l'extrait hépatique. Dans ce cas, il se pourrait que l'hybridome MTG01-HD5 ne soit constitué que d'une seule souche.

5.6. Etude de la spécificité des anticorps monoclonaux

La spécificité des anticorps obtenus a été analysée par une étude comparative sur différentes métallothionéines de mammifères. Les trois métallothionéines de mammifères (MT du cheval, MTI et MTII du lapin) testées proviennent de la firme SIGMA. Les réponses ont été comparées à celles obtenues avec MTG1 et MTG2. Les MTs ont été déposées à raison de 2.5 µg par puits. Le sérum de la souris balb/c immunisée a également été testé. Les réponses sont données dans le tableau 63.

Les résultats indiquent que les anticorps produits par les hybridomes MTG01-113 et MTG01-HD5 ainsi que par les six clones obtenus à partir de MTG01-113 reconnaissent les MT de cheval et de lapin, de la même façon qu'ils reconnaissent MTG1 et MTG2. L'immunsérum de la souris immunisée par la MTG1 reconnaît MTG1 et MTG2, mais donne des réponses négatives avec les métallothionéines de mammifères.

Tableau 62. Mesure de la réponse en ELISA des anticorps monoclonaux produits par les clones obtenus à partir des hybridomes MTG01-51, MTG01-113 et MTG01-HD5. Les réponses sont données en valeur de Dû. Les surnageants de culture ont été testés sur MTG1, MTG2 (250 ng/puits) et sur un extrait hépatique de gardons intoxiqués, dilué au 1/30°. Les valeurs significatives sont en caractères gras.

Clones	MTG1	MTG2	Extrait hépatique
51 F7	0,297	0,399	-
51 H4	0,443	0,157	-
113A2	1,173	1,204	0,331
113D4	1,142	1,189	0,211
113F2	1,212	1,219	0,978
113G2	1,025	0,924	0,752
113G5	1,159	1,200	0,215
113H8	1,277	1,177	0,165
HD5 AC7			1,037
HDS AE6	-		1,060
HD5 AE8	-	-	1,116
HD5 C11			1,161
HD5 F12	-		1,085
HD5 H2			1,110
SP2O	0,193	0,188	0,057
PBS	0,126	0,169	0,061

Tableau 63. Analyser de la spécificité des anticorps monoclonaux produits par les hybridomes et les clones et du sérum de la **souris** immunisée. Etude sur les métallothionéines de cheval et de lapin. SS+: sérum de **souris** immunisée, SS-: sérum de souris saine.

Anticorps	MTG1	MTG2	MT1 lapin	Mi2 lapin	MT cheval
51 714	0,198	0,258	0,160	0,123	0,126
51 1014	0,173	0,217	0,151	0,109	0,107
51 1314	0,176	0,151	0,141	0,131	0,551
73 1314	0,160	0,202	0,151	0,141	0,143
73 2014	0,202	0,213	0,158	0,143	0,156
73a 1014	0,225	0,316	0,175	0,155	0,158
73b 1314	0,131	0,390	0,147	0,118	0,119
94 1414	0,111	0,125	0,137	0,109	0,110
94 2014	0,173	0,251	0,224	0,182	0,157
113 1014	1,169	1,175	0,806	1,184	1,143
113 1314	1,206	1,139	0,782	1,220	1,208
113 1414	1,299	1,347	0,594	1,104	1,154
113b 1014	1,277	1,303	1,108	1,410	1,394
HD5 10/4	1,141	1,274	1,070	1,350	1,249
HD5 13/4	1,260	1,302	1,010	1,306	1,211
HD5 2014	1,227	1,255	0,819	1,344	1,118
51-F7	0,297	0,399	0,180	0,142	0,119
51-H4	0,443	0,648	0,157	0,135	0,131
113-A2	1,173	1,204	0,719	1,072	1,114
113-D4	1,142	1,189	0,981	1,188	1,133
113-F2	1,212	1,219	1,057	1,282	1,146
113-G2	1,025	0,924	1,323	1,099	1,033
113-G5	1,159	1,200	0,802	1,120	1,161
113-H8	1,277	1,177	0,876	1,163	1,148
SS+	1,143	1,895	0,257	0,201	0,161
SS-	0,407	1,006	0,785	0,414	0,252
SP2O	0,193	0,188	0,160	0,139	0,130
PBS	0,126	0,169	0,232	0,148	0,095

5.7. Approche monoclonale du niveau d'intoxication des gardons

Afin d'approcher l'utilisation potentielle de l'anticorps monoclonal pour évaluer la contamination des gardons par les métaux traces, une étude préliminaire de la réponse de l'anticorps monoclonal MTG01-HD5-AC7 a été menée sur des extraits de foies de poissons intoxiqués par injection intrapéritonéale de combinaison de Zn et de Cd. Des aliquotes de chacun des 45 extraits hépatiques provenant de l'expérience décrite précédemment (voir § 11.5. du chapitre "matériels et méthodes") ont été diluées 10 fois dans du tampon phosphate contenant 0,5g/l d'EDTA après avoir ajusté les concentrations protéiques. Les puits d'une plaque ELISA ont été sensibilisés par deux réplicats de 100 µl de chacune des **45** solutions ainsi obtenues. Nous avons additionné de l'EDTA dans le tampon phosphate en espérant décrocher les métaux fixés aux métallothionéines.

Les diagrammes en barre de la figure 102 présentent les moyennes des absorbances obtenues après ELISA des 8 essais et du témoin ainsi que les écarts-types correspondants ($n=5$). L'analyse de variance révèle qu'il existe une différence très significative entre les essais ($F=4,73$; $p<0,0005$ pour **44** ddl). Les moyennes comparées à l'aide d'un test **SNK** (tableau **64**) révèlent que:

1- la fixation de l'anticorps monoclonal MTG01-HD5-AC7 est significativement supérieure pour l'essai témoin que pour l'ensemble des 8 essais d'intoxication.

2- Il n'existe pas de différence significative entre la reconnaissance des extraits des poissons intoxiqués des différents essais (animaux exposés expérimentalement au Cd, au Zn ou à leurs combinaisons).

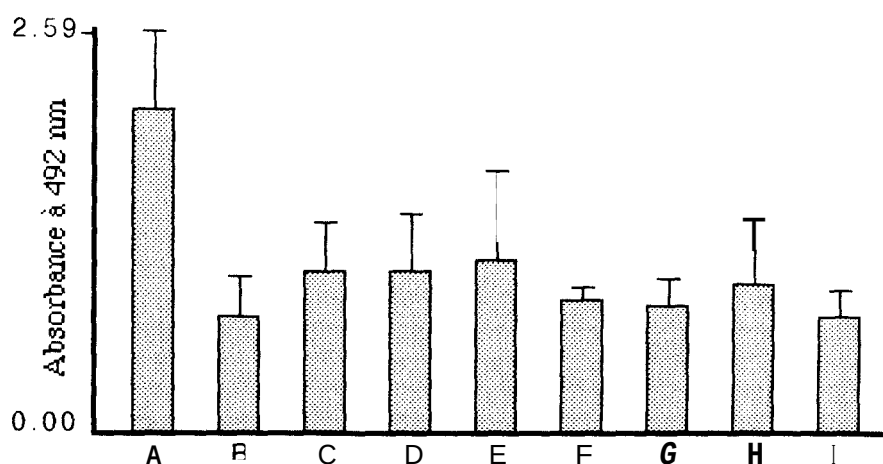


Figure 102. Utilisation potentielle de l'anticorps monoclonal MTG01-HD5-AC7 pour l'évaluation de la contamination hépatique.

Les réponses sont données en moyenne d'absorbance à 492 nm (n=5). La méthode ELISA a été appliquée à des extraits hépatiques chauffés de gardons intoxiqués par différentes combinaisons de Zn et de Cd en injections intrapéritonéales.

A: essai témoin

B: essai Cd- (1,5 mg de Cd / kg de poids frais)

C: essai Cd-Zn- (1,5 mg de Cd et 15 mg de Zn / kg de poids frais)

D: essai Cd-Zn+ (1,5 mg de Cd et 30 mg de Zn / kg de poids frais)

E: essai Cd+ (3 mg de Cd / kg de poids frais)

F: essai Cd+Zn- (3 mg de Cd et 15 mg de Zn / kg de poids frais)

G: essai Cd+Zn+ (3 mg de Cd et 30 mg de Zn / kg de poids frais)

H: essai Zn- (15 mg de Zn / kg de poids frais)

I: essai Zn+ (30 mg de Zn / kg de poids frais)

Tableau 64. Comparaison par un test SNK de la fixation de l'anticorps monoclonal MTG01-HD5-AC7 (mesure en absorbance) sur des extraits hépatiques de gardons intoxiqués par injection intrapéritonéale de différentes combinaisons de Zn et de Cd.

Seuil de signification: *** $p < 0,001$

Cd-	Cd-Zn-	Cd-Zn+	Cd+	Cd+Zn-	Cd+Zn+	Zn-	Zn+	
***	***	***	***	***	***	***	***	Témoin
				***				Cd-
								Cd-Zn-
								Cd-Zn+
								Cd+Zn-
								Cd+Zn+
								Zn-

6. Discussion-Conclusion sur l'étude de la métallothionéine

Après chromatographie de filtration sur gel par FPLC de la fraction soluble de foie de gardon intoxiqué par injection intrapéritonéale de Cd et de Zn, le métal recherché par SAAF dans les fractions d'élution est associé en majeure partie à des composés de masse moléculaire d'environ 13.7 kDa. Les avantages de l'utilisation de la FPLC sont l'acquisition d'une bonne résolution, de reproductibilité et un gain de temps par rapport aux techniques de chromatographie en basse pression. Woodworth *et al.* (1982) ont également détecté une protéine fixant le cadmium d'une masse de 9.6 kDa par filtration sur gel en chromatographie basse pression. Ce fait a été confirmé par Brown *et al.* (1987) qui ont estimé la masse de cette métalloprotéine à 10 kDa dans des conditions sensiblement semblables. La masse moléculaire plus élevée déterminée par chromatographie de filtration sur gel peut être attribuée à la forme non-globulaire de la métallothionéine (Kagi et Nordberg, 1979). Brown *et al.* (1987) n'avaient détecté qu'une seule forme en chromatographie d'échange d'ions qui appartenait à la famille des métallothionéines d'après sa composition en acides aminés. De façon plus précise, Bonwick et son équipe (1991) ont estimé la masse moléculaire de la métallothionéine à 6340 ± 838 Da en SDS-PAGE. Cette masse est proche de la masse moléculaire de MTGI déterminée par spectrométrie de masse ($5975 \pm 0,16$ Da). Lors de la purification de la métallothionéine hépatique de gardon, nous avons apporté une étape supplémentaire de séparation par rapport aux études d'autres auteurs dont la dernière étape était une chromatographie d'échange d'ions (les protéines étaient alors séparées par la masse et la charge). Par l'utilisation de la chromatographie en phase inverse, nous avons pu séparer deux composés majeurs composant le pic unique après chromatographie d'échange d'anions (pic III A). Ces deux protéines nommées MTGI et MTG2 ont des hydrophobicités différentes.

L'étude électrophorétique de MTGI et de MTG2 montre que ces deux protéines ont des comportements caractéristiques des métallothionéines (faible mobilité, larges bandes) qui ont déjà été mentionnés pour des métallothionéines d'autres espèces (Chatterjee et Maiti, 1987, Erraiss, 1989). La faible mobilité électrophorétique, qui n'est pas particulière aux métallothionéines de gardon, pourrait s'expliquer par la tendance des métallothionéines à former des structures oligomériques. A ce sujet, Bonwick et ses collaborateurs (1991) ont mis en évidence la formation de structures di- et tétramériques de la métallothionéine hépatique de gardon en SDS-PAGE. La largeur des bandes n'est pas une propriété propre à la métallothionéine de gardon et a été observée aussi pour les métallothionéines de mammifère (Maiti *et al.*, 1982), de xénope et de drosophile (Erraiss, 1989). Cette propriété est certainement due à une certaine instabilité de conformation lors de la migration électrophorétique.

MTGI et MTG2 ont un pI de 7.95 et de 7.83 respectivement. Il semble que ce pI ne soit pas influencé par la charge métallique puisqu'à pH 7.6 la MT n'est pas retenue par le gel de la colonne d'échange d'anions; elle est donc chargée positivement, alors qu'à pH 8,6, au dessus de son pI, donc

chargée négativement, elle est retenue. Ce fait diffère pour les MT de mammifères qui possèdent un pI compris entre 3,9 et 4,6 lorsqu'elles contiennent des métaux (Nordberg *et al.*, 1972; Templeton et Cherian, 1984). En absence de métaux, la MT rénale de cheval possède 2 charges négatives à un pH situé entre 7,5 et 9,5 (Béthune *et al.*, 1979). Le même nombre de charges est détecté pour l'isoforme MT-1 humaine, de lapin et de souris à pH 8,6. Sous les mêmes conditions, la MT-2 possède 3 charges négatives (Kissling, 1979). Les pI correspondants se rapprochent donc des pI de MTG1 et de MTG2.

Seule la protéine MTG1 a été séquencée et caractérisée comme étant une métallothionéine. La séquence de la MT montre que la structure primaire est très bien conservée parmi les espèces de poissons mais également parmi les autres organismes. MTG1 est composée d'un enchaînement de 60 acides aminés, dont 20 cystéines, disposés selon des motifs Cys-Cys, Cys-x-Cys ou Cys-x-x-Cys. Cette nouvelle séquence confirme que les MTs de poissons ne possèdent que 3 AA (MDP) avant le premier résidu cystéique alors que les MT de mammifères en possèdent 4. La séquence révèle l'absence de résidus de leucine et disoleucine, alors que Brown *et al.* (1987) ont évoqué la présence d'un résidu de chaque d'après la composition en acides aminés de la MT de gardon. Si MTG2 est une isoforme de MTG1, sa composition en acides aminés ou sa séquence révéleront peut être la présence de ces deux résidus.

Sur la base de l'évolution moléculaire (Kimura, 1983), une protéine qui a une fonction essentielle est moins sujette à des substitutions d'acides aminés pour maintenir la structure spatiale. C'est certainement le cas des métallothionéines. La conservation de la structure primaire des MTs implique que les protéines aient des fonctions communes. En plus de cet aspect structural, le fait que les MT soient distribuées dans une large variété d'organismes, vertébrés et invertébrés (Fowler, 1984), et que les protéines soient inductibles par les métaux traces, des hormones glucocorticoïdes ou des stress physiques (Brady *et al.*, 1979), indique que les MTs interviennent sans aucun doute dans la régulation du métabolisme des métaux et dans la détoxication (Vallee, 1979). Ce dernier point est appuyé dans notre étude par la détection de Cu associé au pic protéique contenant du Cd et du Zn alors que les poissons n'ont été intoxiqués que par ces deux métaux; les MTs ayant dans ce cas, fixé du Cu endogène. Ce fait avait déjà été remarqué par Brown *et al.* (1986) pour les MTs de gardon et de loche qui fixent du Zn et du Cu alors que les poissons n'avaient été intoxiqués que par du Cd seul.

Il est encore imprudent de parier de deux isoformes puisque la protéine MTG2 n'a pas été séquencée. Nous avons démontré que MTG1 n'était pas une forme oxydée de MTG2 et réciproquement. Les seules différences montrées dans cette étude sont des différences d'hydrophobicité et des pI différents mais très proches. Le comportement électrophorétique de MTG2, semblable à celui de MTG1 et à celui d'autres métallothionéines, nous porte à croire que MTG2 est une métallothionéine. De plus, en milieu acide, les MTs étant libres de métal, la différence

d'hydrophobicité ne peut pas être due à une variation des charges métalliques. L'existence de 2 isoformes de la métallothionéine dans le foie de gardon pourrait être en accord avec des observations faites sur des animaux de différents phyla. Nous pouvons citer en exemple, le rat (Richard et Cousins, 1977), la carpe (Kito *et al.*, 1986), la truite (Olsson et Haux, 1985), le carrassin doré (Yamamura et Suzuki, 1984) et le crabe (Olafson *et al.*, 1979). Il existe cependant d'autres espèces de poissons chez lesquelles une seule forme a été détectée: le poisson chat (Chatterjee et Maiti, 1990), la plie (Overnell et Combs, 1979) et le requin (Hidalgo et Flos, 1986). Chez *Coho salmon*, trois isoformes de MT hépatique ont par contre été isolées (McCarter *et al.*, 1982). La détection de différentes isoformes chez les diverses espèces peut ne pas être due à un phénomène biologique mais simplement à des variations dans les procédures de séparation. Dans cette optique, la technique de séparation par chromatographie de phase inverse a déjà été notée comme étant très efficace comme dernière étape de séparation des protéines (Klauser *et al.*, 1983). La composition en acides aminés ou la séquence de MTG2 pourront lever le voile sur son appartenance à la famille des métallothionéines.

Les MTs existent chez de nombreux organismes; la comparaison de leurs séquences semblent être un bon moyen de classement phylogénétique comme le montre les homologues de séquence des MTs des poissons. Les plus fortes homologues sont mesurées entre les espèces appartenant à un même ordre (95% d'homologie entre les séquences des MTs de gardon et de loche), voire à un même genre (98% entre les MTs de flet et de plie)

La MT pourrait être un outil intéressant pour évaluer l'effet de la pollution environnementale sur la faune piscicole des cours d'eau. Avant qu'une telle évaluation puisse se réaliser, il sera nécessaire de démontrer les liens entre les concentrations métalliques de l'environnement et les taux de MT dans les poissons. A ce sujet, Bonwick *et al.* (1991) ont montré qu'il existait une corrélation positive entre la concentration en MT dans le foie de gardon (dosée en DPP) et la durée d'exposition au Cd dans l'eau. Il faut également remarquer qu'il a été montré que les taux de base des métallothionéines varient avec l'âge, le stade de reproduction, la température de l'eau et le stade de développement chez la truite et la plie (Olsson *et al.*, 1987, 1989, 1990, Overnell *et al.*, 1988). Ces faits doivent absolument être pris en compte pour l'évaluation de l'effet dose/réponse, ce qui implique de nombreuses études préalables. Par une étude des effets d'injections intrapéritonéales de combinaisons de Zn et de Cd sur l'accumulation hépatique de ces deux éléments, nous avons montré que le Cd et le Zn se fixaient essentiellement à la métallothionéine. Lors de l'injection des deux métaux, la présence du Zn diminue la quantité de Cd présent dans la fraction soluble chauffée du foie de gardon. L'existence d'interactions métalliques doit également être prise en compte.

Le choix d'une méthode immunologique semble être la plus facile à utiliser en routine. Cependant, la production d'anticorps anti-MT spécifiques n'est pas facilement réalisable du fait la faible immunogénicité de la métallothionéine. Nous avons pu obtenir par une technique d'hybridation

de cellules myélomateuses avec des cellules spléniques de souris immunisées par MTG1 au moins trois clones producteurs d'anticorps monoclonaux reconnaissant MTG1. Par des études de réactions croisées ayant pour but de vérifier la spécificité des anticorps produits, nous avons remarqué que ces derniers reconnaissent MTG2 mais aussi des métallothionéines de cheval et de lapin. Par contre, le sérum de la souris immunisée ne reconnaît pas les métallothionéines de mammifères. Ce dernier résultat est en accord avec les observations d'autres auteurs (Norey *et al.*, 1989, Chatterjee et Maiti, 1990, Hylland, 1995). La reconnaissance des MTs de mammifères par nos anticorps monoclonaux pourrait s'expliquer par le fait que les différentes MTs possèdent des épitopes communs, épitopes de structure ou épitopes conformationnels. Au cours de contrôle de spécificité, nous n'avons pas pu mettre en évidence la reconnaissance de MTG1 électro-transférée sur une feuille de nitrocellulose (technique du Western-Blot) par les anticorps monoclonaux. Ceci peut s'expliquer par le fait que MTG1 a été dénaturée lors de la migration électrophorétique par la présence de **SDS** et de β -mercaptoéthanol. La linéarisation de la protéine pourrait empêcher la reconnaissance par les anticorps monoclonaux. Dans ce cas, l'épitope reconnu par les anticorps serait plutôt conformationnel. Une coupure enzymatique de MTG1, suivie d'un contrôle de la reconnaissance des différents peptides par les anticorps monoclonaux nous renseignera sur le **type** d'épitope reconnu.

L'utilisation d'un anticorps monoclonal dans l'approche immunologique de l'étude de la contamination hépatique des gardons nous a montré que les réponses des gardons intoxiqués par différentes combinaisons de Cd et de Zn étaient significativement inférieures à celles des témoins. Ces résultats sont totalement opposés à la réponse attendue, c'est-à-dire une immunoréactivité plus importante des extraits hépatiques des poissons intoxiqués par rapport à celle des poissons non contaminés. Nous pouvons émettre une hypothèse qui expliquerait ce fait. La MTG1 utilisée pour immuniser la souris qui est à l'origine des anticorps obtenus, était exempte de métal en raison d'un séjour dans un tampon acide lors de l'étape de chromatographie de phase inverse. L'anticorps monoclonal est donc dirigé contre une apothionéine. Il se pourrait alors que cet anticorps ne reconnaisse pas ou faiblement les métallothionéines chargées avec du Zn et/ou du Cd. Dans cette optique, nous avons deux possibilités: soit l'anticorps reconnaît un épitope qui est masqué par les métaux, soit il reconnaît un épitope conformationnel qui est modifié en présence de métaux. Dans les extraits témoins, l'anticorps reconnaîtrait des apothionéines présentes certes, en très faible quantité (voir le § 4.1.), mais occasionnant néanmoins une réponse très significative par rapport aux extraits hépatiques de poissons intoxiqués. Dans ces derniers, les métallothionéines seraient majoritaires par rapport aux apothionéines malgré l'utilisation de l'**EDTA**.

CHAPITRE IV.

DISCUSSION
ET
CONCLUSION

GENERALES

CHAPITRE IV. DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES

I. DISCUSSION GENERALE

L'évaluation de la qualité du milieu aquatique peut être envisagée **par** l'étude de différents compartiments: le biotope caractérisé par ses divers habitats et dans lequel nous pouvons analyser l'eau et le sédiment, les organismes vivants, animaux ou végétaux. **Au** cours de notre étude, pour évaluer l'impact de la contamination métallique et organique au niveau du canal à grand gabarit du Nord de la France, de l'Aa et de l'Aa canalisé, nous avons eu différentes approches telles que les analyses **d'eau**, les analyses de sédiments, et l'étude des macroinvertébrés benthiques. Nous allons, au cours de cette discussion, tenter de faire apparaître les inconvénients et les avantages des méthodes utilisées par rapport aux résultats obtenus, aux coûts, ou encore à leurs réalisations.

1-L'eau.

L'analyse des concentrations métalliques dans les eaux brutes des différents sites étudiés ont permis de faire un classement général des cours **d'eau** selon un ordre de qualité décroissante (tableau 65)

Ces analyses **d'eau** n'ont été réalisées que lors des deux premières campagnes et pour 7 sites sur les 14 étudiés. Il s'est en effet avéré que la détermination de certaines concentrations métalliques était limitée **par** les seuils de détection des appareils utilisés. Concernant les concentrations métalliques, il était alors impossible d'obtenir un nombre de valeurs suffisantes pour espérer réaliser des études statistiques. Les analyses de métaux traces ne sont d'ailleurs plus effectuées en routine depuis quelques années par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie qui rencontrait les mêmes problèmes. En fait, l'Agence de l'Eau mesure surtout le pH, la température, la conductivité, le taux de matières **en** suspension, la DBO₅, la DCO, la teneur en oxygène dissous, le pourcentage de saturation en oxygène, les teneurs en NH_4^+ , NO_2^- et NO_3^- , l'azote Kjeldahl et la teneur en PO_4^{3-} (voir les tableaux 12 et 24). Ces paramètres fournissent des renseignements généraux sur les conditions de vie mais présentent de fortes variabilités **en** raison des caractéristiques mêmes du milieu. Le problème des micropolluants (métaux, xénobiotiques, ...) repose sur le fait qu'ils sont souvent en concentrations

inférieures aux seuils de détection et qu'il est impossible de les rechercher tous. De plus, les analyses d'eau ont l'inconvénient d'être ponctuelles, et de ne fournir une estimation de la qualité qu'à un moment donné. De nombreuses analyses espacées dans le temps sont dès lors nécessaires pour estimer la qualité moyenne d'un site et pour intégrer les variations dues à des causes aussi diverses que le cycle nycthéral, les rejets industriels intermittents, les lâchers d'écluses, ... La multiplication du nombre d'analyses et du nombre de contaminants recherchés augmente considérablement le coût des études qui est souvent un facteur limitant. De plus, certaines analyses impliquent des conditions de stockage et de stabilisations particulières pour éviter une évolution des échantillons, ce qui engendre des contraintes supplémentaires. Certaines analyses sont cependant inévitables quand un problème est connu (effluent, par exemple) ou lors d'une pollution aiguë.

Bien que de nombreuses études sur les effets de certains contaminants de l'eau sur les organismes vivants soient menées en laboratoire, il est difficile d'extrapoler les résultats sur les phénomènes *in situ* du fait des nombreuses interactions existant entre les diverses composantes du milieu naturel. En plus des analyses physico-chimiques et chimiques, il est en effet important de réaliser des analyses biologiques pour évaluer l'impact de la qualité de l'eau sur les organismes vivants. Cette évaluation peut être effectuée en laboratoire à l'aide de tests de toxicité (test sur daphnies, test "Microtox" sur bactéries, ...) réalisés surtout sur des effluents car ils ne sont bien souvent fiables que si la contamination est assez importante. L'approche de l'impact de la qualité de l'eau sur les communautés naturelles doit également passer par des études sur le terrain (recherche de biomarqueurs qui sont généralement plus sensibles, étude de populations, ...) que nous détaillerons par la suite.

2- Les sédiments

Les paramètres physico-chimiques et les paramètres organiques tels que le carbone organique total, l'azote total Kjeldahl, le phosphore total, peuvent être déterminés dans les sédiments. L'analyse des sédiments présentent plusieurs intérêts. Tout d'abord, ceux-ci ont une forte capacité d'adsorption et concentrent certains contaminants tels que les métaux (Cairns *et al.*, 1984). Les micropolluants sont alors plus concentrés que dans l'eau et donc mieux détectables car leurs concentrations sont souvent au-dessus des seuils de détection. De plus, des prélèvements par carottage, par exemple, donneront des renseignements sur les pollutions passées, mais il faudra toutefois tenir compte des interactions dues à des variations éventuelles de granulométrie (des envasements à certaines périodes peuvent amener plus de fractions fines qui ont une forte capacité d'adsorption donc de concentration). Un autre intérêt réside dans le fait de pouvoir mettre en évidence une contamination actuelle en utilisant les sédiments superficiels. Ces derniers peuvent en effet être d'origine récente mais il convient toutefois de noter qu'ils peuvent également être le fruit d'une remise en suspension de sédiments

anciens due à des facteurs divers (curage, trafic fluvial, lâcher d'écluse, modification des paramètres physico-chimiques, ...)

Au cours de cette étude, nous avons déterminé des teneurs en métaux et en matière organique dans les sédiments piégés, des sédiments prélevés au fond des cours d'eau et dans la fraction fine ($<63 \mu\text{m}$) de ces derniers. Il s'avère que les analyses des différents types de sédiments ont mené aux mêmes conclusions quant au degré de contamination de certains sites du canal à grand gabarit (canal d'Aire et canal de la Deûle en particulier). Les avantages d'utiliser le sédiment piégé sont multiples *car* il est facilement récolté et rend possible l'étude des éventuels transferts de polluants à partir du sédiment vers les organismes. Cette fraction sédimentaire est en effet totalement en contact avec les organismes, contrairement à la zone plus profonde du sédiment récupérable en utilisant une benne ou un carottier et qui est, d'ailleurs, souvent très pauvre, voire totalement dépourvue de faune. De plus, la technique de récupération des sédiments par piégeage **permet** d'obtenir des sédiments à l'endroit même où vivent les macroinvertébrés et où il est parfois impossible d'en prélever avec des instruments tels que les bennes (présence de blocs de pierre, sédiments trop compacts,...)

Les valeurs des paramètres ont été analysées par différentes méthodes. Les méthodes statistiques de comparaison multiple ont permis de classer les sites en fonction de l'enrichissement des sédiments pour chaque paramètre (tableau 65).

Cette classification diffère selon les paramètres considérés mais nous voyons que, globalement, les sites du canal d'Aire (62-63) et du canal de la Deûle (77-78-79-80) sont les plus enrichis en éléments toxiques et organiques et que les sites du canal de la Sensée (site **46**) et de l'Aa (site 101) sont les moins chargés.

La comparaison des moyennes des valeurs des différents paramètres aux normes actuellement en vigueur ou aux valeurs de référence apporte des renseignements supplémentaires quant au degré de contamination des différents sites. Ainsi, nous avons pu montrer que le canal à grand gabarit au niveau du bassin minier (canal d'Aire et canal de la Deûle) était **nettement** contaminé **par** les métaux traces. On ne peut, au passage, que regretter l'absence de normes françaises **pour** certains paramètres tels que les hydrocarbures, les PCB ou la MO. La comparaison des teneurs métalliques des sédiments aux valeurs de référence données par le Ministère de l'Environnement (1993) ont **permis** de déterminer les niveaux de contamination des sites (tableau 65).

Les méthodes d'analyses multivariées telles que l'Analyse en Composantes Principales **permettent** de visualiser sur un graphique la position des sites entre eux en fonction des charges globales des sédiments. **Ces** analyses peuvent également mettre en évidence des corrélations entre les paramètres. Les ACP effectuées ont révélé que les sites du canal d'Aire (**62-63**) et du canal de la

Deûle (77-78-79-80) sont nettement plus chargés que les sites de l'Aa (101) et du canal de la Sensée (46).

Tout comme dans le cas de l'eau, les analyses de sédiments sont coûteuses. La recherche de contaminants est souvent limitée aux contaminants présumés être présents selon la nature et l'environnement du site. Il est donc souvent impossible de caractériser totalement un sédiment **en** recherchant l'ensemble des micropolluants. De plus, le dosage des contaminants donne une vague estimation de la toxicité potentielle des sédiments mais ne fournit **pas** de renseignements précis sur la toxicité réelle. Pour les organismes vivants, celle-ci dépendra des conditions physico-chimiques et **des** interactions abiotiques et biotiques diverses qui ont une influence sur la spéciation, la biodisponibilité des contaminants **et** sur leurs effets.

Pour déterminer la toxicité des sédiments, il faut, par exemple, utiliser des tests de toxicité tels que le test "Microtox". Nous avons utilisé ce dernier lors d'une étude pour l'Agence de l'Eau (Grumiaux *et al*, 1992). Ces tests réalisés sur les sédiments de quelques sites du canal à grand gabarit avaient prouvé la forte toxicité des sédiments du canal d'Aire (sites 62 et 63).

Une autre façon d'évaluer la toxicité des eaux et des sédiments d'un site est d'étudier les effets sur les organismes vivant dans cette zone. Ainsi, il est nécessaire d'effectuer des études *in situ* afin de prendre en considération des bioindicateurs benthiques et de visualiser l'impact de la qualité du biotope sur les communautés vivantes.

3- Les organismes vivants

La qualité biologique du milieu aquatique peut être envisagée à trois niveaux d'organisation: l'individu, la population ou la communauté (Wong et Dixon, 1995). Rappelons que la population correspond à un ensemble d'individus appartenant à une seule et même espèce sans limite spatiale. La communauté (ou le peuplement) est un ensemble de populations habitant un même écosystème.

Au niveau individuel, les études sont centrées **sur** l'observation des réponses biochimiques et physiologiques aux contaminants du milieu. Le principe des marqueurs biochimiques se base sur la supposition que tout effet chimique sur l'écosystème débute par une interaction dans les organismes entre un composé chimique et des récepteurs biochimiques (Hodson, 1986). Dans ce cas, l'indicateur d'exposition doit être observé avant que les effets soient irréversibles et à des concentrations de toxique typiques des milieux contaminés. Dans cette optique, la métallothionéine en tant qu'indicateur d'exposition des organismes aux métaux traces a **été étudiée par** de nombreux auteurs (George et Olsson, 1994). Dans notre travail, nous avons démontré que la métallothionéine hépatique du gardon est induite **par** des injections intrapéritonéales de Cd et/ou de Zn et que ces deux métaux s'accumulent

au niveau du foie. Une approche préliminaire de l'utilisation de l'anticorps monoclonal pour estimer la contamination hépatique a révélé l'existence d'une réponse significativement différente entre les animaux témoins et les animaux intoxiqués. D'autres études et des applications *in situ* seront nécessaires pour élaborer un test immunologique d'évaluation de la contamination des gardons à partir des anticorps monoclonaux spécifiques de la métallothionéine hépatique de gardon. Ce test serait basé sur l'emploi de la technique ELISA qui est rapide et qui ne nécessite pas l'utilisation de produits radioactifs contrairement à la technique RIA.

Des transferts de polluants chez le gardon sont actuellement étudiés par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie en collaboration avec le Conseil Supérieur de la Pêche sur un réseau d'une soixantaine de points du bassin Artois-Picardie. Les analyses portent essentiellement sur la détermination des concentrations en métaux traces dans le foie, les reins et les branchies. Des études comparatives entre de telles données et celles obtenues par l'utilisation du test immunologique pourront être envisagées. L'étude de poissons présente cependant quelques inconvénients dûs, **par** exemple, aux réempoissonnements ou aux déplacements des poissons.

L'étude des transferts de micropolluants peut s'avérer délicate **car** il existe de nombreuses variations de réponse en fonction de l'âge, du sexe, ... (voir le chapitre d'introduction). De telles analyses sur les macroinvertébrés du canal à grand gabarit (dosage de métaux traces) n'ont pas fourni de résultats concluants (Grumiaux *et al.*, 1992). On remarquera toutefois l'intérêt des études sur des organismes accumulateurs (bioaccumulateurs) qui donnent des renseignements même si les micropolluants sont sous forme de traces indétectables dans le milieu.

Au niveau des populations, des réponses telles que les relations âge/taille (croissance), la fécondité (reproduction) et les classes d'âge (recrutement) peuvent être étudiées (Munkittrick et Dixon, 1989). A ce sujet, les piégeages des macroinvertébrés des sites retenus ont révélé quelques familles communes à de nombreux sites:

- les *Erpobdellidae*,
- les *Glossiphoniidae*,
- les *Asellidae*,
- les *Chironomidae*.

Il serait intéressant d'approfondir les recherches sur les populations d'*Erpobdella*, de *Glossiphonia*, d'aselles et de chironomes, afin de vérifier si elles présentent des variations (au niveau de la croissance, la reproduction,...) **en** fonction de la qualité des milieux dans lesquels elles vivent.

Au niveau du peuplement ou de la communauté, l'évaluation de la qualité du milieu explore les changements de la diversité spécifique ou encore de la présence ou de l'absence d'espèces indicatrices. A ce sujet, Schlindler (1987) indique que les premières réponses à un stress d'origine

anthropique dans les écosystème aquatiques impliquent des changements dans la composition spécifique tels que l'augmentation des petites espèces à fort potentiel de reproduction et de dispersion ou la disparition des espèces indicatrices sensibles. Dans notre étude, nous avons effectivement pu montrer la disparition de taxons tels que les *Gammaridae*, les *Atyidae*, les *Astacidae*, certains mollusques, certains trichoptères et l'augmentation des abondances de certaines familles telles que les *Tubificidae* et les *Chironomidae* lorsque la qualité du milieu se dégradait. Les changements des structures des communautés peuvent être illustrés par l'élaboration des chaînes alimentaires et le calcul de l'abondance relative des macroinvertébrés classés selon leur mode de nutrition. Le calcul de descripteurs de diversité (indice de diversité, d'équitabilité, d'abondance,...) nous renseignera sur la structure des communautés alors que le calcul des indices biologique nous permettra de faire une estimation de la qualité du milieu. Dans ce sens, à titre purement exploratoire, compte tenu des différentes modalités de récolte pronées par les auteurs, nous avons calculé des indices à l'aide de diverses grilles ou méthodes (IB, IQBP, IBGN, ASFT). Le calcul des différents indices biologiques permet de classer les sites selon leur qualité biologique (tableau 65).

D'après les indices et les scores, la qualité biologique du site de l'Aa (101) est la meilleure. Les sites 62 (canal d'Aire) et 80 (canal de la Deûle) ont la plus mauvaise qualité. Ces constatations sont semblables à celles faites avec les autres méthodes (dosages des métaux dans l'eau ou les sédiments). Cependant, nous voyons que les sites de l'Aa canalisé (102-103-104) sont de meilleure qualité biologique que le site de la Sensée (46) alors que nous avons montré que les sédiments de ce dernier site étaient globalement moins chargés en métaux traces que ceux de l'Aa canalisé. Ceci démontre l'importance de facteurs autres que les paramètres chimiques des sédiments dans l'estimation de la qualité du milieu aquatique. Dans ce cas précis, le faible trafic fluvial, la présence de végétaux supérieurs et la présence d'habitats plus diversifiés, sont certainement la cause de l'amélioration de la qualité biologique bien que la qualité du sédiment soit moindre. Nous notons par ailleurs que le score ASPT* classe le site 46 au même niveau de qualité que le site 101 alors que les autres indices lui confèrent une qualité moins bonne que celle des sites de l'Aa canalisé. Cet écart est sans doute dû au fait que le score ASPT ne tient **pas** compte de la diversité de l'échantillon, contrairement aux indices biocénétiques.

Les méthodes faisant intervenir les macroinvertébrés benthiques présentent **des** difficultés d'utilisation dans les systèmes atypiques tels que les canaux. Elles occasionnent également un coût bien trop élevé lorsque des pièges normalisés sont utilisés. Dans notre étude, nous avons montré que nous pouvions récolter ces organismes avec un substrat artificiel dont le coût est faible. Le principal inconvénient est l'emprise en temps **qui** est importante. En effet, si nous utilisons des substrats artificiels (dans le cas **des** canaux), il faut compter un temps de piégeage relativement long (**4** semaine pour notre étude). Le temps passé à réaliser les pièges, les poser et les relever, à trier, à déterminer et compter les macroinvertébrés est également important. Cependant, avec l'habitude et la pratique, ces

temps peuvent être considérablement réduits. En effet, sur l'ensemble des cours d'eau étudiés au cours de ce travail et par notre service une cinquantaine de taxons ont habituellement été rencontrés. Avec l'habitude, ces taxons sont facilement et rapidement identifiables et des déterminations plus fines allant jusqu'à l'espèce peuvent être envisagées.

D'autres indices utilisant des groupes plus restreints ont également été décrits pour estimer la qualité de l'eau. Les peuplements de chironomes ont déjà fait l'objet de la mise au point d'un indice chironomidien employé dans le bassin de la Somme en Picardie (Bazerque *et al.*, 1989). Cet indice semble donner une bonne évaluation de la qualité du milieu. De plus, la détermination des exuvies à l'aide de clés adaptées serait relativement aisée après apprentissage (Bazerque, communication personnelle). Se basant sur la détermination des exuvies nymphales, cet indice présente les inconvénients de devoir récupérer des exuvies *en* excellent état et de fausser l'estimation en récoltant des exuvies dérivantes. Les indices fondés sur l'étude des peuplements d'oligochètes (Lafont, 1989) seraient, par contre, difficilement applicables dans certains canaux de la région. Ceci pour des raisons purement techniques dues à la nature même des fonds qui sont parfois recouverts de blocs de pierre ou d'agglomérats, n'autorisant aucun prélèvement de sédiment à l'aide d'une benne. Les indices diatomiques (Prygiel, 1993, 1995) basés sur la détermination des genres ou espèces de diatomées polluoindicatrices fournissent des renseignements saisonniers intéressants sur la qualité de l'eau. On peut toutefois regretter que ces derniers indices ne donnent que très peu de renseignements sur l'écosystème en place et sur la qualité du substrat ou sur les effets d'aménagements des canaux comme peuvent le faire les indices utilisant les macroinvertébrés benthiques. Le calcul de tous ces indices pourraient néanmoins, quand l'utilisation de ces derniers est possible, apporter un complément intéressant à nos propres données.

Le tableau 65 reprend l'ensemble des classements des sites obtenus à l'aide des différentes méthodes utilisées. Nous voyons que, globalement, les sites 101(Aa) et 46 (canal de la Sensée) sont de meilleure qualité physico-chimique et biologique ~~et~~ que les sites du canal d'Aire (62-63) et du canal de la Deûle (77-78-79-80) sont de qualité très médiocre. Cependant, il apparaît quelques variations dans le classement des sites en fonction de la méthode prise en compte. Par exemple, les sites de l'Aa canalisé (102-103-104) sont classés au niveau N3 selon la charge métallique des sédiments mais ont une meilleure qualité biologique déterminée par les indices biocénotiques que le site 46 (canal de la Sensée) dont les sédiments sont moins chargés en métaux. Comme cela a **déjà** été signalé, ceci peut s'expliquer simplement par une richesse taxonomique plus importante au niveau de l'Aa canalisé due certainement à un trafic fluvial moins important (canal à moyen gabarit) ~~et~~ à la présence de macrophytes qui favorisent la présence de nombreux mollusques. Par ailleurs, alors que les analyses de métaux, les indices biocénotiques et la richesse taxonomique classent le site 101 toujours dans les deux premières places, les descripteurs de diversité le classent après des sites de qualité généralement moins bonne. Ceci s'explique notamment par la dominance importante de quelques taxons ~~et~~ en

particulier la forte abondance des *Gammaridae* et des *Erpobdellidae*. On remarquera que les descripteurs de diversité sont parfois trompeurs en donnant des valeurs que l'on pourrait considérer correctes pour des sites de qualité très mauvaise. C'est le cas, par exemple, du site 62 en février 1992 où il n'a été trouvé que deux familles, les *Tubificidae* (88 individus) et les *Chironomidae* (37 individus). L'indice de Simpson avait alors une valeur moyenne de 0,58 et l'indice de Pielou indiquait une bonne équirépartition des individus avec une valeur de 0,88. Ces descripteurs doivent donc être utilisés avec prudence et en faisant référence aux inventaires faunistiques.

Les indices biocénotiques vont permettre d'estimer la qualité du milieu de vie des macroinvertébrés benthiques. La grille de l'IB donne une très bonne note au site 101 (8/10) qui n'a pas une note plus élevée simplement à cause de l'absence de plécoptères. Les grilles de l'IQBP et de l'IBGN sont plus sévères que la précédente puisqu'elles font chuter la note du meilleur site à 10, mais dans ce cas avec un barème noté jusque 20. Ces deux indices accordent plus d'importance que le précédent à la richesse taxonomique et font une distinction plus fine entre les différentes familles de plécoptères. En effet, après les trichoptères à fourreau larvaire (taxon le moins polluosensible rencontré dans notre étude), les grilles de l'IQBP et de l'IBGN font référence à trois groupes faunistiques repères alors que la grille de l'IB ne fait référence qu'à un seul. La grille de l'IBGN permet de classer le site 105 avant le site **46** par la présence de *Philopotamidae* en octobre 94. Les trois grilles classent toujours les sites de la Deûle et du canal d'Aire en très mauvaise qualité. La grille des IQBP permet de faire une différence importante entre l'Aa libre et l'Aa canalisé (note qui chute de 10 à 6), alors que cet écart de qualité n'est pas net avec la grille de l'IB ou de l'IQBP (chute d'un point). La méthode britannique des scores ne tenant pas compte de la richesse taxonomique accorde une qualité biologique meilleure au site 46 qu'aux sites de l'Aa canalisé.

De plus, l'utilité de l'étude des macroinvertébrés benthiques pour estimer l'impact des charges métalliques des sédiments sur les organismes vivants **paraît** aussi avoir été démontrée à l'aide des analyses de co-inertie en particulier. En effet, il semble exister une co-structure significative entre la position des sites expliquée par la faune benthique et celle expliquée par les données métalliques des sédiments.

Tableau 65. Récapitulatif des classements des sites obtenus avec les différentes méthodes utilisées.
 (les valeurs moyennes des indices biocénétiques sont données entre parenthèses)
 (1): nombre de maillons des réseaux trophiques construits à partir des inventaires.
 (2): **I'AFC** permet de faire un regroupement de sites en fonction des structures des communautés mais pas un classement en fonction de la qualité

METHODE UTILISEE	CLASSEMENT DES SITES SELON UN ORDRE DE QUALITE DECROISSANTE				
EAU					
Teneurs métalliques	46 - 101 > 76 - 104 > 105 > 62 - 63				
Hydrocarbures	76 > 46-62-63-105-101-104				
PCB	62 > 46-76-63-105-101-104				
SEDIMENTS					
<u>Dosage de polluants</u>					
Al	101 > 105-104 > 46-102-77-78-79-80 > 63-76 > 62 -103				
Cd	101-46 > 76 > 102-103-104-105 > 77-80 > 78 > 62-63-79				
Cr	46 > 101 > 104 > 62-63-76-77-78-79-80-102 > 103 > 105				
Cu	46-76-101-102-104-105 > 77-80-103 > 63-79 > 62-78				
Fe	46-77-78-79-80-101-102 > 62-63-76-105 > 103 > 104				
Pb	101-104 > 46 > 105 > 76-102 > 103 > 77-80 > 62-63-79 > 78				
Zn	46-101-102-103-104-105 > 76-77-80 > 63-78-79 > 62				
COT	77 > 46-79-101 > 76-78-102-105 > 62-63-80-103-104				
NTK	77-78-79-80-102-103 > 46-76-101 > 105 > 63-104 > 62				
P	77 > 46-78-79-80-101-102 > 76-103-104-105 > 63 > 62				
<u>Niveau de contamination</u>	N1 101	N2 > 46 (Cd-Pb)	N3 > 76 (Pb) 102-104-105 (Cd)	N3 > 105 (Cd-Pb) 77-80-103 (Cd-Pb)	N3 > 62 (Cd-Pb-Zn) 62-63-78-79
<u>ACP</u>	101-46 > 76-105-102-104 > 63-77-78-79-80-103 > 62				
FAUNE					
Nombre de familles	101 > 104 > 46 > 105 > 76 > 103 > 102 > 77-79 > 63 > 62 > 78 > 80				
Nombre de maillons (1)	101-104 > 46-76-105-103 > 77-78-79-102 > 62-63-80				
Diversité (H')	102 > 103 > 46 > 105 > 104 > 76 > 79 > 101 > 77 > 78 > 63 > 80 > 62				
Equitabilité (e)	102 > 103-105 > 46 > 76 > 79 > 62-104 > 78 > 101 > 77 > 63 > 80				
Dominance (S)	102 > 103 > 46 > 105 > 79 > 76-104 > 77 > 101 > 78 > 62 > 63 > 80				
IB*	101 (8)	> 103 (7)	> 46-102-104-105 (6)	> 63-76-77-78-79 (5)	> 80-62 (3)
IQBP*	101 (10)	> 102-103 (6)	> 46-104-105 (5)	> 76 (4)	> 63-77-78-79 (3)
IBGN*	101-103 (9)	> 104-102 (8)	> 105 (7)	> 46 (6)	> 76-77-79 (5)
ASPT*	46-101 (4,5)	> 102-103-104 (4)	> 76-105 (3,5)	> 78-79 (3)	> 63-77-80 (2,5)
DRF	102-103-104 > 46-77-78-79-105 > 62-63-80				
AFC (2)	(101)	(46)	(76-63-102-103-104-105)	(77-78-79)	(62-80)

II. CONCLUSION GENERALE

Notre travail a eu pour objet l'étude des variations de la structure des réseaux trophiques caractéristiques de quelques secteurs du Canal à Grand Gabarit. Ces derniers avaient été désignés par l'Agence de l'Eau Artois-Picardie en raison d'une contamination plus ou moins marquée du milieu aquatique en matières organiques et en certains micropolluants tels que les métaux lourds.

Nous nous sommes intéressés aux macroinvertébrés épibenthiques directement disponibles pour la faune piscicole et qui peuplent les bords du cours d'eau. Le fond du canal est en effet rempli de sédiments vaseux dont les couches profondes, généralement putrides, très peu propices à la vie, sont soumises périodiquement à des dragages. Nous avons déjà longuement insisté sur l'impossibilité d'employer, pour un tel système atypique, les méthodes normalisées pour le calcul des indices biologiques. L'outil que nous avons développé (méthode de piégeage avec usage de grilles telles que celle de la recherche de l'IQBP) présente au moins l'avantage d'être utilisable dans tous les cours d'eau et d'être très peu coûteux. C'est ainsi qu'avec toutes les réserves requises, notre laboratoire a pu effectuer avec l'aide de l'Agence de l'Eau Artois-Picardie, la Société des Eaux du Nord, le Ministère de l'Environnement via la DIREN, le CETE, un premier diagnostic sur les potentialités biologiques d'un certain nombre de points situés sur la Haute-Lys, la Hem, les Rigoles du Nord et du Pas-de-Calais, la Loosne et la Souchez.

Parallèlement aux investigations sur les macroinvertébrés dont les principaux résultats sont présentés dans ce mémoire, la caractérisation des poissons présents dans les mêmes zones du canal à Grand Gabarit a été effectuée avec l'aide des Fédérations de pêche du Nord et du Pas-de-Calais. Nous disposons donc de réseaux trophiques relativement complets en ce qui concerne la macrofaune (Grumiaux *et al.*, 1994).

L'Agence de l'Eau Artois-Picardie et d'autres structures régionales pratiquant des analyses périodiques sur les sédiments profonds, ce sont les sédiments superficiels directement *en* contact avec la faune épibenthique que nous avons étudiés. Une bonne adéquation entre les degrés de contamination et la structure des réseaux trophiques a généralement été observée. Pour affiner ces résultats, il conviendrait, lors de prochaines recherches, d'utiliser, quand cela est possible, plusieurs méthodologies complémentaires telles, par exemple, que celles qui révèlent la qualité de l'eau (indices diatomiques) ou du sédiment profond (indices oligochètes). Il est bien évident que d'autres paramètres devraient également être pris en compte: largeur et profondeur du cours d'eau, vitesse du courant, présence ou non de macrophytes, ...

Quoi qu'il en soit, les corrélations négatives démontrées entre les concentrations dans les sédiments de certains métaux lourds et les IQBP* méritent d'être mises en exergue. La vérification,

qui n'est pas aisée eu égard à la multiplicité des facteurs présents, que ces corrélations sont le reflet d'un impact réel sur la faune, serait bien sûr du plus haut intérêt. Notons que dans d'autres études qui ne sont pas présentées dans ce mémoire, nous avons analysé les transferts de métaux lourds dans le compartiment biotique (macroinvertébrés et poissons) (Grumiaux *et al.*, 1994). Les facteurs de concentration sont généralement faibles (mais ne présagent *en* rien de la toxicité réelle de certains micropolluant). Seules, certaines espèces de macroinvertébrés, largement répandues et bioaccumulatrices, telles que certaines hirudinées (Dhainaut-Courtois, communication personnelle), pourraient être retenues *pour* la détection de métaux traces. Il convient, de plus, de mentionner que des contaminations ont aussi été trouvées dans divers tissus de poissons. Depuis ces résultats, et compte tenu des recherches sur les métallothionéines que nous avons entreprises, l'Agence de l'Eau Artois-Picardie, avec l'aide du Conseil Supérieur de la Pêche, a décidé d'effectuer périodiquement des analyses sur le gardon (*Rutilus rutilus*), espèce courante dans la plupart des cours d'eau de la Région Artois-Picardie. Ceci permettra un suivi du degré de contamination de la faune piscicole pour lequel il faudra rechercher la réelle corrélation avec le niveau de contamination du milieu (abiotique et biotique). Par ailleurs, comme nous l'avons également déjà dit dans ce mémoire, une autre approche possible et complémentaire est l'étude de certains marqueurs biochimiques de pollution tels que les métallothionéines impliquées dans l'homéostasie du Zn et dont la synthèse est induite lors de contaminations par certains métaux lourds.

En conclusion, nous tenons à nouveau à souligner que les résultats présentés dans ce mémoire s'intègrent dans un ensemble de recherches effectuées parallèlement, soit par nous-mêmes, soit par notre laboratoire, soit par d'autres organismes tels que l'Agence de l'Eau Artois-Picardie.

Le travail de pionnier que nous avons effectué au niveau du canal à Grand Gabarit a déjà trouvé des applications pour l'étude d'autres rivières dont au moins une partie du cours est atypique. Les outils que nous avons développés pour les recherches *in situ* doivent maintenant être perfectionnés avec l'étude d'autres sites et, si des collaborations peuvent être établies, la confrontation d'autres techniques complémentaires. Quant aux études biochimiques et immunologiques menées au laboratoire en raison du besoin recensé, elles devraient trouver prochainement leur application sur le terrain avec l'aide du Conseil Supérieur de la Pêche.

LISTES DES
ABREVIATIONS,
DES FIGURES ET
DES TABLEAUX

LISTES DES ABREVIATIONS, DES FIGURES ET DES TABLEAUX

1. LISTE DES ABREVIATIONS

ACP	Analyse en Composantes Principales
AEAP	Agence de l'Eau Artois-Picardie
AFC	Analyse Factorielle des Correspondances
Al	Aluminium
ANOVA	Analysis of variance (Analyse de variance)
C.E.M.A.G.R.E.F.	Centre d'Etude et du Machinisme Agricole du Génie Rural et des Eaux et Forêts
Cd	Cadmium
C.E.T.E.	Centre d'Etudes Techniques de l'Equipement Nord-Picardie - Lille
Cl	Classe
COT	Carbone organique total
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
DBO	Demande Biologique en Oxygène
DCO	Demande Chimique en Oxygène
DDE	Direction Départementale de l'Equipement
ddl	Degré de liberté
DIA	Dot Immunobinding Assay
DIREN	Direction Régionale de l'Environnement
DMSO	Diméthylsulfoxyde
D.R. I.R.E.	Direction Régionale de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
Emb.	Embranchement
eqH	Equivalent habitant
F.	Famille
Fe	Fer
Fig	Figure
FPLC	Fast Pressure Liquid Chromatography
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HCl	Acide chlorhydrique
HClO ₄	Acide perchlorique
Hg	Mercure
HGPRT	Enzyme hypoxanthine-guanine-phosphoribosyl-transférase
HNO ₃	Acide nitrique
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hyd.	Hydrocarbure
IB	Indice Biotique
IBGN	Indice Biologique Global Normalisé
Ig	Immunoglobuline
IPL	Institut Pasteur de Lille

IQBP	Indice de Qualité Biologique Potentielle
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption - Time of Flight
MES	Matières en suspension
MS222	Méthyl Sulfonate
MT	Métallothionéine
MTs	Métallothionéines
NTK	Azote Total Kjeldahl
O.	Ordre
p.	Page
Pb	Plomb
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCB	Polychlorobiphényle
PEG	Polyéthylèneglycol
PF	Perte au feu
ppb	Partie par billion ($\mu\text{g/kg}$ ou $\mu\text{g/l}$)
ppm	Partie par million (mg/kg ou mg/l)
RIA	Radioimmuno-Assay
S.E.M.A.	Service d'Etude des Milieux Aquatiques
S.H.E.	Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie
S.R.A.E.	Service Régional de l'Aménagement des Eaux
SAB	Sérumalbuminebovine (BSA en anglais)
SDS-PAGE	Sodium Dodécyl Sulfate - PolyAcrilamide Gel Electrophoresis
<i>sp.</i>	Species
SVF	Sérum de veau foetal
Tabl.	Tableau
TFA	Acide trifluoroacétique
VLE	Valeurs Limites d'Épandage
4-VP	4 -Vynilpyridine
Zn	zinc

II. LISTE DES FIGURES

Figure 1. Cycle des métaux traces dans la nature	14
Figure 2. Effets des métaux traces sur l'organisme	19
Figure 3. Répartition des résidus cystéines, séparation des chaînes α et β au sein des métallothionéines.	30
Figure 4. Structure des deux domaines de fixation des métaux de la métallothionéine de lapin	30
Figure 5. Les différents types de méthodes d'évaluation de la qualité des eaux dérivées du Système Saprobique	46
Figure 6. Répartition géographique des pollutions par arrondissements en 1979.	55
Figure 7. Localisation des industries dans le bassin versant du canal à grand gabarit.	59
Figure 8. Localisation des sites étudiés	67
Figure 9. Les différentes étapes de la purification de la métallothionéine.	82
Figure 10. Etapes de production d'anticorps monoclonaux spécifiques de la métallothionéine hépatique de gardon.	88
Figure 11. Etapes de la dégradation d'Edman	92
Figure 12. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en décembre 1991.	105
Figure 13. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en février 1992.	106
Figure 14. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en avril 1992.	107
Figure 15. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en mai 1992.	108
Figure 16. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en juin 1992.	109
Figure 17. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en septembre 1994.	110
Figure 18. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en octobre 1994.	111
Figure 19. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés en mars 1995.	112
Figure 20. Proportion de chaque fraction granulométrique dans les sédiments profonds et piégés (octobre 1994 et mars 1995)	120
Figure 21. Analyses en Composantes Principales des données centrées et réduites des sédiments profonds	130

Figure 22. Analyses en Composantes Principales des données centrées et réduites de la fraction fine des sédiments profonds	131
Figure 23. Analyses en Composantes Principales des données centrées et réduites des sédiments piégés	133
Figure 24. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 46000	145
Figure 25. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 76000	145
Figure 26. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 77000	146
Figure 27. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 78000	146
Figure 28. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 79000	146
Figure 29. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 80000	147
Figure 30. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 62000	147
Figure 31. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 63000	147
Figure 32. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 105000	148
Figure 33. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 101000	148
Figure 34. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 102000	149
Figure 35. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 103000	149
Figure 36. Réseau trophique élaboré à partir de la liste des macroinvertébrés benthiques récoltés dans le site 104000	150
Figure 37. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 46000	152
Figure 38. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 76000	153
Figure 39. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 62000	154
Figure 40. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 63000	155

Figure 41. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 105000	156
Figure 42. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 101000	157
Figure 43. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 104000	158
Figure 44. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition dans le site 77000, 78000, 79000, 80000, 102000, 103000	159
Figure 45. Diagrammes rangs/fréquences des sites étudiés en juin 1992	161
Figure 46. Diagrammes rangs/fréquences des sites étudiés en septembre et octobre 1994	162
Figure 47. Abondance relative des macroinvertébrés répartis selon leur mode de nutrition. Caractérisation des trois groupes et du site 101 définis par les DRF de septembre et octobre 1994	164
Figure 48. Composition taxonomique des trois groupes et du site 101 définis par les DRF de septembre et octobre 1994	164
Figure 49. AFC de toutes les observations de la totalité des sites	166
Figure 50. Moyennes des IB* calculés à l'aide de la grille des Indices Biotiques	171
Figure 51. Moyennes des IQBP* calculés à l'aide de la grille des Indices de Qualité Biologique Potentielle	171
Figure 52. Moyennes des IBGN* calculés à l'aide de la grille de l'Indice Biologique Global Normalisé	171
Figure 53. Moyennes des ASPT* calculés à l'aide de la méthode britannique des scores	171
Figure 54. Cercle des corrélations entre les variables métalliques et biologiques et les deux premiers facteurs de l'ACP centrée réduite	173
Figure 55. Cercle des corrélations entre les variables métalliques, organiques et biologiques et les deux premiers facteurs de l'ACP centrée réduite	175
Figure 56. ACP centrée réduite du tableau des teneurs métalliques des sédiments	179
Figure 57. ACP centrée du tableau faunistique	181
Figure 58. Distribution d'abondance des 33 taxons faunistiques sur la carte factorielle de l'ACP	182
Figure 59. Résultat du test de Monté-Carlo réalisé pour l'analyse de Co-inertie 1	184
Figure 60. Diagramme des valeurs propres de l'analyse de co-inertie 1	184
Figure 61. Projection des axes d'inertie des analyses séparées sur les axes de co-inertie 1	185

Figure 62. Projection du nuage de 44 points à 7 composantes dans l'analyse de co-inertie 1	185
Figure 63. Projection du nuage de 44 points à 33 composantes dans l'analyse de co-inertie 1	185
Figure 64. Projection simultanée dans le plan principal de l'analyse de Co-inertie 1	187
Figure 65. ACP centrée et réduite du tableau des teneurs métalliques et organiques des sédiments	188
Figure 66. ACP centrée du tableau faunistique	191
Figure 67. Distribution d'abondance des 27 taxons faunistiques sur la carte factorielle de l'ACP	192
Figure 68. Résultat du test de Monté-Carlo réalisé pour l'analyse de Co-inertie II	193
Figure 69. Diagramme des valeurs propres de l'analyse de co-inertie II	193
Figure 70. Projection des axes d'inertie des analyses séparées sur les axes de co-inertie II	194
Figure 71. Projection du nuage de 18 points à 11 composantes dans l'analyse de co-inertie II	194
Figure 72. Projection du nuage de 18 points à 27 composantes dans l'analyse de co-inertie II	194
Figure 73. Projection simultanée en analyse de co-inertie II	196
Figure 74. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués au Cd et au Zn par injection intrapéritonéale	205
Figure 75. Mesure de l'absorbance au spectrophotomètre de 190 à 300 nm des fractions contenant les protéines fixatrices des métaux (pic III) obtenues par chromatographie de filtration sur gel	207
Figure 76. Chromatographie échangeuse d'ions des fractions contenant les protéines fixatrices de métaux riches en groupements SH obtenues après la chromatographie de filtration sur gel	209
Figure 77. Séparation par RP-HPLC des fractions contenant les métalloprotéines obtenues après la chromatographie d'échange d'anions.	210
Figure 78. Chromatographies de MTG1 (a) et MTG1(O) (b) en phase inverse sur colonne C8 équilibrée dans de l'eau/TFA.	212
Figure 79. Chromatographies de MTG2 (a) et MTG2(O) (b) en phase inverse sur colonne C8 équilibrée dans de l'eau/TFA.	213
Figure 80. Analyse électrophorétique (SDS-PAGE 14% en présence de β -mercaptoéthanol).	215
Figure 81. Analyse électrophorétique (SDS-PAGE 14% en absence de β -mercaptoéthanol).	216

Figure 82. Analyse électrophorétique (SDS-PAGE 5-25% en présence de β -mercaptoéthanol).	218
Figure 83. Effet de différentes concentrations de B-mercaptoéthanol en analyse électrophorétique de MTG 1 (SDS-PAGE 5-25%).	219
Figure 84. Electrofocalisation de MTG 1 et MTG2 provenant de la chromatographie en phase inverse.	220
Figure 85. Droite de calibration de l'électrofocalisation calculée à partir des distances de migration des témoins de pI connu	220
Figure 86. Electrophorèse capillaire de MTG1 native et réduite et alkylée	221
Figure 87. Spectromètre de masse de MTG1 native par ESMS (a) et de MTG1 réduite et alkylée par MALDI-TOF (b).	223
Figure 88. Séparation par RP-HPLC des peptides de la coupure de MTG1 par l'endoprotéinase Lys-C.	225
Figure 89. Analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) des peptides (Ka à Kh) obtenues par coupure de MTG1 avec l'endoprotéinase Lys-C.	226
Figure 90. Séquence en acides aminés de la méïallothionéine hépatique du gardon	228
Figure 91. Teneurs moyennes en Zn et en Cd et en SH et écarts-types correspondant, dans les extraits hépatiques chauffés de gardons intoxiqués par différentes combinaisons des Zn et de Cd en injections intrapéritonéales	236
Figure 92. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons non-intoxiqués	239
Figure 93. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués. Profil Cd-	240
Figure 94. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués. Profil Cd+	241
Figure 95. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués. Profil Zn-	243
Figure 96. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués. Profil Zn+	244
Figure 97. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués. Profil Cd-Zn-	245
Figure 98. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués. Profil Cd-Zn+	246
Figure 99. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués. Profil Cd+Zn-	247
Figure 100. Chromatographie de gel filtration par FPLC de la fraction hépatique soluble de gardons intoxiqués. Profil Cd+Zn+	248

Figure 101.Immunodétection de la métallothionéine hépatique de gardon. 250

Figure 102. Utilisation potentielle de l'anticorps monoclonal MTG01-HD5-AC7
pour l'évaluation de la contamination hépatique 258

III. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Métaux rejetés par les principales industries.	14
Tableau 2. Métaux essentiels et concentrations nécessaires pour l'homme (en mg/70kg).	18
Tableau 3. Rôle des métaux au sein de l'organisme	18
Tableau 4. Quelques effets des métaux traces sur les poissons.	24
Tableau 5. Immunoréactivité de métallothionéine hépatique de diverses espèces vis-à-vis de différents anticorps polyclonaux.	37
Tableau 6. Quelques espèces piscicoles chez lesquelles la métallothionéine a été étudiée.	39
Tableau 7. Composition en acides aminés (% de résidus) de quelques métallothionéines de vertébrés.	41
Tableau 8. Séquences en acides aminés de métallothionéines de poissons et de mammifères.	42
Tableau 9. Populations du département du Nord et stations d'épuration: situation en 1990	54
Tableau 10. Industries implantées dans le bassin versant du canai à grand gabarit; canaux et rivières recevant leurs rejets.	57
Tableau 10 (suite). Industries implantées dans le bassin versant du canal à grand gabarit; canaux et rivières recevant leurs rejets.	58
Tableau 11. Liste des plus importants rejets industriels de métaux du Nord/Pas-de-Calais	60
Tableau 12. Mesures effectuées sur l'eau des différents points situés le long du canal à Grand Gabarit et de l'Aa dans ses portions libre et canalisée (moyennes sur 1989 et 1990). Agence de l'Eau Artois-Picardie (1990).	61
Tableau 13. Mesures effectuées sur les sédiments des différents points situés le long du canal à Grand Gabarit et de l'Aa dans ses portions libre et canalisée. Agence de l'Eau Artois-Picardie (1990).	62
Tableau 14. IQBP et indices de pollution (IP) donnés par le SRAE en 1990 et en 1992 sur des points situés le long du canal à Grand Gabarit et de l'Aa canalisé.	63
Tableau 15. Grille standard de détermination des Indices Biotiques	75
Tableau 16. Limites pratiques de détermination taxonomique	75
Tableau 17. Grille standard de détermination des Indices de Qualité Biologique Potentielle	76
Tableau 18. Limites pratiques de détermination taxonomique	76

Tableau 19. Grille standard de détermination de l'IBGN	77
Tableau 20. Tableau de détermination du score BMWP	78
Tableau 21. Composition et utilisation des milieux de culture cellulaire	95
Tableau 22. Concentration en métaux traces, hydrocarbures et PCB ($\mu\text{g/l}$) dans les eaux superficielles brutes.	98
Tableau 23. Classement des sites en fonction des teneurs en métaux traces dans les eaux brutes.	98
Tableau 24. Grille de qualité des cours d'eau (eaux brutes).	100
Tableau 25. Teneurs métalliques moyennes dans les sédiments piégés des sites étudiés.	103
Tableau 26. Niveau de qualité des sédiments piégés des sites étudiés selon les normes du Ministère de l'Environnement.	116
Tableau 27. Teneurs en NTK, P, COT et perte au feu dans les sédiments,	118
Tableau 28. Comparaison des sédiments piégés des sites échantillonnés en septembre 1994 en utilisant des tests SNK	118
Tableau 29. Teneurs moyennes en métaux (Moy) et écarts-types (ET) dans les sédiments piégés et profonds en octobre 1994 et mars 1995.	121
Tableau 30. Moyenne (Moy) des teneurs en NTK, COT, P et PF et écarts-types (ET) correspondants dans les sédiments piégés et profonds en octobre 1994 et mars 1995.	122
Tableau 31. Métaux contaminants et niveau de contamination des sites étudiés selon la prise en compte des sédiments profonds ou piégés.	123
Tableau 32. Comparaison des sites selon les mesures des différents paramètres dans les sédiments piégés (a), dans les sédiments profonds (b) et dans les fractions fines (c) (octobre 1994)	125
Tableau 33. Comparaison des sites selon les mesures des différents paramètres dans les sédiments piégés (a), les sédiments profonds (b) et dans les fractions fines (c) (octobre 1995)	126
Tableau 34. Résultats des ANOVA à deux voies montrant les effets du type de sédiments et de la période sur les teneurs métalliques et organiques (sites 46, 76, 62, 63, 105, 101, 104)	127
Tableau 35. Matrices des corrélations entre les différents paramètres des sédiments piégés	129
Tableau 36. Matrices des corrélations entre les différents paramètres des sédiments profonds	129
Tableau 37. Matrices des corrélations entre les différents paramètres des fractions fines	129
Tableau 38. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans le site 46	135

Tableau 39. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans le site 76	136
Tableau 40. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans le site 62	137
Tableau 41. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans le site 63	138
Tableau 42. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans le site 105	139
Tableau 43. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans le site 101	140
Tableau 44. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans le site 104	141
Tableau 45. Distribution des macroinvertébrés benthiques dans les sites 77, 78, 79, 80, 102, 103	142
Tableau 46. Numérotation des taxons dans les réseaux trophiques (figures 24 à 36)	144
Tableau 47. Familles ou genres occupant les trois premiers rangs des DRF de juin 1992 et de septembre-octobre 1994	163
Tableau 48. Indices d'abondance-dominance, de diversité et d'équitabilité calculés à partir des relevés de piégeage pour chaque site et pour chaque période	167
Tableau 49. Indices biocoenotiques calculés à partir des relevés de piégeage pour chaque site et pour chaque période	170
Tableau 50. Abréviations et numérotations des taxons dans les analyses de co-inertie.	176
Tableau 51. Numérotations des prélèvements dans les analyses de Co-inertie.	177
Tableau 52. Matrices des corrélations entre les différents métaux dosés dans les sédiments.	180
Tableau 53. Matrices des corrélations entre les différents paramètres des sédiments.	189
Tableau 54. Alignement des séquences d'acides aminés des métallothionéines de gardon, de truite, de brochet, de loche franche, de flet , de plie, de cheval et d'humain	229
Tableau 55. Homologie entre la séquence en acides aminés de la MTG1 et de celles de quelques autres organismes	231
Tableau 56. Homologie de séquence en acides aminés des métallothionéines de poisson	232
Tableau 57. Comparaison par un test SNK des teneurs moyennes en Zn, Cd et SH dans les extraits hépatiques de gardons intoxiqués par injections intrapéritonéales de différentes combinaisons de Zn et de Cd	237
Tableau 58. Criblage des hybridomes producteurs d'anticorps spécifiques de la métallothionéine de gardon par la méthode ELISA.	251
Tableau 59. Détermination de l'isotype des anticorps anti-métallothionéine de gardon produits par les hybridomes 51, 73, 94, 113 et HD5.	251

Tableau 60. Analyse de la stabilité des souches hybrides sélectionnées.	253
Tableau 61. Réponses en ELISA sur un extrait hépatique brut des sumageants de culture des hybridomes	253
Tableau 62. Mesure de la réponse en ELISA des anticorps monoclonaux produits par les clones obtenus à partir des hybridomes MTG01-5I, MTG01-1 13 et MTG01-HD5.	255
Tableau 63. Analyses de la spécificité des anticorps monoclonaux produits par les hybridomes et les clones et du sérum de la souris immunisée.	256
Tableau 64 . Comparaison par un test SNK de la fixation de l'anticorps monoclonal MTG01-HD5-AC7 (mesure en absorbance) sur des extraits hépatiques de gardons intoxiqués par injection intrapéritonéale de différentes combinaisons de Zn et de Cd.	258
Tableau 65. Récapitulatif des classements des sites obtenus avec les différentes méthodes utilisées.	271

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

- Agence de bassin Rhin-Meuse**, 1991, Indicateurs de la qualité des eaux superficielles. Concentrations de référence pour divers métaux et micropolluants organiques, Rapport final Agence de Bassin Rhin- Meuse, 178p.
- Agence de l'Eau Artois Picardie**, 1990, Annuaire de la qualité des eaux du bassin Artois-Picardie (1989-1990).
- Agence de l'Eau Artois Picardie**, 1990, Annuaire de la qualité des sédiments du bassin Artois-Picardie (1985-1990).
- Agences de l'Eau**, 1993. Etude bibliographique des méthodes biologiques d'évaluation de la qualité des eaux de surface continentales. Etude Inter-Agences n°35.
- Amend D.F., Yasutake T. & Morgan R.**, 1969. Some factors influencing susceptibility of rainbow trout to the acute toxicity of an ethyl mercury phosphate formulation (Timsan). Trans. Amer. Fish. Soc., 98: 419-425.
- Amiard J.C., Amiard-Triquet C., Metayer C. & Marchand J.**, 1980, Etude du transfert de Cd, Pb, Cu et Zn dans les chaînes trophiques néritiques et estuariennes 1. Etat dans l'estuaire interne de la Loire au cours de l'été 1978, Water Research., 14: 665-673.
- Amiard-Triquet C.**, 1989. Bioaccumulation et nocivité relatives de quelques polluants métalliques à l'égard des espèces marines. Bull. Envir. Contam. Toxicol. 27: 201-208.
- Baccini P. & Roberts P.V.**, 1976. Die Belastung der Gewässer durch Metalle. Beil. Forsch. Tech. Neu Zürcher Z., 18: 57-58.
- Bacrot S.**, 1983, Pollution dans la région Nord/Pas-de-Calais. Essai de synthèse, DEA de géographie et de l'aménagement, USTL, 2, 205 p.
- Badsha K.S. & Goldspink C.R.**, 1982, Preliminary observations on the heavy metal content of four species of freshwater fish in NW England. J. Fish Biol., 21: 251-267.
- Badsha K.S. & Goldspink C.R.**, 1988, ~~Heavy~~ metal levels in three species of fish in Tjeukemeer, a dutch polder lake. Chemosphere, 17 (2): 459-463.
- Ballan-Dufrançais C. Jeantet A.Y. & Halpern S.**, 1982. Localisation intracellulaire par microanalyse de métaux et de métalloïdes dans la glande digestive d'un mollusque bivalve (*Pecten maximus*). Implication des processus de digestion. C.R. Acad. Sci., 284: 673-678.
- Barbier G., Arnal O., Delattre J.M., Grosse H. & Morel M.**, 1986, Le littoral de la région Nord/Pas-de-Calais: qualité du milieu marin. Rapports Scientifiques et Techniques de l'IFREMER n°3, 152p.
- Baudin J.P.**, 1985. Accumulation simultanée par les voies directes et trophiques du ^{65}Zn par *Cyprinus carpio* L. (Pisces, Cyprinidae). Oecol. Applic., 6: 259-268.
- Bazerque M.F., Laville H. & Brouquet Y.** 1989. Biological quality assessment in two rivers of the northern plain of France (Picardie) with special relevance to chironomid and diatom indices. Acta Biol. Debr. Oecol. Hung., 3: 29-39.
- Beattie J.H. & Pascoe D.**, 1979. A cadmium-binding protein in rainbow trout. Toxicology letters, 4: 241-246.

- Becker G.L., Chen C.H., Greenawalt J.W. & Lehninger A.L.,** 1974. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. J. Cell. Biol., 61: 316-326.
- Bennouna T.,** 1990. Bioaccumulation des métaux lourds chez les invertébrés dulçaquicoles. Effets histopathologiques et moyens de défense développés par un poisson d'eau douce: le gardon (*Rutilus rutilus* L.). DEA de Toxicologie de l'Environnement, Université des Sciences Juridiques Economiques et Sociales de Metz / Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie de l'université de Lille I, 40 p.
- Benoit D.A., Leonard E.N., Christensen G.M. & Fiandt J.T.,** 1976. Toxic effects of cadmium on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). Trans. Am. Fish. Soc., 105: 550-560.
- Benson W.H. & Birge WJ.,** 1985. Heavy metal tolerance and metallothionein induction in fathead minnows: results from field and laboratory investigations. Environmental Toxicology and Chemistry, 4: 209-217.
- Benson W.H. & Birge WJ.,** 1987. Detection of cadmium-binding proteins in fish chronically exposed to heavy metals. Environmental Toxicology and Chemistry, 6: 623-626.
- Bentley P.J.,** 1991. Accumulation of cadmium by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): influx from environmental solutions. Comp. Biochem. Physiol., 99C (3): 527-529.
- Benzecri J.P.,** 1973. L'analyse des données. TI: La taxonomie; TII: L'analyse des correspondances, Dunod Ed., Paris.
- Berg L.S.,** 1940. Classification of Fishes, both recent and fossil. Trav. Inst. Zool. Acad. Sc. U.R.S.S., 5: 346-500.
- Berger B., Dallinger R. & Thomaser A.,** 1995. Quantification of metallothionein as biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. Environmental Toxicology and Chemistry, 14(5):781-791.
- Berthet B.,** 1989. Caractérisation des formes physico-chimiques de stockage de l'argent soluble chez les mollusques filtreurs. Oceanis, 15(4): 401-409.
- Bethune J.L., Budreau A.J., Kagi J.H.R. & Vallee B.L.,** 1979. In: "Metallothionein", J.H.R. Kagi and M. Nordberg eds., Birkhauser Verlag, Basel, 207-210.
- Bij de Vaate A.,** 1995. Macroinvertebrate communities in the Grensmaas Stretch of the river Meuse: 1981-1990. Journal of Freshwater Ecology 10 (1): 75-82.
- Biological Monitoring Working Party,** 1978. Final Report: assessment and presentation of the biological quality of rivers in Great Britain. December 1978. Unpublished Report, Department of the environment, Water Data Unit, 37 p.
- Blondel C., Dhennin D., Pelerin I., Revel V., Grumiaux F. et Dhainaut-Courtois N.,** 1995. Etude écologique et écotoxicologique de la Souchez et des rigoles du Nord et du Pas-de-Calais. Convention Société des Eaux du Nord et de Nature et Vie / Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie (USTL), 42p.
- Boilly B. & Richard A.,** 1978. Accumulation du fer chez une annélide Polychète: *Magelona papillocornis* O.F. Müller. C.R. Acad. Sci., 198: 1005-1008.
- Bonnefous A.,** 1985. Les métallothionéines, leur importance dans la biocinétique des métaux. Thèse de Doctorat Vétérinaire. Faculté de Médecine de Nantes.

- Bonwick G.A., Fielden P.R. & Davies D.H.**, 1991. Hepatic metallothionein levels in roach (*Rutilus rutilus* L.) continuously exposed to water-borne cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 99C: 119-125.
- Bordin G., Mc Court J. & Rodriguez A.**, 1992. Trace metal in the marine bivalve *Macoma balthica* in the Westerschelde estuary (The Netherlands). Part 1: analysis of total copper, cadmium, zinc and iron concentrations-locational and seasonal variations. *Sci. Total Environ.*, 127: 255-280.
- Bouquegneau J.M. & Noel-Lambot F.**, 1978, Les métallothionéines. Structure, fonctions et incidence dans les milieux marins pollués par les métaux lourds. *Actualité de biochimie marine*, Colloque GABIM, La Rochelle, pp. 219-232.
- Bouquegneau J.M., Gerday C. & Disteché A.**, 1975. Fish mercury-binding thionein related to adaptation mechanisms. *Febs Lett.*, 55: 173-177.
- Bournaud M., Maucet D. & Chavanon G.**, 1984. Méthode pratique de mesure de la dérive des macroinvertébrés dans un cours d'eau - application à la détection de perturbations du milieu. *Bull. Ecol.*, 15 (3): 199-209.
- Brady F.O. & Kafka R.L.**, 1979. Radioimmunoassay of rat liver metallothionein. *Anal. Biochem.*, 98: 89-94.
- Brady F.O. & Webb M.**, 1981. Metabolism of zinc and copper in the neonate. *J. Biol. Chem.*, 256: 3931-3935.
- Brady F.O., Panemangalore M., Day F.A., Fiskin A.M. & Peterson G.**, 1979. "Metallothionein," *ed.* by J.H.R. Kägi and Norberg, Birkhauser Verlag, Basel, 1979, p. 261.
- Bremner I. & Beattie J.H.**, 1990. Metallothionein and the trace minerals. *Ann. Rev. Nutr.*, 10: 63-83.
- Bremner I.**, 1987. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Experientia Supplementum* Vol.52, Metallothionein II, 81-107.
- Bridcka R., Brezina M. & Kalous V.**, 1965. Polarography of proteins and its analytical aspects. *Talanta*, 12: 1149-1162.
- Brkovic-Popovic I. & Popovic M.**, 1977. Effects of heavy metals on survival and respiration rate of tubificid worms: **Part II** - Effects on respiration rate. *Environ. Pollut.*, 13: 93-98.
- Brodersen K.P.**, 1995. The effect of wind exposure and filamentous algae on the distribution of surf zone macroinvertebrates in Lake Esrom, Denmark. *Hydrobiologia*, 297: 131-148.
- Brooks R.R. & Rumsey D.**, 1974. **Heavy** metals in some New Zealand commercial sea fishes. *N.Z. J. Mar. Freshwat. Res.*, 8 (1): 155-166.
- Brouwer M., Whalling P. & Engel D.W.**, 1986. Copper-metallothioneins in the American lobster, *Homarus americanus*; potential role as Cu(I)-donors to apohemocyanin. *Environ. Health Perspect.*, 65: 93-100.
- Brown A.F. & Pascoe D.**, 1988. Studies on the acute toxicity of pollutants to freshwater macroinvertebrates. 5. The acute toxicity of cadmium to twelve species of predatory macroinvertebrates. *Arch. Hydrobiol.*, 114 (2): 311-319.
- Brown B.E.**, 1976. Observations on the tolerance of the isopod *Asellus meridianus* rac. to copper and lead. *Water Research*, 10: 555-559.

- Brown M.W., Schurben D., Solbe J.F. de L.G., Cryer A. & Kay J., 1987.** Sequestration of environmental cadmium by metallothionein in the roach (*Rutilus rutilus*) and the stone loach (*Noemacheilus barbatulus*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 87C: 65-69.
- Brownlow C.A. & Bolen E.G., 1994.** Fish and macroinvertebrate diversity in first-order blackwater and alluvial streams in North Carolina. *Journal of Freshwater Ecology*, 9 (4): 261-270.
- Brunet C., 1993.** Végétation aquatique des eaux stagnantes et des rivières à cours lent de la région Nord/ Pas-de-Calais. Nord Nature Editions, Villeneuve d'Ascq, n° hors-série, 93 p.
- Bryan G.W., 1967.** Zinc regulation in the freshwater crayfish (including some comparative copper analysis). *J. Exp. Biol.*, 46: 281-296.
- Bryan G.W., Hummerstone L.G. & Ward E., 1986.** Zinc regulation in the lobster *Homarus gammarus*: importance of different pathways of absorption and excretion. *J. Mar. Biol. Ass. UK.*, 66: 175-199.
- Bryan G.W., Potts G.W. & Forster G.R., 1977.** Heavy metals in gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.). *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.*, 57: 379-390.
- Bubb J.M., Lester J.N., 1994.** Anthropogenic heavy metal inputs to lowland river system, a case study. The River Stour, U.K.. *Water, Air and Soil Pollution*, 78: 279-296.
- Burrows I.G. & Whitton B.A., 1983.** Heavy metals in water, sediments and invertebrates from a metal-contaminated river free of organic pollution. *Hydrobiologica*, 106: 263-273.
- Byczkowska-Smyk W., 1971.** Observation on the ultrastructure of hepatic cells of the chub (*Leuciscus cephalus* L.) and roach (*Rutilus rutilus* L.). *Acta biol. crac., ser. zool.*, 14: 279-284.
- Cairns J. & Scheier A., 1968.** *Progr. Fish Cult.*, 30: 3-8. *in* Hartung 1973.
- Cairns M.A., Nebeker A.V., Gakstatter J.H. & Griffis W.L., 1984.** Toxicity of copper-spiked sediments to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3: 435-445.
- Carpene E. & Vasak M., 1989.** Hepatic metallothioneins from goldfish (*Carassius auratus* L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 92B (3): 463-468.
- Carson B.L., Ellis III H.V. & Mc Can H.V., 1986.** Cadmium: mammalian toxicity summary. *Toxicology and biological monitoring of metals in humans*, pp. 51-58.
- Cassini A., Tallandini L., Favero N. & Albergoni V., 1986.** Cadmium bioaccumulation studies in the freshwater molluscs *Anadonta cygnea* and *Unio elongatulus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 84C: 35-41.
- Cazes P., 1980.** L'analyse de certains tableaux rectangulaires décomposés en blocs : généralisation des propriétés rencontrées dans l'étude des correspondances multiples. I. Définitions et applications à l'analyse canonique des variables qualitatives. II. Questionnaires : variantes des codages et nouveaux calculs de contributions. *Les Cahiers de l'Analyse des Données*, 5: 145-161 & 387-406.
- Cellot B. & Bournaud M., 1988.** Dynamique spatio-temporelle des déplacements de macroinvertébrés dans une grande rivière. *Canadian Journal of Zoology*, 66: 352-363.

- Chaisemartin C.**, 1975. Analyse expérimentale comparée de la toxicité du cuivre dans l'eau chez les astacidae. Actes du 98ème congrès national des Sociétés Savantes, Saint-Etienne, 1973, 1: 145-155.
- Chan K.M., Davidson W.S., Hew C.L. & Fletcher G.L.**, 1989. Can. J. Zool. 67: 2520-2529. *In* Hylland *et al*, 1991.
- Chassard-Bouchaud C.**, 1982. Localisation ultrastructurale de cadmium dans la glande digestive du crabe *Carcinus maenas* (crustacé décapode). Microanalyse par spectrographie des rayons X. C.R. Acad. Sci. Paris, série III, 294: 153-157.
- Chatterjee A. & Maiti J.B.**, 1990. Comparison of the immunological properties of mammalian (rodent), bird, fish, amphibian (toad) and invertebrate (crab) metallothioneins. Mol. Cell. Biochem., 94: 175-181.
- Chatterjee A. & Maiti J.B.**, 1987. Purification and immunological characterization of catfish (*Heteropneustes fossilis*) metallothionein. Mol. Cell. Biochem., 78: 55-64.
- Chen R.W. & Ganther H.E.**, 1974. Relative cadmium binding capacity of metallothionein and other cytosolic fractions in various tissues of the rat. Environ. Physiol. Biochem., 5: 378-388.
- Cherian M.G. & Chan H.M.**, 1993. Biological functions of metallothionein - a review. In K.T. Suzuki, N. Imura & M. Kimura, eds., Metallothionein III - Biological Roles and Medical Implications. Birkhäuser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 87-109.
- Cherian M.G. & Nordberg M.**, 1983. Cellular adaptation in metal toxicology and metallothionein. Toxicology, 28: 1-15.
- Cherian M.G.**, 1982. Studies on toxicity of metallothionein in rat kidney epithelial cell culture. *in* "Biological Roles of Metallothionein", E.C. Foulkes ed., Elsevier/North-Holland, 193-202.
- Cherian M.G., Templeton D.M., Gallant K.R. & Banerjee D.**, 1987. Biosynthesis and metabolism of metallothionein in rat during perinatal development. Experientia Supplementum Vol.52. Metallothionein II, 499-505.
- Chessel D. & Dolédec S.**, 1993. ADE Version 3.6 : HyperCard O Stacks and QuickBasic MicroSoft O Programme library for the Analysis of Environmental Data. Manuel d'utilisation. 8 fascicules. URA CNRS 1451, Université Lyon 1, 69622 Villeurbanne cedex. 750 p.
- Chessel, D. & Mercier, P.**, 1993. Couplage de triplets statistiques et liaisons espèces-environnement. In : Biométrie et Environnement. Lebreton, J.D. & Asselain, B. (Eds.) Masson, Paris. 15-44.
- Chessman B.C.**, 1995. Rapid assessment of rivers using macroinvertebrates: a procedure based on habitat-specific sampling, family level identification and a biotic index. Australian Journal of Ecology, 20: 122-129.
- Cosson R.P.**, 1987. Influences des pratiques agricoles sur la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds : approche écotoxicologique, Thèse d'état, Université de Paris- Sud, Orsay, 275 p.
- D'Anjelo A.M. & Signorile G.**, 1973. Studio sulla localizzazione del mercurio in anellidi oligocheti (*Tubifex tubifex*). L'igiene moderna, 3: 285-292.
- Dajoz R.**, 1975. Précis d'écologie, Editions Gauthier-Villars, Paris, 549 p.
- Dambre J.-L.**, 1989. Les voies navigables du Nord/Pas-de-Calais au service de l'économie et des populations. Label voie d'eau, 112, Office National de la Navigation.

- Davidson M.R. & Gerald P.**, 1976. Improved techniques for the induction of mammalian cell hybridization by polyethyleneglycol. *Samat. Cell. Genet.*, 2: 165.
- Davies P.E. & Nelson M.**, 1994. Relationships between riparian buffer widths and the effects of logging on stream habitat, invertebrate community composition and fish abundance. *Aust. J. Mar. Freshwater Res.*, 45: 1289-1305.
- De Pauw N., Ghetti P.F., Manzini P. & Spaggiardi D.R.**, 1992. Biological assessment methods for running water. In: *River Water Quality - Ecological Assessment and Control*. Newman, Piavaux, Sweeting (Eds), Commission of the European Communities, Bruxelles, p. 217-248.
- De Pauw N., Roels D. & Fontoura A.P.**, 1986. Use of artificial substrates for standardized sampling of macro-invertebrates in the assessment of water quality by Belgian Biotic Index, *Hydrobiologia*, 133: 237-258.
- De Pauw N. & Vanhooren g.**, 1983. Method for biological quality assessment of watercourses in Belgium. *Hydrobiologia*, 100: 153-168.
- Dehaine C.**, 1992. Contamination métallique et microorganique des poissons d'eau douce, synthèse bibliographique, Rapport de DESS Gestion des Ressources Naturelles Renouvelables, Agence de l'Eau Artois-Picardie-Université des Sciences et Technologies de Lille I, 52 p.
- Dehay F., Dubois C., Grelle C., Lemaire F., Lesimple F.-X., Régniez S., Grumiaux F. et Dhainaut-Courtois N.**, 1994. Etude écologique et écotoxicologique de la Souchez. Convention du Conseil Régional et de Nature et Vie / Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie (USTL), 106p.
- Demuynck Sylvain**, 1992. Identification des métalloprotéines (myohémérythrine et hémoblogine) liant le cadmium chez l'Annélide Polychète endobenthique *Nereis diversicolor*. Distribution tissulaire et cinétique du métal en conditions expérimentales. **Thèse** de Doctorat, USTL - Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie, 61 p.
- Dennaï N., Dhainaut-Courtois N., Nejmeddine A, Baert J.-L. & Dhaiaaut A.**, 1986. Effets du cadmium et du mercure sur un ver marin (*Nereis diversicolor* O.F. Müller). Mécanisme de détoxification. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 302: 489-494.
- Descamps H.**, 1971. La vie dans les cours d'eau. , Presses Universitaires de France, Paris, Que sais-je? n°1452, 128p.
- Dethier M.**, 1985. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 6: Hétéroptères aquatiques et ripicoles, genres et principales espèces. Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 54 (10): 250-261.
- Dethier M.**, 1986. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 6: Hétéroptères aquatiques et ripicoles, genres et principales espèces. Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 55 (1): 11-40.
- Dethier M.**, 1988. Les macroinvertébrés benthiques du Rhône genevois - I. Aspects méthodologiques et indices de qualité biologique globale. Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 57 (8): 261-280.
- Dewarumez J.M., Davoult D. & Frontier S.**, 1991. Examples of responses of benthic communities to environmental stress (Dover Strait, France). *Oceanologica acta*, vol sp., 11: 191-196.

- Dhainaut-Courtois N., Demuynck S., Nejmeddine A., Raveillon B., Septier F., Benouareth D.-E. et Dhainaut A., 1989.** Effets de la pollution minérale et organique sur des invertébrés endobenthiques estuariens. *Médecine, Biologie, Environnement*, 17: 59-65.
- Dhainaut-Courtois N., Arrouijal F.Z. & Demuynck S., 1988.** Effets biologiques de trois métaux lourds (chrome, nickel et plomb) sur *Nereis diversicolor* (Annélide polychète). *Océanis*, 14: 423-433.
- Dhainaut-Courtois N., Demuynck S. & Salzet-Rveillon B., 1991.** Mécanismes de détoxification chez les poissons et invertébrés marins. *Océanis*, 17 (4): 403-419.
- Dhainaut-Courtois N. & Romont R., 1996.** Biomarqueurs d'exposition aux métaux lourds. Invertébrés benthiques de zones d'estuaires et portuaires. Chapitre à paraître dans l'Ouvrage intitulé "Utilisation de Biomarqueurs en Ecotoxicologie" édité par l'INRA.(sous-presse)
- Dhainaut A. et Ruffin P., 1996.** Les Protéines de stress.Chapitre à paraître dans l'ouvrage intitulé "Utilisation de Biomarqueurs en Ecotoxicologie" édité par l'INRA (sous presse).
- Dhennin D., Revel V., Grumiaux F. et Dhainaut-Courtois N., 1996.** Etude écologique et écotoxicologique de la Loosne. Convention Nœux Environnement, Conseil Régional, DDE Pas-de-Calais et DIREN / Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie (USTL), 80p.
- Direction Regionale de la Navigation du Nord/Pas-de-Calais, 1986.** Les voies navigables dans le Nord/Pas-de-Calais, 19p.
- Dissanayake C.B., Tobschall H.J., Palme H., Rast U & Spettel B., 1983.** The abundance of some major and trace elements in highly polluted sediments from the Rhine River near Mainz, West Germany. *The Science of the Total Environment*, 29 (3): 243-260.
- Doledec, S. & Chessel, D., 1994.** Co-inertia analysis: an alternative method for studying species-environment relationships. *Freshwater Biology*, 31: 277-294.
- Dorn P., 1974.** The effects of mercuric chloride upon respiration in *Conger leucophaeta*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 12: 86-91.
- Douben P.E.T., 1989.** Uptake and elimination of waterborne cadmium by the fish *Noemacheilus barbatulus* L. (stone loach). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 576-586.
- D.R.I.R.E., 1992,** L'industrie au regard de l'environnement en 1991, 258p.
- Duquesne S. & Richard A., 1994.** Isolation and characterization of naturally and artificially induced hepatic metallothioneins from two species of flatfish: *Limanda limanda* and *Microstomus kitt*. *Marine Biology*, 119: 461-470.
- Duquesne S. & Richard A., 1995.** The presence of metallothionein-like proteins in the liver of two species of flatfish: *Limanda limanda* and *Microstomus kitt*. *Oceanologica Acta*, 18 (1): 129-133.
- Duquesne S., 1992.** Bioaccumulation métallique et métallothionéines chez trois espèces de poissons du littoral Nord-Pas-de-Calais. Thèse de Doctorat, USTL-Station marine de Wimereux, 264 p.
- Eaton D.L. & Toal B.F., 1982.** Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 66: 134-132.
- Edman P., 1950.** In Han K.K. et al., 1985.

- Edman P.**, 1956. In Han K.K. *et al.*, 1985.
- Eisier R.**, 1981. Trace concentration in marine organisms. New-York, Pergamon Press, 695 p.
- Elinder C.G., Kjellstrom T. & Lind B.**, 1978. Cadmium concentration in human liver, blood and bile: a comparison with a metabolic model. *Environ. Res.*, 17: 236-241.
- Ellman G.L., Diane Courtney K.D., Valentino Andres Jr. et Featherstone R.M.**, 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 7: 88-95.
- Empain A.**, 1978. Relations quantitatives entre les populations de bryophytes aquatiques et la pollution des eaux courantes. Définition d'un indice de qualité des **eaux**. *Hydrobiologia*, 60 (I): 49-74.
- Engel D.W. & Brouwer M.**, 1987. Metal regulation and molting in the blue crab, *Callinectes sapidus*: metallothionein function in metal metabolism. *Biol. Bull.*, 173: 237-249.
- Engel D.W. & Brouwer M.**, 1991. Short-term metallothionein and copper changes in blue crab at ecdysis. *Biol. Bull.* 180: 447-452.
- Erraïss N.E.**, 1989. Caractérisation du système métallothionéine chez le **xénope** et la drosophile. Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud, Centre d'Orsay, 152 p.
- Escoffier B. & Pages J.**, 1990. Analyses factorielles simples et multiples - objectifs, méthodes et interprétations. 2ème édition. Dunod, Paris, 274 p.
- Feldman S.L. & Cousin R.J.**, 1976. Degradation of hepatic zinc-thionein after parenteral zinc administration. *Biochem. Biophys. Acta.*, 544: 638-646.
- Feldman S.L., Squibb K.S. & Cousins R.J.**, 1978. Degradation of cadmium-thionein in rat liver and kidney. *J. Toxicol. Environ. Health*, 4: 805-813.
- Fisher, R.A.**, 1940. The precision of discriminant functions. *Annals of Eugenics*, 10: 422-338.
- Fletcher C.A., Bubb J.M. & Lester J.N.**, 1994. Magnitude and distribution of anthropogenic contaminants in salt marsh sediments of the Essex coast, UK.II. Selected metals and metalloids. *The Science of the Total Environment*, 155: 47-59.
- Forstner U. & Wittmann G.T.W.**, 1979. Metal Pollution in the aquatic environment, Springer-Verlag, Berlin, 486 p.
- Foulkes E.C.**, 1981. Biological roles of metallothioneins. Proceedings of a USA-Japan Workshop Held at the University of Cincinnati, Ohio. March 22-27. *Developments in Toxicology and Environmental Science*, 9, Elsevier.
- Fowler B.A.**, 1984. Conference on High Affinity Metal-Binding Proteins in Non-Mammalian Species. Triangle Park, N. C., which appeared in *Environ. Health Perspectives*, 65, 3.
- Fowler B.A., Hildebrand C.E., Kojima Y. & Webb M.**, 1987. Nomenclature of metallothionein. *Experientia Supplementum* Vol.52. Metallothionein II, 19-22.
- Franzin W.G. & Mc Farlane G.A.**, 1980. An analysis of the aquatic macrophyte, *Myriophyllum exalbescens*, as an indicator of metal contamination of aquatic ecosystems near a base metal smelter. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 24: 597-605.
- Frontier S. & Pichod-Viale D.**, 1991. Ecosystèmes. Structure, fonctionnement, évolution. Masson. Paris, 400 p.

- Frontier S .**, 1976. Utilisation des diagrammes rang-fréquence dans l'analyse des écosystèmes. J. Rech. océanogr., 1: 253-312.
- Garvey J.S.**, 1984. Environ. Health Perspect., 54: 117-127. *In* Hylland *et al*, 1995.
- Garvey J.S., Vander-Mallie R.J. & Chang C.C.**, 1982. Radioimmunoassay of metallothioneins. In: Methods in enzymology, (Langore J.J. & Van Vunakis H., Eds), Academic Press New-York, 84: 121-138.
- George S., Leaver M., Frerichs M. & Burgess D.**, 1990. Marine Env. Res., 28: 173-177. *In* Hylland *et al*, 1991.
- George S.G. & Olsson P.E.**, 1994. Metallothioneins as Indicators of Trace Metal Pollution. Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries. Edited by Krammer K.J.M. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL 33431, 151-171.
- George S.G. & Pirie B.J.S.**, 1979. The occurrence of cadmium in sub-cellular particles in the kidney of the marine mussel, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. Biochim. Biophys. Acta., 580: 234-244.
- George S.G.**, 1983. Heavy metal detoxication in *Mytilus* kidney. An *in vitro* study of Cd- and Zn-binding to isolated tertiary lysosomes.
- Gidding J.C.**, 1973. Chemistry, man, and environmental change. An integrated approach. San Francisco, Canfield Press.
- Giudici N.M., Migliore L. & Guarino S.M.**, 1986, Effects of cadmium on the cycle of *Asellus aquaticus* (L.) and *Proasellus coxalis* (Dolff.) (*Crustacea isopoda*). Environmental Technology Letters, 7: 45-54.
- Gommes R. & Muntau H.**, 1975. La distribution de quelques métaux lourds (Zn, Cu, Cr, Ni, Mn, Co) dans la zone littorale des bassins sud et de Pallanza du Lac Majeur. Mem. Ist. Ital. Idrobiol., 32: 245-259.
- Gower A.M.**, 1994. Relationships between macroinvertebrate communities and environmental variables in metal-contaminated streams in South-West England. Freshwater Biol., 32: 199.
- Graveline N.**, 1991, Beauté du Nord, **Flandres-Artois-Picardie**, Minerva, Genève-Paris, 184p.
- Greenacre, M.J. & Vrba, E.S.**, 1984. Graphical display and interpretation of antelope census data in African wildlife areas, using correspondence analysis. Ecology, 65: 984-997.
- Grezel D.**, 1992. Participation des IgA spécifiques de l'antigène protecteur Sm28GST aux mécanismes de défense contre le schistosome au cours d'infestations expérimentales. Thèse de doctorat. Université de Droit et Santé de Lille II, 144p.
- Grumiaux F, Demuynck S. & Dhainaut-Courtois N.**, 1994. Etude de la contamination métallique et organique du canal à grand gabarit. Isolement de la métallothionéine de gardon (*Rutilus rutilus*). Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie, Rapport du contrat Agence de l'Eau Artois-Picardie/ USTL n°9 1X01. 171 p.
- Grumiaux F. & Dhainaut-Courtois N.**, 1996. Benthic macroinvertebrate communities of the canal a grand gabarit, Aa river and the canalized Aa river in the North of France. Journal of Freshwater Ecology, 11 (2): 131-138.

- Grzych J.M.**, 1982. Production d'anticorps monoclonaux contre *Schistosoma mansoni*. Etude de leurs activités biologiques. Thèse de 3^{ème} cycle en Biochimie. Université des Sciences et Techniques de Lille. 138p.
- Guary J.C. & Négrel R.**, 1981. Calcium phosphate granules: a trap for transuranics and iron in crab hepatopancreas. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68A: 423-427.
- Haguenoer J.-M. & Furon D.**, 1981, Toxicologie et hygiène industrielles. Tome 1. Les dérivés minéraux. Edition: technique et documentation, Paris, 2 13-238p.
- Hakanson L.**, 1984. Metals in fish and sediments from the River Kolbäcksan water system, Sweden. *Arch. Hydrobiol.*, 101 (3): 373-400.
- Hamer D.H.**, 1986. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.*, 55: 913-951.
- Hamilton S.J. & Mehrle P.M.**, 1987. Cadmium-saturation for measuring metallothionein in brook trout. *Transactions of the American Fisheries Society*, 116(4): 541-550.
- Han K.K., Belaiche D., Moreau O. & Briand G.**, 1985. Review current developments in stepwise edman degradation of peptides and proteins. *Int. J. Biochem.*, 17: 429-445.
- Hartung R.**, 1973. Biological effects of heavy metal pollutants in water. In *Metal ions in biological systems*, Dhar S.K., Ed, Plenum Publ. Corporation, New-York, 161-172.
- Haux C. & Förlin L.**, 1988. Biochemical methods for detecting effects of contaminants on fish. *Ambio*, 17: 6.
- Havens K.**, 1994. An experiment comparaison of the effects of two chemical stressors on a freshwater zooplankton assemblage. *Environ. Pollut.*, 84 (3): 245.
- Hayford B.L., Sublette J.E. & Herrmann S.J.**, 1995. Distribution of Chironomids (Diptera: Chironomidae) and Ceratopogonids optera: Ceratopogonidae) along a Colorado Thermal Spring Effluent. *Journal of the Kansas Entomological Society*, 68 (2): 77-92.
- Henry J.P. & Magniez G.**, 1983. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 4: Crustacés isopodes (principalement asellotes). *Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 52 (10): 319-357.
- Hidalgo J. & Flos R.**, 1986. Dogfish metallothionein - II. Electrophoretic studies and comparison with rat metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 83C (1): 105-109.
- Hill, M.O.**, 1974. Correspondence analysis : A neglected multivariate method. *Journal of the Royal Statistical Society, C*, 23: 340-354.
- Hirschfeld, H.O.**, 1935. A connection between correlation and contingency. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, Mathematical and Physical Sciences*, 31: 520-524.
- Hirschfeld, H.O.**, 1935. A connection between correlation and contingency. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society, Mathematical and Physical Sciences* : 31, 520-524. Theory and applications of correspondence analysis. Academic Press, London. 1-364.
- Hodson P.V.**, 1986. Water quality criteria and the need for biochemical monitoring of contaminant effects on aquatic ecosystems, Chap. 2. In B.T. **Hart (ed)**, *Water Quality Management Freshwater Ecotoxicity in Australia*. Water Studies Centre, Chisholm Institute of Technology, Melbourne, Australia.
- Hogstrand C, Olsson P.E. & Haux C.**, 1989. A radioimmunoassay for metallothionein in Fish. *Marine Environmental Research*, 28: 183-186.

- Hogstrand C. & Haux C.**, 1990. A radioimmunoassay for perch (*Perca fluviatilis*) metallothionein. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 103: 56-65.
- Hogstrand C. & Haux C.**, 1990. Metallothionein as an indicator of heavy-metal exposure in two subtropical fish species. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 138: 69-84
- Hogstrand C. & Haux C.**, 1992. Evaluation of differential pulse polarography for the quantification of metallothionein - A comparison with **RIA**. *Analytical Biochemistry*, 200: 388-392.
- Horowitz A.J. & Elrick K.A.**, 1993. Effect of mining and related activities on the sediment trace element geochemistry of lake Coeur d'Alene, Idaho, USA. **Part 1**: surface sediments. *Hydrological Processes*, 7: 403-423.
- Hunziker P.E. & Kagi J.H.R.**, 1985. Metallothionein. In: Metalloprotein. **Part 2**. Chap.4. (P.M. Harrison, ed.). Verlag Chemie. Weinheim.
- Hylland H., Haux C. & Hogstrand C.**, 1995. Immunological characterization of metallothionein in marine and freshwater fish. *Marine Environmental Research*, 39: 111-115.
- Hylland H., Haux C., Hogstrand C., Sletten K. & Andersen R.A.**, 1994. Properties of cod metallothionein, its presence in different tissues and effects of Cd and Zn treatment. *Fish Physiology and Biochemistry*, 13(1): 81-91.
- Hyllner S.J., Andersson T., Haux C. & Olsson P.E.**, 1989. Cortisol induction of metallothionein in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *J. Cell. Physiol.*, 139: 24-38.
- Jespersen J.W.**, 1990. A freshwater invertebrate community after a century of canalization. *Natura Jutlandica*, 22 (12): 189-199.
- Jones M.M., Basinger M.A. & Tarka M.P.**, 1980. The relative effectiveness of some chelating agents in acute copper intoxication in the mouse. *Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol.*, 27: 571-577.
- Kagi J.H.R. & Nordberg M.**, 1979. Metallothionein. Proceedings of the first international meeting on metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins. Zurich, July 17-22. *Experientia Supplementum*, 34.
- Kagi J.H.R. & Kojima Y.**, 1987. Chemistry and biochemistry of metallothionein, *Experientia Supplementum*, 52: 25-61.
- Kagi J.H.R. & Schaffer A.**, 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry*, 27: 8509-8515.
- Kagi J.H.R. & Vallee B.L.**, 1960. Metallothionein: a cadmium and zinc containing protein from equine cortex. *Journal of Biological Chemistry*, 235 (12): 3460-3465.
- Kagi J.H.R., Himmelhoch S.R., Wangher P.D., Bethune J.L. & Vallee B.L.**, 1974. Equine hepatic and renal metallothioneins. Purification, molecular weight, amino-acid composition, and metal content. *J. Biol. Chem.*, 249: 3537-3542.
- Kagi J.H.R., Vasak M., Lerch K., Gilg D.E.O., Hunziker P., Bernhard W.R. & Good M.**, 1984. Structure of mammalian metallothionein. *Environ. Health Perspect.*, 54: 93-103.
- Keck G.**, 1977. Etude écologique et toxicologique d'un micropolluant-type: les PCB. *Revue Med. Vet.*, 128(1): 25-49.

- Khalaf G. & Lahoud M.**, 1983. Contribution à l'étude écologique des fleuves côtiers du Liban - 1. Le Nahr-El-Kalb. Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 52 (1): 21-32.
- Kiffney P.M. & Clements W.H.**, 1993. Bioaccumulation of heavy metals by benthic invertebrates at the Arkansas River, Colorado. Environ. Toxicol. Chem., 12 (8): 1507.
- Kiffney P.M. & Clements W.H.**, 1994. Structural responses of benthic macroinvertebrate communities from different stream orders to zinc. Environ. Toxicol. Chem. 13(3): 389.
- Kikuchi Y., Irie M., Ikebuchi H., Sawada J., Terao T., Nakayama S., Igushi S. & Okada Y.**, 1990. J. Biochem., 107: 650-654. *In* Hylland *et al*, 1995.
- Kille P., Stephens P.E. & Kay J.**, 1991. Elucidation of cDNA sequences for metallothioneins from rainbow trout, stone loach and pike liver using the polymerase chain reaction. Biochimica et Biophysica Acta, 1089: 407-410.
- Kimura M.**, 1983. Evolution of genes and proteins. Eds, M; Ney et R.K., Koehn, Sinauer Associate Inc., Publishers, 222 p.
- Kimura M., Otaki N. & Imano M.**, 1979. *In* "Metallothionein", Kagi J.H.R. and Nordberg M. eds., Birkhäuser Verlag, Basel, p. 163-168.
- Kissling M.M.**, 1979. Ph.D. Thesis, University of Zürich, Switzerland. *In* Kagi et Kojima, 1987.
- Kito H., Ose Y. & Sato T.**, 1986. Cadmium binding protein (metallothionein) in carp. Environ. Health Perspect., 65: 117-124.
- Kito H., Ose Y., Mizuhira V., Sato T., Ishikawa T. & Tazawa T.**, 1982, Separation and purification of (Cd, Cu, Zn)-metallothionein in carp hepato-pancreas, Comp. Biochem. Physiol., 73C (1): 121-127.
- Kojima Y., Berger C. & Kagi J.H.R.**, 1979. *In* "Metallothionein", Kagi J.H.R. and Nordberg M. eds., Birkhauser Verlag, Basel, p. 153-161.
- Kojima Y., Berger C., Vallee B.L. & Kagi J.H.R.**, 1976. Amino-acid sequence of equine renal metallothionein-IB. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73: 3413-3417.
- Kolkwitz R. & Marsson M.**, 1908. Okologie der pflanz-lichen saprobien. *Ber. Dt. Bot. Ges.*, 26: 505-519.
- Kuroshima R.**, 1995. Hepatic metallothionein and glutathione levels in Red Sea bream. Comp. Biochem. Physiol., 110C (1): 95-100.
- Labat R., Lhonnoré D. & Chaisemartin C.**, 1977. La contamination des chaînes biologiques d'eau douce par bioaccumulation. 22ème Congrès de l'Association Française de Limnologie, Metz, 16-19 mai, 16p.
- Lafont M.**, 1983. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 3. Annélides oligochètes. Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 52 (4): 108-136.
- Lafont M.**, 1989. Contribution à la gestion des eaux continentales : utilisation des oligochètes comme descripteurs de l'état biologique et du degré de pollution des eaux et des sédiments, Thèse d'état, Université Claude Bernard, Lyon I, 311 p.

- Lake P.S. & Thorp V.J.**, 1974. The gill lamellae of the shrimp *Parathya tasmania* (atylidae: crustacea). Normal ultrastructure and changes with low levels of cadmium. 8th International Congress on Electron Microscopy, 2: 448-449.
- Lange C.R. & Lambert K.E.**, 1995. Biomonitoring. Water Environment Research, 67 (4): 738-749.
- Larsonneur C.**, 1977. La cartographie des dépôts meubles sur le plateau continental français: méthode mise au point et utilisée en Manche. J. Rech. Océanogr., 2 (2): 33-39.
- Larsson A.**, 1977. Some experimentally induced biochemical effects of cadmium on fish from the Baltic sea. Ambio. Spec. Rep., 5: 67.
- Lewis T.E. & Macintosh A.W.**, 1986. Uptake of sediment bound lead and zinc by the freshwater isopod *Asellus communis* at three different pH levels. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 15: 495-504.
- Ley H.L., Failla M.L. & Cherry D.S.**, 1983. Isolation and characterization of hepatic metallothionein from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Comp. Biochem. Physiol., 74B (3): 507-513.
- Lindergren C.C. & Lindergren G.**, 1973. Mitochondrial modification and respiratory deficiency in the yeast cell caused by cadmium poisoning. Mutations research, 21: 315-322.
- Littlefield J.**, 1964. Selection of hybrids from mating of fibroblast *in vitro* and their presumed recombinates. Science, 145: 709.
- Lortal S.**, 1986. Le cadmium en France. Rapport de stage, Ecole Supérieure Agronomique de Montpellier, 42 p.
- Lunetta d'Ancona G. & Russo S.**, 1983. Hemopoietic tissue in *Perinereis cultrifera* cytological identification and observations after treatment with lead. Basic Appl. Histochem., 27: 303-310.
- Luten J.-B., Bouquet W., Burgraft M.-M & Rus J.**, 1986. Accumulation, elimination and speciation of cadmium and zinc in mussels, *Mytilus edulis*, in the natural environment. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 18: 243-248.
- Mackay E.A., Overnell J., Dunbar B., Davidson I., Hunziker P., Kagi J.H.R. & Fothergill E.**, 1993. Complete amino acid sequences of five dimeric and four monomeric forms of metallothionein from the edible mussel *Mytilus edulis*. Eur. J. Biochem., 218: 183-194.
- Maiti I., Mbickay M., Marengo C. & Thirion J.P.**, 1982. Immunological characterization of metallothioneins in mouse LMTK cells and in variant resistant to cadmium. J. Cell. Physiol., 112: 35-41.
- Marafante E.**, 1976. Binding of mercury and zinc to cadmium binding protein in liver and kidney of goldfish (*Carassius auratus* L.). Experientia, 32: 149-150.
- Margoshes M. & Vallee B.L.**, 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. The Journal of the American Chemical Society, 79: p.4813.
- Martoja M. & Martoja R.**, 1984. La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. Le Courrier du CNRS, 54: 32-37.
- Martoja R., Truchet M. & Bouquegneau J.-M.**, 1982. Une néphropathie provoquée par le cadmium chez l'anguille adaptée à l'eau de mer (téléostéen). C. R. Acad. Sci. Paris, série III 295: 369-374

- Mason C.F.**, 1987. A survey of mercury, lead, and cadmium in muscle of British freshwater fish. *Chemosphere*, 16 (4): 901-906.
- Matthey W., Della Santa E. & Wannenmacher C.**, 1984. Manuel pratique d'écologie, Payot Lausanne, 264 p.
- Matthiessen P. & Brafield A.E.**, 1973. The effects of dissolved zinc on the gills of the stickleback *Gasterosteus aculeatus* L. *J. Fisch. Biol.*, 5: 607-613.
- McCarter J.A., Matheson A.T., Roch M. , Olafson R.W. & Buckley J.T.**, 1982. Chronic exposure of *Coho salmon* to sublethal concentrations of Cu-II. Distribution of Cu between high and low molecular weight proteins in liver cytosol and the possible role of MT in detoxification . *Comp. Biochem. Physiol.*, 72c: 21-26.
- McKee M.J., Knowles C.O. & Buckler D.R.**, 1989. Effects of aluminium on the biochemical composition of atlantic salmon. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 18: 243-248.
- Mehra R.J. & Bremmer I.**, 1983. Development of a radioimmunoassay for rat liver metallothionein- I and its application to the analysis of rat plasma and kidneys. *Biochem. J.*, 213: 459-465.
- Ministère de l'Environnement**, 1993. Carte 1993, La pollution des cours d'eau par les métaux. Ministère de l'Environnement (Direction de l'Eau)/ Agences de l'Eau.
- Moore J.W. & Ramamoorthy S.**, 1984. Heavy metals in natural waters, applied monitoring and impact assessment. Springer-Verlag New York Inc. 270 p.
- Mount D.**, 1966. *Air Wat. Pollut. Ind. J.*, 10: 49-56. (*in* Hartung 1973).
- Mouvet**, 1986. Mousses aquatiques et métaux lourds, exploitation des résultats du Bassin Rhin-Meuse. Agence de l'eau Rhin-Meuse
- Mulhauser B. & Monnier G.**, 1995. Guide de la faune et de la flore des lacs et des étangs d'Europe. Editions Delachaux et Niestlé, Lausanne-Paris, 336 p.
- Muller G. & Prosi F.**, 1978. Verteilung von zink, kupfer und cadmium in verschiedenen organen von plötzen (*Rutilus rutilus* L.) aus Neckar und Elzen. *Z. Naturforsch*, 33c: 7-14.
- Munkittrich K.R. & Dixon D.G.**, 1989. A holistic approach to ecosystem health assessment using fish population characteristics. *Hydrobiologia*, 188/189: 123-135.
- Muramoto S.**, 1981. Influence of complexans (EDTA, DPTA) on the toxicity of cadmium to fish at chronic levels. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 26: 641-646.
- Nassogne A.**, 1970. Le rôle des invertébrés marins dans le cumul et le transport des radionucléides. *Rev. Inst. Océanogr. Med.*, 20: 79-99.
- Nath R., Paliwal V.K., Prasad R. & Kambadur R.**, 1987. Role of metallothionein in metal detoxification and metal tolerance in protein calorie malnutrition and calcium deficient monkeys (*Macaca mulatta*). *Experientia Supplementum* Vol.52. Metallothionein II, 631-638.
- Naylor C., Pindar L. & Calow P.**, 1990. Inter- and intraspecific variation in sensitivity to toxins; the effects of acidity and zinc on the freshwater crustaceans *Asellus aquaticus* (L.) and *Gammarus pulex* (L.). *Water Research*, 24, (6): 757-762.
- Nehring, R.B. ,** 1976. Aquatic insects as biological monitors of heavy metals pollution. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 15 (2): 147-154.

- Nehring, R.B.; Nisson R. & Minasian G.,** 1979. Reliability of aquatic insects versus water samples as measures of lead pollution. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 22: 103-108.
- Nemer M., Travaglini E.C., Rondinelli E. & D'Alonzo J.,** 1984. Developmental regulation, induction and embryonic tissue specificity of sea urchin metallothionein gene expression. *Developmental Biology*, 102: 471-482.
- Newman M.C. & McIntosh A.W.,** 1982. The influence of lead in components of a freshwater ecosystem on molluscan tissue lead concentrations. *Aquatic Toxicol.*, 2: 1-19.
- Niethammer K.R., Atkinson R.D., Baskett T.S. & Samson F.B.,** 1985. Metals in riparian wildlife of the lead mining district of Southern Missouri. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 14: 213-223.
- Noel J.C., Bogusz D., Bara J.C., Laurent R., Stockman G & Mathian R.,** 1980. La pollution industrielle dans le bassin Nord/Artois Picardie. Bilan de dix années 69-79., Agence de l'eau Artois Picardie, Cahier technique n°1.
- Noel-Lambot F., Gerday C. & Disteche A.,** 1978. Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 61C : 177-187.
- Nordberg G.F.,** 1972. Cd metabolism and toxicity. *Environ. Physiol. Biochem.*, 2: 7-36.
- Nordberg G.F., Nordberg M., Piscator M. & Vesterberg, O.,** 1972. *Biochem. J.*, 126: 491-498. *In* Kagi et Kojima, 1987.
- Norey C.G., Cryer A. & Kay J.,** 1990. Induction of metallothionein gene expression by cadmium and the retention of the toxic metal in the tissues of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 97C (2): 215-220.
- Norey C.G., Lees B.M., Darke B.M., Stark J.M., Baker T.S., Cryer A. & Kay,** 1990. Immunological distinction between piscine and mammalian metallothioneins. *Comp. Biochem. Physiol.*, 95B: 597-601.
- Norris R.H., Lake P.S. & Swain R.,** 1981. Ecological effects of mine effluents on the South Esk River, Northeastern Tasmania. II. Trace metals. *Marine and Freshwater Research*, 32: 165-173.
- Occhiogrosso T.J., Waller W.T. & Lauer G.J.,** 1979. Effects of heavy metals on benthic macroinvertebrate densities in Foundry Cove on the Hudson river. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 22: 230-237.
- Olafson R.W. & Sim R.G.,** 1979. An electrochemical approach to quantitation and characterization of metallothioneins. *Anal. Biochem.*, 100: 343-351.
- Olafson R.W. & Thompson J.A.J.,** 1974. Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrate. *Mar. Biol.*, 28: 83-86.
- Olafson R.W., Sim R.G. & Boto K.G.,** 1979. Isolation and chemical characterization of the heavy metal-binding protein metallothionein from marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 62B: 407-416.
- Olsson P.E. & Haux C.** 1985. Rainbow trout metallothionein. *Inorg. Chim. Acta*, 107: 67-71.

- Olsson P.E. & Haux C.**, 1986. Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca fluviatilis*). *Aquatic Toxicol.*, 9: 231-242.
- Olsson P.E. & Hogstrand C.**, 1987. Improved separation of perch liver metallothionein by fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 402: 293-299.
- Olsson P.E., Haux C. & Förlin L.**, 1987. Variations in hepatic metallothionein, zinc and copper levels during an annual reproductive cycle in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Fish Physiol. Biochem.*, 3: 39-47.
- Olsson P.E., Larsson A. & Haux C.**, 1988. Metallothionein and heavy metal levels in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exposure to cadmium in the water. *Marine Environmental Research*, 24: 151-153.
- Olsson P.E., Zafarhullah M. & Gedamu L.**, 1989. A role of metallothionein in zinc regulation after oestradiol induction of vitellogenin synthesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Biochem. J.*, 257: 555-559.
- Olsson P.E., Zafarhullah M., Foster R., Hamor T. & Gedamu L.**, 1990. Developmental regulation of metallothionein messenger RNA, zinc and copper levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Eur. J. Biochem.*, 193: 229-235.
- Onosaka S. & Cherian M.G.**, 1982. Comparison of metallothionein determination by polarographic and cadmium-saturation methods. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 63: 270-274.
- Otvos J.D. & Armitage J.A.**, 1980. Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7094-7098.
- Overnell J. & Combs T.L.**, 1979. Purification and properties of plaice metallothionein, a cadmium-binding protein from the liver of the plaice (*Pleuronectes platessa*). *Biochem. J.*, 183: 277-283.
- Overnell J., Fletcher T.C. & McIntosh**, 1988. Factors affecting hepatic metallothionein levels in marine flatfish. *Mar. Environ. Res.*, 24: 155-158.
- Pattée E.**, 1981. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 1: Turbellariéstriclades paludicoles (planaires d'eau douce). *Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 50 (9): 279-304.
- Pequignot J. & Gire M.P.**, 1975. Intoxication par le nitrate de plomb chez la carpe (*Cyprinus carpio* L.). Influence sur la structure histologique de la rate et l'hématocrite. *J. Eur. Toxicol.*, 8: 165-168.
- Pequignot J.**, 1975. Effets de différents toxiques (Pb, Cu, formol, NH₄) chez la carpe: altérations cytologiques des organes excréteurs et hématopoïétiques. *J. Eur. Toxicol.*, 8: 361-369.
- Pequignot J., Labat R. & Chatelet A.**, 1975. Action de sulfate de cuivre sur les cellules à mucus de l'alevin de truite (*Salmo irideus*). *J. Eur. Toxicol.*, 8: 52-56.
- Pesson P.**, 1976. La pollution des eaux continentales, incidence sur les biocénoses aquatiques, Editions Gauthier-Villars, Paris, 285 p.
- Petering D.H. & Fowler B.A.**, 1986. Discussion summary; Roles of metallothionein and related proteins in metal metabolism and toxicity: problems and perspectives. *Environmental Health Perspectives*, 65: 217-224.

- Philippeau G.**, 1992, Comment interpréter les résultats d'une analyse en composantes principales.?, ITCF, Paris, 63 p.
- Pickering Q.H. & Henderson C.**, 1965. Water pollution, 10: 453-463 (*in* Hartung, 1973).
- Pielou E.C.**, 1975. Ecological diversity. John Wiley and sons, New York., 165 p.
- Piotrowski J.K., Bolanowska W. & Sapota A.**, 1973. Evaluation of metallothionein content in animal tissues. Acta Biochim. Polonica, 20: 207-215.
- Pontecorvo G.**, 1975. Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethyleneglycol treatment. Somat. Cell. Genet., 1: 397.
- Prosi F.**, 1979. Factors controlling biological availability and toxic effects of lead in aquatic organisms. Science of the Total Environment, 79: 157-169.
- Prygiel J.**, 1991. Use of benthic diatoms in surveillance of the Artois-Picardie basin hydrobiological quality. In : Whitton B.A., Rott E., Friedrich G. (eds). Use of algae for monitoring rivers (C). Institut für Botanik. Universität Innsbruck, p. 89-96.
- Prygiel J. & Coste M.**, 1993. The assessment of water quality in the Artois-Picardie water basin (France) by the use of diatom indices. Hydrobiologia. 269/270: 343-349.
- Prygiel J., Leveque L. & Iserentant R.**, 1995. L'I.D.P.: un nouvel indice diatomique pratique pour l'évaluation de la qualité des eaux en réseau de surveillance. Rev. Sci., sous presse.
- Ramade F.**, 1979. Ecotoxicologie. Editions Masson, Paris, 228 p.
- Ramade F.**, 1987. Eléments d'écologie, écologie fondamentale. Editions McGraw-Hill, Paris, 403 p.
- Ramade F.**, 1989. Eléments d'écologie, écologie appliquée. Editions McGraw-Hill, Paris, 579 p.
- Ramo J. del, Torreblanca A., Martinez M, Pastor A. & Diaz-Mayans J.**, 1995. Quantification of cadmium-induced metallothionein in crustaceans by the silver-saturation method. Marine Environmental Research, 39: 121-125.
- Ray S.**, 1984. Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. Experientia, 40: 14-23.
- Regis J., Gaude T., Pattee H., Persat H. & Zandonella P.**, 1980. La Saône à son entrée dans l'agglomération lyonnaise: étude physicochimique et biologique. Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 48 (10): 550-573.
- Reichert W.L., Federighi D.A. & Malins D.C.**, 1979. Uptake and metabolism of lead and cadmium in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Comparative Biochemistry and Physiology, 63C: 229-234.
- Reynolds E.S.**, 1963. The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Bio., 142: 310-325
- Richard M.P. & Cousins R.J.**, 1977. Isolation of an intestinal metallothionein induced par parenteral zinc. Biochem. Biophys. Res. Commun., 75: 286.
- Richards R.I., Heguy A. & Karin M.**, 1984. Cell, 37: 263-272. *In* Kägi et Kojima, 1987.

- Richoux P.**, 1982a. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 2: Coléoptères aquatiques (genres: adultes et larves). Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 51 (4): 105-128.
- Richoux P.**, 1982b. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 2: Coléoptères aquatiques (genres: adultes et larves) (suite). Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 51 (8): 257-272.
- Richoux P.**, 1982c. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 2: Coléoptères aquatiques (genres: adultes et larves) (suite et fin). Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon, 51 (9): 289-304.
- Roch M. & Mc Carter J.A.**, 1984. Hepatic metallothionein production and resistance to heavy metals by rainbow trout (*Salmo gairdneri*). I-Exposed to an artificial mixture of zinc, copper and cadmium. Comp. Biochem. Physiol., 77C: 71-75.
- Roch M., McCarter J.A., Matheson A.T., Clark M.J.R. & Olafson W.**, 1982. Hepatic metallothionein in Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 39: 1596-1601.
- Roesijadi G., Unger M.E. & Morris J.E.**, 1988. Immunological quantification of metallothioneins of a marine mollusc. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45: 1257-1263.
- Roig M.**, 1991. Etude de la contamination par les métaux lourds de la chaîne alimentaire de l'Aa (Nord / Pas-de-Calais). Essais de production de métalloprotéine de gardon (*Rutilus rutilus*) par intoxication par le cadmium. DEA de Toxicologie de l'Environnement. Université de Metz / Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie, Université de Lille I, 67 p.
- Romane F.**, 1972. Utilisation de l'analyse multivariable en Phytoécologie. Investigación pesquera, 36: 131-139.
- Romont R.**, 1996. Caractérisation multiparamétrique de la qualité des sédiments et description des communautés macrozoobenthiques associées des ports de Dunkerque Ouest et Boulogne-sur-Mer et des estuaires de l'Aa et de la Canche (Région Nord/Pas-de-Calais). Thèse de Doctorat - USTL / Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie.
- Romont R., Pruvot C., Arehmouch L. et Dhainaut-Courtois N.**, 1993. Etude de la pollution métallique des sédiments et de la macrofaune associée dans l'avant-port ouest de Dunkerque. Rapport de la convention PAD/USTL n°924033, 152p.
- Romont R. et Dhainaut-Courtois N.**, 1994a. Qualité des sédiments du cercle d'évitage de l'Avant-Port Ouest de Dunkerque. Rapport de la convention USTL/PAD n°944012, 17p.
- Romont R. et Dhainaut-Courtois N.**, 1994b. Cartographie des paramètres physico-chimiques des sédiments meubles de l'Avant-Port Ouest de Dunkerque. Rapport de la convention USTL/PAD n°944012, 39p.
- Romont R. et Dhainaut-Courtois N.**, 1994c. Bilan des études sur la macrofaune benthique et les sédiments des estuaires de l'Aa et de Canche et des sites portuaires de Boulogne/Mer et Dunkerque-Ouest. Rapport Contrat Etat-Région Nord-Pas-de-Calais, Programme DYSCOP 1 (1992- 1994) et Contrat Port Autonome de Dunkerque (1994), 23p.
- Romont R. & Dhainaut-Courtois N.**, 1996. Indicateurs écologiques et bioaccumulateurs en milieu marin. Invertébrés benthiques des zones estuariennes et portuaires de la Région Nord-Pas-de-Calais. Troisième Conférence Internationale sur la Biogéochimie des Eléments traces. "Sols contaminés." Paris Ed. INRA (sous-presse).

- Rondelaud D., Chaisemartin C. & Barthe D.,** 1976. Données histologiques et histochimiques sur le transfert de deux métaux (Fe^{+++} , Cu^{++}) chez *Lymnaea (galba) truncatolata* Müller. *Annals of Limnology*, 12: 269-281.
- Rosenberg D.M. & Resh V.H.,** 1982. The use of artificial substrates in the study of freshwater benthic macroinvertebrates. In Cairns, J. (*ed.*, Artificial substrates. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor. ISBN 0-250-40404-4.
- Rutherford J.E. & Mellow R.J.,** 1994. The effects of an abandoned roost yard on the fish and macroinvertebrate communities of surrounding beaver ponds. *Hydrobiologia*, 294: 219-228.
- S.R.A.E,** 1990. Résultats des analyses hydrobiologiques du réseau national de bassin, campagne 1990. Service régional de l'Aménagement des Eaux Région Nord- Pas-de-Calais, 10p.
- Salomon W. & Forstner V.,** 1984. Metals in the hydrocycle. Springer-Verlag, *ed.* Berlin.
- Salzet-Raveillon B .,** 1993. Caractérisation et mode d'expression d'une protéine anti-bactérienne (MPII) impliquée dans la défense du milieu intérieur de l'Annélide Polychète *Nereis diversicolor*. Thèse de Doctorat, USTL - Laboratoire de Phylogénie Moléculaire des Annélides.
- Salzet M., Wattez C., Baert J.L. & Malecha J .,** 1993. Biochemical evidence of angiotensin II-like peptides and proteins in the brain of the Rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. *Brain Res.*, 631: 247-255.
- Sandhall A.,** 1991. Insectes et petites bêtes. Nathan Nature, 288 p.
- Sangaland G.B. & O'Halloran M.J.,** 1973. Adverse effects of cadmium on brook trout testis and *in vitro* testicular androgen synthesis. *Biology of reproduction*, 9: 394-403.
- Saunier, eau et environnement,** 1989. Etude diagnostic des réseaux d'assainissement et impacts sur le milieu récepteur, Rapport général pour la Direction Départementale de l'équipement du Nord, 91 p .
- Scheuhammer A.M. & Cherian G.,** 1986. Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 82: 417-425.
- Schlinder D.W.,** 1987. Detecting ecosystem responses to anthropogenic stress. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 44 (suppl. 1): 6-25.
- Schroeder j. & Cousins R.J.,** 1990. Interleukin 6 regulates metallothionein gene expression and metabolism in hepatocyte monolayer cultures. *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 3137-3141.
- Schuhmacher M., Domingo J.L., Llobet J.M. & Corbella J.,** 1995. Variations of heavy metals in water, sediments, and biota from the delta of Ebro River, Spain. *Journal of Environmental Science and Health*, A30(6): 1361-1372.
- Schweiger G.,** 1957. Die toxikologische Einwirkung von Schwer-metalsalzen auf Fische und Fischnahrtiere. Bayerische Biologische Versuchsanstalt, 54-78.
- Septier François,** 1992. Etude de la bioconcentration de métaux lourds chez une annélide polychète estuarienne endobenthique (*Nereis diversicolor*). Utilisation des plans factoriels pour une meilleure évaluation des risques écotoxicologiques liés aux interactions métalliques. Thèse de Doctorat, USTL - Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie, 144p.
- Septier F., Demuynck S., Thomas P. & Dhainaut-Courtois N.,** 1991. Bioconcentration de métaux lourds chez une annélide polychète estuarienne: *Nereis diversicolor*. *Oceanologica Acta*, 11: 263-274.

- Service d'Assistance Technique à l'Exploitation des Stations d'Épuration**, 1989. Rapport sur le fonctionnement des stations d'épurations des collectivités locales du département du Nord en 1989.
- Shannon C.E. & Weaver W.**, 1949. The mathematical theory of communication. University Illinois Press. 117p.
- Simkiss K.**, 1976. Intracellular and extracellular routes in biomineralization. *In*: Calcium in Biological Systems. Symp. Soc. Exp. Biol., 30: 423-444, University Press, Cambridge.
- Simkiss K.**, 1979. Metal ion in cells. Endeavour, new Series, 3 (1): 1-6.
- Simkiss k., Taylor M. & Mason A.Z.**, 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. Mar. Biol. Letters, 3: 187-201.
- Simpson E.H.**, 1949. Measurement of diversity. Nature 163: 688.
- Somerfield P.J.**, 1994. Benthic community structure in relation to an instantaneous discharge of waste from a tin mine. Mar. Pollut. Bull., 28 (6): 363.
- Sorenson J.R.J., Cambell I.R., Tepper L.B. & Lingg R.D.**, 1974. Aluminium in the environment and human health. Health Perspect, 8: 3-95.
- Sprenger M. & Mc Intosh A.**, 1989. Relationship between concentrations of Aluminium, Cadmium, Lead and Zinc in water, sediments and macrophytes in six acidic lakes, Arch. Environ. Contam. Toxicol., 18: 225-231.
- Spry D.J. & Wood C.M.**, 1989. The influence of dietary and waterborne zinc on heat-stable metal ligands in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 45: 32-41.
- Squibb K.S., Pritchard J.B. & Fowler B.A.**, 1982. Renal metabolism and toxicity of metallothionein. *in* "Biological Roles of Metallothionein", E.C. Fouikes *ed.*, Elsevier/North-Holland, 181-192.
- Sterry P.**, 1992. Les étangs et rivières. Guide de terrain. Casterman, 128p.
- Stone H; & Overnell J.**, 1985. Non-metallothionein cadmium binding proteins. Comp. Biochem. Physiol., 75C: 211-215.
- Sulaiman N., George S. & Burke M.D.**, 1991. Assessment of sublethal pollutant impact on flounders in an industrialised estuary using hepatic biochemical indices. Mar. Ecol. Progr. Ser., 68: 207-212.
- Suzuki K.T., Sunaga H., Kobayashi E. & Hatakeyama S.**, 1987. Environmental and injected cadmium are sequestered by two major isoforms of basal copper, zinc-metallothionein in gibel (*Carassius auratus langsdorfi*) liver. Comp. Biochem. Physiol., 87C (1): 87-93.
- Tachet H., Bournaud M. & Richoux P.**, 1984. Introduction à l'étude des macroinvertébrés d'eau douce. Université de Lyon (Association Française de Limnologie), 155p.
- Templeton D.M. & Cherian M.G.**, 1984. Biochem. J., 221: 569-575. *In* Kagi et Kojima, 1987.
- Thieffry N.**, 1992. Etude de la contamination par les métaux lourds des chaînes alimentaires de l'Aa, recherche de métalloprotéines complexant le zinc chez l'hirudinée *Erpobdella octoculata*. Rapport de DEA de Toxicologie de l'Environnement. Université de Metz et Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie de l'université de Lille 1.

- Thomas D.G., Solbe J.F. de L.G., Kay J. & Cryer A.**, 1983. Environmental cadmium is not sequestered by metallothionein in rainbow trout. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 110: 584-592.
- Ting K.S., Liang Y.I., Shi J., Chen X. & Gu T.**, 1965. Chelate stability of sodium dimercapto-succinate on the intoxications from many metals. *Chin. Med. J.*, 51: 304-307.
- Towbin H., Staehelin T. et J.G.**, 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76: 43-50.
- Tucker L.R.**, 1958. An inter-battery method of factor analysis. *Psychometrika*, 23 (2): 111-136.
- Tuffery G. & Verneaux J.**, 1968. Méthode de détermination de la qualité biologique des eaux courantes, C.E.R.A.F.E.R., 4, Paris.
- Tukendorf A. & Baszynski T.**, 1985. Partial purification and characterization of copper-binding protein from roots of *Avena sativa* grown on excess copper. *J. Plant. Physiol.*, 120: 57-63.
- Turner J.S. & Robinson N.J.**, 1995. Cyanobacterial metallothioneins: Biochemistry and molecular genetics. *Journal of Industrial Microbiology*, 14: 119-125.
- Vahrenkamp H.**, 1973. Metalle in lebensprozessen. *Chemie Unserer Zeit*, 7: 97-105.
- Valle B.L.**, 1979. "Metallothionein," ed. by J.H.R. Kägi and Norberg, Birkhauser Verlag, Basel, 1979, p. 19.
- Vallée B.L.**, 1976. Zinc biochemistry: a perspective. *T.I.B.S.*, 88-91.
- Vasak M. & Kagi J.H.R.**, 1983. Spectroscopic properties of metallothionein. In: *Metal Ions in Biological Systems* (Siget, H., ed), pp. 213-273, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel.
- Vergon J.P. & Bourgeois C.**, 1993. Introduction pratique à la systématique des organismes des eaux continentales françaises - 10: Les larves de diptères chironomidae. *Bulletin mensuel de la Société Linnéenne de Lyon*, 62 (4): 101-132.
- Verneaux J., Faessel B. & Malesieux G.**, 1976. Note préliminaire à la proposition de nouvelles méthodes de détermination de la qualité des eaux courantes, C.T.G.R.E.F., division qualité des eaux, pêche et pisciculture, 13p.
- Waalkes M.P., Harvey M.J. & Klaassen C.D.**, 1984. Relative *in vitro* affinity of hepatic metallothionein for metals. *Toxicol. Letters*, 20: 33-39.
- Watson T.A. & McKeown B.A.**, 1976. The activity of delta 5-3 beta hydroxysteroid dehydrogenase enzyme in the interrenal tissue of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) exposed to sublethal concentrations of zinc. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 16: 173-181.
- Webb. M.**, 1987. Metallothionein in regeneration, reproduction and development. *Experientia Supplementum Vol.52. Metallothionein II*, 483-498.
- Weis J.S. & Weis P.**, 1994. Effect of contaminants from chromated copper arsenate-treated lumber on benthos. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 26 (1): 103.
- Wentzel R. & McIntosh A.**, 1977. Sediment contamination and benthic macroinvertebrate distribution in a metal impacted lake. *Environ. Pollut.*, 14: 187-193.
- Whitton B.A.**, 1970. Toxicity of Zinc, Copper and Lead to *Chlorophyta* from flowing waters, *Arch. Microbiol.*, 72: 353-360.

- Wielgus-Serafinska E. & Strzelec M.**, 1983. Influence of lead poisoning on ultrastructural changes in the body wall of *Eisenia foetida* oligochaeta. 2- Long action of different concentration of lead on ultrastructural changes in the cells of the body wall. *Folia. Histochem. Cytochem.*, 21: 145-152.
- Winge D.R. & Garvey J.S.**, 1983. Antigenicity of metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2472-2476.
- Winge D.R., Nielson K.B., Gray W. & Hamert D.**, 1985. Yeast metallothionein; sequence and metal-binding properties. In: 2nd International Meeting on Metallothionein, August 21-24. Zurich, abstracts p. 72-73.
- Wobeser G.**, 1975. Acute toxicity of methyl mercury chloride and mercuric chloride for rainbow trout (*Salmo gairdneri*) fry and fingerlings. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 32: 2005-2013.
- Wofford H.W. & Thomas P.**, 1984. Interactions of cadmium with sulphhydryl-containing compounds in striped mullet (*Mugil cephalus* L.). *Mar. Env. Res.*, 14: 119-137.
- Wolnik K.A., Frick F.L., Capar S.G., Meyer M.W., Satzger R.D., Bonnin E. & Gaston C.M.**, 1985. Elements in major raw agricultural crops in the United States. 3. Cadmium, lead and eleven other elements in canots, field corn, onions, rice, spinach and tomatoes. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 33: 807-811.
- Wong P.T.S. & Dixon D.G.**, 1995. Bioassessment of water quality. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 10: 9-17,
- Woodiwiss F.S.**, 1964. The biological system of stream classification used by the Trent River Board. *Chem. Ind.*, p. 443-447.
- Woodworth J. & Pascoe D.**, 1983. Induction of cadmium-binding protein in the three-spined stickieback. *Aquatic Toxicol.*, 3: 141-148.
- Woodworth J., Evans A.S.A. & Pascoe D.**, 1983. The production of cadmium-binding protein in three species of freshwater fish. *Toxicology Letters*, 15: 289-295.
- Yamamura M. & Suzuki K.T.**, 1984. Characterisabon of metallothionein induced in the fish *Carassius auratus* langsdorfi. *Comp. Biochem. Physiol.*, 79C: 63-69.
- Zadory L.**, 1984. Freshwater molluscs as accumulation indicators for monitoring heavy metal pollution. *Fresenius Zeitschrift der Analytischen Chemie*, 317: 375-379.
- Zauke G.P.**, 1981. Cadmium in *Gammaridae* (Amphipoda: crustacea) of the rivers Werra and Weser: geographical variation and correlation to cadmium in sediments. *Environmental Pollution* (series B), 2: 465-474.
- Zhang Y.S. & Schlenk D.**, 1995. Induction and characterization of hepatic metaliothionein expression from cadmium-induced channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14 (8): 1425-1431.
- Zimmer U.E. & Handel A.**, 1993. Guide de la faune et de la flore de nos régions. Editions Arthaud, Paris, 398 p.

RESUME
ABSTRACT

RESUME

Ce travail concerne d'une part l'étude de la contamination métallique et organique du canal à grand gabarit du Nord de la France et de ses effets sur la macrofaune benthique. Par ailleurs, la caractérisation de la métallothionéine hépatique du gardon a été effectuée afin d'élaborer un test immunologique d'évaluation de la qualité du milieu aquatique.

Plusieurs paramètres (Al, Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn, COT, P, NTK) ont été dosés dans les sédiments récoltés, de décembre 1991 à avril 1995, dans le canal à grand gabarit, l'Aa et l'Aa canalisé. **Les** résultats, comparés aux normes en vigueur, et traités par des méthodes statistiques (Comparaison de moyennes, ACP...) ont montré la forte contamination des canaux du bassin minier. Divers traitements (calcul d'indices, AFC, **DRF**,...) et analyses des inventaires de macroinvertébrés benthiques piégés dans des substrats artificiels ont permis de caractériser les communautés qui reflètent parfaitement la qualité du biotope (indices faibles et **structures** perturbées au niveau du bassin minier). Des ACP ont montré que des indices biocoenotiques sont corrélés négativement avec les charges en Cd, Zn, Pb et Cu des sédiments. Des Analyses de Co-Inertie ont révélé une co-structure spatiale entre la position des sites expliquée par les données faunistiques et celle expliquée par les données multiparamétriques des sédiments.

Deux protéines (MTG1, MTG2) ont été isolées d'extraits hépatiques de gardons intoxiqués par des injections intrapéritonéales de Zn et de Cd. Les caractéristiques de MTG1 (5975,5 Da, 60 acides aminés dont 20 cystéines) et son importante homologie (61%) avec la métallothionéine rénale de cheval et des métallothionéines de poissons permettent de la classer dans la famille des métallothionéines de classe 1. Les anticorps monoclonaux produits reconnaissent sans distinction MTG1 et MTG2 ainsi que des métallothionéines de mammifères. Une approche immunologique de l'estimation de la contamination hépatique de gardons a révélé une différence significative entre des animaux témoins et intoxiqués expérimentalement.

ABSTRACT

This work concerned the evaluation of the metallic and organic contamination of the Canal à Grand Gabarit (Northern, France) and the consequences on the benthic macroinvertebrates communities. The characterization of the roach hepatic metallothionein was also determined to produce an immunological test to assess river quality.

Several parameters (Al, Cd, Cu, Fe, Pb, Zn, TOC, P, TKN) were measured in sediments taken from the Canal à Grand Gabarit, and the Aa river. The **data** compared to French Norms and statistically treated (mean comparison tests, PCA, ...) showed a strong contamination of the canals localized in the Bassin Minier. The communities of the benthic macroinvertebrates collected with artificial substrates were characterized using several treatments (indices, FCA, RFD, ...) and showed to be in good agreement with the values found for the sediments parameters. CPA showed that biocenotic index values were negatively correlated with the Cd, Zn, Pb and Cu of the sediments. Co-Inertia Analysis revealed a spatial co-structure between the position of the sites explained by faunistic **data** and that explained by multiparametric sediments data.

Two proteins (MTG1 **and** MTG2) were isolated from the liver of roach exposed to Cd and Zn by means of intraperitoneal injections. The molecular mass (5975,5 Da), the length (60 amino acids), the cysteine content (20 residues) and the homology with horse (61%) **and** piscine (75 to 95%) metallothioneins allowed to consider MTG 1 as a class 1 metallothionein. Monoclonal antibodies raised against MTG1 can recognize both MTG1, MTG2 and mammals metallothioneins. Using an immunological approach, significant differences were recorded between control and metal exposed fishes.

Les travaux présentés dans mon mémoire ont conduit aux rapports, publications et communications suivants:

Grumiaux F, Demuynck S. et Dhainaut-Courtois N., 1994. Etude de la contamination métallique et organique du canal à grand gabarit. Isolement de la métallothionéine de gardon (*Rutilus rutilus*). Service d'Hydrobiologie et d'Ecotoxicologie, Rapport du contrat Agence de l'Eau Artois-Picardie/ USTL n°91X01. 171 pp.

Grumiaux F. et Dhainaut-Courtois N., 1996. Benthic macroinvertebrate communities of the canal a grand gabarit, Aa river and the canalized Aa river in the North of France. *Journal of Freshwater Ecology*, 11 (2): 131- 138. (sous presse)

Grumiaux F., Bulet Y., Salzert H., Demuynck S et Dhainaut-Courtois N., 1996. Isolation and structural characterisation of hepatic metallothionein from roach (*Rutilus rutilus*). *FEBS Letters*; (Soumis)

Grumiaux F., Demuynck S., Romont H., Pruvot C et Dhainaut-Courtois N., 1995. Recherches écotoxicologiques sur les systèmes aquatiques dulçaquicoles et marins de la Région Nord-Pas de Calais. Colloque LILLE / ULB. 30 mai, LILLE. (poster)

Grumiaux F., Demuynck S, Dhainaut-Courtois N., 1995. Méthodes chimiques et biologiques appliquées à l'étude écotoxicologique de cours d'eau de la région Nord-Pas de Calais. Troisième conférence internationale sur la biogéochimie des éléments traces, 15-19 mai, PARIS. (poster)

D'autres études menées en parallèle ont conduit à la publication suivante:

Grumiaux F., Demuynck S, Leprêtre A et Dhainaut-Courtois N., 1996. Teneurs métalliques et organiques dans les sédiments et effets sur les communautés benthiques dans deux cours d'eau représentatifs de la Région Nord/Pas-de-Calais. (soumis)