

## TOXICITE AIGUE ET DISTRIBUTION TISSULAIRE DU CUIVRE LORS D'INTOXICATION SUBAIGUE CHEZ LA TRUITE ARC-EN-CIEL (*SALMO GAIRDNERI*)

Mohamed FEKHAOUI<sup>1</sup>, Alain DEVAUX<sup>2</sup> et Gérard KECK<sup>2</sup>

محمد فخاوي، ألان دوفوه وجيرار كيك

### ملخص

السمية الحادة والتوزيع النسيجي للنحاس عند حدوث تسمم شبه حاد لدى التروتة القزحية.

درست السمية الحادة والتوزيع النسيجي وتراكم الكروم (الذي قدم في شكل ملح حامض الكروميك) عند تبين من خلال التوزيع النسيجي للنحاس، بعد عرض دام 7 أيام بكثافة قدرها 0,5 ملغرام في اللتر، تراكم انتقائي لهذه المادة في الخياشم أكثر منه في الكبد والكلية، في حين يظهر أن الوجود الطبيعي للنحاس في الكبد يؤثر على تراكمه في هذا العضو.

### RESUME

La toxicité aiguë du cuivre sous sa forme soluble ( $\text{Cu}^{2+}$ ) et l'influence de la dureté de l'eau sur celle-ci sont étudiées chez la truite arc-en-ciel (*Salmo gairdneri*). La distribution tissulaire du cuivre après exposition à moyen terme (7 jours) à une concentration de 0,5 mg/l de  $\text{Cu}^{2+}$  montre une accumulation sélective de cet élément dans les branchies par rapport au foie et au rein. Cependant, la présence naturelle du cuivre dans le foie semble affecter d'une manière importante son accumulation dans cet organe.

### SUMMARY

Acute toxicity and tissular distribution of copper during subacute intoxication of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*). The acute toxicity of copper and the hardness influence were studied on rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Distribution and retention of copper after short-term exposure (7 days) to 0,5 mg/l of  $\text{Cu}^{2+}$  show a selective accumulation in gills in comparaison with liver and kidney. However, the natural presence of copper in liver affects its accumulation in this organ.

### INTRODUCTION

Le cuivre est un élément essentiel, présent dans de nombreuses protéines et métallo-enzymes qui sont impliquées dans les réactions d'oxydo-réductions avec l'oxygène, dans la production d'énergie et d'autres processus physiologiques. Comme tous les métaux, il a une grande affinité pour les radicaux thiols (SH) des acides aminés soufrés. Dans l'organisme, le foie retient essentiellement plus le cuivre que les autres métaux. Chez l'homme, dans le foie environ 65% du cuivre sont présents dans la fraction soluble et 8% dans les mitochondries. Les métallo-thionéines, connues

<sup>1</sup> Département de Zoologie et Ecologie Animale, Institut Scientifique, B.P. 703, Rabat-MAROC.

<sup>2</sup> Laboratoire de Pharmacie-Toxicologie, Ecole Nationale Vétérinaire, Lyon, FRANCE.

pour leur grande capacité de stockage des métaux, représentent des sites de fixation privilégiés du cuivre (EVANS, 1973). Chez les poissons, la teneur naturelle du foie en cuivre maximale observée chez *Noemacheilus barbatulus* est de l'ordre de 156 ppm (SOLBE & COOPER 1967). Elle est de l'ordre de 180 ppm chez la truite (CALAMARI & MARCHETTI, 1973). Chez *Scardinius erythrophthalmus* elle est beaucoup plus faible de l'ordre de 9 ppm (VAN HOFF & VANSAN, 1981). Cette teneur est susceptible de varier beaucoup selon l'espèce et le régime alimentaire. De même, les effets toxiques du cuivre vis à vis des organismes aquatiques varient en fonction des espèces et des conditions physico-chimiques du milieu. Ils concernent des niveaux et des degrés différents chez un même individu; perturbations de l'osmorégulation, essentiellement chez les poissons d'eau douce qui sont des hyper-osmorégulateurs (LEWIS & al., 1971), changement du rythme respiratoire (O'HARA 1971) effet sur le comportement (KLEEREKOPER & al., 1972), effet sur la perception (HARA & al., 1976).

L'évaluation de la toxicité aiguë de nombreux polluants, notamment le cuivre, repose généralement sur la détermination des  $CL_{50}$ . Cependant, au cours de ces dernières années de nombreux auteurs se sont penchés sur un aspect important de cette toxicité. Il s'agit de l'étude de la cinétique d'accumulation des polluants, principalement les métaux lourds, dans l'organisme lors d'expositions à court et à moyen terme permettant ainsi de mettre en évidence l'organe d'accumulation préférentielle de ces éléments toxiques. Partant de ce point de vue, nous essaierons dans ce travail d'étudier la cinétique de répartition du cuivre chez la truite arc-en-ciel lors d'une intoxication subaiguë. Comme préalable à cette étude, nous estimerons la toxicité aiguë du cuivre par la détermination des  $CL_{50}$  24-72 et 96h ainsi que l'influence de la dureté de l'eau sur la solubilité de ce métal et par conséquent sur sa toxicité (modification de la biodisponibilité du cuivre).

## TOXICITE AIGUE ET INFLUENCE DE LA DURETE

### Matériels et méthodes

► Une série de solutions contenant respectivement 0,06-0,3-0,8-3 et 8 mg/l de  $Cu^{2+}$  est constituée; les différentes concentrations sont obtenues à partir de la dissolution du sulfate pentahydraté ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ) dans une eau de dureté totale 300 ppm de  $CaCO_3$ . Elles sont réparties dans 10 bacs d'un volume de 14L, à raison de deux bacs pour chaque solution, plus deux bacs témoins contenant seulement de l'eau. Les poissons ont été acclimatés durant une semaine aux conditions du laboratoire et mis à jeûn 48h avant le début de l'essai. Dans chaque bac 4 truites sont introduites, soit un total de 8 poissons par concentration. Le brassage et l'aération sont assurés par des diffuseurs d'air. L'ensemble est placé dans un grand bac de 1000L rempli d'eau renouvelée pour limiter les variations de température. Les morts sont récupérés et la mortalité enregistrée chaque heure. Les observations concernant le comportement, les différents symptômes que peuvent présenter les truites sont relevés au cours de l'essai ainsi que le pH et la température de l'eau des bacs.

### RESULTAT ET DISCUSSION

Les résultats de la répartition de la mortalité en fonction du temps pour les différentes concentrations de cuivre utilisées, sont donnés dans le tableau I. On observe une mortalité d'autant plus importante que les concentrations en cuivre sont plus élevées. Le taux de mortalité atteint 100% après un temps d'exposition de 48h pour les fortes concentrations (3 et 8mg/l). Pour

Les autres concentrations et après 93h d'exposition, le taux de mortalité ne dépasse pas 62,5% et 25% respectivement pour les concentrations 0,8 0,3 et 0,06 mg/l de Cu<sup>2+</sup>. Afin de stabiliser la variance de la distribution de la mortalité (%M), nous avons effectué la transformation angulaire :  $\text{arc sin } \sqrt{\frac{\%M}{100}}$ . Il ressort de cette représentation graphique (fig. 1) :

Temps (h)	17	19	21	23	40	42	47	66	88	93
concentration (mg/l de Cu <sup>2+</sup> )										
C <sub>1</sub> = 8	12.5		50		87.5		100			
C <sub>2</sub> = 3	12.5	25		37.5	87.5	100				
C <sub>3</sub> = 0.8					40			50	62.5	
C <sub>4</sub> = 0.3			12.5						25	
C <sub>5</sub> = 0.06									12.5	25

Tab. I : Répartition de la mortalité (%) en fonction du temps pour les différentes concentrations en cuivre utilisées.

- les droites C<sub>1</sub> et C<sub>2</sub> correspondant aux concentrations 8 et 3 mg/l de Cu<sup>2+</sup> présente des pentes relativement proches.
- les pentes des droites C<sub>3</sub> et C<sub>4</sub>, qui correspondent aux concentrations 0,8 et 0,3 mg/l de Cu<sup>2+</sup>, sont beaucoup plus faibles que celles des précédentes.

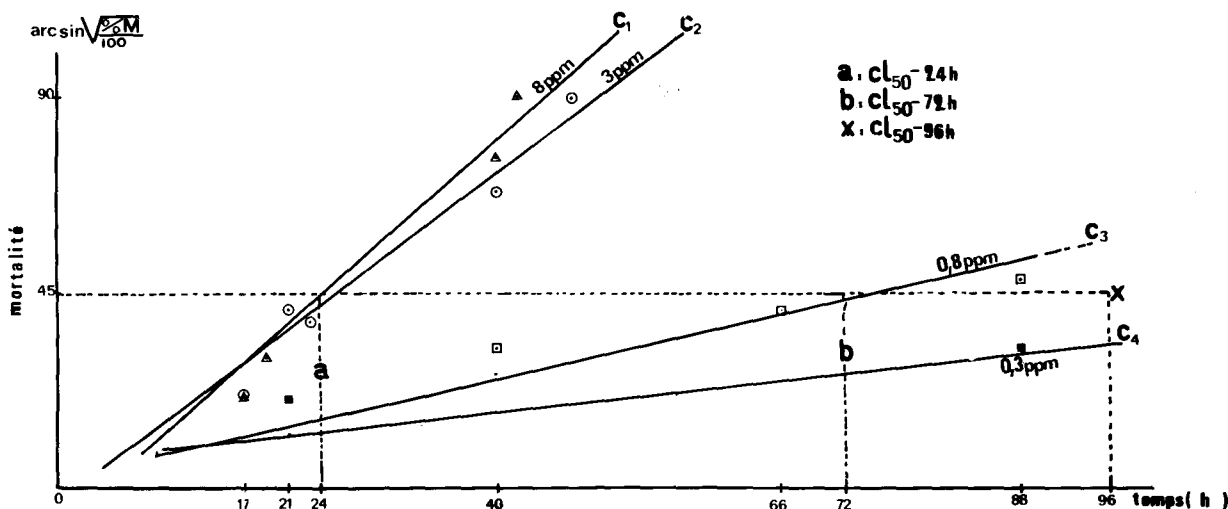


Fig. 1 : Cinétique de mortalité (arc sin √(%M/100)) des concentrations 0,3 ; 0,8 ; 3 et 8 ppm de Cu<sup>2+</sup>

Ceci montre une mortalité correspondante progressive. Cet aspect important correspond à l'effet cumulatif qui se produit dans le cas des divers métaux lourds, agents-cumulatifs. Ceci s'explique notamment par une absorption continue du cuivre (sous forme de Cu<sup>2+</sup>) à des concentrations faibles jusqu'au seuil critique associé à l'effet lethal. Ceci est illustré par les CL<sub>50</sub> calculées à partir de la figure 1 (tab. II).

CL <sub>50</sub> -24h	CL <sub>50</sub> -72h	CL <sub>50</sub> -96h
3	0.8	0.3-0.8

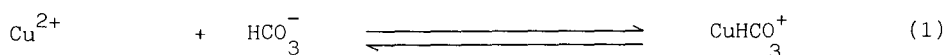
Tab. II : Concentrations Lethales 50% pour les truites arc-en-ciel en mg/l de Cu<sup>2+</sup>.

La CL<sub>50</sub>-24h obtenue est de l'ordre de 3mg/l, alors que les CL<sub>50</sub>-72 et 96h sont beaucoup plus faibles. Elles sont de l'ordre de 0,8 et 0,3-0,8 mg/l respectivement. La toxicité du cuivre vis à vis des poissons, notamment la truite, a été étudiée par de nombreux auteurs. Ainsi CALAMARI et MARCHETTI (1973) ont retrouvé une CL<sub>50</sub>-96h très proche de celle retrouvée dans la présente étude et chez la même espèce, de l'ordre de 0,83 mg/l de Cu<sup>2+</sup>. Généralement, l'effet toxique du cuivre vis

à vis des organismes aquatiques peut se produire à des niveaux et des degrés différents. Les poisons qui sont des hyperosmorégulateurs, freinent la perte ionique et absorbent l'eau. Les ions ainsi absorbés sélectivement à travers l'épithélium branchial sont retenus dans la vessie (RENFO et al., 1973). Cependant, les branchies sont, le premier site de l'osmorégulation et de la respiration. De ce fait, elles sont très vulnérables aux lésions car elles sont en contact direct avec les toxiques. Les perturbations de l'osmorégulation, induites par le cuivre à la suite des altérations importantes de la structure branchiale, sont reflétées par la composition ionique du sang (LEWIS et al., 1971, O'CONNOR et FROMM, 1975). Outre l'effet sur l'osmorégulation, le cuivre a un effet sur le rythme respiratoire. Ainsi une concentration de 2,4 mg/l de  $\text{Cu}^{2+}$  fait augmenter le rythme respiratoire de *Lepomis macrochirus* (O'HARA, 1971). Cette élévation de la fréquence de ventilation tend à augmenter l'apport en oxygène, suite à une défaillance dans l'échange gazeux.

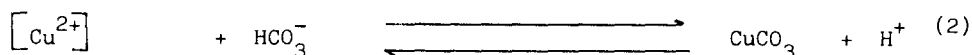
### INFLUENCE DE LA DURETE SUR LA TOXICITE DU CUIVRE

D'après la figure 1, les concentrations 8 et 3 mg/l de  $\text{Cu}^{2+}$  donnent lieu à la même cinétique de mortalité. De plus, dans le bac contenant la solution de 8 mg/l de  $\text{Cu}^{2+}$ , une forte précipitation de couleur bleuâtre a été observée. Ces deux faits nous laissent penser à une interférence de certains paramètres du milieu, essentiellement la dureté, avec le cuivre dissous. Généralement la toxicité des métaux lourds est plus importante dans une eau douce que dans une eau dure. Elle est liée directement à leur solubilité qui dépend de la concentration en ions bicarbonates. Dans le cas du cuivre, les équilibres possibles entre le  $\text{Cu}^{2+}$  et le bicarbonate sont les suivants (d'après SCAIFE, 1957) :



la constante d'équilibre

$$K_1 = \frac{[\text{CuHCO}_3^+]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{HCO}_3^-]}$$



$$\text{d'où} \quad K_2 = \frac{[\text{CuCO}_3][\text{H}^+]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{HCO}_3^-]}$$

d'après les équations (1) et (2), la concentration en cuivre totale est :

$$[\text{Cu}_t] = [\text{Cu}^{2+}] + [\text{CuCO}_3] + [\text{CuHCO}_3^+]$$

$$\frac{K_1 + K_2}{[\text{H}^+]} = \frac{[\text{Cu}_t] - [\text{Cu}^{2+}]}{[\text{Cu}^{2+}][\text{HCO}_3^-]}$$

Cet équilibre dépend étroitement du pH. Le cuivre en solution existe donc sous la forme ionique  $\text{Cu}^{2+}$  et la forme insoluble  $\text{CuCO}_3$  avec libération d'un ion hydrogène.

Ainsi la présence du cuivre sous sa forme libre dépend essentiellement de la concentration en ions bicarbonates. BRUNGS et al. (1976) ont observé que les limites de tolérance (TL) chez le vairon *Phoxinus phoxinus*, varient en fonction de la dureté comme le montre le tableau III :

En passant d'une dureté de 148 ppm à 360 ppm, la limite de tolérance augmente d'une manière importante pour le cuivre total ( $Cu_t$ ). Par contre elle a peu varié pour le cuivre dissous ( $Cu_d$ ). Nous en déduisons que la majorité de ce dernier a été complexée sous une forme insoluble, ce qui explique l'augmentation importante de la  $TL_{96}$  du cuivre total.

dureté totale (ppm $CaCO_3$ )	TL <sub>96</sub> (limite de tolérance après 96 h d'exposition)	
	( $Cu_t$ )	( $Cu_d$ )
148	1.6	0.6
360	21	0.96

Tab. III : Variation de la limite de tolérance (TL) en fonction de la dureté de l'eau chez le vairon (*Phoxinus phoxinus*).

Ces observations nous permettent de conclure, qu'au cours de nos essais, une partie du cuivre dissous à la concentration 8 mg/l, dans une eau de dureté totale de 300 ppm de  $CaCO_3$  à pH 8,5 (tab. IV), est précipitée sous forme de carbonate insoluble. Ceci pourrait expliquer la cinétique de mortalité identique pour les concentrations 3 et 8 mg/l de  $Cu^{2+}$ . La complexation du cuivre influence directement sur sa disponibilité vis à vis des organismes aquatiques, donc réduit sa toxicité.

jours	1er	2ème	3ème	4ème	5ème
Température (°C)	-	8	8	10	10.5
pH	8.5	8.1	8.2	8.2	8.2

Tab. IV : Variations de la température et du pH au cours des différents essais.

## TOXICITE SUBLETHALE ET CINETIQUE D'ACCUMULATION DU CUIVRE

### MATERIELS ET METHODES

Des truites arc-en-ciel de 40-50 g sont utilisées. Elles sont acclimatées durant une semaine et mises à jeûn 48 h avant l'expérimentation. Trois lots de 50 truites chacun sont formés :

- 1 lot témoin,
- 2 lots expérimentaux (essai 1 et 2) exposés à 0,5 mg/l de  $Cu^{2+}$

Chaque bassin contient 100 litres d'eau d'une dureté de 300 ppm de  $CaCO_3$ . L'oxygénation et le brassage sont assurés par aération artificielle. Des prélèvements de 5 poissons sont effectués quotidiennement dans les trois bassins pendant 7 jours et les individus sacrifiés. Les poissons sont examinés et autopsiés. Les organes, foie, rein et branchies sont regroupés par "pools" de 5 poissons. Les teneurs en cuivre sont déterminées par dosage en spectrophotométrie d'absorption atomique, après une minéralisation préalable au four à 550°C et reprise des cendres avec un mélange d'acide nitro-chlorhydrique.

### RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des analyses d'organes (foie, rein et branchies) sont représentés dans les tableaux V, VI, VII et les figures 2,3 et 4. Toutes les valeurs sont exprimées en ppm de poids sec. Les figures 2,3 et 4 illustrent les relations entre les teneurs en cuivre dans les différents organes et le temps d'exposition. Il est à noter qu'après 7 jours d'exposition une mortalité brutale a été enregistrée pour l'ensemble des poissons.

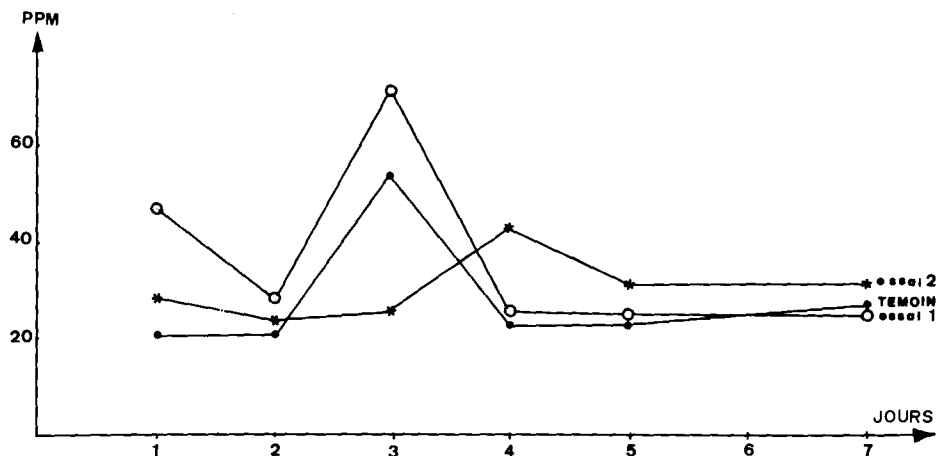


Fig. 2 : Variation de la teneur du rein (en ppm de cuivre/poids sec) dans l'essai 1 et 2 durant 7 jours d'exposition.

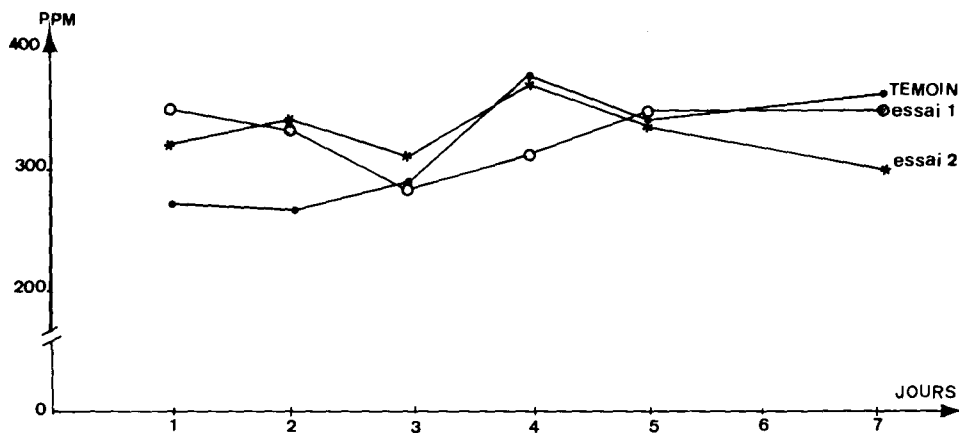


Fig. 3 : Variation de la teneur du foie (en ppm de cuivre/poids sec) dans l'essai 1 et 2 durant 7 jours d'exposition.

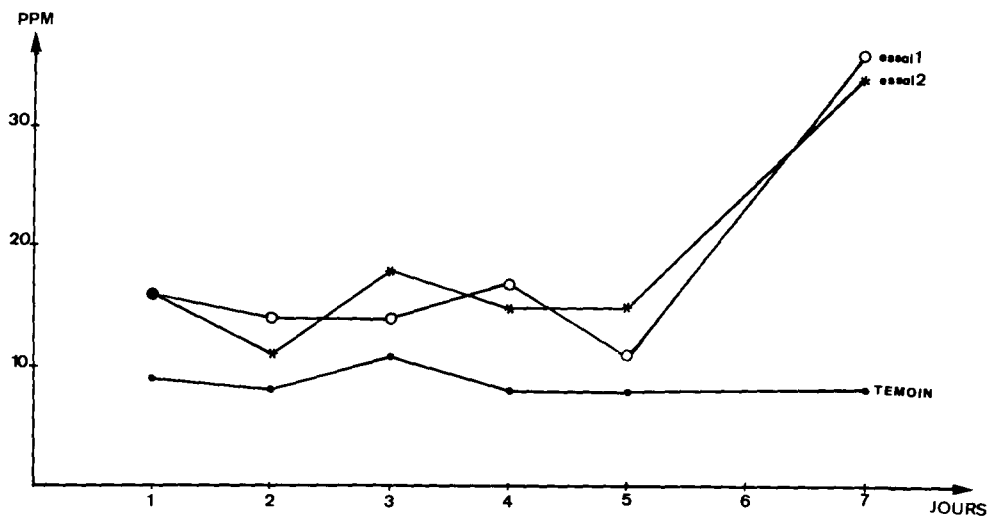


Fig. 4 : Variation de la teneur des branchies (en ppm de cuivre/poids sec) dans l'essai 1 et 2 durant 7 jours d'exposition.

## Cinétique d'accumulation du foie et du rein

Au vu des valeurs enregistrées pour ces deux organes par rapport à celles du témoin, aussi bien dans l'essai 1 que dans l'essai 2 (tabl. VI et VII), il semble que l'accumulation du cuivre soit très faible et peu significative. Ainsi dans le foie (fig. 3), les teneurs mesurées au premier et au deuxième jour (349 ppm essai 1 et 321 ppm essai 2) sont identiques à celles du cinquième et septième jour. Le rein (fig. 2) se caractérise, lui aussi, par une constance de sa teneur. Une très faible augmentation du taux d'accumulation peut être observée notamment dans l'essai 2 entre le quatrième et le septième jour, mais elle reste peu significative.

Par ailleurs, il faut souligner que les fluctuations observées sont dues probablement à des incertitudes liées à la méthode analytique et surtout à des variations individuelles dans les différents lots, du fait notamment, de la présence naturelle du cuivre à des taux élevés dans le foie (de l'ordre de 350 ppm). Cette teneur endogène varie de façon très importante selon l'espèce, l'âge et la nourriture. Chez le saumon coho, cette teneur est de l'ordre de 1 ppm (Mc CARTER et al., 1982), par contre chez *Scardinius erythrophthalmus*, elle est de 7 ppm (VAN HOOFF et VAN SAN, 1981). Chez l'anguille *Anguilla anguilla*, elle est plus élevée, 17 ppm (NOEL-LAMBOT et al., 1978). Cette variation met en relief l'intérêt de la connaissance des teneurs endogènes des organes à étudier avant toute évaluation d'une contamination par des agents polluants, principalement les métaux lourds. L'absence d'accumulation du cuivre au niveau du foie et du rein peut être liée soit à une élimination importante de ce métal, soit à un contrôle du passage du cuivre au niveau des branchies par conséquent à une faible absorption à travers l'épithélium branchial.

## Cinétique d'accumulation des branchies

Les résultats obtenus pour les deux essais sont représentés dans le tableau V et la fig. 4. La teneur endogène du cuivre dans les branchies est très faible par rapport à celle du foie. Elle est de l'ordre de 8 à 11 ppm.

Après 24h d'exposition et pour les deux essais, le taux d'accumulation passe d'une valeur de 8 ppm (témoin) à une valeur de 16 ppm après quoi il reste constant durant les cinq jours d'exposition suivants. Après cette phase de constance, les teneurs augmentent d'une manière importante pour passer à 34 ppm (essai 2) et 36 ppm (essai 1) (fig. 4). Par ailleurs il est à rappeler que cette augmentation importante a été accompagnée d'une mortalité brutale. La constance des teneurs branchiales, suggère une absorption moins efficace ou une élimination rapide et importante. Cette

x=jours	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Témoin	8	8	11	8	8	-	8
Essai 1	16	14	14	17	11	-	36
Essai 2	16	11	18	15	15	-	34

Tab. V : Variation de la teneur des branchies en cuivre (PPM/poids sec) en fonction du temps chez le témoin et les lots expérimentaux.

x=jours	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Témoin	278	261	291	377	339	-	363
Essai 1	349	334	284	295	344	-	347
Essai 2	321	341	309	371	338	-	310

Tab. VI : Variation de la teneur du foie (PPM/poids sec) en fonction du temps chez le témoin et les lots expérimentaux.

x=jours	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7
Témoin	21	21	54	23	23	-	27
Essai 1	47	29	72	26	25	-	25
Essai 2	29	24	26	43	31	-	31

Tab. VII : Variation de la teneur du rein (PPM/poids sec) en fonction du temps chez les lots expérimentaux et le témoin.

deuxième hypothèse est supportée par les observations de HILTON et *al.* (1982), suivant lesquelles le taux d'élimination rénal augmente d'une manière importante après injection de solutions métalliques dont le cuivre, chez la truite. Cependant, le fait que le cuivre ait persisté durant cette période, suite à l'accumulation initiale peut être dû soit à une chélation par le mucus très riche en protéines et sa précipitation au niveau des branchies, soit à une fixation au niveau du tissu branchial sans effet apparent. En exposant des truites arc-en-ciel à une concentration de 0,4 mg/l de  $\text{Cu}^{2+}$  pour une durée de 120h, CALAMARI et MARCHETTI (1973) ont obtenu les résultats représentés dans le tab. VIII.

	sang	foie	rein	branchies
témoin	0.6	180	2.29	1.08
Lot expérimental	1.54	190	5.40	16.04

Tab. VIII : Cinétique d'accumulation du cuivre chez la truite arc-en-ciel (d'après CALAMARI & MARCHETTI, 1973)

Ces résultats montrent que le cuivre s'accumule d'une façon importante au niveau des branchies avec des teneurs relativement élevées par rapport aux autres organes. Deux autres points importants sont à signaler, l'absence d'accumulation du cuivre dans le sang et la teneur endogène très élevée du foie. Ces observations sont en accord avec nos résultats et ceux de VAN HOOFF et VAN SAN (1981) chez l'espèce *Scardinius erythrophthalmus*.

	branchies	foie	rein
témoin	6	7	6
Lot expérimental	40	20	28

Tab. IX : Cinétique d'accumulation du cuivre cf. *scardinius erythrophthalmus* (d'après VAN HOOFF & VAN SAN, 1981).

Exposée à une concentration subléthale de 0,5 mg/l  $\text{Cu}^{2+}$  pour 21 jours, cette espèce montre des teneurs importantes dans les branchies moindre dans le foie et le rein (tab. IX) :

Ainsi donc, tous ces résultats témoignent d'une accumulation sélective du cuivre dans les branchies. Par ailleurs, la mortalité des poissons qui coïncide avec la brusque augmentation du taux du cuivre dans les branchies, laisse penser que la teneur du cuivre ait atteint probablement un seuil critique responsable de l'effet léthal. En effet l'état de faiblesse, les difficultés dans la respiration ainsi que l'hypersecrétion du mucus, relevée avant la mort des poissons, montrent une atteinte de la fonction respiratoire. SELLERS et *al.* (1975), O'HARA (1971), ont observé des perturbations des paramètres respiratoires chez *Lepomis macrochirus* et le poisson-lune, à la suite de l'exposition aux concentrations subléthales de 0,09 et 0,07 mg/l de  $\text{Cu}^{2+}$ . MOUNT (1964) a observé également que l'accumulation importante au niveau des branchies est suivie de mortalité des poissons.

En conclusion, l'exposition des truites arc-en-ciel à une concentration de 0,5mg/l de  $\text{Cu}^{2+}$  pour une durée de sept jours a montré que la cinétique d'accumulation se caractérise par une accumulation sélective de ce métal dans les branchies. Il faut souligner que la présence naturelle du cuivre dans le foie affecte d'une manière importante son accumulation du fait d'une saturation probable des sites de fixation au niveau de cet organe.

Sur le plan pratique, ces résultats montrent l'intérêt d'utiliser les branchies comme organe de prélèvement lors de mortalité subaiguë de poissons et de tenir compte de l'influence des paramètres physico-chimiques, principalement la dureté et le pH. La nécessité de prendre en considération les teneurs endogènes (taux de base) au niveau des organes concernés est à envisager.

## REFERENCES

- BRUNGS W.A., GECKLER J.R. et GAST M. (1976). - Acute and chronic toxicity of copper to the fathead minnow in a surface of variable quality. *Wat. Res.*, 10, 1 : 37-43.



- CALAMARI D. et MARCHETTI R. (1973). - The toxicity of mixtures of metals and surfactant to rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Wat. Res.*, 7 : 1453-1464.
- EVANS G.W. (1973). - Copper homeostasis in the mammalian system. *Physiol. Rev.*, 53 : 535-570.
- HARA T.J. et MAC DONALDS S. (1976). - Olfactory responses to skin mucus substances in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 54 : 41-47.
- HILTON J.W., HODSON P.V. et SLINGER S.J. (1982). - Absorption, distribution, half-life and possible route of elimination of dietary selenium in juvenile rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 71C : 49-55.
- KLEEREKOPER H. et TIMMS A.M. (1972). - Locomotor response of gold fish, channel cat fish and large mouth bass to a copper-polluted mass of water in an open field. *Wat. Res.*, 8, 6:1574-1580.
- LEWIS S.D. et LEWIS W.M. (1971). - The effect of zinc and copper on the osmolarity blood serum of the channel cat fish *Ictalurus punctatus raffinesque* and golden shiner *Notemigonus crysoleuca*. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 100 : 639-643.
- Mc CARTER J.A., MATHESON A.T., ROCH M. et OLAFSON R.W. (1982). - Chronic exposure of coho salmon to sublethal concentrations of copper. II Distribution of copper between high and low molecular weight proteins in liver cytosol and the possible role of metallothionein in detoxification. *Comp. Biochem. Physiol.*, 72C 1 : 21-23.
- MOUNT D.I. (1964). - An autopsy technique for zinc-caused fish mortality. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 93 : 174-182.
- NOEL-LAMBOT F., GERDDY G. et DISTECHE (1978). - Distribution of Cd, Zn and Cu in liver and gills of the eel *Anguilla anguilla* with special reference to metallo-thioneins. *Comp. Bioch. Phys.*, 61C, 1 : 177-187.
- O'HARA J. (1971). - Alteration in oxygen consumption in blue gills exposed to sublethal treatment with copper. *Wat. Res.*, 1 : 731-737.
- SCAIFE J.E. (1957). - The solubility of malachite. *Can. J. Chem.*, 35 : 1332-1340.
- SELLERS C.M. JR., HAETH A.G. et BASS M.L. (1975). - The effect of sublethal concentration of copper and zinc on ventilatory activity blood  $O_2$  and pH in rainbow trout *Salmo gairdneri*. *Water Res.*, 9 : 401-405.
- SOLBE DE L.G. et COOPER V.A. (1976). - Studies on the toxicity of copper sulphate to stone loach *Noemacheilus barbatulus* in hard water. *Water Res.*, 10, 6 : 523-527.
- VAN HOOFF F. et VAN SAN E. (1981). - Analysis of copper, zinc, cadmium and chromium in fish tissues. A tool for detecting metal caused fish kills. *Chemosphere.*, 10 : 1127-1135.