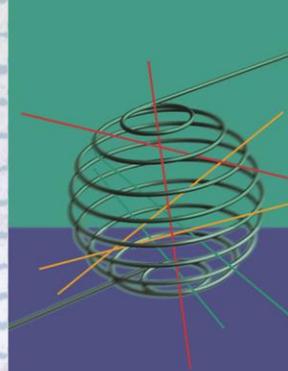




**Impact des métaux
lourds et des
polychlorobiphényles
sur les organismes
de Mer du Nord - ICAS**

**GESTION
DURABLE DE LA
MER DU NORD**



POLITIQUE SCIENTIFIQUE FEDERALE

PLAN D'APPUI SCIENTIFIQUE A UNE POLITIQUE DE DEVELOPPEMENT DURABLE (PADD-I)

Programme: "Gestion durable de la mer du Nord"

Impact des métaux lourds et des polychlorobiphényles sur les organismes de Mer du Nord

Philippe Dubois¹, Geoffroy Coteur¹, Pol Gosselin², Pascale Wantier³, Bruno Danis¹, Yves Chambost¹, David Gillan¹, Guillemette Joly¹, Philippe Pernet¹, Gilles Radenac^{1,5}, Sandrine Dutrieux¹, Pol Postiaux², Olivier Cotret⁴, Jean-Louis Teyssie⁴, Scott Fowler⁴, Jean-Pierre Villeneuve⁴, Chantal Cattini⁴, Paco Bustamante⁵, Robert Flammang³, Michel Jangoux², Michel Warnau^{1,4}

1. Laboratoire de Biologie Marine CP 160/15, Université Libre de Bruxelles, av . Roosevelt, 50, B-1050 Bruxelles, Belgique
2. Laboratoire de Biologie Marine, Université de Mons-Hainaut, Av. du Champs de Mars, Pentagone, 7000 Mons.
3. Laboratoire de Chimie Organique, Université de Mons Hainaut, Av. Maistriau 19, 7000 Mons..
4. Marine Environment Laboratory, International Atomic Energy Agency, 4, Quai Antoine 1^{er}, BP n°800, MC-98012 MONACO.
5. Laboratoire de Biologie et d'Environnement Marins, UPRES-EA 3168, Université de La Rochelle, 22 Avenue Michel Crépeau, 17042 La Rochelle, France.

D/2004/1191/42

RESUME	1
ABSTRACT	3
1. INTRODUCTION	5
2. MATERIELS ET METHODES	7
2.1. Echantillonnage	7
2.2. Analyses	11
2.2.1 Métaux.	11
2.2.2. PCBs.	11
2.3. Essais embryotoxicologiques	12
2.4. Essais immunotoxicologiques	15
2.4.1. Phagocytose <i>in vivo</i>	15
2.4.2. Production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO) et concentration en amœbocytes circulants (CAC).	17
3. RESULTATS ET DISCUSSION.	18
3.1. Validations.	18
3.1.1. <i>Asterias rubens</i> en tant que bioindicateur de contamination.	18
3.1.1.1. Expositions simples	19
3.1.1.2. Exposition mixte	20
3.1.2. Les larves d'échinodermes de Mer du Nord en tant qu'embryoessais de toxicité	21
3.1.2.1. Sensibilité des embryons: influence des solutions métalliques.	22
3.1.2.2. Embryotoxicité des sédiments du Sør fjord	23
3.1.2.3. Embryotoxicité des sédiments du panache de l'Elbe.	25
3.1.3. Sensibilité du système immunitaire d' <i>Asterias rubens</i> aux métaux et PCBs.	27
3.1.3.1. Le système immunitaire d' <i>Asterias rubens</i> .	27
Diversité morpho-fonctionnelle des amœbocytes.	27
Caractérisation de la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO) par les amœbocytes.	27
3.1.3.2. Effets des facteurs environnementaux sur les réponses immunes d' <i>Asterias rubens</i> .	28
3.1.3.3. Effets des métaux lourds sur les réponses immunes d' <i>Asterias rubens</i> .	28
Contaminations métalliques <i>in vitro</i> .	28
Contaminations métalliques <i>in vivo</i>	29
Contaminations métalliques <i>in situ</i> au Sør fjord (Norvège)	30
3.1.3.4. Effets des PCBs sur les réponses immunes d' <i>Asterias rubens</i>	33
3.2. Contamination des sédiments et organismes par les métaux et PCBs en Mer du Nord.	35
3.2.1. Sédiments	35
3.2.1.1. Métaux	35
3.2.1.2. PCBs	36
3.2.2. <i>Asterias rubens</i>	38
3.2.2.1. Métaux	38
3.2.2.2. PCBs.	39

3.3. Toxicité des sédiments de la Mer du Nord	
3.3.1. Plateau continental belge	43
3.3.1.1. Tests entrepris avec <i>A. rubens</i>	43
3.3.1.2. Tests entrepris avec <i>P. miliaris</i> .	46
3.3.2. Plateaux continentaux néerlandais et allemand	46
3.3.2.1. Tests entrepris avec <i>A. rubens</i> .	47
3.3.2.2. Tests entrepris avec <i>P. miliaris</i> .	47
3.3.3. Conclusions.	47
3.4. Effets des contaminants sur le système immunitaire des astéries.	50
3.4.1. Plateau continental belge	50
3.4.2. Côtes néerlandaises et allemandes	51
3.5. Analyse intégrée	52
4. Conclusions et Recommandations	55
REMERCIEMENTS	56
BIBLIOGRAPHIE	57

RESUME

Bien que l'émission de contaminants persistants tels les métaux lourds et les biphényles polychlorés (PCBs) dans les mers européennes soit maintenant sévèrement contrôlée, voire interdite, ces contaminants constituent toujours une menace pour de nombreux écosystèmes marins. En effet, de par leur faible solubilité, ces contaminants se sont associés aux sédiments, lesquels représentent maintenant une source majeure de contamination secondaire et contribuent à la persistance de la contamination initiale. La recherche présentée a pour but de déterminer la biodisponibilité et l'impact de ces contaminants pour les organismes benthiques de Mer du Nord.

Dans un premier temps, les bioindicateurs, bioessais et biomarqueurs utilisés furent validés à la fois en laboratoire et sur le terrain. Ceci permit de montrer que l'étoile de mer *Asterias rubens* est un bioindicateur de contamination par les PCBs (sa valeur bioindicatrice des contaminations métalliques avait été démontrée précédemment). Les développements embryonnaire et larvaire des espèces de Mer du Nord d'oursin (*Psammechinus miliaris*) et d'astérie (*A. rubens*) s'avérèrent de bons bioessais de toxicité des sédiments. Ces tests, particulièrement sensibles et préconisés par de nombreuses agences environnementales dans le monde (par ex. l'EPA américaine) permettent d'évaluer de façon générale la toxicité des sédiments étudiés (sans inférence quant aux effets sur les organismes locaux). Finalement, la sensibilité du système immunitaire de l'astérie vis-à-vis des métaux et PCBs fut établie. L'état de santé immunitaire des astéries a été évalué en mesurant l'activité phagocytaire et la production de radicaux oxydants par les cellules immunitaires. L'activité phagocytaire mesure la capacité des cellules de défense à ingérer les microorganismes pathogènes. Les radicaux oxydants sont indispensables à la destruction de ces microorganismes. Si leur non-production pose donc un problème grave de défense à l'organisme, il faut noter que leur surproduction peut être délétère pour ce même organisme vu la réactivité de ces radicaux vis-à-vis des molécules biologiques.

La biodisponibilité a été évaluée en comparant les concentrations en métaux lourds (Cd, Pb, Zn, Cu) et PCBs (congénères 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) dans les sédiments et dans les astéries *A. rubens*, prélevés sur les plages et le plateau continental belges et le long des côtes hollandaises et allemandes entre 1998 et 2000. Le sédiment apparaît comme une source majeure de contamination pour cette espèce, ce qui indique que les contaminants étudiés sont effectivement biodisponibles. Cette biodisponibilité varie toutefois selon le contaminant et le site considéré. En particulier, si tous les métaux étudiés apparaissent biodisponibles le long des côtes hollandaises et allemandes, seuls le zinc et le cuivre montrent une

origine sédimentaire importante sur les côtes belges. La contamination des astéries par les PCBs hautement chlorés présente une corrélation plus importante avec celle des sédiments que la contamination par les PCBs faiblement chlorés. Dans certaines stations belges (en particulier sur la plage de Knokke), la forte contamination des étoiles de mer par les PCBs ne trouve pas sa source dans les sédiments. Ces résultats soulignent la nécessité d'employer des bioindicateurs, l'analyse des sédiments ne fournissant pas systématiquement une information quant à la contamination des organismes. Les étoiles montrent les plus fortes contaminations dans le panache de l'Escaut (Knokke, Oostende, Breskens) et dans la Baie allemande –dans le panache de l'Elbe- (il faut noter que les étoiles sont absentes de l'Escaut occidental).

La toxicité des sédiments récoltés a été testée à l'aide de deux bioessais: les développements embryonnaire et larvaire de l'oursin *P.miliaris* et de l'étoile de mer *A.rubens*. Les résultats obtenus montrent que le développement larvaire de l'oursin est plus sensible aux métaux que celui de l'étoile de mer. Par contre, ce dernier apparaît plus sensible aux contaminations par les PCBs hautement chlorés. Des altérations significatives du développement larvaire ont été enregistrées suite à l'exposition aux sédiments récoltés sur les plages ou immédiatement au large de Knokke, Oostende, Nieuwpoort et Breskens et dans la Baie allemande. Une faible qualité des sédiments de la côte belge est donc apparente.

Les résultats concernant l'état de santé du système immunitaire des astéries sont contrastés. D'une manière générale, l'activité immunitaire (phagocytose et production de radicaux oxydants) apparaît stimulée chez les étoiles vivant dans le panache de l'Escaut. Ces étoiles apparaissent donc sous le coup d'un stress immunitaire dont l'origine doit être déterminée (contaminants chimiques, éventuellement autres que ceux étudiés, contamination par des microorganismes). Par contre, les astéries de la Baie allemande (panache de l'Elbe) montrent une forte immunosuppression qui semble liée à la contamination par les métaux lourds.

En conclusion, il apparaît que les sédiments constituent effectivement une source de contamination par les métaux et PCBs pour les organismes benthiques (représentés par l'étoile de mer). Les sédiments de la Baie allemande et de la côte belge montrent une toxicité significative et le système immunitaire des astéries prélevées dans ces sites est affecté. Si la situation de la Baie allemande apparaît assez claire (toxicité des sédiments, immunosuppression), l'état de contamination et les effets de celle-ci en ce qui concerne la côte belge sont beaucoup plus complexes (ainsi qu'en attestent les analyses multivariées prenant tous les facteurs étudiés en compte) et nécessitent des études complémentaires. Il s'agira, en particulier, d'évaluer l'impact des contaminants (en incluant si possible d'autres composés organochlorés et les

dérivés du pétrole) sur l'état des populations d'organismes benthiques (en élargissant le spectre d'espèces étudiées). Il apparaît toutefois, dès maintenant, que des mesures de précaution concernant la qualité de produits de la pêche devraient être prises dans les zones les plus côtières.

ABSTRACT

Although the release of persistent contaminants like heavy metals and polychlorinated biphenyls (PCBs) in European seas has now been severely regulated or banned, these contaminants are still a threat for numerous marine ecosystems. Indeed, due to their low solubility, these contaminants are associated with sediments. As a consequence, they now represent a major secondary source of contamination which contributes to the persistence of the original one. The goal of the present research is to determine the bioavailability and impact of these contaminants in benthic organisms of the North Sea.

In a first step, validations of the used bioindicators, bioassays and biomarkers were carried out using both laboratory and field contaminations. This allowed to qualify the starfish *Asterias rubens* as a bioindicator of PCB contamination (bioindicative value towards metals had been demonstrated previously). Embryo and larval development of North Sea species of sea urchin (*Psammechinus miliaris*) and starfish (*A. rubens*) were shown to be effective bioassays of sediment toxicity. These tests are highly sensitive and recommended by several environmental agencies like the US EPA. They allow to assess the relative toxicity of sediments from different locations (without inferring the actual toxicity for the resident biota). Finally, the sensitivity of the starfish immune system towards metals and PCBs was established. The well-being of the immune system of starfishes was assessed by measuring the phagocytic activity and the production of reactive oxygen species (ROS) by immune cells. The phagocytic activity measures the capacity of defence cells to ingest pathogenic microorganisms. Oxygen radicals are produced to destroy the ingested pathogens. If a reduced production is thus worrying for the organism, an increased production can also be deleterious because these radicals are highly reactive towards biological macromolecules.

The bioavailability was assessed by comparing metal (Cd, Pb, Zn, Cu) and PCB (# 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180) concentrations in sediments and in starfishes *A. rubens*, collected on Belgian beaches and continental plate and along the Dutch and German coasts between 1998 and 2000. The sediment appeared as a major source of contamination for that species, indicating an effective bioavailability of the studied contaminants. However, this bioavailability varied according to the considered contaminant and location. In particular, if all metals appeared bioavailable

along the Dutch and German coasts, only zinc and copper concentrations were correlated in sediment and biota in the Belgian sites. Concentrations of highly-chlorinated PCBs in the sediment was better correlated with those in the starfish than concentrations of low-chlorinated PCBs. In some Belgian stations (in particular on the beach of Knokke), the high contamination of the starfishes by PCBs was not linked to a sediment contamination. These results emphasize the need for bioindicators, as the sediments do not always reveal contaminations. Starfishes showed the highest contaminations in the plume of the Scheldt River (Knokke, Oostende, Breskens) and in the German Bight, in the plume of the Elbe River (it is noteworthy that starfishes do not occur in the Westerscheldt estuary).

The toxicity of sediments collected in the same locations as starfishes were tested using two bioassays, the embryo and larval developments of the sea urchin *P.miliaris* and of the starfish *A.rubens*. The results showed that the sea urchin development is more sensitive to metals than the starfish one whereas the latter is more affected by highly-chlorinated PCBs. Significant alterations of the larval development were induced by sediments collected on the beaches or immediately off Knokke, Oostende, Nieuwpoort, and Breskens and in the German Bight. A poor quality of sediments along the Belgian coast is thus apparent.

The results obtained about the immune system of starfishes are contrasted. In general, both the phagocytic activity and ROS production appeared stimulated in starfishes living in the plume of the Scheldt River. These starfishes are thus submitted to an immune stress whose origin is unknown (chemical or microorganism contamination?). On the contrary, the starfishes of the German Bight (plume of the River Elbe) showed a significant immunosuppression apparently linked to metal contamination.

In conclusion, sediments of the North Sea appear as an effective source of contamination by metals and PCBs for benthic organisms (as illustrated by the starfishes). The sediments of the German Bight and the Belgian coast show a significant toxicity and the immune system of the starfishes collected in these places is altered. If the status of the German Bight is rather obvious (sediment toxicity, immunosuppression), the contamination status of the Belgian coast and its effects appears much more complex (as attested by multivariate analysis) and make further studies necessary. In particular, the impact of contaminants (including other organochlorine compounds and oil derivatives) on populations of benthic organisms should be assessed. However, precaution measures about the quality of sea food collected in the coastal zone should be immediately taken.

1. INTRODUCTION

Selon les derniers rapports sur l'état de santé de la Mer du Nord (NSTF 1993, OSPAR 2000), certains métaux lourds (Cd, Hg, Pb, et Cu) et les biphényles polychlorés (PCBs) sont encore des contaminants préoccupants dans plusieurs sites de la Mer du Nord dont des sites proches de régions économiquement importantes (régions touristiques et de pêche par exemple). De par leur faible hydro-solubilité, les métaux lourds et les PCBs sont principalement associés aux sédiments qui représentent donc une source majeure de contamination pour le benthos. En particulier, l'association prédominante des métaux lourds et des PCBs avec les sédiments a été mise en évidence lors de plusieurs études poursuivies en Mer du Nord (e.g. Temmerman 1988, Everaarts *et al.* 1990, Stebbing *et al.* 1992, NSTF 1993). En conséquence, les rapports NSTF et OSPAR insistent sur le besoin (1) de clarifier l'impact des métaux lourds sur le benthos ("les points qui restent à clarifier sont l'importance biologique des plus hautes concentrations métalliques dans les sédiments totaux et leurs fractions granulométriques fines et la vitesse d'assainissement dans les régions de sédimentation à court et moyen terme") et des PCBs ("des informations sur les effets sur les organismes des contaminants organiques [dont les PCBs] dans les sédiments sont encore nécessaires") associés aux sédiments et (2) dans la mesure du possible, d'établir de nouvelles séries temporelles d'indications des changements biologiques, chimiques et physiologiques. En Mer du Nord, les principales régions qui contiennent des sédiments contaminés sont les estuaires (tel l'Escaut occidental), le Dogger Bank, et des régions géographiquement restreintes de décharges de résidus (p.ex. le Sør fjord en Norvège) (Kröncke 1987).

Les informations disponibles sur l'impact des métaux lourds et des PCBs associés aux sédiments sur les organismes marins (et particulièrement le benthos) proviennent principalement de bioessais de toxicité qui ne démontrent que l'impact des sédiments à contaminations complexes (voir e.g. Butler *et al.* 1992, Chapman *et al.* 1992). A notre connaissance, très peu de travaux ont été consacrés à des contaminations uniques ou à des contaminations complexes mais contrôlées. De plus, la plupart des espèces étudiées ne sont ni des espèces dominantes ni des espèces clés, représentatives des écosystèmes benthiques de la Mer du Nord (voir e.g. Hostens & Hamerlynck 1994, Kröncke & Knust 1995 pour les taxons dominants dans les différents écosystèmes). Ceci signifie que le principal impact écologique des contaminants associés aux sédiments n'a quasi pas été étudié.

Dans les écosystèmes de la Mer du Nord, le groupe des échinodermes fournit plusieurs espèces qui sont dominantes qualitativement et/ou quantitativement dans le macrobenthos, au nombre desquelles figurent l'astérie *Asterias rubens* et les

échinides *Echinocardium cordatum* et *Psammechinus miliaris* (Davoult *et al.* 1988, Hostens & Hamerlynck 1994). De même, les larves d'échinodermes dominent le mésozooplancton depuis les années 80 (Lindley *et al.* 1995). De plus, il a été montré que certaines espèces d'échinodermes sont des bioindicateurs valables de contamination par les métaux lourds (Cd, Hg, Pb) (Bjerregaard 1988, Sørensen & Bjerregaard 1991, Temara *et al.* 1996a, 1998a,b, Warnau *et al.* 1997); les mêmes et d'autres espèces accumulent rapidement les PCBs en concentrations relativement élevées (den Besten *et al.* 1989, Bright *et al.* 1995). De plus, la haute sensibilité du développement des échinides envers les polluants (y compris les métaux lourds et les PCBs) fait de celui-ci le sujet de bioessais largement utilisés (Kobayashi 1984, Pagano *et al.* 1986, Environment Canada 1992, Warnau *et al.* 1996). En ce qui concerne la Mer du Nord, il a été montré pendant le Programme d'Impulsion en Sciences Marines (1992-1996), (1) que le bien-être d'*A. rubens* est effectivement détérioré lors de contaminations expérimentales ou *in situ* (Temara *et al.* 1997a,b), (2) qu'*A. rubens* joue un rôle dans le cycle global des métaux lourds dans certaines régions côtières (Temara *et al.* 1997c), et (3) que le tube digestif d'*A. rubens* est un indicateur à court terme (jour - semaine) et le squelette un intégrateur (mois - année) de contamination métallique (Temara *et al.* 1996, 1998b).

Il apparaît donc nécessaire d'étudier l'impact des contaminants (parmi lesquels les métaux lourds et les PCBs) associés aux sédiments sur les écosystèmes benthiques de la Mer du Nord (en particulier les écosystèmes d'intérêt pour la Belgique, qui sont parmi les plus contaminés de cette mer) en tenant compte des espèces qui modèlent les écosystèmes, comme les échinodermes. L'impact des métaux lourds et des PCBs devrait être étudié en conditions de contaminations uniques et complexes mais contrôlées de manière à définir les rôles respectifs de chacun des contaminants et les éventuelles interactions dans leurs toxicités. Les échinodermes offrent aussi l'opportunité d'être utilisés comme bioindicateurs de contamination par les métaux lourds à deux échelles temporelles.

Les objectifs de la recherche étaient dès lors (1) déterminer l'impact des métaux lourds et des PCBs associés aux sédiments, avec un intérêt particulier pour les solutions mixtes de ces deux types de composés, sur des espèces représentatives du macrobenthos de la Mer du Nord, à savoir l'astérie *Asterias rubens* et l'échinide *Psammechinus miliaris*, et (2) utiliser *A. rubens* pour déterminer les tendances géographiques de la contamination par les métaux lourds en Mer du Nord.

Pour ce faire, trois axes de travail ont été retenus: (1) les quatre métaux les plus préoccupants en Mer du Nord et les 7 congénères de PCBs conseillés par l'ICES ont été analysés dans les sédiments et les organes de l'étoile de mer *Asterias rubens*; (2) la toxicité des sédiments a été évaluée sur des embryons et larves de l'oursin

Psammechinus miliaris et de l'astérie *A.rubens* (essais embryotoxiques) et (3) les effets des contaminants sur le système immunitaire de l'astérie *A.rubens* ont été déterminés.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1. Echantillonnage

L'échantillonnage a été réalisé entre 1998 et 2000 sur les plateaux continentaux belges, néerlandais et allemand entre Nieuwpoort et l'embouchure de l'Elbe (soit un total de 35 stations) (Figs 1-3). Une station située dans un bras de mer fermé (Scharendijke, Grevelingenmeer, Pays-Bas) a également été considérée. L'échantillonnage a été effectué pour partie par chalutage (chalut à perche de 3m, maille de 6mm) et carottage (carottier Reineck) à partir du navire océanographique "Belgica" (campagnes 9803a, 9905, 9910 et 0012) et pour partie en pêche à pied ou en plongée sous-marine. Les positions de stations étudiées sont présentées au

Tableau I.

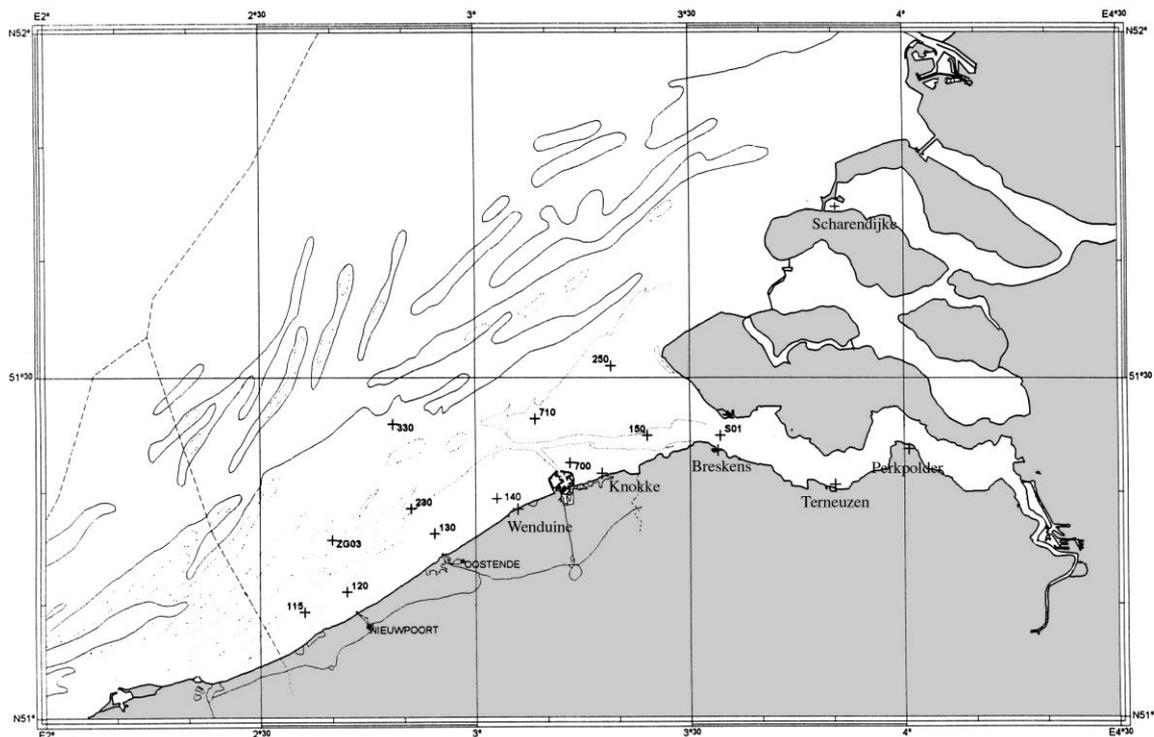


Fig. 1. Stations du plateau continental belge échantillonnées en 1998.

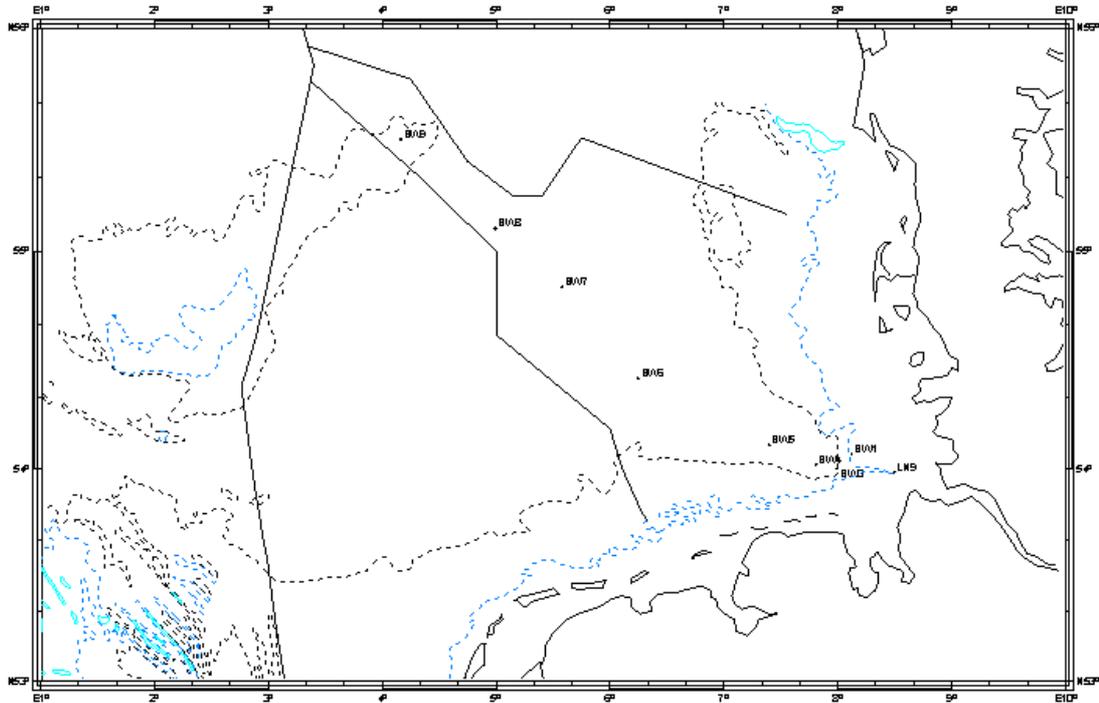


Fig. 3. Stations du plateau continental allemand échantillonnées en 2000.

Dans chaque station, 6 échantillons d'environ 500 g de sédiments (5 premiers centimètres) ont été prélevés et immédiatement congelés (-20°C). Les astéries ont été récoltées dans les mêmes stations (elles ne sont toutefois pas présentes dans toutes les stations). Pour les analyses de métaux et PCBs, des astéries appartenant à la même classe de taille (50 à 70mm de rayon mesuré du centre de la bouche à l'extrémité du bras) ont été prélevées et disséquées immédiatement; 5 compartiments corporels ont été séparés (tégument oral, tégument aboral, système digestif central, cæcums pyloriques et gonades) et immédiatement congelés (-20°C). Pour les analyses immunotoxicologiques, les astéries sont maintenues en aquarium pendant 1 à 3h après récolte puis le liquide cœlomique est prélevé et les analyses réalisées immédiatement.

Par ailleurs, une campagne a été menée au Sør fjord (Norvège), un "hot spot" de contamination par les métaux. Les nombreuses chutes d'eau se jetant dans le Sør fjord ont incité les industriels du début du siècle à y implanter des centrales hydroélectriques couplées à des usines de transformation de minerais métalliques. Les déchets de ces usines ont été déversés depuis plusieurs décennies dans la partie amont du fjord, établissant ainsi un gradient de contamination allant du fond du fjord vers son embouchure. Cet endroit constitue donc un site de choix pour l'étude de l'impact d'une contamination métallique et nous a permis de réaliser des expériences de contamination et de décontamination *in situ*. L'échantillonnage a été effectué dans quatre stations (S1 à S4, Fig.4) réparties le long d'un gradient de

Tableau I. Positions des stations échantillonnées

Station	Latitude N	Longitude E
Nieuwpoort	51°08.80	02°42.80
Oostende	51°13.80	02°54.40
Wenduine	51°17.80	03°04.40
Knokke	51°20.80	03°17.80
Breskens	51°24.40	03°30.00
Terneuzen	51°20.70	03°48.30
Perkpolder	51°24.80	02°02.60
Scharendijke	51°44.50	03°50.70
SO1	51° 25.00	03°34.20
120	51° 11.10	02°42.07
130	51° 16.25	02°54.30
140	51° 20.00	03°24.00
150	51° 25.00	03°25.00
230	51° 18.50	02°51.00
250	51° 31.00	03°19.00
330	51° 26.00	02°48.50
700	51° 22.60	03°13.20
710	51° 26.45	03°08.32
ZG3	51° 15.70	02°40.00
LN1	51°50.00	03°30.00
LN2	52°10.00	03°55.00
LN3	52°35.00	04°10.00
LN4	53°00.00	04°25.00
LN5	53°25.00	04°48.00
LN6	53°38.00	05°37.00
LN7	53°48.00	06°35.00
LN8	53°55.00	07°25.00
LN9	53°58.50'	08°30.00'
BW1	54°04.00	08°07.50
BW3	54°00.00	08°00.00
BW5	54°06.50	07°24.00
BW6	54°25.00	06°15.00
BW7	54°50.00'	05°35.00'
BW8	55°06.00	05°00.00
BW9	55°30.00	04°10.00

contamination par les métaux lourds (S1, à la tête du fjord, étant la station la plus contaminée; S4, à l'embouchure du fjord représente la station la moins contaminée). Les échantillons récoltés sont d'une part des sédiments et d'autre part des étoiles de mer *Asterias rubens* (2 variétés, rouge et noire). Tous les échantillons ont été récoltés en plongée autonome. Des astéries ont également fait l'objet de transferts

entre zone contaminée (S1) et zone contrôlée (S4). Ces transferts ont eu pour but d'étudier en conditions naturelles les phénomènes de contamination (astéries de S4 placées en S1) et de décontamination (astéries de S1 placées en S4). Pour ces expériences les astéries sont maintenues dans des cages. Le phénomène de contamination a été suivi sur une période de 24 jours; le phénomène de décontamination a été suivi sur une période de 17 jours. Pour chaque point d'échantillonnage de ces expériences des tests immunotoxicologiques ont été effectués et des organes ont été prélevés afin de pouvoir réaliser les analyses mentionnées ci-dessous.

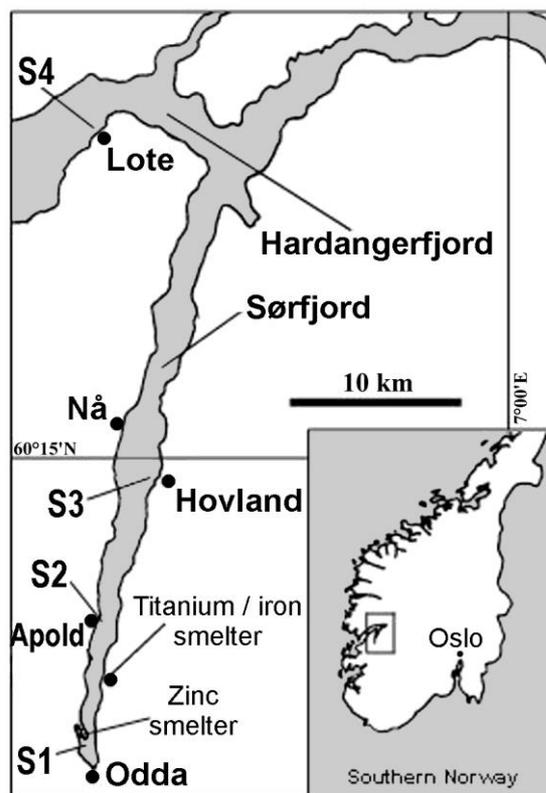


Fig. 4. Le Sør fjord et sa localisation dans le sud de la Norvège; S1-S4: sites d'échantillonnage

2.2. Analyses

2.2.1 Métaux.

Les échantillons séchés ont été minéralisés par l'acide nitrique à température croissante ou à haute pression dans un four à micro-ondes. Les minéralisats sont ensuite filtrés et analysés par spectrométrie d'émission atomique (ICP-AES), d'absorption atomique électrothermique en four graphite (GF-AAS) ou d'absorption atomique à flamme (F-AAS). Les calibrations ont été réalisées par ajout dosé à un standard certifié de tissu de moule (BCR n°278R). Le standard certifié est dosé tous les dix échantillons. Si la mesure s'écarte de plus de 10% de la valeur certifiée, la série d'analyses est éliminée. Les méthodes complètes sont décrites dans Warnau et al. (1995) et Coteur et al. (2003a).

2.2.2. PCBs.

Sept polychlorobiphényles, dont l'étude est recommandée par l'ICES (International Council for Exploration of the Sea) (congénères IUPAC #28, #52, #101, #118, #138, #153 et #180), ont été analysés dans les sédiments et divers compartiments corporels de l'étoile de mer *Asterias rubens*. L'extraction des échantillons a été réalisée à l'aide d'un mélange de trois solvants : dichlorométhane, méthanol et eau selon la méthode de Booij *et al* (1994); cette technique est reconnue pour extraire de manière efficace les PCBs ainsi que les lipides totaux. La purification des extraits a été réalisée sur une colonne comprenant du sulfate de sodium, de l'oxyde d'alumine basique et de la silice acide (cette technique de purification est recommandée par l'organisme Beltest depuis la crise de la dioxine). Pour les sédiments, une étape de purification supplémentaire au mercure afin d'éliminer le soufre présent fut nécessaire (Goerlitz et Law 1971). Les extraits purifiés sont alors analysés par chromatographie gazeuse et spectrométrie de masse (GCQ de chez Finnigan équipé d'un échantillonneur automatique AS9000 et d'une colonne capillaire CP-Sil8; 50 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Les spectres de masse sont enregistrés en mode ionisation électronique en utilisant la technique de 'multiple reaction monitoring'. La précision de la technique d'analyse a été testée en utilisant des référents certifiés provenant du BCR (Bureau Communautaire des Références) (Tableaux II, III). La limite de détection est comprise entre 0.01 et 0.1 ng g⁻¹ de poids sec, selon le congénère.

Tableau II : Analyse d'un standard certifié de sédiment du port de Nova scotia (HS1) en ng/g poids sec (n = nombre de réplicats)

IUPAC #	Données certifiées (ng/g)	Analyses (ng/g) (n=5)
101	1.62 ± 0.21	2.34 ± 0.49
138	1.98 ± 0.28	1.90 ± 0.40
153	2.27 ± 0.28	2.19 ± 0.45
180	1.17 ± 0.15	0.76 ± 0.45

Tableau III : Analyse d'un standard certifié d'huile de maquereau (CRM n°350) en ng/g lipides

IUPAC #	Données certifiées (ng/g)	Analyse (ng/g) (n=5)
28	22.5 ± 4.0	24.9 ± 5.5
52	62 ± 9	64.6 ± 0.9
101	164 ± 9	196.7 ± 5.7
118	142 ± 20	118.8 ± 2.6
138 + 163	274 ± 27	274.1 ± 8.3
153	317 ± 20	311.2 ± 9.4
180	73 ± 13	68.1 ± 1.8

2.3. Essais embryotoxiques

Les bioessais d'embryotoxicité ont été développés pour deux espèces d'échinodermes: l'astérie *Asterias rubens* et l'échinide *Psammechinus miliaris*.

Les spécimens d'*A. rubens* et de *P. miliaris* proviennent des régions d'Ambleteuse (Département du Nord, France) et de Luc-sur-Mer (Normandie, France), respectivement. Les animaux ont été récoltés en pêche à pied à marée basse et ramenés au laboratoire de biologie marine de l'Université de Mons-Hainaut. Ils y ont été maintenus en aquarium et nourris *ad libitum*, les astéries avec des moules communes (*Mytilus edulis*) et les échinides avec des grains de maïs.

L'eau utilisée est de l'eau de mer naturelle prélevée dans la région de Wimereux (Département du Nord, France). Cette eau a été stockée à 14°C et décantée pendant au moins 48 heures. Avant usage, l'eau est passée sur un filtre Millipore de 0,22 µm de vide de maille (i.e., Eau de Mer Filtrée ou EMF).

L'émission des gamètes a été induite chez *A.rubens* en injectant 1 ml d'une solution de 1-méthyl adénine (1MA) 100 µM par 100g de poids corporel. La dose de 1MA a été répartie entre les différents bras pour stimuler semblablement les différentes gonades. Chaque astérie ainsi stimulée a ensuite été placée dans un aquarium rempli d'EMF. La ponte débutait plus d'une demi-heure après injection. Les gamètes ont été récoltés au moyen d'une pipette Pasteur au niveau des différents gonopores et transférés dans des piluliers de verre. Chez *P.miliaris*, l'émission des gamètes a été induite par l'injection d'une solution de KCl 0,5M à travers la membrane péristoméale à raison de 200µl par 10g de poids corporel. Les gamètes sont ensuite récoltés en plaçant l'échinide face aborale vers le bas sur un pilulier de verre de 50ml rempli d'EMF. La couleur du frai permet de reconnaître le sexe du géniteur: blanc pour les mâles et orangé pour les femelles. Les gamètes ont ensuite été stockés à 14°C avant de procéder aux fécondations.

Les œufs d'une même femelle ont été répartis dans une ou plusieurs boîtes de Pétri en plastique stériles préalablement remplies d'EMF (volume maximum incluant le frai: 50ml par boîte). Un premier contrôle visuel permet d'écarter les frais constitués majoritairement d'œufs de forme irrégulière (le plus souvent piriforme), faiblement colorés ou formant des amas. Les spermatozoïdes provenant de trois mâles sont mélangés dans un pilulier de verre de 50ml. Le niveau, dans le pilulier, est ajusté à 25ml au moyen d'EMF. Au cours d'une même série de tests, les œufs de plusieurs femelles sont fécondés en rajoutant 0,20ml du mélange de spermatozoïdes à chaque boîte de pétri. On facilite la répartition des spermatozoïdes en agitant doucement la boîte de pétri. Les œufs sont ensuite maintenus à 14°C. Une heure après la fécondation, l'apparition de la membrane de fécondation constitue le second test de qualité: elle traduit la réussite et la qualité de la fécondation. Le développement d'une membrane irrégulière indique une possible polyspermie. Trois heures après la fécondation, l'homogénéité des premiers clivages de l'œuf constitue le troisième test de qualité: ne sont utilisés pour les tests que les frais où plus de 80% des œufs en sont arrivés au stade 4 blastomères après 3 heures et se sont divisés de manière régulière.

Les sédiments à tester sont maintenus à -20°C depuis leur prélèvement jusqu'à leur préparation pour les tests. Les échantillons sont alors séchés à 80°C pendant 72h et pesés. Une partie de chacun de ces échantillons (100 à 200g poids sec) est ensuite fractionnée en passant à travers une colonne de tamis de vide de maille décroissant (>1000 µm, 500 à 1000 µm, 250 à 500 µm, 125 à 250 µm, 63 à 125 µm, et <63 µm)

à l'aide d'une tamiseuse. Le tamisage se fait de manière intermittente (les vibrations de la tamiseuse s'interrompent 1s toutes les 2s). Les éventuels agglomérats de sédiments, visiblement non représentatifs de leur fraction granulométrique, sont broyés délicatement avec un mortier en porcelaine. Dans la grande majorité des cas, les fractions supérieures à 1000 μ m étaient virtuellement absentes. Lorsqu'elles étaient présentes, elles étaient constituées de coquilles de mollusques. Ces éléments de plus de 1000 μ m sont éliminés manuellement des fractions totales (échantillons non fragmentés) avant que ces derniers ne soient soumises aux larves. Les différentes fractions ainsi séparées sont ensuite pesées et stockées dans des flacons de PET de tare connue.

Les tests sont réalisés dans des boîtes multipuits stériles Falcon. Chaque plaque comprend 6 puits d'une capacité de 14 ml chacun et à chaque test correspond une plaque; il y a donc 6 répliquats par test. Dans chaque puits, ca. 250 embryons sont exposés, soit à 10ml d'une solution de contaminant, soit à 0,1g de sédiment dans 10ml d'EMF (i.e., concentration finale en sédiment: 1%). Des contrôles (C) sont entrepris en parallèle aux expositions expérimentales. Ils consistent en des développements réalisés dans de l'EMF seule (C-EMF) et, dans certains cas, en des développements réalisés en présence de sédiment "propre" (i.e., pauvre en contaminants) prélevés dans la région de Wimereux dans de l'EMF (C-SED). Ces sédiments sont toujours soumis aux embryons après avoir été séchés à l'étuve (70°C pendant 72h minimum) et à la même concentration que les sédiments des séries expérimentales. Le C-SED permet de préciser si un sédiment peut par sa seule présence avoir une influence sur le développement des embryons. Après 72h, les pourcentages des différentes classes larvaires obtenues sont dénombrés sur un échantillon de 100 individus par puits. La Figure 5 résume les caractéristiques des quatre classes larvaires observées au cours de nos tests. La classe "Mort" repris uniquement dans ce tableau correspond à un arrêt total du développement le plus souvent constaté soit juste après l'exposition au contaminant, soit peu après le stade 4 blastomères. Les données exprimées en pourcentage sont simplifiées en regroupant les classes larvaires pour ne considérer que deux catégories:

- Larves "Viabiles" = Larves Normales + Larves Retardés
- Larves "Non-Viabiles" = Larves Anormales + Blastulas

Les différences entre séries expérimentales et séries contrôles correspondantes sont vérifiées au moyen du test de Dunnett. Les différences entre les séries expérimentales sont mesurées à l'aide d'une ANOVA à un facteur. S'il y a une différence, l'ANOVA est suivie d'un test de comparaison multiple des moyennes de Tukey. Les résultats exprimées en pourcentage ont préalablement subi la transformation arcsinus (Zar 1996). Dans certain cas, les proportions des différentes classes larvaires sont comparées entre deux traitements au moyen du test G. Pour

tout ces tests, le seuil de signification est toujours fixé à $\alpha = 0,05$. Les tests sont réalisées au moyen du logiciel Systat 8.01.

2.4. Essais immunotoxicologiques

2.4.1. Phagocytose *in vivo*

L'activité phagocytaire a été mesurée tel que décrit par Coteur et al. (2002a). Une suspension de bactéries (*Micrococcus luteus*, Sigma) couplées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC, Sigma) a été préparée et diluée afin d'obtenir une concentration de 10^9 bactéries ml^{-1} dans de l'eau de mer artificielle (EMA, Sigma). Un volume de 0,5ml de cette suspension est injecté dans chaque astérie (0,1ml dans chaque bras). Après une incubation de 12h, les amœbocytes sont récoltés en coupant l'extrémité d'un bras et en drainant 2,5ml de liquide coelomique dans 17,5ml de formaldéhyde (4% dans de l'EMA). Deux aliquotes de 4ml de ces amœbocytes fixés sont utilisés;

Fig. 5. Définition des classes larvaires de *Psammechinus miliaris* et d'*Asterias rubens* observées au cours des tests d'embryotoxicité.

Type larvaire (Abréviation)	Description	
<p>Normal (N)</p>	<p>Larve pyramidale présentant un archentéron différencié, une paire de baguettes squelettiques trifides, une paire de coelomes distinct et un réseau diffus de cellules mésenchymateuses dans tout le blastocoele</p>  <p><i>Psammechinus miliaris</i></p>	<p>Larve piriforme présentant un archentéron différencié, une paire de coelomes distincts et un réseau dense de cellules mésenchymateuses dans la partie la plus antérieure de son blastocoele</p>  <p><i>Asterias rubens</i></p>
<p>Retardé (R)</p>	<p>Larve qui présente une morphologie normale, mais dont l'organogenèse est inachevée</p>  <p><i>Psammechinus miliaris</i></p>	 <p><i>Asterias rubens</i></p>
<p>Anormal (A)</p>	<p>Larve présentant des altérations morphologiques externes ou internes</p>  <p><i>Psammechinus miliaris</i></p>  <p><i>Asterias rubens</i></p>	
<p>Blastula (B)</p>	<p>Larve bloquée au stade blastula et dont la cavité est remplie de cellules mésenchymateuses</p>  <p><i>Asterias rubens</i></p>	

le premier aliquote est centrifugé à 2700g pendant 15min à 4°C et le surnageant est remplacé par de l'EMA. Cet aliquote est utilisé pour la détermination de la concentration totale en bactéries dans le liquide cœlomique (voir ci-dessous). Le deuxième aliquote est rincé (par centrifugation à 400g, 10min, 4°C) avec du PBS (0,1M, pH 7,4) et ensuite incubé dans une solution de lysozyme (5mg ml⁻¹ dans du PBS) pendant 1h à 37°C (afin d'éliminer les bactéries non-phagocytées). Enfin, cet aliquote est rincé deux fois et resuspendu dans de l'EMA. Cet aliquote est utilisé pour la détermination de la concentration en bactéries phagocytées et en amœbocytes dans l'échantillon.

La concentration en bactéries totales ou phagocytées est déterminée en mesurant la fluorescence du FITC (longueur d'onde d'excitation: 485nm, longueur d'onde d'émission: 535nm, cette mesure est proportionnelle à la concentration en bactéries). La concentration en amœbocytes est déterminée en mesurant l'absorbance à une longueur d'onde de 280nm (cette mesure est proportionnelle à la concentration cellulaire). L'activité phagocytaire est exprimée en pourcentage de bactéries phagocytées (% d'unités de fluorescence) divisé par la concentration en amœbocytes (unités d'absorbance).

2.4.2. Production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO) et concentration en amœbocytes circulants (CAC).

La production d'IRO par les amœbocytes a été mesurée tel que décrit par Coteur et al. (2002b). Brièvement, 3ml de liquide cœlomique sont prélevés dans un volume équivalent de tampon anticoagulant. La concentration en amœbocytes est déterminée en mesurant l'absorbance de l'échantillon à 280nm ou par comptage des amœbocytes sur un haemocytomètre de Thoma. Cette mesure permet de calculer la concentration en amœbocytes circulants (CAC) dans le liquide cœlomique. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée et resuspendue dans de l'EMA sans calcium, ni magnésium (EMASCM) afin d'obtenir une concentration cellulaire de 10⁶ cellules ml⁻¹. Une solution stock de luminol – peroxydase de raifort (HRP) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) est fraîchement diluée 100 fois dans de l'EMA (les concentrations finales en luminol et HRP sont 2,5x10⁻¹ mg ml⁻¹ et 5x10⁻¹ mg ml⁻¹, respectivement).

Deux méthodes de mesure ont été utilisées. Pour la première, la réaction est initiée en ajoutant 400µl de la suspension d'amœbocytes dans des tubes contenant 500µl de la solution de luminol/HRP et 100µl d'une suspension de bactéries (*M. luteus*, 2,5x10⁹ bactéries ml⁻¹, pour la production d'IRO stimulée) ou 100µl d'EMA (pour la production d'IRO non-stimulée). Les tubes sont incubés à 13°C et la chémiluminescence est mesurée (temps d'intégration: 10sec) toutes les 10min sur

une période de 2h à l'aide d'un luminomètre Lumat LB 9507 (Berthold) équipé d'un filtre d'atténuation d'un facteur 100. Le même protocole est utilisé pour la seconde méthode en l'adaptant toutefois au format de microplaques à 96 puits (Coteur et al. 2002b). La réaction est initiée en ajoutant 80µl de la suspension d'amoebocytes dans des puits d'une microplaque opaque blanche (Lumitrac, Greiner) contenant 100µl de la solution de luminol/HRP et 20µl de la suspension de bactéries ou 20µl d'EMA. La microplaque est placée à 13°C et la chémiluminescence est mesurée (temps d'intégration: 0,5sec, gain du photomultiplicateur: 80) toutes les 10min sur une période de 2h à l'aide d'un luminomètre SpectrafluorPlus (Tecan). Les résultats sont exprimés comme la somme de toutes les mesures effectuées à intervalles de 10min pour 10^6 cellules ml^{-1} , et cela pour les amoebocytes stimulés ou non-stimulés. De plus, un index de stimulation, définit comme étant la chémiluminescence stimulée divisée par la chémiluminescence non-stimulée (en pourcentages) est également calculé.

3. RESULTATS ET DISCUSSION.

3.1. Validations.

Dans un premier temps, les modèles utilisés ont été validés. Il s'agissait de valider (1) *Asterias rubens* en tant que bioindicateur de contamination par les métaux et les PCBs, (2) les larves d'échinodermes de Mer du Nord en tant qu'embryoessais de toxicité et (3) la sensibilité du système immunitaire d'*Asterias rubens* aux métaux et PCBs.

3.1.1. *Asterias rubens* en tant que bioindicateur de contamination.

A. rubens avait été validée en tant que bioindicateur de contamination par les métaux lors de travaux précédents, s'inscrivant dans le "Programme d'Impulsion en Sciences marines" financé par les SSTC (Temara et al. 1996a,b, 1997, 1998a,b). La valeur bioindicatrice d'*A. rubens* vis-à-vis des PCBs a été déterminée lors de contaminations expérimentales en aquarium réalisées en collaboration avec le Marine Environment Laboratory (International Atomic Energy Agency, Monaco, Dr.M. Warnau, Prof. S.W. Fowler). Pour ce faire, deux types de contaminations expérimentales ont été réalisées: (i) des expositions simples par l'eau ou les sédiments utilisant le congénère #153 marqué au carbone-14 et (ii) une exposition mixte par les sédiments utilisant 10 congénères "froids". Les expositions aux PCB ont été suivies (congénères froids) ou non (congénère radioactif) d'une période de décontamination.

3.1.1.1. Expositions simples

Deux lots d'astéries ont été exposés pendant 34 jours au PCB #153-¹⁴C soit via l'eau de mer, soit via les sédiments. L'eau et les sédiments avaient été préalablement contaminés par le radiotracer selon les méthodes décrites par Murdoch *et al.* (1997) et Schweitzer *et al.* (2000). La stabilité des concentrations contaminantes (18 ng.l⁻¹ pour l'eau et 50 ng.g⁻¹ PS pour les sédiments) a été contrôlée régulièrement. L'accumulation du congénère #153 a été suivie en prélevant des individus à 8 temps différents. Huit compartiments corporels ont été considérés pour le comptage β (Danis *et al.* 2003). Les résultats ont été exprimés en ng.g⁻¹ de lipides pour chaque organe et sont présentés à la Figure 6. Ils montrent que les cinétiques observées tendent à commencer par une période de latence puis à atteindre une phase plateau après une augmentation exponentielle. Dans la grande majorité des cas, l'accumulation est décrite au mieux par un modèle développé par Dr. Philippe GROSJEAN:

$$C_t = \frac{C_{ss} * (1 - \exp(-k * t))}{(1 - \exp(-k * (t - l)))}$$

Ce modèle est la combinaison d'une équation logistique et d'une équation exponentielle à saturation.

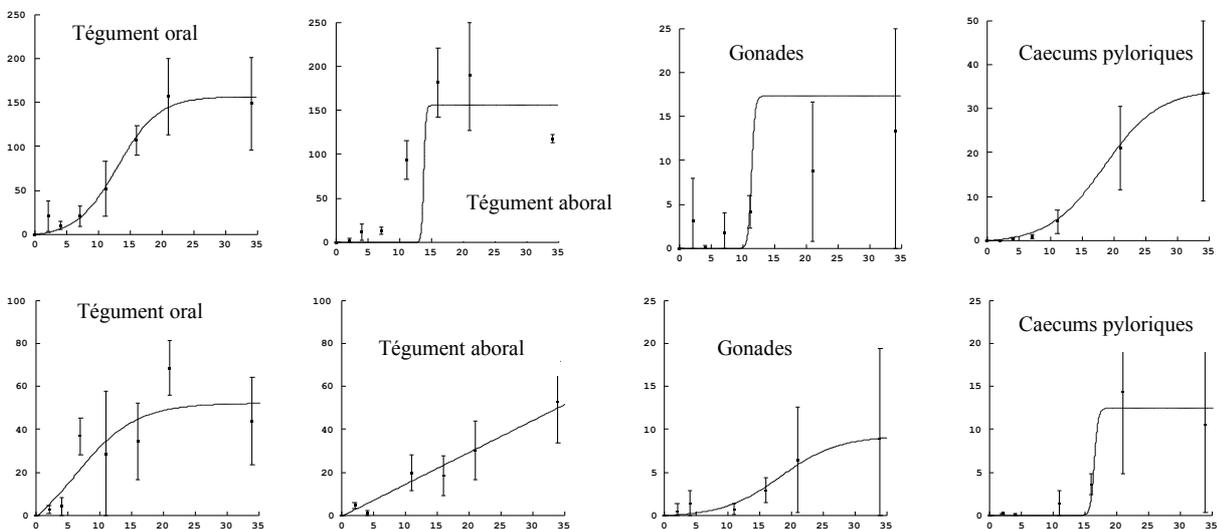


Fig 6. Cinétiques d'accumulation du PCB #153 (concentration moyenne \pm écart-type, ng.g⁻¹ lipides totaux) dans les différents compartiments corporels d' *Asterias rubens*, via l'eau de mer (en haut) et les sédiments (en bas).

L'équilibre est atteint plus rapidement lorsque l'astérie est exposée via l'eau de mer. Les téguments sont les compartiments qui accumulent le plus intensément le congénère #153. Enfin, l'accumulation du congénère #153 par *A. rubens* est plus efficace lorsque cette dernière est exposée via l'eau de mer, cette efficacité est supérieure de 3 à 4 ordres de grandeur. Aussi, les concentrations atteintes à

l'équilibre sont en adéquation avec les concentrations mesurées dans l'environnement (y compris dans d'autres études), ce qui est un argument en faveur de l'utilisation de l'astérie en tant que bioindicateur.

Au vu de l'ensemble des résultats obtenus, il apparaît que l'utilisation de radiotraceurs est un outil très prometteur pour l'étude de la bioaccumulation des PCB. Son extrême sensibilité fait que l'on peut s'intéresser à des organes-clés de petite taille qui représentent trop peu de matériel pour les méthodes d'analyses classiques.

3.1.1.2. Exposition mixte

Afin de déterminer si des différences existent entre les cinétiques d'accumulation et d'élimination de différents congénères de PCB, une exposition mixte a été réalisée. Pour ce faire, des astéries ont été placées durant 35 jours en présence de sédiments préalablement contaminés par 10 congénères "froids". La stabilité des concentrations contaminantes a été évaluée en prélevant régulièrement des échantillons de sédiments. Les cinétiques d'accumulation ont été suivies en prélevant des individus au long des 35 jours d'exposition, les astéries restantes ayant été replacées ensuite en conditions non contaminantes. Les cinétiques d'élimination des PCB ont été suivies pendant 57 jours. Les téguments et les caecums pyloriques ont été considérés. Les concentrations en chacun des 10 congénères sélectionnés ont été déterminées en CGHR-ECD. Ces concentrations ont ensuite été normalisées par le contenu lipidique des compartiments considérés. Ces dosages ont été réalisés par Mme Chantal CATTINI et le Dr. Jean-Pierre VILLENEUVE (Marine Environment Laboratory, International Atomic Energy Agency).

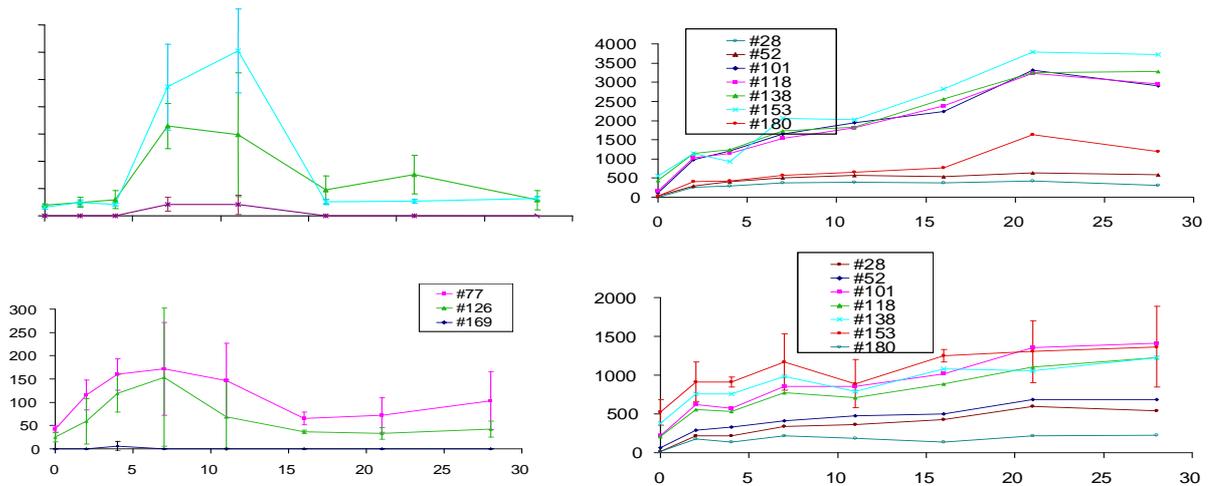


Fig. 7. Cinétiques d'accumulation des différents congénères de PCB (ng.g^{-1} lipides totaux) dans les téguments (haut) et les caecums pyloriques (bas) d'*Asterias rubens* lors de l'exposition mixte via les sédiments.

Lorsque l'on considère la somme des 10 PCBs testés, les résultats montrent que, dans les deux compartiments corporels étudiés, les accumulations suivent une cinétique à saturation et que les téguments concentrent les PCB le plus intensément, ce qui est en accord avec les observations faites au cours de l'exposition simple. En considérant les congénères séparément, on obtient les résultats présentés à la Figure 7. Comme pour la somme des congénères, les PCB non coplanaires suivent une cinétique à saturation avec des différences inter-congénères au niveau de leur concentration à saturation. Par ailleurs, il existe une corrélation significative entre ces concentrations et celle mesurée dans les sédiments ce qui indique encore une fois que l'astérie est un bon bioindicateur de contamination par les PCB. Contrairement aux PCB non coplanaires, les congénères coplanaires ne s'accumulent pas selon une cinétique à saturation: ils présentent un pic entre les 7^{ème} et 11^{ème} jour d'exposition, puis leur concentration chute brutalement. Cette chute pourrait être due à un mécanisme de détoxication des PCB, détoxication qui serait spécifique à certains congénères (les plus toxiques).

3.1.2. Les larves d'échinodermes de Mer du Nord en tant qu'embryoessais de toxicité

Les séries expérimentales préliminaires avaient comme objectifs la mesure de la sensibilité des embryons des espèces étudiées et la validation du modèle expérimental choisi. La sensibilité des espèces sélectionnées a été étudiée en exposant des embryons à des solutions de sel de métal de concentrations connues. Le modèle expérimental a ensuite été validé en exposant des embryons à des sédiments prélevés le long de gradients de contamination reconnus, à savoir des

sédiments prélevés à différentes stations réparties dans le Sør fjord (Norvège) et le long d'un transect parcourant le panache de l'Elbe (plateau continental allemand).

3.1.2.1. Sensibilité des embryons: influence des solutions métalliques.

Des embryons ont été exposés à des solutions de cadmium (Cd), de cuivre (Cu), de plomb (Pb) ou de zinc (Zn) dans de l'EMF et, ce, à des gradients de concentration: de 10^{-9} à 10^{-4} M pour *A. rubens* et de 10^{-7} à 10^{-4} M pour *P. miliaris*. Les proportions relatives des différentes classes larvaires obtenues dans nos séries expérimentales sont résumées dans le Tableau IV. Ces tests ont été réalisés en juin 1998 pour *A. rubens* et en mai 1999 pour *P. miliaris*.

Les quatre métaux considérés exercent tous un effet dose-dépendant sur les deux types de développement larvaire étudiés. Chez les deux espèces étudiées, des taux de mortalité larvaire de 100% ont été obtenus pour chaque métal en réponse à des concentrations situées au dessus des mêmes concentrations-seuils: plus de 10^{-5} M pour le Cd, le Pb et le Zn et plus de 10^{-6} M pour le Cu. Par comparaison avec les données disponibles dans la littérature, ce bioessai présente une sensibilité comparable à celle des tests utilisant le développement larvaire d'échinides réguliers (Pagano *et al.* 1986, Kobayashi 1995, Warnau *et al.* 1996). Comme démontré dans ces mêmes études, le cuivre est le métal le plus toxique, les trois autres métaux montrant des toxicités similaires. Aux concentrations immédiatement inférieures à ces concentrations-seuils, les embryons se développent essentiellement de manière anormale. Chez *P. miliaris*, de telles concentrations induisent, en présence de Cd ou de Pb, une majorité de larves retardées. De manière générale, les taux des diverses classes larvaires obtenues deviennent significativement identiques au contrôle (C-EMF) à la plus basse des concentrations testées (i.e., 10^{-7} M pour *P. miliaris* et 10^{-9} M pour *A. rubens*). La seule exception à cette règle a encore été observée chez *P. miliaris*: les taux des différentes classes larvaires induits par la solution de Cu 10^{-7} M restent différent du C-EMF, même si les larves normales y sont dominantes.

Les métaux testés présentent donc une action embryotoxique réelle sur les premiers stades de développement des deux échinodermes considérés. La sensibilité brute des deux espèces est dans l'ensemble comparable. Cependant, l'induction, aux mêmes concentrations critiques, de l'apparition de classes larvaires différentes supporte l'idée que ces contaminants agissent à des niveaux physiologiques différents selon les espèces.

3.1.2.2. Embryotoxicité des sédiments du Sør fjord

Les sédiments soumis aux larves ont été prélevés dans le Sør fjord (Norvège) entre le 21 mai et le 19 juin 2000. Ces sédiments ont été récoltés dans les quatre stations réparties le long du fjord (Fig.4). La toxicité de ces sédiments a été évaluée en exposant des embryons de *P. miliaris* à une concentration de 1 % de sédiment entier (seulement débarrassé manuellement des fragments de plus de 1000µm; Fraction totale) et de leur fraction granulométrique 125 à 63 µm (Fraction 125-63 µm). La Figure 8 résume la position des stations échantillonnées et les résultats des bioessais.

De manière générale, les taux de larves normales obtenus en réponse à ces sédiments se sont avérés être toujours significativement inférieurs aux taux obtenus avec les contrôles (C-EMF et C-SED). Pour la fraction totale, les taux de larves normales croissent en même temps que l'on s'éloigne de la source principale de pollution du Sør fjord. Pour la fraction 125-63µm, la même tendance générale apparaît, même si le pourcentage de larves normales induit par la station S2 est inférieur à celui induit par la station S1. Il n'est pas apparu de différence significative entre les taux de larves normales induits par les trois stations situées le plus en

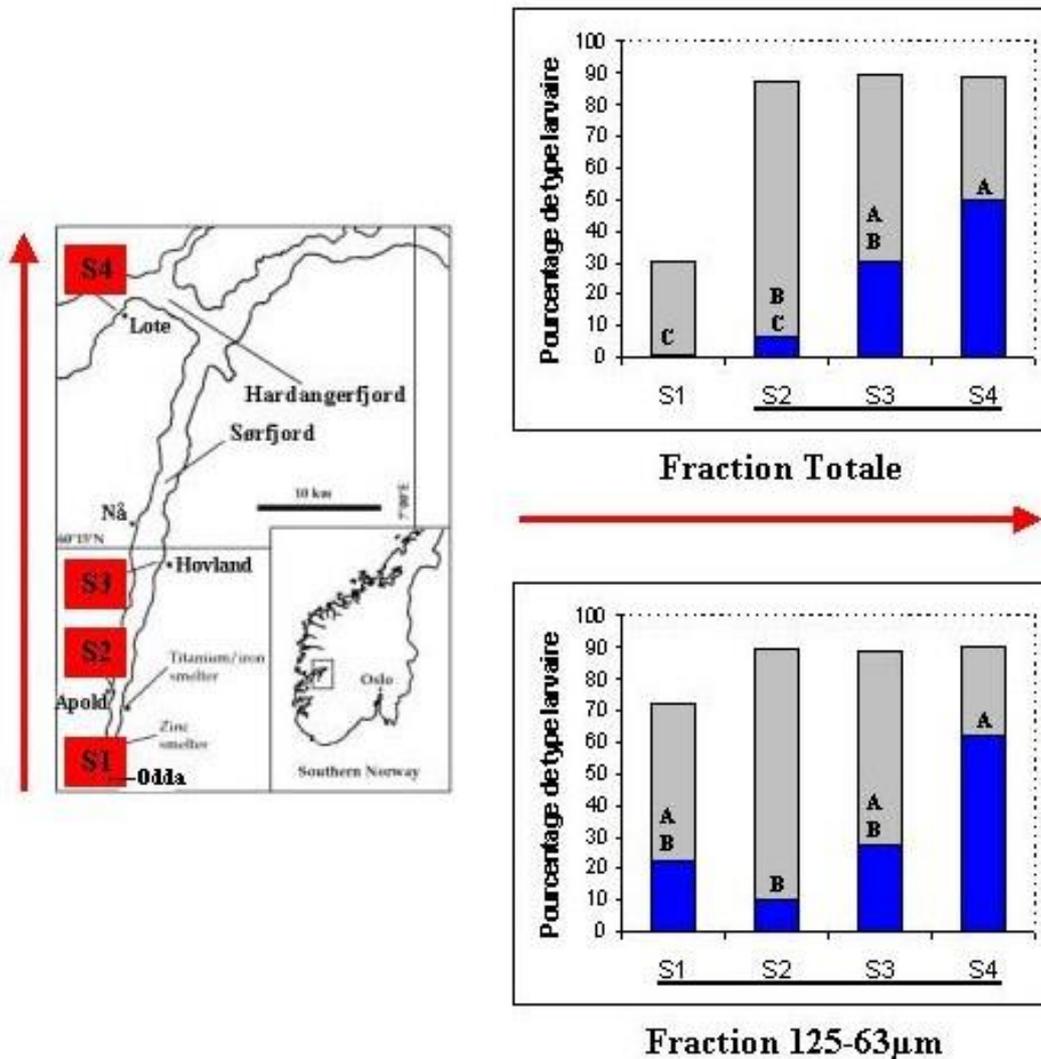


Fig. 8. Embryotoxicité des sédiments du Sør fjord chez *P. miliaris*. Les 4 stations échantillonnées le long du Sør fjord sont représentées sur la carte; la flèche rouge indiquant le sens décroissant du gradient de contamination. Les graphiques présentent les résultats des bioessais entrepris chez *P. miliaris* avec les sédiments entiers (Fraction totale) ou avec la fraction comprise entre 125 et 63 µm (Fraction 125-63µm). Les pourcentages de larves normales et retardées sont représentés en bleu et gris, respectivement. La somme des pourcentages de ces deux classes larvaires correspondant au pourcentage de larves viables. Les taux de larves normales partageant le même indice ne diffèrent pas significativement. Il n'est pas apparu de différence significative entre les taux de larves viables entre les stations jointes par la même ligne noire. Ces séries expérimentales ont été accompagnées d'un contrôle eau de mer (C-EMF) (81,73% de larves normales et 92,36% de larves viables) et d'un contrôle sédiment (C-SED) (87,44% de larves normales et 93,88% de larves viables).

amont dans le fjord (S1, S2 et S3) et entre les trois stations ayant induit les taux de larves normales les plus élevés (S1, S3 et S4). Les taux de larves viables sont moins contrastés. Pour les deux fractions considérées, les taux de larves viables n'ont été significativement différents des taux obtenus avec les deux contrôles que pour la station S1. Le taux de larves viables induit par cette station S1 est significativement différent des taux induits par les trois autres stations pour la fraction totale mais pas pour la fraction 125-63µm.

Les tests réalisés avec *P. miliaris* ont démontré le pouvoir discriminant de ce type de bioessais. Si le sédiment le plus pollué a induit un taux important de larves non-viables (i.e., larves anormales pour l'essentiel), la réponse aux autres sédiments a été caractérisée par des valeurs supérieures des taux de larves retardées, les taux de larves viables restant du même ordre. Cette réponse est similaire à celle que nous avons pu observer pour cet échinide en réponse à des concentrations sub-létales en métaux lourds (voir rubrique 3.1.2.1). Bien que les résultats obtenus en réponse à la fraction fine soient légèrement plus contrastés, nous avons décidé de ne plus nous intéresser qu'à la fraction totale du sédiment dont l'intérêt écologique est plus évident.

3.1.2.3. Embryotoxicité des sédiments du panache de l'Elbe.

Les sédiments soumis aux larves ont été prélevés dans neuf stations réparties le long d'un transect parcourant le panache de l'Elbe depuis son embouchure jusqu'à la haute mer (Fig.3). Cette récolte a été réalisée en mai 2000. Nous avons cherché à préciser l'influence (1) de la concentration en sédiment soumise aux embryons et (2) de l'état de préparation du sédiments (frais *versus* sec). Concernant ce dernier point, il était possible que la préparation du sédiment telle qu'elle est utilisée en routine puisse altérer leur toxicité relative en détruisant une catégorie de contaminant. Cette préparation implique en effet la congélation des sédiments suivie de leur séchage à 70°C (sédiment sec). Comme il était impossible de tester le sédiment immédiatement après prélèvement, nous avons décidé d'en conserver un échantillon au réfrigérateur sans le congeler, ni le sécher (sédiment frais). Des sédiments de l'Elbe (fraction totale) de même origine ont été soumis aux larves après avoir subi ces deux modes de préparation.

Les sédiments expérimentaux ont été pour partie conservés de 4 à 10 jours dans un réfrigérateur à 4°C (sédiment frais), pour partie et à l'issue d'une même période de conservation à -20°C séchés à l'étuve (70°C pendant 48h, sédiment sec). Les sédiments ont été présentés aux embryons à trois concentrations différentes: 0,3, 1% et 3% en volume. Ces concentrations étaient obtenues en introduisant, dans 10ml d'EMF, 0,03g, 0,1g et 0,3g de sédiment (poids sec), respectivement. Ces tests ont été accompagnés des deux types de contrôles: des développements réalisés dans de l'EMF seule (C-EMF) et des développements réalisés en présence de sédiments secs provenant de la région de Wimereux, France (ce sédiment a été soumis aux embryons aux trois concentrations expérimentales précisées plus haut; C-SED). Les résultats complets de ces bioessais réalisés en avril 2001 sont présentés dans le Tableau Va,b pour les sédiments secs et frais, respectivement.

Il n'est pas apparu de différence significative entre les taux de larves normales et les taux de larves viables induits, d'une part, par le C-EMF et, d'autre part, par les C-SED aux trois différentes concentrations considérées.

Il n'est généralement pas apparu de différence significative entre les résultats enregistrés en réponse à des sédiments soumis aux larves à l'état sec ou frais. Les seules différences significatives notables ont été observées pour les larves, tant normales que viables, en réponse aux sédiments de deux stations situées en tête du panache de l'Elbe, mais pas aux mêmes concentrations. Cette différence se manifeste pour les sédiments de la station BW1 testés à 0,3% et pour ceux de la station BW3 à 3%. Signalons encore que les sédiments de la station BW7, située en queue de panache, ont également induit des taux de larves normales significativement différents selon qu'ils étaient soumis secs ou frais, mais uniquement à la concentration de 3%.

En général, il n'est pas non plus apparus de différence significative entre les taux de larves normales ou viables induits aux trois différentes concentrations testées. Seule exception notable, les sédiments secs de la station BW3 qui induisent à la concentration de 3% un taux de larves normales différents de ceux induits aux deux autres concentrations.

Donc, si l'on ne considère que les taux de larves normales et viables induits par les sédiments secs soumis aux larves à la concentration de 1%, comme fait classiquement, nous constatons que ces taux sont, dans l'ensemble, significativement inférieurs aux contrôles. Parmi les quelques cas pour lesquels il n'est pas apparu de différence significative, signalons celui des sédiments des stations LN9 (située en tête du transect) et BW7 (située en queue du transect) pour lesquels les taux de larves normales et viables se sont avérés identiques à ceux induits par le témoin C-EMF.

Si l'on compare entre eux les taux de larves normales et viables induits par les sédiments secs des différentes stations soumis à la concentration de 1%, on constate que les taux les plus élevés sont induits en réponse aux sédiments des stations LN9 (située en tête du transect) et BW7 (située en queue du transect) tandis que les taux les plus bas sont enregistrés en réponse au sédiment de la station LN5 (située au milieu du transect). Ces taux ne permettent pas de discriminer ces stations.

Malgré le peu de contraste apparu entre les résultats de ces tests, il est indéniable que, dans les limites des concentrations testées, les résultats sont globalement identiques. Nous avons donc décidé de conserver la concentration de 1% pour les tests ultérieurs, car c'est à la fois la concentration la plus simple à manipuler et celle

couramment admise pour les bioessais (Kobayashi 1995). Comme il n'est pas non plus apparu de différence sensible entre les taux des différentes classes larvaires induits en présence de sédiments frais ou secs, nous avons décidé de conserver ce dernier mode de préparation de nos échantillons qui est le plus simple en pratique et le moins aléatoire à grande échelle. Enfin, pour des raisons de facilité, seul le contrôle eau (C-EMF) sera réalisé en routine.

3.1.3. Sensibilité du système immunitaire d'*Asterias rubens* aux métaux et PCBs.

3.1.3.1. Le système immunitaire d'*Asterias rubens*.

Diversité morpho-fonctionnelle des amoebocytes.

Bien qu'*A. rubens* ne possède que des amoebocytes dans son liquide coelomique, il est apparu que ce type cellulaire ne forme pas un ensemble homogène (Coteur et al. 2002a). Trois groupes d'amoebocytes ont été distingués sur base de leurs paramètres cytométriques et de leur activité phagocytaire lors de l'injection de bactéries dans l'astérie. Les amoebocytes G1 sont de petite taille et relativement peu actifs alors que les amoebocytes des groupes G2 et G3 participent à des réponses à court terme (1h) mais également à long terme (24h) par leur activité phagocytaire intense. Les amoebocytes les plus grands, G3, sont les plus actifs et deviennent majoritaire dans le coelome lors de l'injection des bactéries. La diversité morpho-fonctionnelle des amoebocytes d'*A. rubens* pourrait lui conférer une régulation plus fine de la réponse vis-à-vis d'un stimulus, ce qui peut expliquer en partie sa faible sensibilité à des pathogènes naturels.

Caractérisation de la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO) par les amoebocytes.

Outre leur activité phagocytaire, les amoebocytes sont capables de produire des IRO lorsqu'ils sont stimulés. Une méthode de mesure de cette production, utilisant du luminol (un substrat chromogène) et une peroxydase exogène, a été optimisée et ensuite employée à la caractérisation des espèces réactives produites ainsi que des stimuli auxquels répondent les amoebocytes (Coteur et al. 2002). Il est apparu que les espèces produites et détectées par cette méthode sont le superoxyde anionique, le peroxyde d'hydrogène et le peroxydite. Cette production est stimulée uniquement par l'interaction directe des amoebocytes avec des bactéries ou des composantes de la paroi bactérienne et non pas par des composés solubles tels que le PMA ou la lectine ConA. Ces résultats permettront certainement de préciser l'importance que revête ce mécanisme dans l'immunité des échinodermes.

3.1.3.2. Effets des facteurs environnementaux sur les réponses immunes d'*Asterias rubens*.

Ce travail comporte cinq aspects : le suivi de la production d'IRO au cours d'un cycle annuel *in situ*, l'effet de la température et de la salinité de l'eau de mer en aquarium, l'effet du stress de transport des astéries et l'impact de la présence du parasite *Orchitophrya stellarum* dans les gonades d'*A. rubens* (Coteur et al. 2004).

Il apparaît que la production d'IRO varie de manière significative au cours d'un cycle saisonnier. Parmi les différents facteurs environnementaux étudiés, la température semble avoir le plus d'influence sur cette réponse immune. Cet effet se superpose probablement aux modifications physiologiques induites par la gamétogenèse. La salinité et le stress lié au transport des astéries n'affectent pas significativement la production d'IRO bien qu'une certaine prudence s'impose dans les premières 24 heures après le transport des animaux. Enfin, le parasitisme par *O.stellarum* s'avère sans effet sur la production d'IRO mais induit une augmentation significative de la concentration en amoebocytes dans le liquide coelomique (CAC).

Dès lors, il serait, au cours d'études de bio-surveillance, préconisé de choisir des saisons ne présentant pas de températures extrêmes. Le début de l'automne (i.e. la période de post-ponte) et le printemps apparaissent à cet égard comme les périodes idéales.

3.1.3.3. Effets des métaux lourds sur les réponses immunes d'*Asterias rubens*.

Contaminations métalliques *in vitro*.

Afin de distinguer les effets systémiques des métaux des effets exercés spécifiquement sur les amoebocytes, ces derniers ont été exposés à court terme à différents métaux en solution. Comme la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO) par ces amoebocytes doit être mesurée simultanément à la contamination (i. e. dans le même milieu), l'effet des métaux sur le système de mesure (sans les cellules) a été vérifié au préalable. Seules les concentrations ne présentant pas d'interférences avec le système de mesure ont été prises en compte pour la suite de l'expérience.

Parmi les métaux testés (aluminium, argent, cadmium, chrome, cuivre, fer, mercure, plomb, zinc et, en tant que contrôle supplémentaire, le calcium), seuls le mercure et l'argent affectent les amoebocytes. L'effet exercé par ces deux métaux est similaire, à savoir, l'inhibition dose dépendante (suivant une relation linéaire ; $p < 0,001$ et $p = 0,004$ pour l'argent et le mercure respectivement) de la production d'IRO des amoebocytes au repos (non-stimulés). Ces résultats démontrent que les amoebocytes sont très résistants à l'action directe des métaux (aux concentrations

environnementales), mis à part le mercure et l'argent qui ont souvent été reconnus comme étant les plus toxiques (Fugère *et al.* 1996, Fournier *et al.* 2000).

Contaminations métalliques *in vivo*

Afin de déterminer les effets des métaux lourds sur les réponses immunes d'*A. rubens* en conditions contrôlées, des contaminations *in vivo* ont été réalisées. Pour ce faire, les deux principales voies de contamination des astéries (l'eau de mer et la nourriture) ont été étudiées et comparées.

Contamination via l'eau.

Des astéries ont été placées dans 5 aquariums de 30 l. Après une période d'acclimatation de 7 jours, des métaux sont ajoutés séparément dans 4 aquariums,

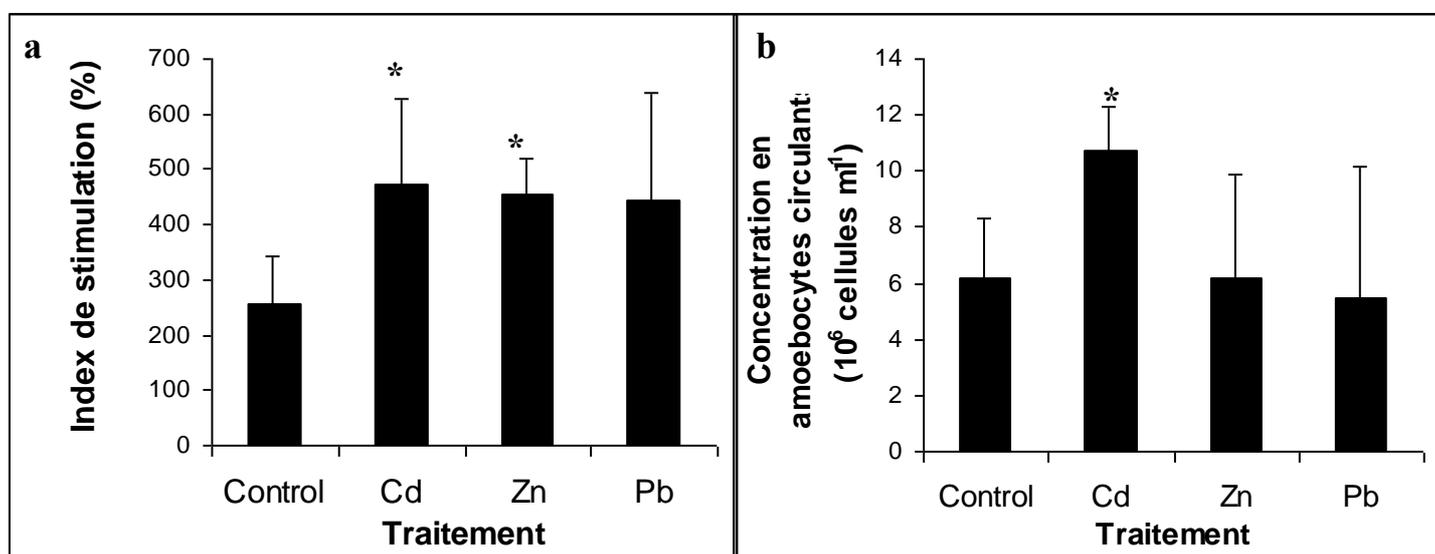


Fig. 9. Production d'IRO (a) et concentration en amœbocytes circulants (b) pour des astéries contaminées pendant 14 jours au cadmium ($50\mu\text{g l}^{-1}$), au zinc ($300\mu\text{g l}^{-1}$) ou au plomb ($50\mu\text{g l}^{-1}$). Légende: *, stimulation significative ($p < 0.05$) par rapport au contrôles.

le cinquième aquarium servant de contrôle. Le cadmium ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$) et le plomb ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) ont été ajoutés à une concentration nominale de $50\mu\text{g l}^{-1}$; le zinc ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$) à $300\mu\text{g l}^{-1}$ et le cuivre ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$) à $150\mu\text{g l}^{-1}$. Ces concentrations ont été choisies en multipliant les concentrations moyennes de ces métaux dans les eaux océaniques (Clark, 1997) par 1000 environ afin de réaliser des contaminations aiguës. L'eau contaminée ainsi que les moules (*Mytilus edulis*) servant de nourriture sont remplacés tous les jours. Après 14 jours de contamination, l'activité phagocytaire *in vivo* et la production d'IRO sont mesurées comme décrit précédemment. Une mortalité importante étant survenue au cours de la contamination par le cuivre, seules les contaminations par le cadmium, le zinc et le plomb ont pu être étudiées. L'activité phagocytaire des astéries contaminées par ces trois métaux ne diffère pas significativement de celle des astéries contrôles ($p > 0.05$).

La production d'IRO, exprimée en pourcentage de stimulation, est affectée par le cadmium et le zinc ($p < 0.05$) (Fig. 9a). La concentration en amœbocytes circulants (CAC) est accrue chez les astéries contaminées par le cadmium ($p < 0.05$) (Fig. 9b).

Contamination via la nourriture.

Des moules (*Mytilus edulis*) ont été placées pendant 5 jours en aquarium. Une solution de cadmium (concentration finale de $400 \mu\text{g l}^{-1}$) ou une solution contrôle a été ajoutée dans les aquariums après chaque renouvellement d'eau de mer. Ensuite, les astéries et les moules ont été placées (au jour 0) dans deux cages *in situ* (l'une contenant les moules contrôles et l'autre contenant les moules contaminées) à Scharendijke (Pays-Bas) à raison d'une moule par astérie et par jour. Dix astéries ont été prélevées au jour 0 (contrôle de début d'expérience), et 20 astéries (10 dans chaque cage) aux jours 1, 7 et 18. La concentration en amœbocytes circulants et la production d'IRO par ces amœbocytes au repos ou stimulés ont été mesurées sur chacune des astéries prélevées.

Les astéries nourries avec des moules contaminées accumulent le cadmium de manière efficace (cette accumulation est significative aux jours 7 et 18). La production d'IRO au repos pour les astéries ayant reçu des moules contaminées est significativement stimulée par rapport à celle des astéries contrôles (T-test au jour 18, $p < 0,05$). Par contre, la production d'IRO par les amœbocytes stimulés ne diffère pas significativement entre les deux groupes d'astéries. De même, la CAC n'est pas significativement affectée par la contamination. La stimulation de la production d'IRO par le cadmium, observée lors de cette expérience, correspond aux résultats obtenus lors de la contamination par ce même contaminant via l'eau de mer. Toutefois, l'effet est retardé par rapport à l'accumulation du contaminant dans les organes de l'astérie, ce qui suggère que les mécanismes de toxicité mettent plusieurs jours à se mettre en place.

Contaminations métalliques *in situ* au Sør fjord (Norvège)

L'étude comporte trois parties : (1) la mesure des réponses immunitaires d'astéries prélevées dans 4 populations naturelles réparties le long d'un transect (de S1 -site le plus contaminé- à S4 -site le moins contaminé-); (2) la mesure de ces mêmes réponses au cours d'une expérience de décontamination pour laquelle des astéries ont été prélevées en S1 et transférées (en cage) en S4 ; et (3) la mesure de ces réponses au cours d'une expérience de contamination pour laquelle des astéries ont été prélevées en S4 et transférées (en cage) en S1 (Coteur et al. 2003b).

Transect. Compte-tenu de l'existence d'un gradient vertical de salinité allant d'une eau peu salée (10-15‰) en surface vers une eau à 30‰ en profondeur (<10m), le

transect a été établi pour des astéries vivant à 30‰ mais également pour des astéries vivant à 22-26‰. De plus, l'existence de deux variétés de couleur d'*A. rubens* (rouge et noire), présentant apparemment un développement distinct du squelette (les noires étant plus calcifiées), s'est imposée au début de cette étude et nous a conduits à doubler le transect constitué par les astéries à 22-26‰ : l'un considérant uniquement les « astéries rouges » et l'autre les « astéries noires ». Au total, trois transect ont donc été établis : astéries rouges à 30‰ ("R30"), astéries rouges à 22-26‰ ("R22-26") et astéries noires à 22-26‰ ("Noires").

En conditions peu contaminées (*i.e.* en S4), alors que la production basale (non-stimulée) d'IRO est semblable pour les trois types d'astéries considérées, la variété noire répond de façon significativement plus intense à une stimulation bactérienne (facteur de 2 à 3) par rapport aux deux types d'astéries rouges. D'autre part, la production d'IRO par les amoebocytes d'astéries noires n'est pas significativement altérée par la contamination (Fig. 10a). Au contraire, la production d'IRO par les amoebocytes d'astéries rouges à 30‰ augmente significativement de l'embouchure (S4, moins contaminée) vers l'amont du fjord (S1, très contaminé), alors que la production d'IRO pour les astéries rouges à 22-26‰ augmente significativement de S4 vers S2 mais reste basse en S1 (Fig. 10a). Cette dernière observation pourrait refléter une sensibilité à des contaminants différents (ayant des profils de concentration différents le long du transect). L'absence d'effets sur la production d'IRO par les amoebocytes d'astéries noires pourrait refléter l'existence de

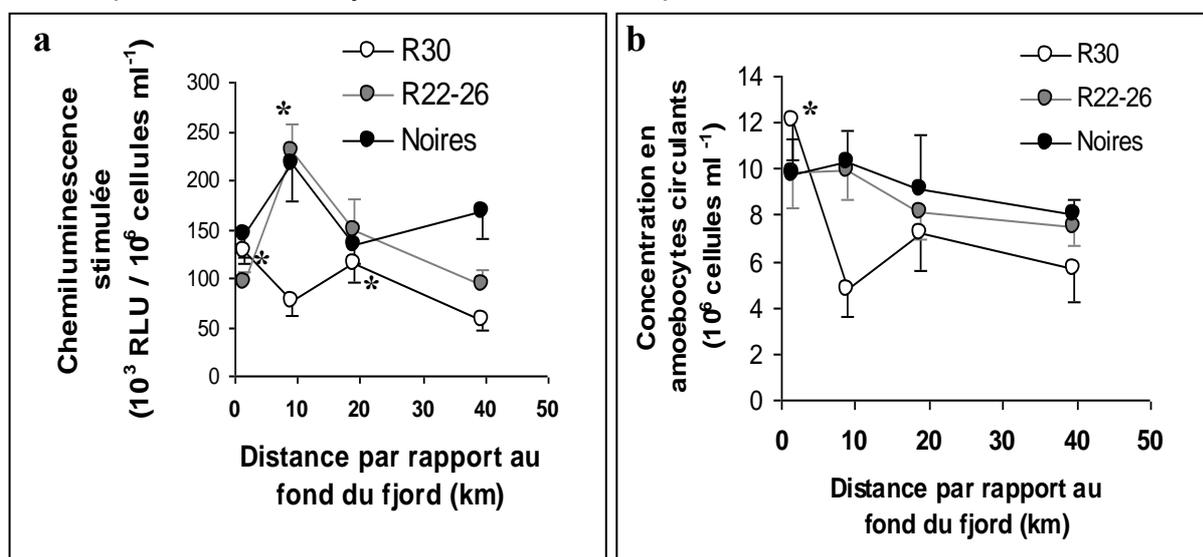


Fig. 10. Réponses immunes d'*A. rubens* récoltées le long d'un gradient de contamination métallique. Les réponses immunes ont été mesurées, pour les trois groupes d'astéries, dans des stations situées à distance croissante (de S1 vers S4) du fond du Sørdfjord. (a) Production d'IRO par les amoebocytes stimulés et (b) concentration en amoebocytes circulants (CAC) dans le liquide coelomique, pour chaque groupe d'astérie (moyennes \pm erreur standard, n=10). Légende: *, significativement différent de la réponse immune du même groupe d'astéries en S4.

mécanismes de détoxication (incorporation des métaux dans le squelette ou sur des protéines de type métallothionéines) plus efficaces pour cette variété. La concentration en amœbocytes circulants (CAC) augmente également pour les astéries rouges à 30‰ prélevées le long du transect de S4 vers S1. Par contre ce paramètre immunitaire n'est pas affecté chez les deux variétés prélevées à 22-26‰ (Fig. 10b).

Expérience de décontamination.

La production d'IRO par les amœbocytes d'astéries expérimentales ne diffère pas significativement de celle des astéries contrôles. L'augmentation de la production d'IRO par les astéries provenant de S1 par rapport à celle de S4, observée lors de l'étude des transects, semble donc être irréversible, au moins à court terme (10 jours).

Expérience de contamination.

La production d'IRO par les amœbocytes d'astéries expérimentales décroît significativement au cours des premiers jours de transfert (de S4 vers le site le plus contaminé : S1) par rapport aux astéries contrôles (astéries provenant de S4 et mises en cages en S4) (Fig. 11a). Au delà du 10^{ème} jour, l'activité des deux groupes d'astéries ne diffère plus significativement. De même, la CAC des astéries transférées de S4 vers S1 est déprimée dans les premiers jours d'expérimentation (Fig. 11b). Ces résultats pourraient indiquer que les mécanismes de détoxication des métaux chez *A. rubens* se mettent en place après plusieurs jours seulement, ce qui

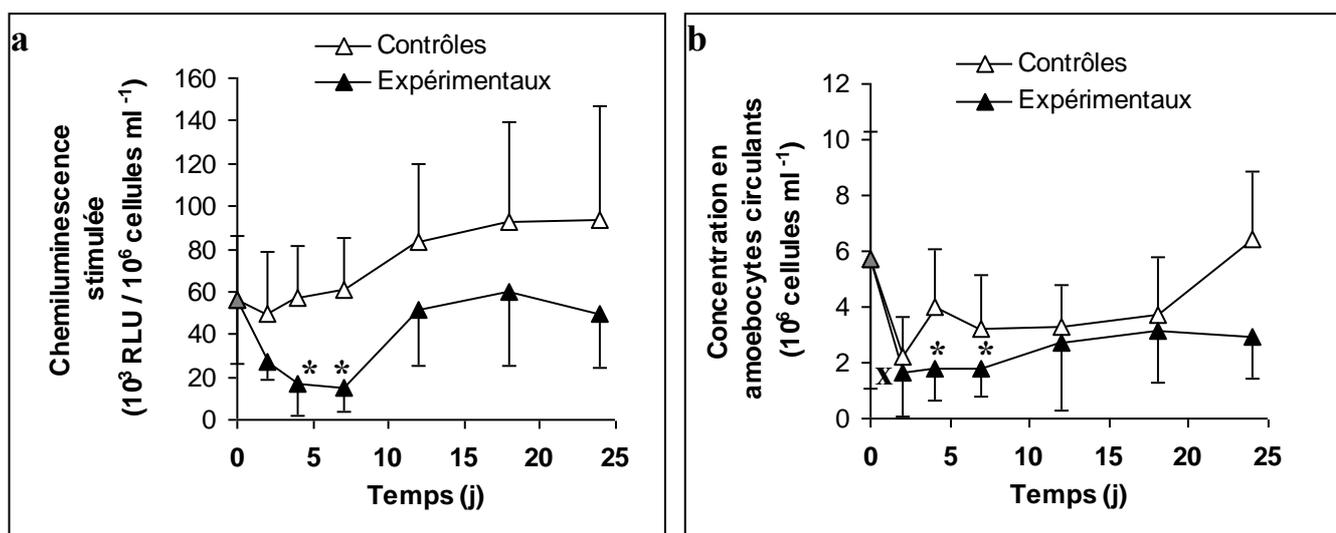


Fig. 11. Effets du transfert des astéries rouges à 30‰ de S4 (site de référence) vers S1 (site le plus contaminé) (astéries expérimentales, triangles noirs). Les contrôles comportent des astéries récoltées au début de l'expérience (contrôle J0, triangle gris) et des astéries récoltées en S4 et mises en cage en S4 (contrôles de mise en cage, triangles blancs). (a) Production d'IRO par les amœbocytes stimulés et (b) concentration en amœbocytes circulants dans le liquide coelomique (moyennes \pm écarts types, n=10). Légende: *, différence significative entre les expérimentaux et les

contrôles de mise en cage (i.e. effet significatif de la contamination); X, différence significative entre les contrôles de mise en cage et le contrôle J0 (i.e. effet significatif de la mise en cage des astéries).

expliquerait une toxicité qui ne s'exprime que dans les premiers jours de contamination. En effet, Temara et al. (1997a) ont mis en évidence un temps de latence entre le début de la contamination d'*A. rubens* par le cadmium et l'induction de métallothionéines chez cette espèce.

3.1.3.4. Effets des PCBs sur les réponses immunes d'*Asterias rubens*

Les effets des PCBs sur les réponses immunitaires d'*A. rubens* ont été mesurés lors d'expositions mixtes par les sédiments (rubrique 3.1.1.2) et lors d'injections intracoelomiques.

Exposition mixte. Les résultats montrent que l'activité phagocytaire des amœbocytes tend à augmenter au cours de la période durant laquelle les astéries sont exposées aux PCB; après la restauration des conditions non contaminantes, cette activité tend à diminuer (Fig.12).

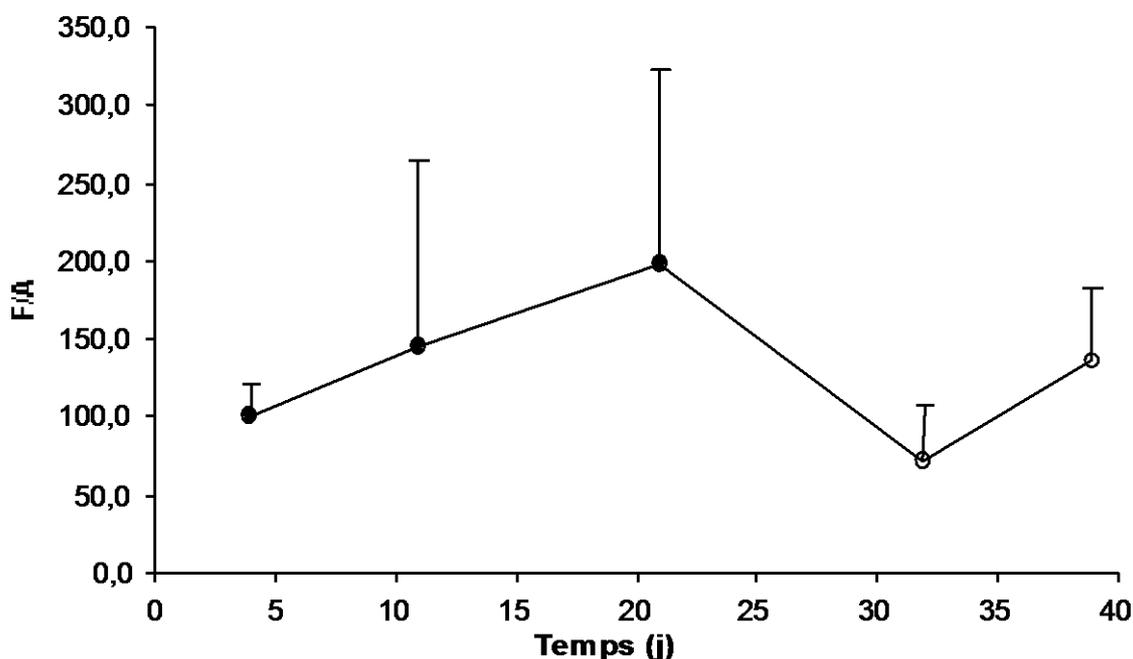


Fig.12: *Asterias rubens*. Variation de l'activité phagocytaire *in vivo* exprimée en % de bactéries phagocytées (F) par unité d'absorbance ($m \pm sd$), chez des astéries exposées aux PCB.

Une importante augmentation de la production d'IRO s'observe après 7 jours d'exposition; cette production chute ensuite pendant au moins 7 jours après la restauration des conditions non contaminantes (Fig. 13). Les amœbocytes tendent ensuite à recouvrer leur niveau initial de production d'IRO, ce qui suggère que les effets des PCB sur la production d'IRO sont réversibles. D'autre part, l'hypothèse émise précédemment selon laquelle la détoxification des PCB serait congénère-spécifique chez *A. rubens* est supportée par le fait qu'il existe un parallèle entre ce marqueur et les concentrations en PCB dans les astéries: il existe de très fortes corrélations entre la production d'IRO et la concentration en PCBs coplanaires dans les compartiments corporels d'*A. rubens*.

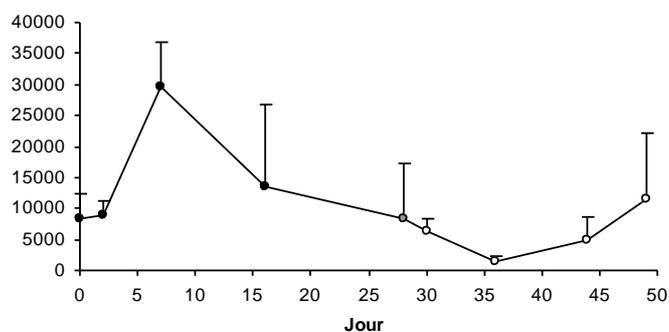


Fig 13: *Asterias rubens*. Production d'IRO par les amœbocytes non stimulés (a) ou stimulés (b) par des bactéries: chimiluminescence (exprimée en relative light units, RLU, m+sd, n=3) produite par les amœbocytes d'astéries exposées aux PCB pendant 28 jours (cercles pleins) puis placées en conditions non contaminantes (cercles vides).

Test de toxicité.

Un test de toxicité a été réalisé afin de déterminer les effets d'un PCB coplanaire sur le système immunitaire d'*A. rubens* (production d'IRO) et la réponse de celui-ci au cours du temps. Le congénère #126 a été injecté dans la cavité générale des astéries.

Les résultats sont présentés à la Figure 14. D'une manière générale, la production d'IRO est nettement inhibée chez les individus injectés. Cette tendance est conservée au cours du temps

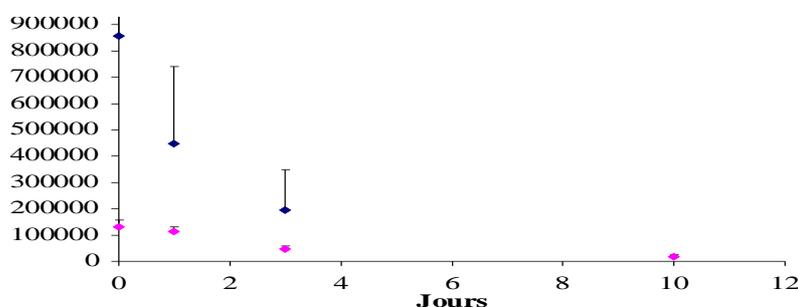


Fig 14: *Asterias rubens*. Production d'IRO par les amœbocytes stimulés par des bactéries: chemiluminescence (exprimée en relative light units, RLU, m+sd, n=3) produite par les amœbocytes d'astéries injectées au temps 0.

3.2. Contamination des sédiments et organismes par les métaux et PCBs en Mer du Nord.

L'ensemble des résultats peut être consulté sur la base de données "Belgian Marine Data Centre" (<http://www.mumm.ac.be/datacentre>). Des analyses complètes ont été publiées ou sont en cours de publication (Coteur et al. 2003c, Danis et al. submitted a, b).

3.2.1. Sédiments

3.2.1.1. Métaux

Les concentrations en Cd, Pb, Zn et Cu ont été mesurées dans la fraction brute des sédiments du plateau continental belge et le long des côtes néerlandaises et allemandes. Les résultats sont présentés ici pour le Cd et le Pb (Figs 15,16). Le plateau continental belge montre des concentrations élevées en métaux dans la frange côtière et l'estuaire de l'Escaut. Ces niveaux dépassent dans de nombreux sites les critères OSPAR d'évaluation écotoxicologique (0,1-1 µg/g PS pour le Cd, 5-50 µg/g PS pour le Pb). Les niveaux sont plus bas au large. Le long des côtes néerlandaises et allemandes, des concentrations supérieures aux critères OSPAR sont relevées dans le panache de l'Escaut et du Rhin et dans la baie allemande.

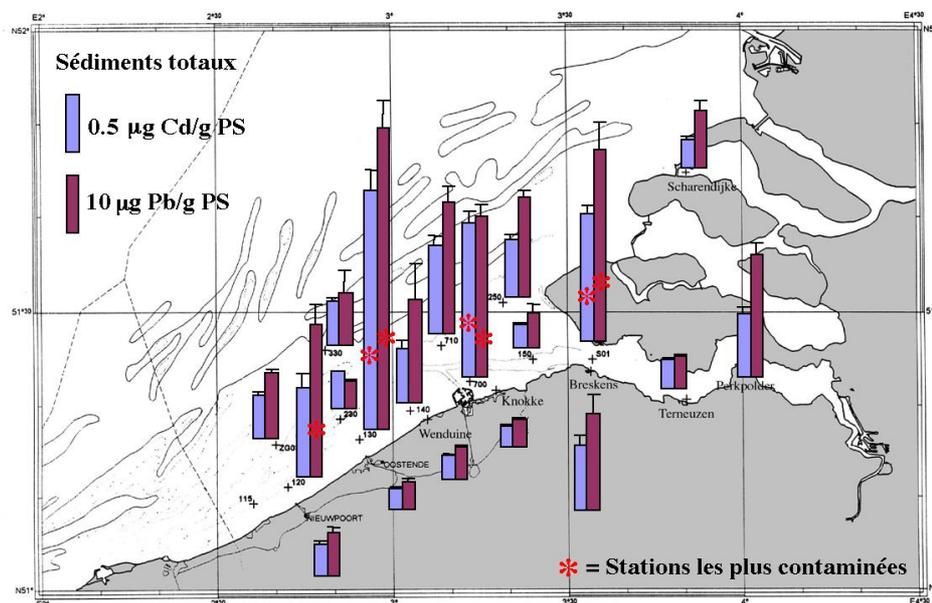


Fig. 15. Concentrations (moyenne + écart type) en cadmium et plomb dans les sédiments totaux du plateau continental belge et de l'embouchure de l'Escaut en 1998.

3.2.1.2. PCBs

Les analyses des sept congénères de PCBs ont été réalisées dans la fraction brute des sédiments. Les résultats concernant le plateau continental belge sont présentés à la Fig.17.

La somme des concentrations est comprise entre 0.3 et 21 ng/g PS. Les concentrations les plus faibles sont rencontrées dans les stations les plus éloignées des côtes (330,250) et les concentrations les plus importantes dans les stations près de l'estuaire ainsi qu'en face d'Ostende (Terneuzen, Perkpolder, 130) indiquant que l'impact des effluents de l'Escaut, plus contaminés, est réduit à une relativement petite région côtière. La station 130, lourdement contaminée est située là où les gyres de l'Escaut rencontrent les courants nord-atlantiques de sorte que les particules provenant de l'Escaut, fortement contaminées, sédimentent. La station de Skarendijke (bras fermé de l'Escaut oriental) apparaît également sérieusement contaminée. Les contaminations des stations ne diffèrent pas de manière significatives si on les considère dans leur ensemble. Cependant, si l'on se base sur des transects perpendiculaires aux côtes (ex : Nieuport, 120, ZG03), les stations au large apparaissent significativement moins contaminées.

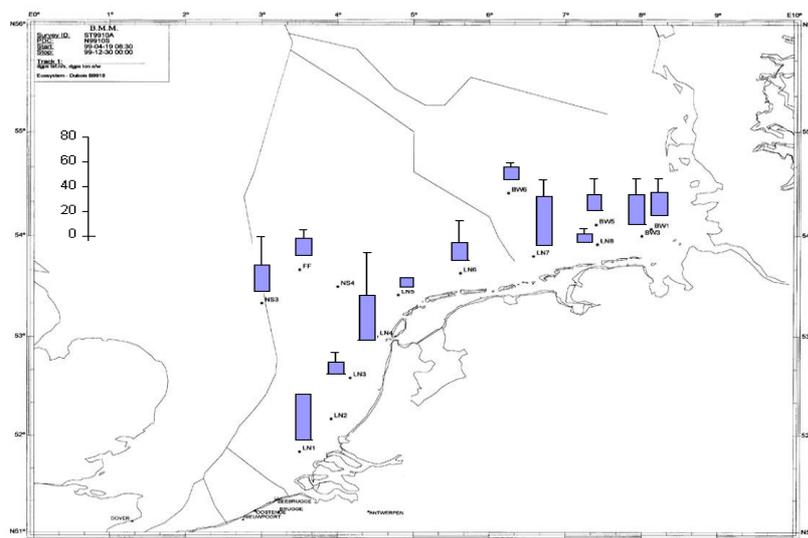


Fig. 1

oids sec.

Les sommes des concentrations dans les sédiments sont comprises entre 6.4 et 39.3 ng/g PS. Nous pouvons observer un gradient de contamination décroissant le long du transect BW lorsqu'on se dirige vers le large. Les stations LN1 (en embouchure du Rhin), LN4 et LN7 (en embouchure de l'Ems) se sont montrées particulièrement contaminées.

Les profils de répartition des sept congénères sont identiques à ceux observés dans les sédiments du plateau continental belge. De même, sur base des répartitions en congénères, on peut observer une tendance à retrouver des concentrations plus importantes en PCBs « lourds » (153, 138 et 180) par rapport aux PCBs « légers » (28, 52) près de l'embouchure de l'Elbe. Des observations similaires ont été rapportées par Goerke et Weber (1998).

3.2.2. *Asterias rubens*

3.2.2.1. Métaux

Les concentrations en Cd, Pb, Zn et Cu ont été mesurées dans des astéries collectées dans les mêmes stations du plateau continental belge et des côtes néerlandaises et allemandes que les sédiments. Deux compartiments ont été analysés: les cæcums pyloriques (organes digestifs et de stockage qui constituent un bioindicateur à court terme) et le tégument (qui constitue un bioindicateur à plus long terme). Les résultats sont présentés ici pour le Cd et le Pb (Figs 19,20). Les

concentrations mesurées indiquent que les métaux associés au sédiment se retrouvent également dans les êtres vivants. Les concentrations les plus élevées ont été relevées chez les astéries des stations intertidales de la côte belge et de la baie allemande.

3.2.2.2. PCBs.

Les analyses ont été réalisées en différenciant les échantillons selon le sexe des astéries. Cependant, comme aucune différence statistique au niveau des concentrations en PCBs n'est apparue ni pour les téguments, ni pour les caecums pyloriques (Fig. 21), les résultats des deux sexes ont été groupés.

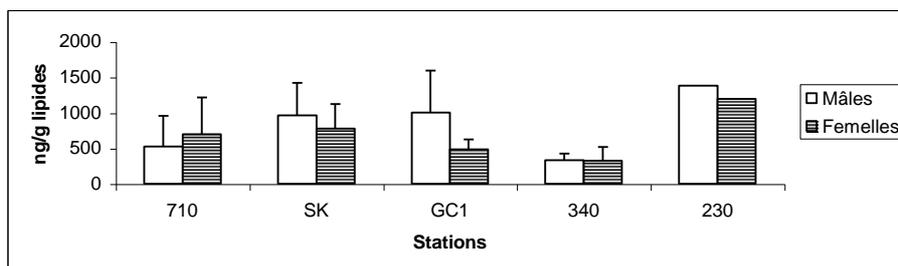


Fig. 21 : Comparaison des concentrations moyennes (ng/g lipides) en PCBs dans les caecums pyloriques d'astéries mâles et femelles.

Les sept congénères de PCBs ont été analysés dans quatre compartiments corporels (téguments oraux et aboraux, caecums pyloriques et gonades) d'astéries collectées sur le plateau continental belge et dans l'embouchure de l'Escaut (Fig. 22).

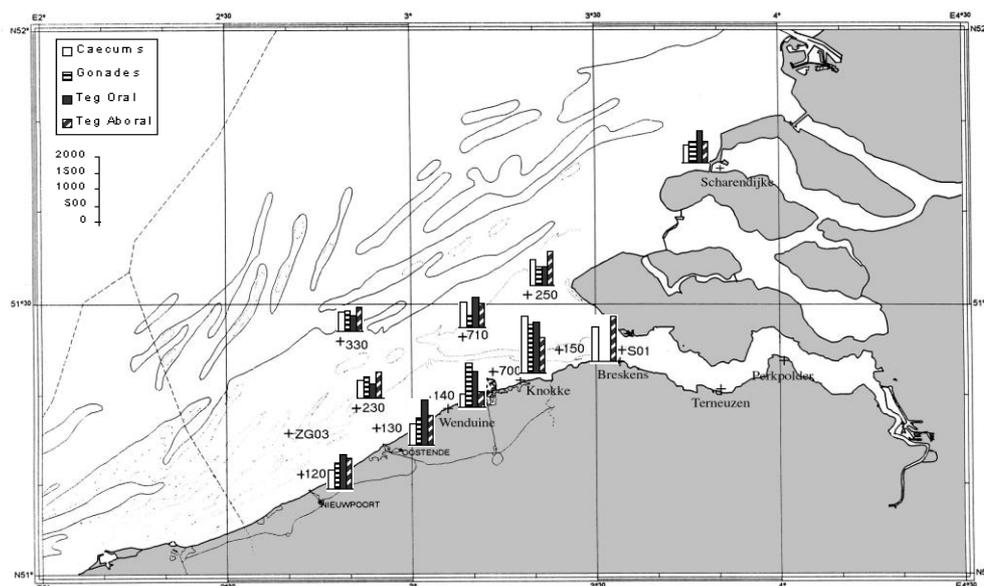


Fig. 22 : Somme des concentrations des sept PCBs (ng/g lipides) dans quatre compartiments d'*Asterias rubens*.

La somme des concentrations en PCBs est comprise entre 400 et 1700 ng/g de lipides dans les caecums pyloriques. Les étoiles de mer qui ont révélé les plus hauts taux de contamination sont localisées à Knokke et Breskens. Les étoiles moins contaminées ont été échantillonnées dans les stations plus au large.

Les concentrations en différents congénères dans les téguments oraux et aboraux ne diffèrent pas de manière significative. On aurait pu s'attendre à des différences car, contrairement au tégument aboral, le tégument oral est en contact direct avec le sédiment bien plus contaminé que la colonne d'eau. Dans la suite du travail, nous n'avons plus fait de distinction entre ces deux compartiments.

Les concentrations en PCBs ainsi qu'en lipides sont plus élevées dans les caecums pyloriques que dans les gonades, elles-mêmes plus contaminées que les téguments. Ceci conforte une étude de Picer et Picer (1986). Les concentrations en lipides par rapport au poids sec sont d'environ 30 % pour les caecums, 20 % pour les gonades et 4% pour les téguments.

Sur base des contenus lipidiques des différents compartiments étudiés, on observe qu'il existe une très bonne corrélation (> 0.9) entre le contenu en lipides et la concentration totale en PCBs (Fig. 23, Tableau VI). La contamination d'un compartiment de l'étoile dépendrait donc de son contenu en lipides. Or, comme il est apparu que les téguments absorbent plus rapidement les PCBs (rubrique 3.1.1) que

les gonades et les caecums pyloriques, on peut imaginer que l'accumulation des PCBs chez *Asterias rubens* suit un modèle biphasique où tout d'abord les PCBs sont accumulés par le tégument et ceux-ci sont ensuite répartis dans les différents compartiments selon leur contenu lipidique.

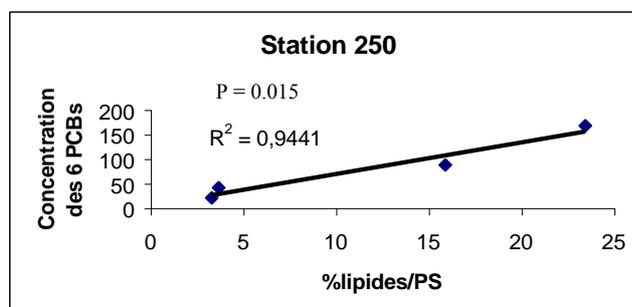


Fig. 23 : Corrélation entre la concentration en PCBs 'Totaux' (Somme des 7 congénères en ng/g PS) et le contenu en lipides (g/100 g poids sec) dans quatre compartiments de l'astérie *Asterias rubens* (tégument oral et aboral, gonades et caecums pyloriques).

Tableau VI : Coefficients de corrélation pour les différentes stations entre la somme des concentrations des 7 congénères et le pourcentage en lipides.

Station	R ²	p
250	0.94	0.015
NP	0.99	0.010
KN	0.97	0.013
Os	0.93	0.082
710	0.93	0.081
230	0.98	0.107
WD	0.35	0.043
330	0.99	0.04
BK	0.99	0.041
SK	0.98	0.083

Le profil de répartition des chlorobiphényles n'est pas tout à fait semblable à celui trouvé dans les sédiments. En effet, bien que les congénères 153 et 138 soient majoritaires et le congénère 52 moins présent, les rapports en concentration des sept congénères sont différents : le congénère 180 est moins présent dans les compartiments corporels de l'étoile de mer que dans les sédiments. De même, le congénère 153, qui représente entre 25 et 30 % en masse des congénères totaux dans les sédiments, se situe entre 30 et 40 % chez les astéries. De nombreuses espèces de poissons telles que le hareng, la morue et l'anguille ont montré ce même rapport (Atuma *et al*, 1996). Ce chlorobiphényle est rapidement bioaccumulé et

lentement excrété en raison de sa structure : deux carbones adjacents non chloro-substitués (Oehme *et al*, 1996). Pruell *et al* (2000) avaient observé une métabolisation importante du congénère 52 chez les polychètes. Cela ne semble pas être le cas chez les étoiles de mer. La plus faible concentration en congénère 180 trouvée chez l'étoile de mer par rapport au sédiment peut s'expliquer par le fait que ce composé est moins biodisponible car plus fortement lié au sédiment à cause de son importante hydrophobicité (McFarland et Clarke, 1989 ; Opperhuizen et Stokkel, 1988) ou que les membranes biologiques sont moins perméables à ce composé plus volumineux (Opperhuizen *et al*, 1985 ; Shaw et Connell, 1984).

Les travaux sur les cinétiques d'accumulation des 7 congénères (28, 52, 101, 118, 153, 138 et 180) par les téguments et les caecums pyloriques de l'étoile de mer *Asterias rubens* (rubrique 3.1.1) ont confirmé la plus faible accumulation du congénère 180. De même, une étude de Hope *et al* (1997) réalisée chez l'oursin *Echinometra mathaei* a aussi montré une bioaccumulation du congénère 153 et une présence moindre du congénère 180 par rapport au sédiment.

Les résultats des analyses réalisées dans les caecums pyloriques et téguments des astéries échantillonnées le long des côtes néerlandaises et allemandes sont présentés à la Figure 24.

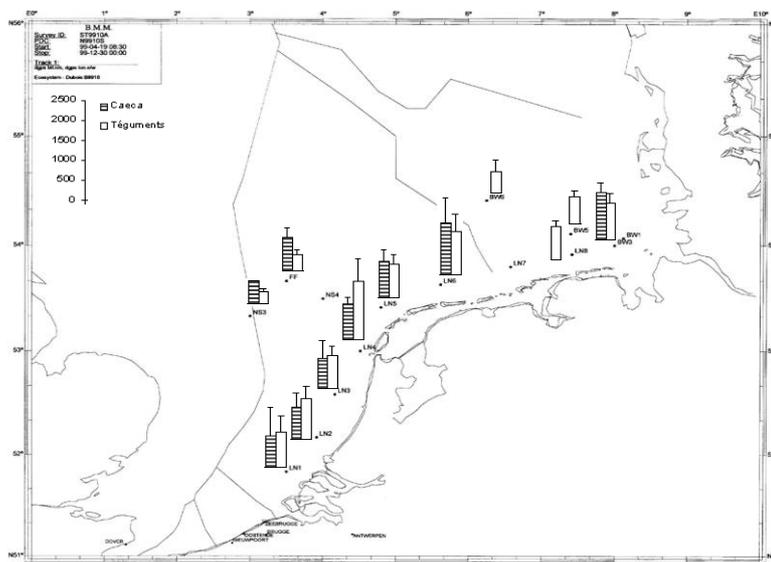


Fig. 24 : Somme des concentrations des sept PCBs (ng/g lipides) dans les caecums pyloriques et téguments totaux d'*Asterias rubens*.

Les concentrations en PCBs (sept congénères) dans les caecums pyloriques sont comprises entre 550 et 1300 ng/g lipides. Ces valeurs correspondent à celles observées par den Besten *et al* (2001) en 1996. Ces auteurs ont mesuré des concentrations en PCBs comprises entre 650 et 1000 ng/g de lipides pour les stations LN1 à LN4. A nouveau, le congénère 180 est moins représenté dans les

compartiments corporels de l'étoile de mer que dans les sédiments et le congénère 153 est plus bioaccumulé.

3.3. Toxicité des sédiments de la Mer du Nord

Les échantillons de sédiments collectés ont été présentés aux embryons des deux espèces d'échinodermes considérés (*A. rubens* et *P. miliaris*). Ces échantillons ont été collectés sur le plateau continental belge et le long des côtes hollandaises et allemandes. Le détail des résultats peut être consulté sur la base de données "Belgian Marine Data Centre" (<http://www.mumm.ac.be/datacentre>). Des analyses complètes ont été publiées ou sont en cours de publication (Coteur et al. 2003c, Danis et al. submitted b)

3.3.1. Plateau continental belge

Les tests ont été réalisés en avril 1999 pour *P. miliaris* et en juin 1999 pour *A. rubens*. Les résultats de ces tests sont présentés dans le Tableau VII et la Figure 25.

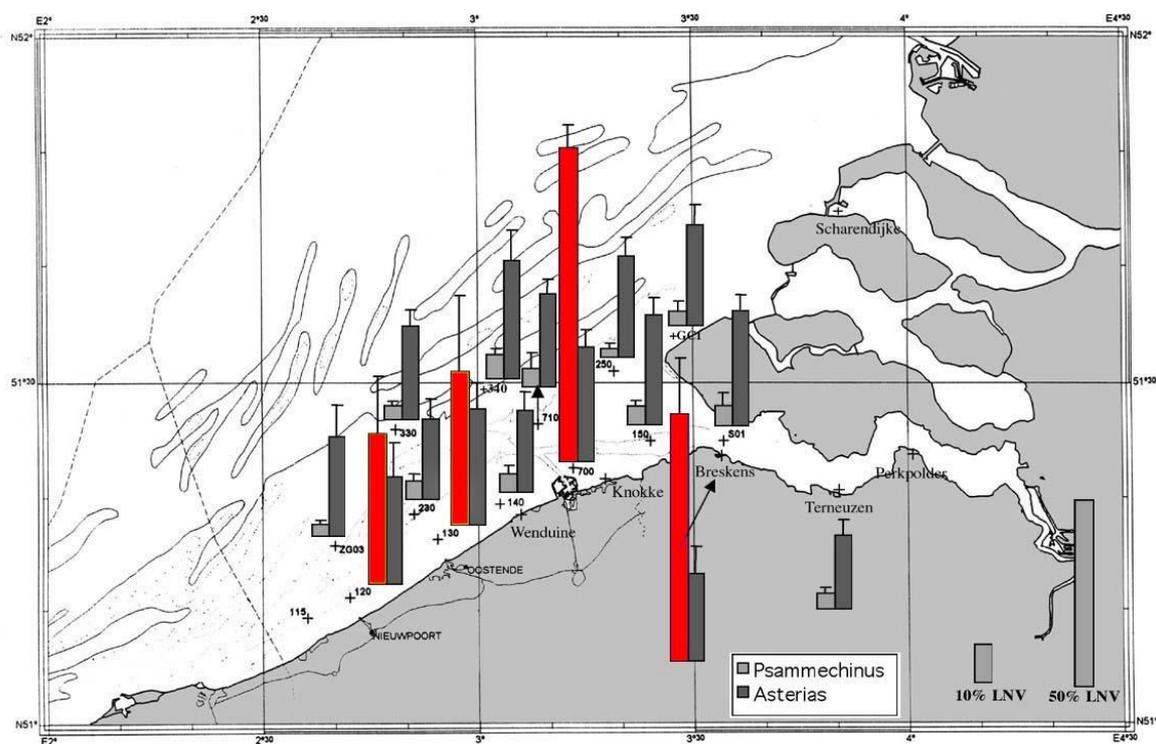


Fig. 25. Embryotoxicité des sédiments du plateau continental belge. Pourcentages (moyenne + écart type) de larves non-viables (%LNV) de *Psammechinus miliaris* (en gris clair) et d'*Asterias rubens* (en gris foncé) induits par les sédiments échantillonnés. Les pourcentages exprimés en rouge sont significativement différents du contrôle C-EMF correspondant.

3.3.1.1. Tests entrepris avec *A. rubens*

L'étude des taux de larves normales et viables au moyen des tests standards n'a révélé aucune différence notable entre les stations (ANOVA) ni entre les stations et le contrôle (C-EMF) (Dunnett). Un Test G a cependant mis en évidence que les sédiments de sept des quinze stations étudiées avaient induit des proportions de larves anormales supérieures au C-EMF (i.e., stations 120, 130, 150, 230, 340, S01 et ZG03). Il n'apparaît cependant pas de tendance nette permettant de caractériser une quelconque tendance au sein des stations échantillonnées. Ainsi, si la station 340 se situe au large, les autres sont côtières et/ou situées dans la plume de l'Escaut.

Tableau VII. Embryotoxicité des sédiments (fraction totale) du plateau continental belge. Pourcentages (moyenne; écart type) des différentes classes larvaires observées chez *Asterias rubens* et *Psammechinus miliaris* (N: normal, A: anormal, LBC: larve à bras courts de *P. miliaris*, B: blastula, R: retardé, V: viable).

Stations		Asterias rubens						Psammechinus miliaris						
		Classes						Classes						
		N	A	B	R		V	N	A	LBC	B	R		V
C-EMF	m.	67,65	22,76	4	5,59		73,24	90,67	7,11	0	0	2,22		92,88
	e.t.	6,96	6,93	2,32	3,32		6,78	2,70	2,30	-	-	1,31		2,29
120	m.	62,33	25,17	3,67	8,83		71,17	58,5	5,5	34,67	0	1,33		59,83
	e.t.	11,57	9,06	0,52	3,06		9,09	14,43	3,27	15,65	-	1,75		15,30
130	m.	59,5	27,83	3,33	9,33		68,83	58,33	5	36,17	0	0,5		58,83
	e.t.	7,48	6,21	2,58	3,08		6,74	20,53	2,37	19,41	-	0,84		19,96
140	m.	72,5	17,17	4,83	5,5		78	93,67	4,5	0	0,33	1,5		95,17
	e.t.	5,09	2,64	2,64	1,97		4,69	3,39	2,26	-	0,82	1,76		2,48
150	m.	61,67	19,17	10	9,17		70,83	93,83	5	0	0	1,17		95
	e.t.	6,83	2,48	3,29	2,86		4,54	2,23	1,55	-	-	1,47		1,55
230	m.	71	14,33	7	7,67		78,67	92,33	4,5	0	0,33	2,83		95,17
	e.t.	8,05	4,18	4,20	4,50		5,54	2,42	1,76	-	0,82	2,04		2,04
250	m.	67,17	21,17	5,5	6,17		73,33	96,33	2,33	0	0	1,33		97,67
	e.t.	5,19	3,19	2,17	1,94		4,97	2,16	1,51	-	-	1,63		1,51
330	m.	71	19,83	5,17	4		75	94,5	3,83	0	0	1,67		96,17
	e.t.	3,79	3,60	2,48	2,76		4,29	1,05	1,17	-	-	1,75		1,17
340	m.	62,67	22,67	8,67	6		68,67	90,33	6,33	0	0	3,33		93,67
	e.t.	9,20	6,28	3,93	4,60		8,16	2,07	1,63	-	-	1,51		1,63
700	m.	65,33	27	3,67	4		69,33	12	4,8	79	0	4,2		16,2
	e.t.	4,03	3,58	1,97	1,26		4,46	6,96	3,03	7,52	-	2,68		6,06
710	m.	68,17	23	2	6,83		75	92,83	5	0	0	2,17		95
	e.t.	3,76	4,90	1,67	3,19		3,69	3,06	4,15	-	-	1,47		4,15
S01	m.	61	26	4,83	8,17		69,17	92,17	5,5	0	0	2,33		94,5
	e.t.	5,80	3,85	2,23	4,07		4,22	3,31	3,27	-	-	1,21		3,27
GC1	m.	66	24,17	2,83	7		73	92,67	3,83	0	0	3,5		96,17
	e.t.	5,33	5,95	2,71	2,53		5,22	4,59	2,56	-	-	3,21		2,56
ZG03	m.	59,67	23,33	3	14		73,67	95,5	3	0	0	1,5		97
	e.t.	9,03	7,55	2	4,56		8,62	1,38	1,26	-	-	1,05		1,26
TN (Terneuze)	m.	73,33	16,17	3,5	7		80,33	92,67	4,33	0	0	3		95,67
	e.t.	6,02	4,02	1,38	2,90		4,23	3,88	1,37	-	-	3,03		1,37
BK (Breskens)	m.	70,17	18,83	4,67	6,33		76,5	27	7,8	58,2	0	7		34
	e.t.	7,91	3,60	3,98	2,42		7,12	14,47	2,49	13,12	-	4,95		14,78

3.3.1.2. Tests entrepris avec *P. miliaris*.

Une classe particulière d'altération développementale est apparue lors de ces tests chez les larves de *P. miliaris*. Cette classe, dite "larve à bras courts" (LBC), se caractérise par l'absence du développement des bras larvaires; le reste de la morphologie étant "normale". Cette classe larvaire spécifique a été induite au contact des sédiments de quatre stations côtières (i.e., stations 120, 130, 700 et BK). Il est intéressant de noter que ces quatre stations se situent face à trois grandes agglomérations du littoral belge (Nieuwpoort, Oostende et Zeebrugge, respectivement) ou dans l'embouchure de l'Escaut (station BK). L'analyse des taux de larves normales et viables ont permis d'aboutir aux mêmes conclusions: les stations dont les sédiments induisent la formation de LBC induisent également des taux de larves normales et viables significativement inférieurs à celui du C-EMF. Les stations 700 et Breskens ont induit les taux les plus bas. Les stations 120 et 130 ont induit des taux intermédiaires. Par ailleurs, trois stations situées au large ont induit des taux de larves normales et viables significativement supérieurs au C-EMF (i.e., stations 250, 330, ZG03)

3.3.2. Plateaux continentaux néerlandais et allemand

Les tests ont été réalisés en en Juin 1999 pour *P. miliaris* et *A. rubens*. Les résultats de ces bioessais sont présentés dans le Tableau VIII et la Figure 26.

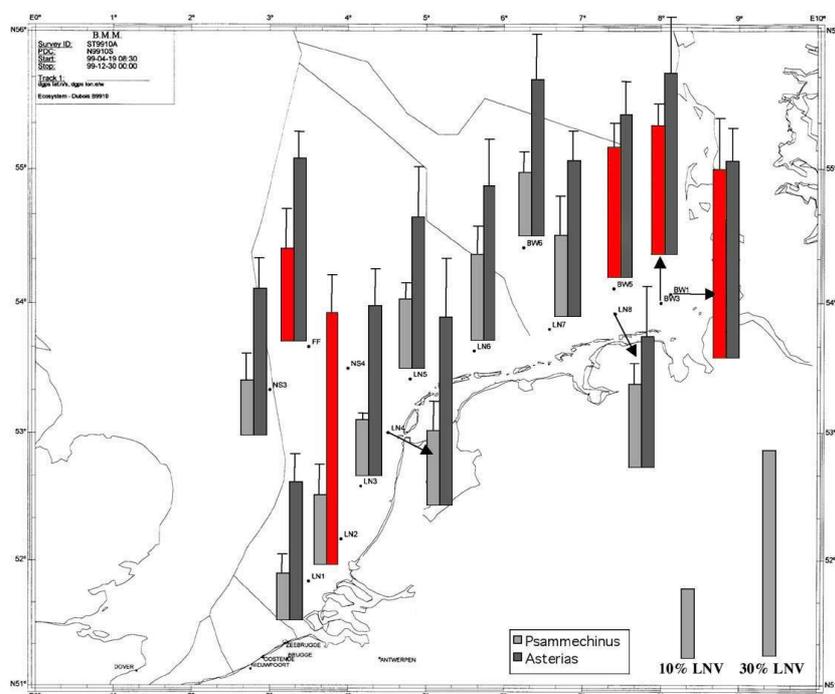


Fig.26. Embryotoxicité des sédiments des plateaux continentaux néerlandais et allemand. Pourcentages (moyenne + écart type) de larves non-viables (%LNV) de *Psammechinus miliaris* (en

gris clair) et d'*Asterias rubens* (en gris foncé) induits par les sédiments échantillonnés. Les pourcentages exprimés en rouge sont significativement différents du contrôle C-EMF correspondant.

3.3.2.1. Tests entrepris avec *A. rubens* .

Ces bioessais n'ont pas été particulièrement discriminants; les taux de larves normales ou viables induits par les sédiments des stations échantillonnées se sont généralement avérés identiques au contrôle C-EMF. Les sédiments des stations LN1 et LN8 ont même induit des taux significativement supérieurs à ce contrôle. Seul le sédiment de la station LN2, située à proximité de l'embouchure du Rhin a induit des taux de larves normales et viables significativement inférieurs au C-EMF. Signalons quand même que les taux de larves normales obtenus en réponse aux sédiments des stations BW (situées dans l'estuaire de Elbe et de la Weser) ont été particulièrement faibles (sans pour autant être significativement différents des stations LN).

3.3.2.2. Tests entrepris avec *P. miliaris* .

La classe larvaire anormale particulière (i.e., LBC) n'a pas été observée en réponse aux sédiments néerlandais et allemands. Ces bioessais ont clairement permis de distinguer, d'une part, les stations LN et NS3 et, d'autre part, les stations BW et FF. Les taux de larves viables obtenus en réponse aux sédiments des stations BW1, BW3, BW5 et FF se sont tous avérés significativement inférieurs au C-EMF. Si l'on considère les taux de larves normales, neuf stations sur quatorze (i.e., stations BW1, BW3, BW5, BW6, LN2, LN4, LN5, LN7 et FF) ont induit des taux significativement inférieurs au contrôle C-EMF.

3.3.3. Conclusions.

De manière générale, les tests réalisés avec les embryons d'*A. rubens* se sont avérés beaucoup moins discriminant que ceux entrepris avec *P. miliaris*. La plus grande sensibilité de l'échinide doit être mise en corrélation avec une spécificité de son développement, à savoir la mise en place de structures squelettiques larvaires. L'échinide est doté de voies physiologiques lui permettant de puiser dans son environnement les minéraux nécessaires à ce processus. Ces voies semblent pouvoir être détournées par certains contaminants qui arrivent ainsi à pénétrer préférentiellement dans ces organismes. Les métaux lourds sont d'ailleurs connus pour pouvoir pénétrer activement dans les échinodermes adultes et se substituer à certains ions dans leurs structures squelettiques (Warnau *et al.* 1995).

L'échinide a permis de mettre en évidence la toxicité relative (1) de stations côtières sur le plateau continental belge et (2) de stations situées plus au large sur le plateau continental allemand. Les origines de ces pollutions sont relativement simples à

cerner: les stations côtières belges font face à des grandes agglomérations tandis que les stations allemandes font face à l'embouchure de l'Elbe et de la Weser (stations BW). Les stations BW appartiennent à un gradient de contamination reconnu (Stebbing & Dethlefsen 1992). La toxicité des stations de ce gradient BW a été mise en évidence précédemment (rubrique 1.2.3). Une autre indication de la pollution de ces stations du panache de l'Elbe est que les taux de larves normales d'*A. rubens* qu'elles ont induites sont relativement bas (même si ils ne diffèrent pas significativement des stations côtières allemandes).

Le taux maximal de larves non-viables d'astérie a été observé à la station LN2 faisant face à l'embouchure du Rhin. Nos propres expériences ont révélé que ces stations soumises à l'influence du Rhin se caractérisaient par des taux importants de PCBs (rubrique 3.2.2.2).

Tableau VIII. Embryotoxicité des sédiments (fraction totale) des stations néerlandaises et allemandes. Pourcentages (moyenne; écart type) des différentes classes larvaires observées chez *Asterias rubens* et *Psammechinus miliaris* (N: normal, A: anormal, B: blastula; R: retardé, V: viable).

Stations		Asterias rubens					Psammechinus miliaris				
		Classes					Classes				
		N	A	B	R	V	N	A	B	R	V
C-EMF	m.	67,41	23,58	5,23	3,76	71,17	89,38	6,61	1,22	2,77	92,16
	e.t.	9,57	6,47	3,63	3,36	8,39	3,75	2,5	1,52	1,44	2,91
BW1	m.	70,67	20,17	8,50	0,67	71,33	26,33	25,33	2,17	46,17	72,5
	e.t.	4,63	5,88	3,56	0,52	4,97	11,18	8,38	2,04	6,37	7,56
BW3	m.	69,67	18,67	7,83	3,83	73,50	27,17	15,83	2,83	54,17	81,33
	e.t.	8,26	4,41	4,54	2,32	8,07	5,12	2,64	1,47	5,49	3,33
BW5	m.	72,67	17,67	6	3,67	76,33	24,83	17,33	1,67	56,17	81
	e.t.	5,32	3,88	3,41	1,97	4,93	17,42	3,83	1,37	17,96	3,52
BW6	m.	74,17	16,83	6	3	77,17	56,67	8,83	0,5	34	90,67
	e.t.	6,05	6,77	1,67	1,41	6,62	21,30	2,79	0,84	19,40	3,08
FF	m.	69,33	18	8,83	3,83	73,17	34	12,83	0,67	52,5	86,5
	e.t.	3,83	2,83	2,93	1,72	3,87	14,39	6,18	0,82	13,23	5,96
LN1	m.	78,33	15,5	4,67	1,5	79,83	84,33	5,67	1,17	8,83	93,17
	e.t.	4,80	3,89	2,42	1,52	4,12	3,67	2,16	0,98	2,56	2,79
LN2	m.	60,33	30,17	6,67	2,83	63,17	81,33	8,67	1,5	8,5	89,83
	e.t.	6,98	4,96	2,50	2,14	5,49	3,61	3,83	2,07	3,83	4,49
LN3	m.	70	18,33	6,5	5,17	75,17	86,83	7,67	0,5	5	91,83
	e.t.	4,69	4,08	1,76	2,23	5,42	2,14	1,21	0,84	1,67	0,98
LN4	m.	67,17	22,50	5	5,33	72,5	79,17	9	1,83	10	89,17
	e.t.	10,07	8,96	1,55	3,20	8,64	7,44	3,03	1,94	6,96	4,40
LN5	m.	70,33	18,5	3,67	7,5	77,83	82,17	8,5	1,67	7,67	89,83
	e.t.	9,42	6,95	1,86	4,59	7,33	3,87	1,87	1,03	4,37	2,32
LN6	m.	73,67	18	4,5	3,83	77,5	83,5	12,33	0,17	4	87,5
	e.t.	6,02	6,26	2,07	1,17	6,83	4,89	4,08	0,41	1,26	4,18
LN7	m.	75,67	17,67	5	1,67	77,33	81,83	11,33	0,5	6,33	88,17
	e.t.	4,55	3,93	3,52	0,82	4,23	5,04	5,01	0,84	4,08	5,64
LN8	m.	77,5	14	5,17	3,33	80,83	83,67	10,83	1,33	4,17	87,83
	e.t.	8,29	6,07	2,79	1,75	7,25	3,88	2,64	1,51	2,40	3,06
NS3	m.	76,67	17,17	4,33	1,83	78,5	86,5	6,5	1,5	5,5	92
	e.t.	5,13	5	2,50	1,17	4,32	3,51	3,67	1,76	2,43	4

3.4. Effets des contaminants sur le système immunitaire des astéries.

Les réponses immunes d'*A. rubens* ont été mesurées lors d'études *in situ* d'une part le long de la côte belge et dans la plume de l'Escaut occidental, d'autre part le long des côtes néerlandaises et allemandes.

3.4.1. Plateau continental belge

Les sites belges et de la plume de l'Escaut occidental ont été échantillonnés en février 1998 et 1999 (Fig. 27). Les résultats indiquent des différences significatives entre les activités phagocytaires mesurées dans les différentes stations. La corrélation entre les résultats obtenus au cours des deux années est non significative ($p=0,201$) ; toutefois si on retire la station « 710 » de la comparaison on obtient un coefficient de détermination de 0,737, significatif ($p=0,015$). Il semble donc que les résultats de 1999 sont en bonne concordance avec ceux de 1998 à l'exception de la station 710 où les activités phagocytaires mesurées changent de façon importante.

La salinité varie très peu entre les stations échantillonnées (l'essentiel du gradient de salinité se situe en amont de l'embouchure proprement dite). Par contre, les concentrations en contaminants dans l'eau et les sédiments dans cette zone sont supérieures au bruit de fond pour la Mer du Nord (NSTF 1993, RVZ 1997, présent travail). Des régressions linéaires entre les concentrations en métaux dans les divers compartiments corporels des astéries et leur activité phagocytaire ont révélé des tendances (Tableau IX). Celles-ci s'expriment essentiellement lorsque l'on compare le paramètre immunitaire avec les concentrations en métaux dans le tégument oral. La présence de nombreux éléments coelomiques dans ce compartiment corporel pourrait expliquer cette relation privilégiée. Une contamination bactérienne de la zone considérée, liée à l'apport de matière organique par l'Escaut est également probable. Les astéries vivant dans la plume de l'Escaut peuvent donc d'une part être soumises à un stress de contamination, d'autre part voir leur système immunitaire plus sollicité que celui des animaux qui vivent en dehors de cette plume.

Tableau IX. Coefficients de détermination et probabilités associées aux régressions linéaires significatives entre l'activité phagocytaire des amœbocytes d'*A. rubens* et les concentrations en métaux lourds dans les sédiments et les différents compartiments corporels d'*A. rubens*.

Compartiments corporels	Métaux étudiés	Coefficient de détermination (R^2)	Probabilité associée à la régression
Caecums Pyloriques	Cuivre	0,131	0,03
Tégument Oral	Zinc	0,354	0,0002
	Plomb	0,198	0,0074
	Cadmium	0,212	0,0054
	Fer	0,190	0,0088
Gonades	Cadmium	0,162	0,0164
	Cuivre	0,183	0,0104
Tube Digestif Central	Cuivre	0,196	0,0077

3.4.2. Côtes néerlandaises et allemandes

Les réponses immunes d'*A. rubens* ont été étudiées dans différentes stations situées en Mer du Nord. La production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IRO) est négativement corrélée à la contamination du milieu (sédiment et astéries) en métaux lourds, alors que la concentration en amœbocytes circulants (CAC) semble être positivement liée à cette contamination. La production d'IRO est affectée à la fois dans la zone située en face de l'estuaire de l'Elbe et de la Weser, et dans la zone sous l'influence de l'Escaut et du Rhin (Fig. 28). Les détails de ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Coteur et al. 2003c).

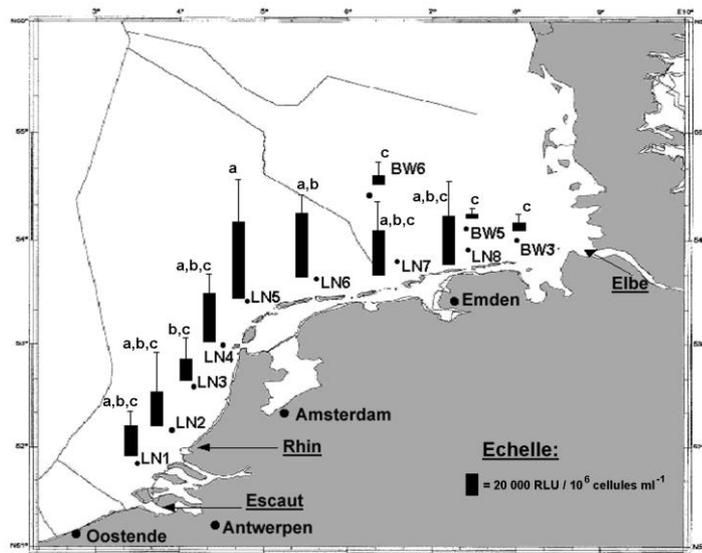


Fig. 28. Production d'IRO par les amœbocytes stimulés chez des astéries récoltées le long des côtes néerlandaises et allemandes. Les stations partageant la même lettre (a-e) ne sont pas significativement différentes.

3.5. Analyse intégrée

Les résultats obtenus pour le littoral belge et pour les plateaux continentaux néerlandais et allemand ont été soumis à des analyses multivariées. Dans un premier temps, les variables présentant les plus fortes corrélations ont été groupées par "hierarchical clustering" (Fig. 29). Ce groupement met en évidence une forte corrélation entre les concentrations en PCBs hautement chlorés dans les sédiments et dans le tégument des astéries, indiquant que ces PCBs accumulés dans les sédiments sont très probablement biodisponibles. Une analyse factorielle effectuée sur ces variables groupées pour les données des plateaux continentaux néerlandais et allemand indique une relation forte entre les concentrations métalliques dans le sédiment et dans les tissus de l'astérie et une opposition tout aussi forte entre d'une part ces concentrations métalliques et d'autre part la production de radicaux oxydants par les cellules immunitaires de l'astérie et la qualité du développement embryonnaire de l'oursin (Fig. 30). Ces résultats soulignent d'une part la biodisponibilité des métaux du sédiment, d'autre part leur implication dans les processus d'immunosuppression et d'embryotoxicité. Un groupement des stations

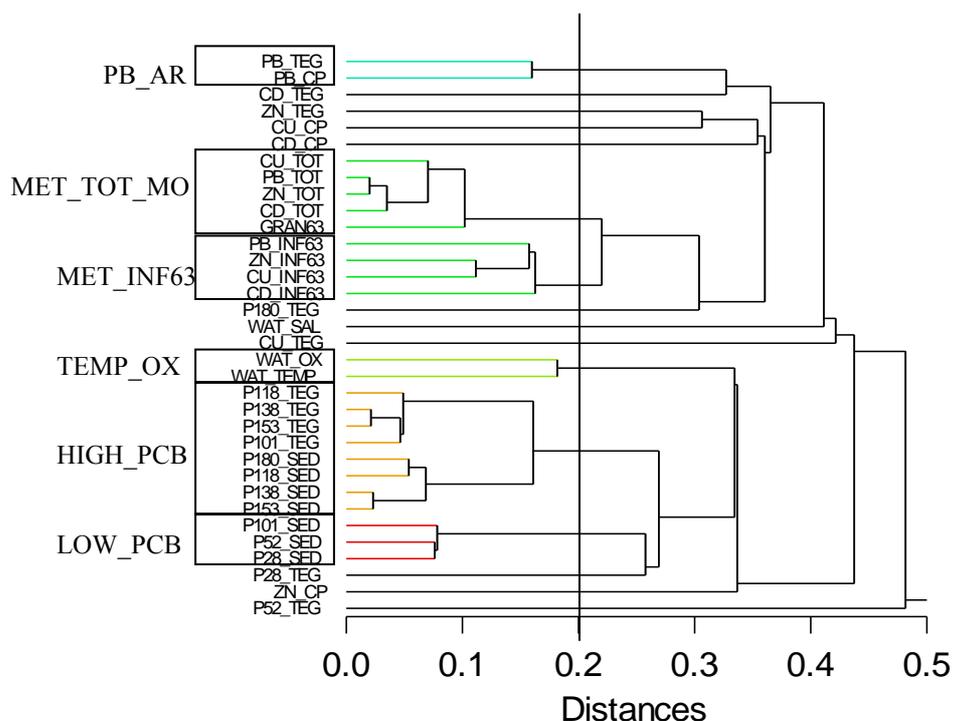


Fig. 29. Arbre de groupement des variables environnementales et de contamination. Les variables présentant une distance de Pearson inférieure à 0,2 furent groupées pour l'analyse factorielle. Six groupes furent déterminés: les concentrations en métal dans la fraction inférieure à 63 μ m des sédiments (MET_INF63), les concentrations en métaux dans la fraction totale des sédiments et le contenu en matière organique (MET_TOT_MO), le plomb dans le tégument et les caecums pyloriques des astéries (PB_AR), les concentrations en PCBs faiblement chlorés dans les sédiments (LOW_PCB), les concentrations en PCBs hautement chlorés dans les sédiments (HIGH_PCB) ainsi que la température de l'eau au niveau du fond et la concentration en oxygène (TEMP_OX). Les autres variables, qui ne furent pas groupées, sont la salinité de l'eau (WAT_SAL) et les concentrations en Cd, Zn, Cu et PCBs #28, 52 et 180 dans le tégument (TEG) et les caecums pyloriques (CP).

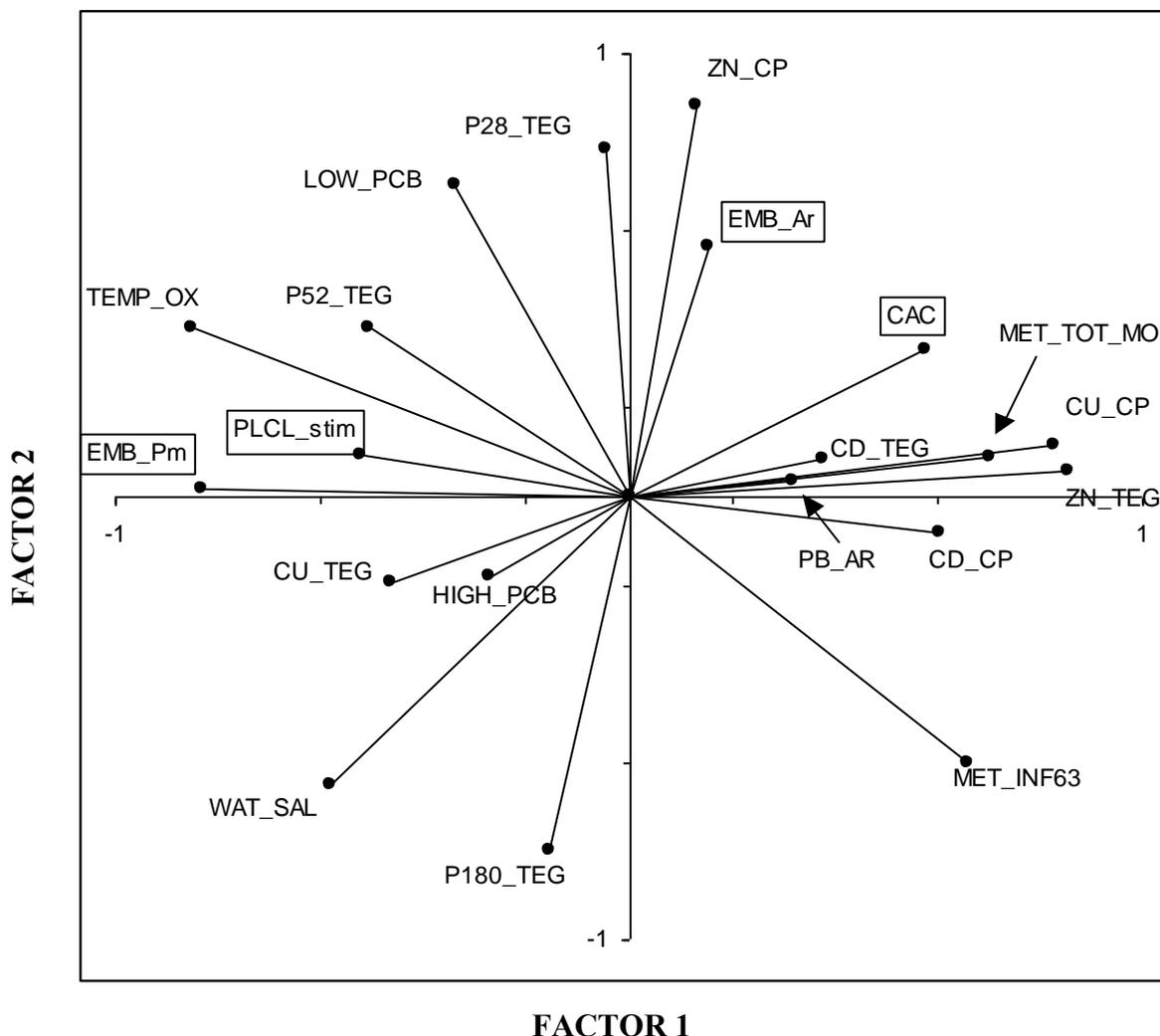


Fig. 30. Relations entre les variables biologiques, environnementales et de contamination. Toutes les variables furent utilisées dans une analyse factorielle utilisant la méthode des composantes principales. Abréviations: CAC: concentration totale en amœbocytes circulants (cellules immunitaires); EMB_Ar et EMB_Pm: taux de larves viables produites lors de tests d'embryotoxicité du sédiment utilisant des embryons d'*Asterias rubens* (Ar) ou de *Psammechinus miliaris* (Pm); PLCL_stim: production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène par des amœbocytes stimulés d'*Asterias rubens*. Les autres abréviations sont identiques à celles de la Figure 29.

("multidimensional scaling") indique que les stations atteintes sont principalement celles de la Baie allemande. Cette analyse a été publiée (Coteur et al. 2003c).

La même analyse a été appliquée aux données récoltées pour la côte belge (à une échelle spatiale beaucoup plus détaillée). L'analyse factorielle nécessite 3 axes pour rendre compte de plus de la moitié de la variation observée indiquant une situation

beaucoup plus complexe (Fig.31). Cette analyse a pu mettre en évidence (1) une relation entre les concentrations métalliques dans le sédiment et les concentrations en Cu et Zn dans les tissus de l'astérie, (2) une relation entre les concentrations en PCBs moyennement chlorés dans le sédiment et dans les tissus de l'astérie et (3) une opposition entre les concentrations en Cd, Pb et Cu dans l'astérie et l'activité phagocytaire de celle-ci. Un groupement des stations indique que les stations côtières sont les plus contaminées.

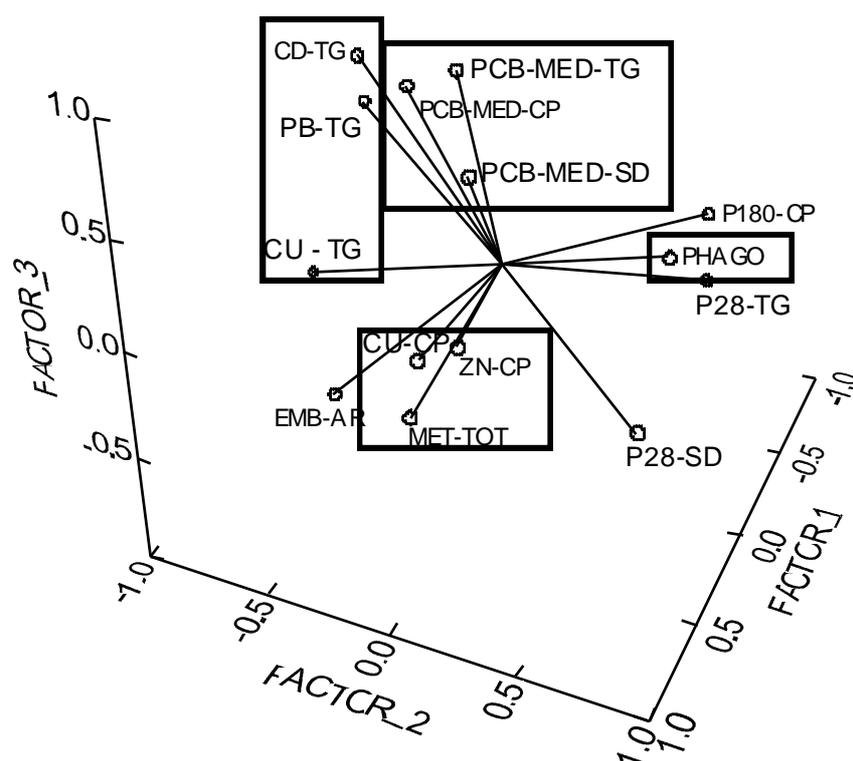


Fig.31. Relations entre les variables biologiques, environnementales et de contamination mesurées sur le plateau continental belge en 1998. PHAGO: activité phagocytaire des amœbocytes; les autres abréviations sont identiques à celles de la Figure 29.

4. Conclusions et Recommandations

En conclusion, il apparaît que:

- Les sédiments de Mer du Nord constituent une source biodisponible de métaux et PCBs
- Les sédiments de la Baie allemande et de la côte belge montrent une embryotoxicité significative
- Le système immunitaire des astéries prélevées dans la Baie allemande et le long de la côte belge est affecté
- Dans la Baie allemande, l'embryotoxicité et les effets sur le système

immunitaire sont corrélés aux concentrations métalliques dans le sédiment

- A la côte belge, les effets sur le système immunitaire semblent liés aux métaux biodisponibles; l'analyse est toutefois plus complexe et suggère l'effet d'autres contaminants

En conséquence, il y aurait lieu de:

- Contrôler la contamination des produits de la mer (poissons plats, crevettes, bivalves) récoltés dans les zones contaminées (en particulier dans le panache de l'Escaut) tant par la pêche professionnelle que par la récolte amateur
- Déterminer l'impact des contaminations sur les populations d'organismes benthiques situées dans ces zones afin d'évaluer les risques en terme de biodiversité et de stabilité des écosystèmes (en particulier les effets sur les espèces structurant les communautés biotiques).

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la Politique Scientifique Fédérale qui a financé la majeure partie de cette recherche. Les échantillonnages en mer n'auraient pu être réalisés sans l'aide des commandants et équipages du R.V. Belgica dont la gestion est assurée par l'Unité de Gestion du Modèle Mathématique de la Mer du Nord. Qu'ils en soient ici chaudement remerciés. Certains travaux présentés ici ont été réalisés en collaboration avec l'Agence Internationale pour l'Energie Atomique (Monaco). G. Coteur et D. Gillan d'une part, M. Warnau et Ph. Dubois d'autre part, sont ou étaient respectivement Chargés de Recherches et Chercheurs Qualifiés du Fonds National de la Recherche Scientifique. B. Danis a bénéficié d'une bourse de doctorat du Fonds pour la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture.

BIBLIOGRAPHIE

- Atlas E., T.Bidleman and S.C.Giam.1986. Atmospheric transport of PCBs to the oceans. In PCBs and the environment (edited by J.S.Waid), CRC Press Boca Raton, 1, Chap. 4, 79-100.
- Atuma S.S., C-E.Linder, O.Andersson, A.Bergh, L.Hansson and A.Wicklund-Glynn. 1996. Chemosphere, 33, 1459-1464 .
- Becker G.A., S.Dick and J.W.Dippner. Hydrography of the German Bight.1992. Mar.Ecol.Prog.Ser., 91, 9-18
- Beyer J., M.Sandvik, K.Hylland, E.Fjeld, E.Egaas, E.Aas, J.U.Skare and A.Goksøyr. 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L) exposed by caging to polluted sediments in Sorfjorden, Norway. Aquatic Toxicol., 36, 75-98 .
- Bjerregaard P. 1988. Effect of selenium on cadmium uptake in selected benthic invertebrates. Mar. Ecol. Prog. Ser. 48: 17-28
- Booij K. and C.Van den Berg. 1994. Comparison of techniques for the extraction of lipids and PCBs from benthic invertebrates. Bull.Enviroin.Toxicol., 53, 71-76.
- Boon J.P., M.B.van Zantvoort, M.J.M.A.Govaert and J.C.Duinker. 1985. Organochlorines in benthic polychaetes (*Nephtys* Spp.) and sediments from the southern North Sea. identification of individual PCB components. Neth.J.Sea Res., 19, 93-109 .
- Bright DA, Grundy SL & KJ Reimer.1995. Differential bioaccumulation of non-*ortho*-substituted and other PCB congeners in coastal Arctic invertebrates and fish. Environ. Sci. Technol. 29: 2504-2512
- Butler R, Chapman PM, van den Hurk P, Roddie B & JE Thain. 1992. A comparison of North American and West European oyster embryo-larval toxicity tests on North Sea sediments. Mar. Ecol. Prog. Ser. 91: 245-251.
- Chapman PM, Swartz RC, Roddie B, Phelps HL, van den Hurk P & R Butler.1992. An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. Mar. Ecol. Prog. Ser. 91: 253-264
- Clark R.B. 1997. Marine pollution. Charendon Press, Oxford.
- Cofino W.P., F.Smedes, S.A.de Jong, A.Abarnou, J.P.Boon, I.Oostingh, I.M.Davies, J.Klungsoyr, S.Wilhelmsen, R.J.Law, J.A.Whinnett, D.Schmidt and S.Wilson. 1992.Mar. Ecol. Prog. Ser., 91, 47-56 .
- Coteur G., De Becker G., Warnau M., Jangoux M. & Dubois Ph.2002a. Differentiation of immune cells challenged by bacteria in the common European starfish, *Asterias rubens* (Echinodermata) Eur. J. Cell. Biol. 81: 413-418.
- Coteur G., Warnau M., Jangoux M. & Dubois PH. 2002b. Reactive oxygen species (ROS) production by amoebocytes of *Asterias rubens* (Echinodermata). Fish Shellfish Immunol. 12: 187-200.
- Coteur G, Pernet Ph, Gillan D, Joly G, Maage A, Dubois Ph 2003a. Field contamination of the starfish *Asterias rubens* by metals. Part 1: short- and long- term accumulation along a pollution gradient. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2136-2144.
- Coteur G, Pernet Ph, Gillan D, Joly G, Dubois Ph. 2003b. Field contamination of the starfish *Asterias rubens* by metals. Part 2: Effects on cellular immunity. *Environ. Toxicol. Chem.* 22: 2145-2151
- Coteur G, Gosselin P, Wantier P, Chambost-Manciet Y, Danis B, Pernet Ph, Warnau M and Dubois Ph. 2003c. Echinoderms as bioindicators, bioassays and impact

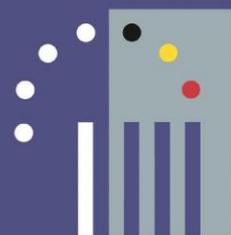
- assessment tools of sediment-associated metals and PCBs in the North Sea. Arch Environ Contam Toxicol. 45: 190-202.
- Coteur G, Corriere N, Dubois Ph. 2004. Environmental factors influencing the immune responses of the common European starfish (*Asterias rubens*). Fish Shellfish Immunol 16: 51-63
- Cofino W.P., F.Smedes, S.A.de Jong, A.Abarnou, J.P.Boon, I.Oostingh, I.M.Davies, J.Klungsoyr, S.Wilhelmsen, R.J.Law, J.A.Whinnett, D.Schmidt and S.Wilson. 1992. Mar. Ecol. Prog. Ser., 91, 47-56.
- Danis B. 1998. Mémoire de Licence, Université Libre de Bruxelles.
- Danis B, Cotret O, Teyssié JL, Fowler SW, Bustamante P & Warnau M. 2003 Delineation of PCB uptake pathways in a benthic sea star using a radiolabelled congener. Mar Ecol Prog Ser 253 :155-163;
- Danis B, Wantier P, Flammang R, Dutrieux S, Dubois Ph & Warnau M (submitted a). Contaminant levels in sediments and asteroids (*Asterias rubens* L., Echinodermata) from the Belgian coast and Scheldt estuary. Polychlorinated biphenyls & heavy metals.
- Danis B, Wantier P, Flammang R, Pernet P, Chambost-Manciet Y, Coteur G, Warnau M & Dubois Ph (submitted b). Bioaccumulation and effects of PCBs and heavy metals in sea stars (*Asterias rubens*, L.) from the North Sea.
- Davoult D, Dewarumeu JM, Prygiel J & A Richard. 1988. Benthic communities map of the French part of the North Sea. Station marine de Wimereux, URA-CNRS 1363, Univ. Sciences & Techniques de Lille Flandres Artois.
- Den Besten PJ, Herwig HJ, Zandee DI & PA Voogt.1989. Effects of cadmium and PCBs on reproduction of the sea star *Asterias rubens*: aberration in the early development. Ecotoxicol. Environ. Saf. 18: 173-180.
- Den Besten P.J., J.M.L.Elenbaas, J.R.Maas, S.J.Dieleman, H.J.Herwig and P.A.Voogt. 1991. Effects of cadmium and polychlorinated-biphenyls (Clophen A50) on steroid-metabolism and cytochrome-P-450 monooxygenase system in the sea star *Asterias-rubens* L. Aquatic Toxicol., 20, 95-110 .
- Den Besten P.J., Valk S., van Weerlee E., Nolting R.F., Postma J.F., Everaarts J.M. 2001.Bioaccumulation and biomarkers in the sea star *Asterias rubens* (Echinodermata : Asteroidea) : a North Sea field study. Mar. Environ. Res., 51, 365-387 .
- Environment Canada.1992. Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). Report EPS 1/RM/27. Environment Canada, Ottawa, ON.
- Everaarts JM, Otter E & CV Fischer.1990. Cadmium and polychlorinated biphenyls: different distribution patterns in North Sea benthic biota. Neth. J. Sea Res. 26: 75-82.
- Everaarts JM & CV Fischer.1989. Micro contaminants in surface sediments and macrobenthic invertebrates of the North sea. NIOZ- Rapport 1989 (6). Nederlands Instituut voor Onderzoek der Zee. North Sea Benthos Survey (ICES), 44 pp.
- Fournier M., Cyr D., Blakley B., Boermans H. & Brousseau P. 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. Amer. Zool. 40: 412-420.
- Fugere N., Brousseau P., Krzysztof K., Coderre D. & Fournier M. 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). Toxicology 109 : 157-166.
- Goerke H. and K.Weber. 1998. The bioaccumulation pattern of organochlorine residues in *Lanice conchilega* (Polychaeta) and its geographical variation between the English Channel and the German Bight. Chemosphere, 37, 1283-1298

- Goerlitz D.F. and Law L.M. 1971. Bull.Environ.Contam.Toxicol, 6, 9-10.
- Gustafsson O., J.Axelsson, D.Broman, M.Eriksson and H.Dahlgaard. 2001.Process-diagnostic patterns of chlorobiphenyl congeners in two radiochronologically characterized sediment cores from the northern Baffin Bay. Chemosphere, 45, 759-766
- Hope B., S.Scatolini, E.Titus and J.Cotter. 1997. Distribution patterns of polychlorinated biphenyl congeners in water, sediment and biota from Midway Atoll (North Pacific Ocean). Mar.Pollut.Bull., 34, 548-563 .
- Hostens K & O Hammerlynck.1994. The mobile epifauna of the soft bottoms in the subtidal Oosterschelde estuary: structure, function and impact of the storm-surge barrier. Hydrobiologia 282/283: 479-496.
- Kobayashi N.1984. Marine ecotoxicological testing with echinoderms. In: Persoone G, Jaspers E, Claus C (eds) Ecotoxicological testing for the marine environment, vol. 1. State Univ. Ghent and Inst. Mar. Scient. Res., Bredene, pp. 341-405.
- Kobayashi N.1995. Bioassay data for marine pollution using echinoderms. In: Cheremisinoff PN (ed) Environmental control technology. Vol 9, Gulf Publ., Houston, p 539-609.
- Kröncke I.1987. Lead and cadmium contents in selected macrofauna species from the Dogger Bank and the eastern North Sea. *Helgoländer Meeresunters.* 41: 465-475
- Kröncke I & R Knust (1995) The Dogger Bank: a special ecological region in the central North Sea. *Helgoländer Meeresunters.* 49: 335-353.
- Lindley JA, Gamble JC & HG Hunt.1995. A change in the zooplankton of the central North Sea (55° to 58° N): a possible consequence of changes in the benthos. Mar. Ecol. Prog. Ser. 119: 299-303.
- McFarland V.A., J.U.Clarke. 1989. Environmental occurrence, abundance and potential toxicity of polychlorinated biphenyl congeners – Considerations for a congener-specific analysis. *Environ.Health Perspect.*, 81, 225-231 .
- Murdoch MH, Chapman PM, Norman DM, Quintino VM. 1997. Spiking sediment with organochlorines for toxicity testing. *Environ Toxicol Chem* 16: 1504-1509.
- NSTF-North Sea Task Force.1993. North Sea Quality Status Report 1993. Oslo and Paris Commissions, London, Olsen & Olsen, Fredensborg, Denmark.
- Oehme M., M.Schlabach, R.Kallenborn, J.E.Haugen. 1996. Sources and pathways of persistent polychlorinated pollutants to remote areas of the North Atlantic and levels in the marine food chain : A research update. *Sci.Tot.Environ.*, 186, 13-24 .
- Opperhuizen A., E.W.Veide, F.A.P.C.Gobas, D.A.K.Liem, J.M.Steen and O.Hutzinger. 1985. Relationship between bioconcentration in fish and steric factors of hydrophobic chemicals. *Chemosphere*, 14, 1871-1896 .
- Opperhuizen A. and R.C.A.Stokkel. 1988. Influence of contaminated particles on the bioaccumulation of hydrophobic organic micropollutants in fish. *Environ. Pollut.*, 51, 165-177 .
- OSPAR 2000. Quality Status Report. 2000. Region II. Greater North Sea. London, UK.
- Pagano G, Cipollaro M, Corsale G, Esposito A, Ragucci E, Giordano GG & NM Trieff 1986. The sea urchin: Bioassay for the assessment of damage from environmental contaminants. In: Cairns JJr (ed.) Community toxicity testing, ASTM STP 920. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 66-92.
- Picer N. and M.Picer. 1986. Chlorinated insecticides and PCBs in asteroidea and holothuroidea species from Rijeka Bay, Yugoslavia. *Sci.Tot.Environ.*, 57, 39-47 .
- Pruell R.J., B.K.Taplin, D.G.McGovern, R.McKinney and S.B.Norton. 2000. Organic contaminant distributions in sediments, polychaetes (*Nereis virens*) and American

- lobster (*Homarus americanus*) from a laboratory food chain experiment. *Mar. Environ. Res.*, 49, 19-36.
- RVZ .1997. Mededeling van het Rijksstation voor Zeevisserij (CLO Gent).
- Schweitzer LE, Bay SM, Suffet IH. 2000. Dietary assimilation of a polychlorinated biphenyl in adult sea urchins (*Lytechinus pictus*) and maternal transfer to their offspring. *Environ Toxicol Chem* 19:1919-1924.
- Shaw G.R. and D.W.Connell. 1984. Physicochemical properties controlling polychlorinated biphenyl (PCB) concentrations in aquatic organisms. *Environ.Sci.Technol.*, 18, 18-23 .
- Sorensen M & P Bjerregaard.1991.Interactive accumulation of mercury and selenium in the sea star *Asterias rubens*. *Mar. Biol.* 108: 269-276.
- Stebbing ARD, Dethlefsen V & M Carr. 1992. Biological effects of contaminants in the North Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 91 (Special Edition).
- Temara A, Warnau M, Ledent G, Jangoux M, Dubois Ph. 1996b. Allometric variations in heavy metal bioconcentration in the asteroid *Asterias rubens* *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 98-105.
- Temara A, Ledent G, Warnau M, Paucot H, Jangoux M, Dubois Ph. 1996. Experimental cadmium contamination of *Asterias rubens* L. (Echinodermata). *Mar. Ecol. Prog.Ser.* 140: 83-90.
- Temara A, Dubois Ph, Langston WJ. 1997a. Quantification of metallothioneins in the common asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata) exposed experimentally or naturally to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 38: 17-34.
- Temara A, Nguyen QA, Hogarth AN, Warnau M, Jangoux M, Dubois Ph. 1997b. High sensitivity of skeletogenesis to Pb in the asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata). *Aquat. Toxicol.* 40: 1-10.
- Temara A, Warnau M, Jangoux M, Dubois Ph. 1997c. Factors influencing the concentrations of heavy metals in the asteroid *Asterias rubens* L. (Echinodermata). *Sci. Total Environment* 203: 51-63.
- Temara A, Aboutboul P, Warnau M, Jangoux M, Dubois Ph. 1998a. Uptake and fate of lead in the common asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata). *Water Air Soil Pollut.* 102: 201-208.
- Temara A, Skei J., Gillan D, Warnau M, Jangoux M, Dubois Ph. 1998b. Validation of the asteroid *Asterias rubens* (Echinodermata) as a bioindicator of spatial and temporal trends of Pb, Cd, and Zn contamination in the field. *Mar. Environ. Res.* 45: 341-356.
- Temmerman I.1988. De kwaliteit van het Scheldesediment. *Water* 43: 200-204.
- Warnau M, Ledent G, Temara A, Jangoux M, Dubois Ph. 1995. Experimental contamination of the echinoid *Paracentrotus lividus* by cadmium: Influence of exposure mode and distribution of the metal in the organism. *Mar.Ecol. Prog.Ser.* 116: 117-124.
- Warnau M, Iaccarino M, De Biase A, Romanelli R, Temara A, Jangoux M, Dubois Ph, Pagano G. 1996. Spermioxicity and embryotoxicity of heavy metals in the echinoid *Paracentrotus lividus*. *Environ. Toxicol. Chem.* 15: 1931-1936.
- Warnau M, Teyssié JL & SW Fowler. 1997. Cadmium bioconcentration in the echinoid *Paracentrotus lividus*: influence of the cadmium concentration in sea water. *Mar. Environ. Res.* 43: 303-314.
- Zar JH.1996. *Biostatistical Analysis*. (3rd edition). Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, N. J., USA.



POLITIQUE SCIENTIFIQUE FÉDÉRALE



RUE DE LA SCIENCE 8
1000 BRUXELLES
www.belspo.be