

La bioaccumulation des éléments minéraux chez le vestimentifère

Riftia pachyptila (Jones) : bilan des connaissances

Hydrothermalisme
Minéraux
Accumulation
Détoxication
Organismes

Hydrothermalism
Minerals
Accumulation
Detoxication
Organisms

Richard P. COSSON

CNRS-EP 61, Service d'Ecotoxicologie, Faculté de Pharmacie, 1, rue Gaston Veil, F 44035 Nantes cedex.

Reçu le 27/03/95, révisé le 04/07/95, accepté le 25/07/95.

RÉSUMÉ

L'analyse de vestimentifères, *Riftia pachyptila*, prélevés en divers sites de la dorsale du Pacifique oriental, met en évidence la bioaccumulation de certains éléments dans leurs tissus. Des variations inter-individuelles fortes sont observées chez des individus prélevés dans un même site ou dans des sites différents. Cette variabilité est sans doute en relation avec le degré d'exposition des différents individus analysés, ainsi qu'avec la variabilité des émissions de fluides (fréquence, durée, intensité, direction, chimie). L'absence de toxicité apparente des éléments s'expliquerait par l'abondance de leurs formes insolubles dans les tissus du ver, ainsi que par la présence confirmée de métallothionéines dont il est admis qu'elles participent aux processus de détoxication des métaux. Le dosage du cadmium, du cuivre et du zinc dans le sang permet d'émettre l'hypothèse de leur transport de la plume vers le trophosome. Ces mêmes métaux ont été quantifiés pour la première fois dans des bactéries isolées du trophosome et dans le liquide coelomique.

ABSTRACT

Bioaccumulation of mineral elements within the vestimentiferan tube worm *Riftia pachyptila* (Jones): a review.

The bioaccumulation of several elements in the tissues of the vestimentiferan worm *Riftia pachyptila*, collected at various sites of the East Pacific Rise, has been evidenced. Important fluctuations of elemental levels are observed among specimens originating from different sites, or even from the same site. These fluctuations are related to the exposure of the sampled organisms and to the high variability of the vent fluids (frequency, duration, intensity, direction, chemistry). The storage of the elements as mineral compounds and the abundance of metallothioneins are responsible for their apparent lack of toxicity, and provide evidence of existing detoxication processes. Cadmium, copper and zinc have been quantified in the blood, leading to the hypothesis of the existence of a metal carrier responsible for their transportation from the plume toward the trophosome. These metals have also been quantified for the first time within isolated symbiotic bacteria and coelomic liquid.

Oceanologica Acta, 1996, **19**, 2, 163-176.

INTRODUCTION

Depuis leur découverte en 1977 (Corliss *et al.*, 1979) les communautés biologiques associées aux sources hydrothermales du Pacifique Oriental (East Pacific Rise: E.P.R.) ont suscité un intérêt constant. De nombreuses publications traitent des particularités anatomiques, physiologiques ou métaboliques, écologiques (abondance de symbioses) développées par les espèces hydrothermales pour faire face aux conditions extrêmes de leur habitat (températures et pressions élevées, anoxie, abondance d'hydrogène sulfuré, absence de photosynthèse). Par contre, peu d'informations ont été publiées à ce jour, concernant les interactions entre la richesse métallique de ces milieux et leur faune associée (Gaill *et al.*, 1984 ; Roesijadi, Crecelius, 1984 ; Roesijadi *et al.*, 1985 ; Juniper *et al.*, 1986 ; Chassard-Bouchaud *et al.*, 1986 et 1988 ; Juniper, 1988 ; Cosson-Mannevy *et al.*, 1988 et 1989 ; Smith, Flegal, 1989 ; Jeanthon, Prieur, 1990 *a* et *b*). Pourtant l'exubérance des peuplements hydrothermaux contraste fortement avec la pauvreté et la faible densité spécifique des peuplements rencontrés dans les sites côtiers contaminés par des rejets métalliques anthropogéniques.

Certains éléments traces présents dans les fluides hydrothermaux (tab. 1) se rencontrent à des concentrations nettement plus élevées que celles généralement observées dans l'eau de mer (Edmond *et al.*, 1982 ; Edmond, Van Damm, 1985 ; Michard *et al.*, 1984, Bowers *et al.*, 1988). Les éléments essentiels (As, Cu, Fe, Mn, Se, Zn) sont des substances hormétiques. Le fonctionnement cellulaire normal nécessite que leur concentration soit maintenue dans une gamme de valeurs strictes, variable selon le métal et le tissu considérés. Au-dessous d'un seuil minimal ou au-dessus d'un seuil maximal apparaissent des perturbations physiologiques. L'information concernant la pénétration des métaux essentiels ou toxiques est fournie par la quantification globale de ces éléments dans l'organisme. Le transfert du milieu ambiant vers l'organisme est quantifié par le calcul du facteur de concentration ($F_c = \text{Rapport entre la concentration du composé dans l'organisme et sa concentration dans le milieu}$).

Pour beaucoup d'espèces, la résistance à la toxicité des métaux est due à leur capacité d'accumuler les polluants métalliques sous une forme non toxique. Le caractère définitif ou temporaire de la séquestration des métaux dépend des ligands cellulaires impliqués. Ainsi la fossilisation des métaux sous forme de composés insolubles d'une grande

stabilité chimique aboutit à une détoxification à plus long terme que lorsque cette détoxification s'exerce au travers de la liaison du métal avec des composés types métallothionéine (MT), dont le « turn-over » varie de quelques jours à quelques mois en fonction du métal associé à l'apoptothionéine.

En écotoxicologie, deux types de structures anatomiques sont considérés comme des cibles préférentielles pour l'accumulation des métaux : celles qui sont directement exposées au milieu contaminé et celles qui participent au transport et au métabolisme des métaux dans l'organisme.

Sur les sites d'échanges milieu extérieur-organisme deux phénomènes non exclusifs sont observés selon la forme physico-chimique (« spéciation ») du métal considéré dans le milieu :

– l'élément métallique adhère à la surface des téguments externes par simple adsorption ou établit des liaisons chimiques avec certains composés structuraux des téguments (protéines soufrées, par ex. : kératine).

– l'élément métallique pénètre au travers des téguments.

Le franchissement des barrières membranaires est un mécanisme naturel pour les métaux essentiels. Les métaux toxiques, grâce à des phénomènes de compétition avec les métaux essentiels, empruntent les mêmes voies. Les ions métalliques, composés hydrophiles, doivent se combiner à des ligands pour former des complexes apolaires ou des structures électriquement neutres afin de franchir la membrane lipidique de nature hydrophobe. Les possibilités d'utiliser les mécanismes de transport actif (compétition au niveau des pompes à calcium et à sodium) ou d'être captés et incorporés par endocytose constituent d'autres voies de passage. La barrière membranaire franchie, le métal exogène va réagir avec les ligands intracellulaires pour lesquels il présente une affinité. Cela peut se traduire par sa fixation sur des substrats ne possédant pas de métaux associés auparavant, ou par une substitution d'un métal natif par le métal exogène sur un site accepteur de cations. La présence de ce métal peut aussi entraîner une série de réactions cellulaires qui auront pour finalité son intégration à une structure chimique assurant sa neutralisation. Cette neutralisation peut être réalisée dans les interfaces avec le milieu (branchies, tractus digestif) ou dans des organes internes impliqués dans le métabolisme général (glandes digestives, organes excréteurs). Dans ce deuxième cas, le

Tableau 1

Concentration de différents éléments dans les fluides hydrothermaux de quelques sites du Pacifique et concentrations moyennes de l'eau de mer. Les concentrations sont exprimées en $\mu\text{g/l}$ d'après les données fournies par les articles d'Edmond *et al.*, (1982) ; Edmond et van Damm (1985) ; Michard *et al.* (1984) ; Bowers *et al.* (1988).

Levels of elements in hydrothermal vent fluids from the East Pacific Rise and average levels encountered in sea water. Levels given as mg/l according to Edmond and van Damm (1983, 1985); Michard et al. (1984); Bowers et al. (1988).

	Ag	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Se	Zn
1° N						20 000 à 63 000			
11° N			< 0,11 à 4,8		92 000 à 361 000	41 000 à 51 000	1,86 à 55,9		2900 à 6900
13° N			6,2 à 7,9		100 000 à 600 000	33 000 à 161 000	2,9 à 28,0		131 à 6700
21° N	4,1	18,5	17,4	2 224	28 000 à 101 000	34 000 à 53 000	63,8	5,7	6929
GUAYMAS	24,8	21,2		<63,5	3 127	7 600	54,9	6,5	275
Eau de Mer	0,002	2,02	0,11	0,44	<0,06	<0,05	0,002	0,20	0,65

métal doit d'abord être fixé par un transporteur qui le véhiculera jusqu'à l'organe.

Dans le présent article, nous dressons le bilan de la bioaccumulation d'éléments (Ag, As, Cd, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb, Se, Zn) chez l'une des espèces majeures des communautés hydrothermales du Pacifique, le vestimentifère *Riftia pachyptila* (Jones). Une synthèse des résultats publiés précédemment (Cosson-Mannevy *et al.*, 1988 et 1989) et de données originales a été réalisée. Une attention toute particulière a été apportée à la distribution de certains métaux, essentiels (Cu, Zn) ou toxiques (Cd), entre les ligands intracellulaires insolubles et solubles. De plus, nous avons quantifié les protéines type métallothionéine (MT) dans différents tissus ou organes de *R. pachyptila*.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les échantillons analysés pour cette étude proviennent des campagnes : OASIS (21° N - 1982), GALAPAGOS (1° N - 1988), HERO 91 (13° N - 1991), HERO 92 (13° N - 1992). Une comparaison est établie avec des données publiées précédemment (Cosson-Mannevy *et al.*, 1988 et 1989) concernant des individus récoltés au cours des campagnes : BIOCYARISE (13° N - 1984) et HYDRONAUT (13° N - 1986).

Choix des parties anatomiques étudiées

Différentes parties anatomiques du *R. pachyptila* ont été analysées : la plume (ou branchie), le vestimentum (organe musculaire), le tronc (contenant le trophosome, caractéristique de l'embranchement) et l'opisthosome (partie terminale du ver). Dans la plume, seuls les filaments branchiaux ont été pris en compte dans cette étude. Dans le tronc, nous avons distingué la paroi musculaire, le trophosome (mélange de bactéries symbiotes et des tissus de l'hôte) et les bactéries elles-mêmes. La séparation des bactéries des tissus de l'hôte a été effectuée par centrifugation différentielle sur gradient de Percoll selon la technique mise au point par Distel et Felbeck (1988) pour séparer les bactéries symbiotes du mollusque bivalve, *Lucinoma aequizonata*, et adaptée au cas de *R. pachyptila* par Jarchow et Felbeck (en préparation). La plume qui baigne directement dans le milieu ambiant est exposée aux particules minérales dissoutes ou en suspension. Les éléments traces peuvent donc être adsorbés sur les filaments branchiaux ou franchir les barrières membranaires et pénétrer dans l'organisme. La majorité des échanges entre le ver et l'eau environnante s'effectue *via* cet organe, le ver ne possédant pas d'autre surface d'échange, comme le tube digestif des autres animaux (Jones, 1984). Les muscles du vestimentum permettent la rétraction de la branchie à l'intérieur du tube protecteur du ver. Nous avons retenu cet organe à titre comparatif, sa participation au métabolisme général étant limitée. Dans le tronc, nous avons voulu établir une différence entre l'enveloppe musculaire contractile et le contenu (trophosome) aux fonctions physiologiques (nutrition, reproduction) essentielles (Felbeck *et al.*, 1981 ; Cavanaugh, 1983 ; Fisher, Childress, 1984 ; Fisher *et al.*, 1988). Dans le trophosome, les composés prélevés dans le milieu

au niveau de la branchie, et véhiculés jusqu'à lui par la circulation sanguine, sont métabolisés grâce à la participation indispensable des bactéries chimioautotrophes. Il nous a paru judicieux d'évaluer les capacités de ces bactéries à accumuler les métaux pour mieux cerner leur éventuelle participation aux processus de détoxication. L'opisthosome, dont la musculature permet l'ancrage du ver dans son tube, est la partie la plus éloignée de la zone d'interface avec le milieu. Sa prise en compte est essentiellement comparative.

Dosages globaux des éléments traces dans les tissus ou organes

Les tissus ou organes conservés congelés après dissection à bord des navires ont été séchés à l'étuve jusqu'à obtention d'un poids constant. Ils ont ensuite été broyés dans un mortier en agate. Plusieurs parties aliquotes (environ 100 mg chacune) de chaque tissu réduit en poudre ont fait l'objet d'une digestion nitrique à 95 °C. L'analyse des éléments traces a été effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique à effet Zeeman en flamme ou au four graphite, selon l'élément dosé (Amiard *et al.*, 1987). Pour les analyses de mercure la digestion nitrique a été effectuée à 60 °C maximum afin d'éviter toute perte par sublimation, et elle a été suivie d'une étape de minéralisation des échantillons aliquotés à l'aide de permanganate de potassium. Les dosages du mercure total ont été effectués par spectrophotométrie d'absorption atomique de la vapeur froide (Hatch, Ott, 1968).

Simultanément aux échantillons de *R. pachyptila*, nous avons analysé des échantillons standards provenant de l'US-NBS et du NRC-Canada. Les résultats obtenus étaient en parfait accord avec les valeurs certifiées. Pour permettre l'expression des résultats relativement au poids sec ou au poids frais des tissus analysés, les teneurs en eau de ces différents tissus ont été calculées.

Étude de la compartimentation des métaux : Cu, Cd, Zn

Trois parties aliquotes de tissus congelés, de trois parties anatomiques, le trophosome (hôte + bactéries), le vestimentum (muscle) et la plume (filaments branchiaux), ont été pesées (environ 1,5 g) puis broyées dans du tampon Tris-HCl (50 mM - pH 8,6) à raison de 4,0 ml/g de poids frais. L'homogénéat ainsi obtenu a été soumis aux ultrasons pour compléter l'homogénéisation mécanique du broyeur (Dounce). Après ultra-centrifugation (100 000 g - 60 min.) nous avons obtenu trois phases : un culot (C1), une phase intermédiaire riche en hémoglobine (Hb) et un surnageant superficiel translucide (S1). Le culot (C1) et des parties aliquotes des phases solubles (Hb et S1) ont subi une digestion nitrique (*cf.* plus haut) pour permettre de quantifier les métaux associés aux composés insolubles (C1) et solubles (Hb et S1).

Les surnageants (S1) restants ont été dénaturés à la chaleur (75 °C - 15 min.), puis centrifugés (40 000 g - 30 min.). Les nouveaux culots obtenus (C2) et des aliquots des nouveaux surnageants (S2) ont été digérés par l'acide nitrique et analysés par spectrophotométrie d'absorption atomique

(comme précédemment) pour déterminer les quantités de métaux associés aux composés thermo-sensibles (C2) et thermo-résistants (S2). Comme précédemment des parties aliquotes des surnageants (S2) ont été congelées pour les analyses biochimiques et la quantification des métallothionéines (fig. 1).

Dosages biochimiques

Les quantités de protéines totales présentes dans les surnageants (S1) et (S2) ont été déterminées par microtitration sur plaques (Pierce) selon un principe expérimental dérivé de la méthode de Lowry *et al.* (1951). La quantification des protéines type métallothionéines (MTs) a été réalisée par polarographie à impulsions différentielles (DPP). Ce protocole analytique repose sur la mesure des groupements SH dans une solution électrolytique contenant l'échantillon à analyser (Thompson, Cosson, 1984). Cette technique utilisée par de nombreux auteurs permet de quantifier les MTs dans des organismes prélevés en milieu naturel ou contaminés expérimentalement, indépendamment de la diversité des isoformes de MTs présentes dans le tissu analysé, et des métaux qui y sont associés. Récemment Olafson et Olsson (1991) ont confirmé, par des dosages effectués sur des fractions obtenues par chromatographie (perméation de gel et échange d'anions), qu'il y avait une parfaite adéquation entre la quantité totale de MTs présente dans les échantillons et l'activité mesurée par DPP.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont présentés organe par organe, accompagnés de commentaires : d'une part, sur les variations intra- et inter-sites lorsqu'il a été possible d'établir des comparaisons, d'autre part, sur les formes physico-chimiques de stockage des métaux mises en évidence dans l'organe étudié.

Bioaccumulation des éléments traces dans la branchie (plume) :

Les résultats des analyses effectuées sur dix individus récoltés lors de la campagne GALAPAGOS (1° N - 1988) sont présentés tableau 2. Peu de données sont disponibles concernant la teneur en éléments traces des fluides émis sur ce site (tab. 1). La concentration en manganèse varierait entre 20 000 et 63 000 mg/l, mais ne se traduit pas par une bioaccumulation importante dans la branchie. Le fer et le cuivre présentent des valeurs relativement homogènes (coefficient de variation faible ou modéré) par opposition au cadmium et à l'arsenic dont les teneurs chez certains individus sont élevées par rapport aux autres. Pour le zinc (autre métal essentiel dont la concentration intra-tissulaire est régulée par l'organisme), si l'on excepte la teneur faible d'un des individus, il y a aussi une relative homogénéité des valeurs observées (pour $n = 9$, $m = 456,8 \mu\text{g/g}$; $\sigma_{n-1} = 147,0$; C.V. = 32 %).

La comparaison des moyennes calculées pour cette étude avec des données acquises sur des échantillons prélevés sur

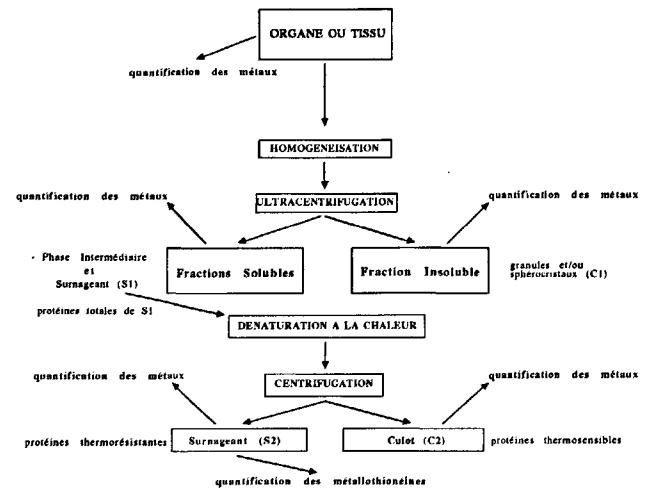


Figure 1

Méthodologie de l'étude de la bioaccumulation des métaux dans les tissus de *Riftia pachyptila*. La quantification des métaux est effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique. Le dosage des métallothionéines est effectué par polarographie à impulsion différentielle. Les teneurs en protéines sont mesurées à l'aide de plaques de microtitration (Pierce) selon un protocole dérivé de la méthode de Lowry *et al.* (1951).

Methodology used for the study of elemental bioaccumulation within the vestimentiferan worm, Riftia pachyptila, Jones. Elements were quantified using Atomic Absorption Spectrophotometry. Metallothioneins were quantified using Differential Pulse Polarography. Proteins were assayed using microtitration plates (Pierce) according to a procedure modified from Lowry et al. (1951).

un même site (13° N) ou sur d'autres sites du Pacifique oriental (1° N et 21° N) lors de différentes campagnes (tab. 2, 3) permet de dégager quelques remarques générales concernant la bioaccumulation des éléments par la plume de *R. pachyptila*. Exception faite du cas du mercure et du sélénium, le plus souvent ce sont les filaments branchiaux qui présentent les plus fortes teneurs élémentaires par rapport à l'axe même de la plume ou au cartilage dont les rôles sont moindres dans le métabolisme de l'espèce et donc dans les échanges avec le milieu ambiant. Le mercure qui s'accumule préférentiellement dans les organismes, sous forme méthylée, forme aussi avec le sélénium des composés minéraux très stables dont l'effet protecteur a été montré chez un grand nombre d'espèces (Caurant, 1994). Globalement une opposition est retrouvée entre Zn, Cu et Se, et les autres éléments (Ag, As, Cd, Hg, Mn, Ni) dont la teneur peut varier fortement d'un individu à l'autre en fonction sans doute de la localisation intra-site de l'échantillon (13° N). Cette remarque est aussi applicable aux variations inter-sites (13°/1°/21° N). Les données fragmentaires que nous possédons concernant les teneurs en éléments des fluides hydrothermaux (tab. 1) font apparaître des variations quantitatives en fonction des sites, qui sont à relier à la nature chimique des roches magmatiques et à la dynamique propre à chaque système hydrothermal (Bonatti, 1984). Il est admis que l'eau environnant les organismes hydrothermaux (par conséquent, les vestimentifères) a une composition chimique très différente de celle des fluides. Cette différence est la conséquence du phénomène de dilution du fluide par la masse d'eau du fond, ce qui entraîne la précipitation de nombreux éléments (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni,

Tableau 2

Variations inter-individuelles des teneurs en éléments traces dans quelques parties ou organes de *Riftia pachyptila* prélevés à différents sites de l'E.P.R. (*East Pacific Rise*). Les teneurs sont exprimées en μg de métal/g de poids sec. m : moyenne ; σ_{n-1} : écart-type ; C.V. : coefficient de variation exprimé en pourcentage ($\text{CV} = \sigma_{n-1}/m$). Les teneurs en plomb étaient inférieures à la limite de détection. n : nombre d'échantillons retenus pour le calcul statistique.

Variations of elemental levels within different anatomical parts of *Riftia pachyptila* collected at the East Pacific Rise. Levels are given as $\mu\text{g/g}$ dry weight. m: mean; σ_{n-1} : standard deviation; C.V.: variation coefficient expressed as percentage ($\text{CV} = \sigma_{n-1}/m$). Levels of lead were under the detection limits. n: number of analysed samples used for the statistics.

	FILAMENTS BRANCHIAUX 1° N n = 10 m - σ_{n-1} - CV	PAROI DU TRONC 13° N n = 5 m - σ_{n-1} - CV	TROPHOSOME 1° N n = 10 m - σ_{n-1} - CV	TROPHOSOME 13° N n = 5 m - σ_{n-1} - CV	PAROI DE L' OPISTHOSOME 13° N n = 5 m - σ_{n-1} - CV
ARSENIC	0,96 - 0,39 - 41	0,16 - 0,04 - 27	1,88 - 0,58 - 31	21,5 - 8,39 - 39	0,92 - 0,53 - 58
CADMIUM	3,05 - 1,65 - 54	0,92 - 0,24 - 26	0,13 - 0,08 - 61	0,13 - 0,09 - 66	0,08 - 0,02 - 30
CUIVRE	12,6 - 1,61 - 13	19,5 - 8,80 - 45	38,2 - 34,1 - 89	68,5 - 33,3 - 49	32,7 - 13,8 - 42
FER	419 - 136 - 32	143 - 20,3 - 14	1208 - 777 - 64	419 - 136 - 32	472 - 197 - 42
MANGANESE	12,9 - 4,4 - 34	6,02 - 1,06 - 18	3,68 - 0,95 - 26		11,9 - 2,8 - 24
MERCURE				6,73 - 5,56 - 83	
ZINC	428 - 165 - 39	83,8 - 9,0 - 11	308 - 93,9 - 31	563 - 150 - 27	476 - 286 - 60

Se; Edmond, Von Damm, 1985) consécutive aux changements de température (d'environ 350 à 10 °C) et de pH (d'environ 3,6 à 7,9). N'ayant aucune donnée sur la composition élémentaire de l'environnement immédiat des vestimentifères, nous avons calculé les facteurs de concentra-

tion entre les fluides et les tissus de *R. pachyptila* à 21° N. Ces valeurs (tab. 4) sont toutes sous-estimées par rapport aux valeurs réelles, les concentrations dans l'eau étant *a fortiori* inférieures à celles rencontrées dans le fluide même. Les valeurs calculées mettent quand même en évi-

Tableau 3

Synthèse des données analytiques de bioaccumulation des éléments traces dans quelques parties ou organes de *Riftia pachyptila* prélevés à différents sites de l'E.P.R. (*East Pacific Rise*). A : 13° N, Cosson-Mannevy *et al.*, 1989; B : 13° N, Cosson-Mannevy *et al.*, 1988; C : 13° N; D : 21° N. C et D données non publiées. Les teneurs sont exprimées en μg de métal/g de poids sec. a : axe de la plume; b : filaments branchiaux; c : cartilage branchial; d : plume entière.

Synthetic presentation of the analytical data available regarding the bioaccumulation of elements within *Riftia pachyptila* anatomical parts. Tube worms were sampled at the East Pacific Rise. A : 13° N, Cosson-Mannevy *et al.*, 1989; B : 13° N, Cosson-Mannevy *et al.*, 1988; C : 13° N; D : 21° N. C et D unpublished data. Levels are given as $\mu\text{g/g}$ dry weight. a : plume axis; b : plume filaments; c : plume cartilage; d : whole plume.

	Ag	As	Cd	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Se	Zn
Branchie											
a	0,5	5,9	0,1	10,3	256	1,9	4,7	0,5		2,4	284
A b	1	15	0,6	25	389	2,2	7,9	1,2		1,4	369
c	0,4	5	0,1	4	321	3,3	7,0	0,5		0,8	213
B d			1,9	28,5		5,9	26,8	5,9		2,1	434
C b		4,4	0,6	14,2		1,23					475
		7,8	0,6	26,7		0,93					475
D d	4,6	4,2	0,7	23,4	215		10,8	3,7	0,6	2,7	506
	1,9	3,2	0,1	12,1	167		7,5	2,6	0,4	2,1	355
Vestimentum											
A	0,6	3,4	1,0	8,4	188	1,5	12,4	2,3		1,6	120
B			0,1	6,7		4,0	15,8	3,5		3,4	134
C		8,1	1,9	28,1		6,6					230
		3,8	0,1	19,6		4,6					186
D	3,7	2,0	0,9	15,9	137		4,2	1,5	0,4	1,9	108
	2,1	3,2	1,2	10,5	165		8,2	0,7	0,3	2,5	128
Tronc											
A	0,7	5,6	0,2	11,2	240	2,1	5,4	0,7		1	198
D	0,6	2,2	3,1	14,0	210		6,3	0,5	0,3	1,2	82
	1,5	1,9	0,3	10,2	122		5,8	0,6	0,3	1,0	79
Trophosome											
A	1,5	4,7	0,1	9,3	576	23	3,1	2,2		0,9	146
B			0,04	23,7		11,3	16,2	4,9		1,7	313
D	21,9	13,1	0,07	89,1	613		1,2	0,7	0,8	5,9	599
	31,3	20,9	0,26	126	833		1,6	0,8	1,4	7,9	299

Tableau 4

Valeurs du facteur de concentration entre les teneurs de la branchie et du trophosome de *Riftia pachyptila* (exprimées en µg/kg) et les concentrations des fluides hydrothermaux (exprimées en µg/l) au site 21° N.

Concentration factor between the levels of elements in *Riftia pachyptila* plume and trophosome (given as µg/kg dry weight) and the levels of these elements within the hydrothermal fluids (given as µg/l).

	Ag	As	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Se	Zn
Branchie entière	1122	227	40	11	2,3	<0,3	9,4	474	73
	463	173	6	5	1,8		6,3	368	51
Trophosome	5341	708	4	40	7	0,04	13	1035	86
	7634	1129	15	57	9	0,05	23	1386	43

dence trois groupes d'éléments parmi ceux pour lesquels un tel calcul était possible. Les métaux tels que le manganèse, le fer, le plomb et le cuivre ne sont que faiblement bioconcentrés dans la plume par rapport à leur concentration initiale dans le fluide hydrothermal. Le fer et le cuivre forment des précipités lorsque le fluide entre en contact avec l'eau de mer du fond (Edmond, Von Damm, 1985). Il est donc logique d'estimer que leur concentration sera relativement faible à proximité de la branchie de *R. pachyptila*, d'où une moindre bio-accumulation. De plus, fer et cuivre sont des métaux essentiels au fonctionnement cellulaire et leur concentration intracellulaire est régulée par l'organisme en fonction des besoins physiologiques. Le plomb, bien que présent dans les fluides en concentration nettement supérieure à celle généralement rencontrée dans l'eau de mer, est faiblement bioaccumulé lui aussi. Deux hypothèses, non exhaustives, peuvent expliquer ce phénomène : soit, le plomb précipite, au débouché des fluides dans l'eau de fond, et sa concentration dans les branchies est faible ; soit les formes physico-chimiques sous lesquelles il se présente dans cette eau environnante sont incompatibles chimiquement avec les sites sur lesquels il pourrait éventuellement se fixer dans l'organisme. Cette incompatibilité chimique est aussi à envisager pour expliquer la faible bio-accumulation du manganèse dont il a été montré (Edmond, Von Damm, 1985) qu'il ne précipitait pas dans la zone de mélange fluide-eau de mer. Au contraire, son abondance relative reste décelable loin des sites hydrothermaux (Klinkhammer *et al.*, 1977). Il faut aussi remarquer que fer et manganèse présentent des concentrations extrêmement élevées dans les fluides et que ces valeurs interviennent de manière prépondérante dans le calcul des facteurs de concentration de ces deux métaux. Le cadmium et le zinc présentent des facteurs de concentration du même ordre de grandeur, bien que leurs concentrations respectives dans les fluides et dans les organismes soient très différentes. Alors que le zinc est un élément essentiel, le cadmium est un métal toxique pour les êtres vivants. Le cadmium présente beaucoup d'analogies avec le zinc (même configuration électronique externe, par ex.) auquel il se substitue très facilement dans les molécules biologiques qu'il dénature (métallo-enzymes, métallothionéines, par ex.). Il est donc particulièrement intéressant d'étudier les formes sous lesquelles le cadmium est accumulé chez *R. pachyptila*. Un troisième groupe d'éléments (As, Se, Ag) présente des facteurs de concentration très élevés, d'autant plus préoccupants que l'arsenic et l'argent sont de puissants toxiques cellulaires

(Garnier-Laplace, 1991 ; Taylor, 1981, in: Amiard-Triquet, 1989).

Bien qu'il n'y ait pas toujours de relation directe entre la bio-accumulation d'un élément et sa toxicité pour l'organisme qui l'accumule, il est légitime de se demander si les éléments présents dans la branchie de *R. pachyptila* sont détectés à des teneurs anormalement élevées. En général les comparaisons se font entre individus appartenant à la même espèce, vivants dans des milieux présentant des niveaux de contamination différents. Il est même recommandé d'établir des comparaisons d'organe à organe, les teneurs globales des individus étant le plus souvent biaisées par un facteur de dilution lié à la taille, et la condition physiologique des organismes (abondance de graisse, phase de croissance ou de reproduction). Pour les organismes hydrothermaux ce type de comparaison n'est pas réalisable, aussi avons-nous établi une comparaison avec quelques espèces marines filtreuses, prélevées dans des estuaires, sachant que les teneurs de référence (tab. 5) ont été calculées pour l'organisme entier et non pas pour un organe particulier (la plume dans notre cas). Cette comparaison met en évidence des teneurs anormalement élevées en argent, cadmium et mercure chez certains échantillons de plume provenant d'individus collectés respectivement à 13 et 21° N (Ag), 13 et 1° N (Cd) et 13° N (Hg). Nous pouvons aussi comparer nos résultats à ceux obtenus par d'autres auteurs (Roesijadi *et al.*, 1985; Smith, Flegal, 1989), pour trois mollusques des sites hydrothermaux du Pacifique analysés *in toto* (tab. 6). Les teneurs élémentaires de *R. pachyptila* sont généralement inférieures à celles rencontrées chez ces trois mollusques à l'exception du cas du mercure. La teneur en sélénium des organismes analysés est équivalente dans les trois études. Pour le zinc, *R. pachyptila* présente des teneurs inférieures à celle observée chez *Calypptogena magnifica*, mais supérieures à celles observées chez les deux autres mollusques. Zinc et cuivre sont des éléments essentiels (*cf.* plus haut) dont les teneurs sont maintenues constantes chez une espèce donnée, mais connues pour varier énormément d'une espèce à l'autre, il n'est donc pas surprenant de trouver des différences entre les espèces analysées. Les teneurs élémentaires rapportées pour les mollusques hydrothermaux sont très élevées et ont été décrites comme telles par les auteurs cités plus haut. Des différences de niveau d'imprégnation sont mises en évidence pour certains éléments entre les trois mollusques analysés. Nous pouvons attribuer ces différences à la nature même du fluide émis sur le site de prélèvement, à la localisation spatiale des échantillons par rapport aux émis-

Tableau 5

Teneurs en différents éléments traces de quelques espèces marines filtreuses prélevées dans des zones estuariennes plus ou moins contaminées. Les valeurs maximales correspondent à des teneurs exceptionnelles, le plus souvent très supérieures aux maxima de la gamme. Les teneurs sont exprimées en µg/g de poids sec (d'après Bryan *et al.*, 1985).

Trace element levels within estuarine filter-feeder species from areas contaminated at a variable extent. The maximum values are very uncommon, and often hugely higher than the maximum of the range. Levels given as µg/g dry weight, according to Bryan et al. (1985).

	Ag	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Ni	Pb	Se	Zn
<i>Nereis diversicolor</i>												
minimum	0,1	8	0,14	0,2	19	349	0,05	5,7	2,3	2,0		163
gamme	0,3 à 6,0	14 à 23	0,44 à 1,23	0,3 à 0,5	21 à 130	554 à 615	0,07 à 0,28	9,6 à 13,9	3,3 à 9,1	3,3 à 5,4		179 à 292
maximum	18,0	84	5,0	0,6	1430	734	2,5	14,1	13,3	685		466
<i>Mytilus edulis</i>												
minimum	0,02		0,4	0,3	6	64		4	0,5	1,7		45
gamme	0,09 à 1,12	12,2	2,2 à 21,0	0,4 à 1,1	7 à 11	154 à 453	0,09 à 0,04	5 à 17	1,4 à 6,2	9,5 à 19	1,6 à 2,6	88 à 300
maximum	16,9		65,0	6,3	262	669		35	12	105		579
<i>Ostrea edulis et crassostrea gigas</i>												
minimum	0,2		1,5		32	128		6	0,1	0,3		300
gamme	0,9 à 6,4	17 et 39	1,6 à 11,8	0,2 et 0,6	38 à 552	140 à 236	0,15 et 0,45	8 à 20	0,4 à 1,7	1,1 à 7,8		396 à 4700
maximum	17,2		29,9		3000	365		33	6,1	12,5		17080

sions et à la physiologie propre de chaque espèce. Les différences avec *R. pachyptila* seraient dues aux mêmes facteurs éco-éthologiques bien que cela soit matériellement impossible à prouver, compte-tenu des moyens dont nous disposons actuellement pour effectuer des prélèvements d'eau ou d'organismes sur le fond. Néanmoins nous retiendrons de ces comparaisons que les teneurs élémentaires observées dans la plume de *R. pachyptila* sont élevées surtout en ce qui concerne le mercure.

La répartition d'un métal dans le tissu branchial entre les ligands solubles (présents dans le cytosol et la phase intermédiaire) et les ligands insolubles (précipités dans le culot) est variable selon le métal considéré (tab. 7). Le cadmium

se répartit de manière équivalente entre les deux types de ligands, alors que le zinc et le cuivre sont présents majoritairement associés aux ligands insolubles.

Les forts pourcentages de métaux associés à la fraction insoluble de l'homogénat (C1) peuvent s'expliquer par l'adsorption de particules riches en éléments métalliques sur la membrane externe des filaments branchiaux. Ils peuvent aussi correspondre à un piégeage sous forme de granules libérés lors de l'éclatement des lysosomes pendant le broyage ou le traitement aux ultrasons (George, 1983 *a* et *b*), ou de concrétions (Mg/Ca, Pi/PPi, *cf.* Viarengo, Nott, 1993) initialement contenus dans des vésicules limitées par une membrane. C'est une stratégie de stockage ubiquiste

Tableau 6

Teneurs en différents éléments traces de trois mollusques hydrothermaux d'après Roesijadi *et al.*, 1985 (*Calyptogena magnifica*), et d'après Smith et Flegal, 1989 (*Bathymodiolus thermophilus* et *Neomphalus fretterae*). Les teneurs sont exprimées en µg de métal/g de poids sec. m : moyenne ; σ_{n-1} : écart-type; C.V. : coefficient de variation exprimé en pourcentage ($CV = \sigma_{n-1}/m$).

Trace element levels within three molluscs from the hydrothermal vents, according to Roesijadi et al, 1985 (Calyptogena magnifica), and according to Smith and Flegal, 1989 (Bathymodiolus thermophilus et Neomphalus fretterae). Levels are given as µg/g dry weight. m: mean; σ_{n-1} : standard deviation; C.V.: variation coefficient expressed as percentage ($CV = \sigma_{n-1}/m$).

	Ag	As	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Pb	Se	Zn
<i>Calyptogena magnifica</i> 21° N											
x	20,4	24,8	9,8	16,6	148	760	0,41		6,0	3,6	2152
σ_{n-1}	2,0	2,8	0,8	1,3	10	240	0,08		2,4	0,9	495
C.V. %	9,8	11,3	8,2	7,8	6,8	31,6	19,5		40,0	25,0	23,0
<i>Bathymodiolus thermophilus</i> 1° N											
x	14,5	14,6		11,2		2500		111		4,05	89,2
σ_{n-1}	6,95	7,88		6,90		5680		107		1,24	24,6
C.V. %	47,9	54,0		61,6		227		96,4		30,6	27,6
<i>Neomphalus fretterae</i> 1° N											
x	27,9	14,9		3,90		393		38,0		7,76	145
σ_{n-1}	14,3	5,57		1,77		128		39,4		2,31	51,1
C.V. %	51,3	37,4		45,4		32,6		103,7		29,8	35,2

Tableau 7

Répartition moyenne (n = 3) des métaux, exprimée en pourcentage de la quantité totale de métal présente dans les échantillons, entre les trois phases obtenues après ultracentrifugation d'homogénéats de différentes parties anatomiques de *Riftia pachyptila*. Arsenic et mercure n'ont pu être pris en compte, leurs teneurs respectives étant trop proches des limites de détection.

Average (n = 3) distribution of metals between the three fractions obtained by ultracentrifugation of *Riftia pachyptila* homogenized tissues. Values are given as percentages of the total amount of metal in the sample. We did not take into account the levels of arsenic and mercury because they were too close to the detection limits.

Organes	Fractions	Cadmium	Cuivre	Zinc
Plume	Cytosol (S1)	18	5	8
	Phase intermédiaire	32	11	23
	Culot (C1)	50	84	69
Vestimentum	Cytosol (S1)	19	6	2
	Phase intermédiaire	34	12	35
	Culot (C1)	47	82	63
Trophosome	Cytosol (S1)	4	4	3
	Phase intermédiaire	12	26	62
	Culot (C1)	84	70	35

dans le règne animal (Martoja, Martoja, 1984), ces structures minérales pouvant servir de réservoir pour les ions essentiels (Cu, Zn) ou de piégeage sous forme inerte pour les ions toxiques (Cd). La phase intermédiaire, riche en hémoglobine, contient relativement plus de métaux que le cytosol translucide. S'agit-il d'une participation directe de l'hémoglobine de *R. pachyptila* au transport des ions métalliques, de la présence de transporteurs spécifiques des métaux, ou simplement d'un artefact dû à la centrifugation ? Des analyses complémentaires sont en cours pour essayer de répondre à cette question. La répartition des métaux présents dans le cytosol entre les protéines thermo-sensibles et thermo-résistantes met en évidence une affinité plus forte de ceux-ci pour les protéines thermo-résistantes, dont les métallothionéines (MTs) font partie (tab. 8).

Si les protéines thermo-résistantes (B) représentent 64 % (C) de la totalité des protéines (A) présentes dans le cyto-

Tableau 8

Répartition moyenne (n = 3) des métaux, exprimée en pourcentage de la quantité totale de métal présente dans le cytosol (S1), entre les protéines thermo-sensibles (C2) et les protéines thermo-résistantes (S2) de différentes parties anatomiques de *Riftia pachyptila*.

Average (n = 3) distribution of metals between the heat-denaturable proteins (C2) and the heat-stable proteins (S2). Values are given as percentages of the total amount of metal in the cytosol (S1) of *Riftia pachyptila* homogenized tissues.

Organes	Composés	Cadmium	Cuivre	Zinc
Plume	Thermosensibles (C2)	17	35	30
	Thermorésistants (S2)	83	65	70
Vestimentum	Thermosensibles (C2)	22	32	13
	Thermorésistants (S2)	78	68	87
Trophosome	Thermosensibles (C2)	-	20	20
	Thermorésistants (S2)	100	80	80

sol (S1), ce qui est donc important, parmi ces protéines thermo-résistantes, il n'y a que 4 % (F) de métallothionéines, ce qui peut paraître faible (tab. 9). Cependant, les concentrations de métallothionéines mesurées lors de cette étude sont tout à fait de l'ordre de grandeur des valeurs trouvées lors de précédentes analyses (tab. 10).

Les concentrations en MTs que nous avons déterminées pour la branchie de *R. pachyptila* sont très élevées par rapport au niveau de base quantifié dans la branchie de moule (*Mytilus edulis*). Par contre, elles se situent dans la gamme des valeurs observées pour les foies de poissons exposés à un environnement contaminé (*Platichthys flesus*) ou dont la teneur naturelle du cuivre dans le foie est elle-même très élevée (*Onchorynchus mykiss*, *Salmo salar*) (tab. 11). La comparaison de concentrations en MTs d'espèces différentes est hautement spéculative. Ici, son but est de démontrer que, si faibles paraissent-elles par rapport aux concentrations totales en protéines, les teneurs en MTs de la branchie de *R. pachyptila* sont du même ordre de grandeur que dans des organes d'autres espèces marines, pour lesquelles il est admis que les MTs interviennent de façon prépondérante dans les mécanismes de détoxification des métaux et participent aux phénomènes de résistance et de tolérance (Viarengo, Nott, 1993).

Bioaccumulation des éléments traces dans le vestimentum

Des variations inter-individuelles des teneurs en zinc et en cuivre de la paroi musculaire du vestimentum ont été mises en évidence, qu'il s'agisse de comparaisons intra-site ou inter-sites (tab. 3). Alors que les teneurs en fer et manganèse semblent stables, les importantes variations des teneurs en Ag, As, Cd, Cu, Hg, Ni et Pb selon les individus récoltés, reflètent vraisemblablement leur degré d'exposition à la pluie de particules minérales provenant des fumeurs. Les facteurs de concentrations des éléments traces dans le vestimentum, par rapport aux fluides (non présentés), sont du même ordre de grandeur que ceux calculés précédemment pour la plume. Les teneurs des différents éléments analysés dans le vestimentum ne présentent pas de grandes variations par rapport à celles mesurées dans la plume, à part une moindre richesse des tissus en fer et en zinc, et deux valeurs exceptionnellement fortes pour le mercure et le chrome. La comparaison avec les valeurs rencontrées chez les organismes estuariens (tab. 5) met, ici aussi, en évidence des teneurs anormalement élevées en argent, cadmium et mercure. Le mercure est connu pour s'accumuler préférentiellement sous forme méthylée dans les tissus musculaires. Les fortes teneurs en mercure du vestimentum reflètent le métabolisme particulier à cet élément. Les teneurs en argent et cadmium demeurent inférieures à celles rapportées pour les Mollusques hydrothermaux (tab. 6).

La répartition du cadmium, du cuivre et du zinc entre les ligands solubles (cytosol, phase intermédiaire) et insolubles (culot) est sensiblement équivalente à celle observée pour la plume (tab. 7), à part la plus forte proportion de zinc dans la phase intermédiaire, riche en hémoglobine, et sa chute dans le cytosol. Etant donnée sa position anatomique à l'intérieur du tube protecteur du ver (rôle encore à

Tableau 9

A : Concentration des protéines totales du cytosol (S1) obtenu après homogénéisation et ultracentrifugation d'une partie aliquote de différentes parties anatomiques de *Riftia pachyptila*. B : Concentration des protéines thermo-résistantes, mesurée dans le surnageant obtenu après dénaturation à la chaleur (S2). D : Concentration des métallothionéines (MTs) mesurée dans (S2). Les concentrations sont toutes exprimées en mg/g de tissu frais homogénéisé (trois replicats d'une même partie aliquote). C : pourcentage de protéines thermo-résistantes par rapport aux protéines totales. E : pourcentage de MTs par rapport aux protéines totales. F : pourcentage de MTs par rapport aux protéines thermo-résistantes.

A : Total protein level in the cytosol (S1) obtained after homogenization and ultracentrifugation of *Riftia pachyptila* homogenized tissues. B : Level of heat-stable proteins in the supernatant obtained after the heat-denaturation (S2). D : Level of metallothioneins (MTs) in the supernatant (S2). Levels are given as mg/g wet weight (three replicates of the same sample). C : Amount of heat-stable proteins versus the total amount of proteins (as percentage). E : Amount of MTs versus the total amount of proteins (as percentage). F : Amount of MTs versus the amount of heat-stable proteins (as percentage).

Organes	A	B	C	D	E	F
	Protéines Totales	Protéines Thermo-résistantes	Pourcentage de B/A	Métallothionéines MTs	Pourcentage de MTs/A	Pourcentage de MTs/B
Plume	6,39	4,06	63,6	0,146	2,28	3,60
Vestimentum	3,48	2,98	85,6	0,062	1,77	2,08
Trophosome	2,49	1,95	78,5	0,063	2,51	3,23

élucider par rapport aux agressions chimiques), il est peu probable que des particules soient adsorbées sur l'épiderme du vestimentum. Par contre, il existe certainement une faible circulation d'eau autour du corps de *R. pachyptila*, à l'intérieur du tube. Cette circulation peut apporter des éléments chimiques sous formes dissoutes, particulièrement diffusibles au travers des membranes. Les fortes proportions de cuivre et de zinc retrouvées dans les culots d'ultracentrifugation, reflètent peut-être simplement des formes insolubles de ces métaux associés aux membranes, pour des raisons structurelles sans liens avec les phénomènes de détoxification.

La proportion de zinc associée aux protéines thermo-résistantes semble légèrement plus élevée que celle observée pour la plume (tab. 8). Il y a moins de protéines totales et thermo-résistantes dans le muscle du vestimentum que dans les filaments branchiaux (tab. 9). Par contre, le pourcentage de protéines thermo-résistantes est encore plus élevé. La concentration tissulaire des MTs est plus faible que dans la plume et leur proportion par rapport aux protéines thermo-résistantes est deux fois moindre. Comme pour la plume, il y a une bonne homogénéité entre les valeurs trouvées précédemment et la concentration en MTs observée dans la présente étude (tab. 10).

Les différences observées entre les filaments branchiaux et la paroi musculaire du vestimentum traduisent la différence des fonctions physiologiques remplies par ces deux entités anatomiques. Etant donnée la faible quantité de MTs dans ses tissus, le vestimentum n'apparaît pas comme un site privilégié où se dérouleraient les réactions métaboliques assurant la détoxification des métaux, mais plutôt comme un organe où seraient stockés, sous des formes minérales insolubles (à définir), les composés issus de ces réactions.

Bioaccumulation des éléments traces dans le tronc

Le tronc du vestimentifère abrite un tissu caractéristique de l'embranchement, le trophosome, dont les fonctions physiologiques sont essentielles puisqu'il contient les bactéries symbiotes qui assurent la nutrition du ver à partir des éléments soufrés filtrés dans la branchie et acheminés jusqu'à

lui via la circulation sanguine (Bosch, Grassé, 1984 a et b). Nous appellerons trophosome le tissu composé du mélange des bactéries avec les structures anatomiques du ver (gonades, vaisseaux sanguins, sang, liquide coelomique, bactériocytes), par opposition à la paroi du tronc (tissu musculaire) et aux bactéries isolées.

Paroi musculaire du tronc

Les résultats de l'étude de la variabilité des teneurs en éléments dans la paroi musculaire du tronc font apparaître une prédominance des métaux essentiels (Cu, Fe, Zn) par rapport aux éléments toxiques (As, Cd) (tab. 2). Le coefficient de variation calculé pour la teneur en cuivre est élevé pour un métal dit « régulé », ce qui traduit une hétérogénéité entre les individus analysés. Pour ce métal les valeurs atteintes restent inférieures aux maxima de la littérature, alors que la teneur moyenne en cadmium est élevée par rapport aux valeurs citées pour référence (tab. 5).

La comparaison inter-sites (tab. 3) met en évidence des teneurs plus élevées en zinc et arsenic à 13° N (A). Par contre la plus forte teneur en cadmium est observée à 21° N. Les teneurs en MTs de la paroi du tronc des *R. pachyptila* prélevés à 21° N sont légèrement inférieures

Tableau 10

Teneurs en métallothionéines (exprimées en mg/g de poids frais) d'homogénats dénaturés à la chaleur, de différentes parties anatomiques de *Riftia pachyptila*. A et B : échantillons provenant de 21° N, données non publiées. C et D : échantillons provenant de 13° N, C : (Cosson-Mannevy *et al.*, 1986), D : cette étude.

Level of metallothioneins in the supernatant obtained after the heat-denaturation (S2) of *Riftia pachyptila* homogenized tissues. Values are given as mg/g wet weight. A and B : samples collected at 21° N, unpublished data. C and D : samples collected at 13° N, C : (Cosson-Mannevy *et al.*, 1986), D : this study.

Organes	A	B	C	D
Plume	295,4	227,7	144,3	146,1
Vestimentum	99,8	127,1	64,1	61,5
Trophosome	245,6	230,3	57,4	63,4

Tableau 11

Concentration en métallothionéines dans la branchie de la moule (*Mytilus edulis*), et dans le foie de différentes espèces de poissons. Les valeurs sont exprimées en mg/g de poids frais (George et Olsson, 1994).

Metallothionein levels in the gill of the mussel (Mytilus edulis), and in the liver of various species of fish. Levels are given as mg/g wet weight, according to George and Olsson (1994).

	<i>Mytilus edulis</i>	<i>Pleuronectes platessa</i>	<i>Onchorynchus mykiss</i>	<i>Salmo salar</i>	<i>Haemulon sciurus</i>	<i>Platichthys flesus</i>
Niveau de base	0,5	15-30	140-240	100	800	34
Zone contaminée						270

(74,7 et 69,6 mg/g poids frais) à celles du vestimentum des organismes provenant du même site (tab. 10).

Trophosome

Deux séries d'analyses ont permis d'étudier la variabilité intra-site des teneurs en éléments dans le trophosome (tab. 2).

La première série de résultats correspond à des individus prélevés à 13° N pendant les campagnes HERO (91 et 92). Les teneurs en arsenic sont exceptionnellement élevées par rapport aux données de la littérature (tab. 5) et équivalentes à celles obtenues chez les Mollusques hydrothermaux (tab. 6). L'arsenic est reconnu comme un élément essentiel depuis 1975 (*in* : Caurant, 1994) et son effet biologique dépend de sa teneur dans l'organisme. Compte-tenu des teneurs observées dans le trophosome, il serait important d'étudier les formes physico-chimiques sous lesquelles est accumulé cet arsenic. Le cuivre présente des fluctuations inter-individuelles importantes qui peuvent refléter des conditions physiologiques particulières aux individus analysés, soit un dérèglement temporaire ou prolongé de l'homéostasie de ce métal chez certains individus. Il existe une corrélation significative ($P < 0,05$) entre les fluctuations des teneurs en cuivre et en mercure. Ce phénomène serait la traduction de l'affinité des deux métaux pour les mêmes ligands intracellulaires (Cosson, 1994 et 1995). Mercure et cadmium, tous deux toxiques, présentent de forts coefficients de variation, conséquence de la difficulté des organismes à réguler leur pénétration, qui est elle-même fonction de leur exposition.

La deuxième série de résultats a été obtenue à partir d'échantillons prélevés sur le site des Galapagos (1° N). Les teneurs en arsenic sont nettement plus faibles que celles observées à 13° N, contrairement aux valeurs observées pour les Mollusques prélevés eux aussi à 1° N (tab. 6). A part une valeur extrême, les teneurs en cadmium sont sensiblement du même ordre chez les individus échantillonnés à 1° N. Comme à 13° N, les teneurs en cuivre fluctuent beaucoup d'un individu à l'autre, le coefficient de variation étant ici très important. De même, le fer est bioaccumulé de manière très variable et l'on observe aussi une forte valeur du coefficient de variation. Ces deux métaux se distinguent nettement du zinc pour lequel est observée une grande homogénéité des résultats et une faible valeur du coefficient de variation. Les variations du cuivre et du fer ne sont pas corrélées et les données dont nous disposons ne permettent pas d'interpréter ces variations en terme de toxicité éventuelle.

La comparaison inter-sites (tab. 3) souligne la faible imprégnation par l'arsenic des individus récoltés aux Galapagos (1° N) et leur richesse en fer, observée aussi chez les Mollusques du même site (tab. 6). Les calculs des facteurs de concentration (tab. 4) font ressortir une forte bioaccumulation de l'argent et du sélénium sur le site 21° N. Sauf exception (Cd, Mn) les facteurs de concentrations, calculés pour le trophosome à 21° N, sont plus forts que ceux calculés pour la plume. Pourtant, le trophosome n'est pas en communication directe avec le milieu extérieur et dans son cas il ne peut donc s'agir de dépôts particulaires (comme sur les filaments branchiaux), mais bien d'éléments transportés, métabolisés et stockés dans cet organe. Il a été montré (Frazier, George, 1985, et Thomson *et al.*, 1985, *in* : George, Olsson, 1994) que chez les huîtres différents types de cellules sanguines pouvaient accumuler de fortes concentrations en cuivre et en zinc, métaux naturellement constitutifs des MTs. Nous ne pouvons donc pas négliger l'hypothèse, chez *R. pachyptila*, d'un transport des métaux de la plume vers le trophosome via des ligands véhiculés par la circulation sanguine.

La répartition du cadmium et du zinc entre les ligands solubles et insolubles du trophosome est différente de celle observée pour la plume et le vestimentum (tab. 7). Le cadmium est majoritairement associé aux composés précipités dans le culot au lieu de se répartir équitablement entre les phases soluble et insoluble. De plus, il est très peu (cinq fois moins) présent dans le cytosol. Le zinc est, pour sa part, majoritairement associé à la phase intermédiaire riche en hémoglobine et faiblement représenté dans le culot (formes insolubles).

L'abondance de cadmium et de cuivre dans ce culot pourrait correspondre à des composés minéraux (granules ou sphéro-cristaux) inertes, représentant les formes finales des processus de détoxication de ces métaux. La proportion de zinc associé aux protéines thermo-résistantes est inférieure à celle observée dans le vestimentum, mais supérieure à celle observée dans la plume (tab. 8). Les proportions de cuivre et de cadmium associés à ces mêmes protéines thermo-résistantes sont nettement supérieures à celles observées dans les deux organes précédemment étudiés. Nous n'avons pas détecté de cadmium dans le culot obtenu après dénaturation à la chaleur du cytosol (S1), et présumons que l'intégralité du cadmium présent dans ce cytosol (4 % seulement du cadmium total de l'échantillon) est liée à des protéines thermo-résistantes.

Les concentrations en protéines totales et thermo-résistantes sont nettement inférieures à celles de la plume et

légèrement inférieures à celles du vestimentum (tab. 9). Le pourcentage des protéines thermo-résistantes par rapport aux protéines totales est intermédiaire entre ceux trouvés dans les deux organes cités. La concentration en MTs est plus faible que dans la plume, mais équivalente à celle du vestimentum.

Compte-tenu des faibles concentrations en protéines totales et thermo-résistantes, le pourcentage des MTs est plus élevé que pour le vestimentum et du même ordre que pour la plume. La faible concentration en MTs est à relier à la faible représentation des métaux étudiés dans le cytosol, une part importante de ceux-ci étant, associée comme souligné plus haut, d'une part aux composés insolubles (Cd, Cu), d'autre part à la phase intermédiaire riche en hémoglobine. Cette phase doit faire l'objet de nos futures recherches pour en définir la composition et l'éventuelle présence de ligands métalliques type MTs ou de MTs *sensu stricto*. Comme pour la plume et le vestimentum, les teneurs en MTs des trophosomes des organismes prélevés à 13° N (C et D) sont homogènes, mais inférieures à celles des deux individus prélevés à 21° N (tab. 10). Cette différence entre sites est plus marquée que pour les autres organes. Le niveau des teneurs en MTs du trophosome des exemplaires prélevés à 21° N est équivalent à celui des teneurs en MTs de la plume des mêmes individus, contrairement aux exemplaires de 13° N pour lesquels ce niveau est nettement inférieur (environ 1/2). Cette importance relative des teneurs en MTs des trophosomes des exemplaires provenant de 21° N est peut-être à rapprocher de leur teneur élevée en argent, cadmium et cuivre (tab. 3).

Bactéries isolées

Des bactéries ont été isolées (Distel, Felbeck, 1988) des tissus de vestimentifères prélevés à 13° N et les suspensions obtenues (n = 7) ont été analysées pour estimer leur richesse relative en métaux (Tab. 12). La masse bactérienne présente dans le millilitre de suspension analysé est inconnue et difficilement quantifiable étant donné le protocole d'isolement utilisé. Si nous estimons à 100 mg la masse isolée de bactéries présentes dans le millilitre de suspension analysé, nous obtenons des teneurs en cadmium, cuivre et zinc, respectivement de 0,02 - 5,4 - 17,4 µg de métal/g de poids sec. Ces valeurs estimées représentent grossièrement : un septième, un treizième et un trente-deuxième des teneurs du trophosome total en cadmium, cuivre et zinc. Etant donné l'importance relative du trophosome (donc des bactéries) par rapport à la masse

totale du ver (15 %, d'après Felbeck et Childress, 1988), cela représente une contribution non négligeable au bilan total de ces métaux dans l'organisme.

Bioaccumulation des éléments dans l'opisthosome

L'opisthosome est la partie terminale du corps de *R. pachyptila*. Il assure son ancrage dans son tube protecteur. C'est un organe musculéux riche en hémoglobine. La quantification des éléments chez cinq individus récoltés à 13° N souligne l'hétérogénéité déjà observée lors des précédentes comparaisons inter-individuelles (tab. 2). Le fer et le zinc présentent de fortes teneurs, avec un fort coefficient de variation pour le zinc. Le cuivre présente des valeurs extrêmes, très supérieures aux autres valeurs observées, et qui correspondent aux valeurs maximales du zinc. Les variations des teneurs en cadmium et en manganèse sont faibles, contrairement à la variation des teneurs en arsenic. La comparaison avec les teneurs moyennes du vestimentum et de la paroi du tronc (tab. 2, 3) fait ressortir :

- une teneur moyenne en arsenic et en manganèse.
- une faible teneur en cadmium.
- une forte teneur en cuivre, fer et zinc pour l'opisthosome.

Quantification des teneurs en métaux traces (Cd, Cu, Zn) dans le sang et le liquide coelomique

Des échantillons de sang et de liquide coelomique ont été prélevés sur trois individus récoltés à 13° N. Les résultats des dosages (tab. 13) mettent en évidence des différences très nettes entre les deux milieux. Le sang présente des teneurs très élevées en zinc, du même ordre de grandeur que celles observées dans les tissus, alors qu'il s'agit ici de teneurs exprimées par rapport au poids frais et non pas au poids sec. Le liquide coelomique présente des teneurs en cuivre légèrement inférieures à celles du sang, mais ses teneurs en cadmium sont nettement supérieures.

La présence de ces métaux dans le sang vient à l'appui de l'hypothèse émise précédemment de leur transport entre la plume, au contact du milieu enrichi en minéraux, et le trophosome où ils semblent être biotransformés et stockés sous des formes inertes. Elle met aussi en évidence un échange de ces métaux avec le liquide coelomique qui représente 26 % de la masse totale de l'animal (Felbeck, Childress, 1988).

Tableau 12

Concentrations en cadmium, cuivre et zinc de suspensions de bactéries, isolées de *Riftia pachyptila* (n = 7) prélevés à 13° N. Les concentrations sont exprimées en µg/l pour le cadmium ; en mg/l pour le cuivre et le zinc. m : moyenne ; σ_{n-1} : écart-type; C.V. : coefficient de variation exprimé en pourcentage (CV = σ_{n-1}/m).

Levels of cadmium, copper and zinc within suspensions of isolated symbiotic bacteria from *Riftia pachyptila* trophosome. Samples (n = 7) were collected at 13° N. Levels are given as µg/l for cadmium and mg/l for copper and for zinc. m: mean; σ_{n-1} : standard deviation; C.V.: variation coefficient expressed as percentage (CV = σ_{n-1}/m).

	1	2	3	4	5	6	7	m	σ_{n-1}	C.V. %
Cadmium	2,5	1,9	1,7	2,8	1,5	1,4	3,1	2,13	0,67	31
Cuivre	1,30	0,19	0,19	1,78	0,08	0,08	0,16	0,54	0,70	129
Zinc	4,76	1,20	1,68	1,33	1,35	0,95	0,90	1,74	1,36	78

Tableau 13

Teneurs en cadmium ($\mu\text{g/kg}$ poids frais), cuivre et zinc (mg/kg poids frais) du sang et du liquide coelomique de trois *Riftia pachyptila* (a, b, c) prélevés à 13° N. m : moyenne ; σ_{n-1} : écart-type; C.V. : coefficient de variation exprimé en pourcentage ($\text{CV} = \sigma_{n-1}/m$).

Levels of cadmium, copper and zinc within the blood and the coelomic liquid of *Riftia pachyptila*. Samples ($n = 3$) were collected at 13° N. Levels are given as $\mu\text{g/kg}$ for cadmium and mg/kg for copper and for zinc. m: mean; σ_{n-1} : standard deviation; C.V.: variation coefficient expressed as percentage ($\text{CV} = \sigma_{n-1}/m$).

	Sang						Liquide coelomique					
	a	b	c	m	σ_{n-1}	C.V. %	a	b	c	m	σ_{n-1}	C.V. %
Cadmium	1,0	0,7	0,7	0,8	0,2	22	1,9	2,4	7,4	3,9	3,0	78
Cuivre	1,02	0,96	0,91	0,96	0,06	6	0,56	0,47	0,72	0,58	0,13	22
Zinc	538	394	365	432	93	21	89	159	94	114	39	34

CONCLUSION

L'étude synthétique que nous avons menée sur la bioaccumulation d'éléments minéraux chez *Riftia pachyptila* a été réalisée grâce à une abondance de données correspondant davantage à des opportunités d'obtention d'échantillons qu'à un programme de prélèvement sérié. Néanmoins, elle permet d'évaluer les interactions entre le vestimentifère typique des sites du Pacifique oriental, et la composante minérale des fluides émis par ces sites. Les analyses effectuées sur des organismes prélevés sur un même site (13° ou 1° N) mettent en évidence une forte variabilité des teneurs en éléments des organismes. Cette variabilité marquée s'explique dans la mesure où les écosystèmes hydrothermaux sont par excellence des milieux extrêmement variables, dans le temps ou dans l'espace. Les données courantologiques obtenues au voisinage des cheminées actives montrent une variabilité très importante dans la direction des courants et dans leur intensité, même si des influences saisonnières ou tidales induisent une certaine rythmicité (Vangriesheim, comm. pers.). Cette variabilité des courants conditionne la répartition des particules minérales autour des fumeurs (Khrpounoff, Albéric, 1991) et, par conséquent, le micro-environnement minéral des organismes sessiles. A cela s'ajoutent les phénomènes de précipitation qui sont fonction de la dynamique des fluides émis et qui conditionnent la nature chimique des éléments au contact des organismes. Outre ces facteurs physico-chimiques, il y a aussi des facteurs physiologiques propres à l'individu échantillonné qui conditionnent la bioaccumulation des éléments.

Nous avons pu montrer qu'il existe une affinité différentielle entre éléments et organes, en relation avec leur fonction physiologique. Et, au sein de ces organes, il existe des affinités particulières pour certains types de ligands. Des différences ont été établies entre les organes à forte implication métabolique comme la plume et le trophosome et des organes impliqués dans des fonctions plus mécaniques tels que le vestimentum, l'opisthosome ou la paroi musculaire du tronc. Nous avons mis en évidence, dans les tissus de *R. pachyptila*, une bioaccumulation de certains éléments, ce qui pose le problème de leur régulation et de leur détoxification. Les mécanismes permettant la régulation des flux de métaux essentiels dans les organes sont perturbés par les phénomènes de compétition entre ceux-ci et les métaux toxiques qui leur sont proches chimiquement, ainsi

que par leur propre présence en excès dans le milieu. C'est l'aptitude des organes, ou des tissus, à maintenir un équilibre entre les flux entrants et sortants (excrétion, neutralisation, stockage) de métaux qui va permettre à l'organisme dans sa globalité de s'adapter à son environnement, d'où l'intérêt d'étudier les phénomènes de bioaccumulation dans l'organe plutôt que dans l'organisme. Le stockage est souvent l'étape finale de la détoxification, c'est pourquoi nous avons essayé d'identifier les formes physico-chimiques des métaux dans les tissus de *R. pachyptila*. Cette étude met en évidence une accumulation préférentielle du cuivre et du zinc sous forme insoluble dans la plume et le vestimentum, alors que le cadmium se répartit de manière sensiblement équivalente entre les formes soluble et insoluble. Dans le trophosome, le cadmium est présent majoritairement sous forme insoluble alors que le zinc est majoritairement associé aux formes solubles. La prépondérance du cuivre et du zinc sous forme insoluble dans la plume peut être associée à la présence de particules minérales demeurées adsorbées sur les filaments branchiaux malgré le rinçage de l'organe avant son conditionnement à bord. Par contre cette hypothèse est beaucoup moins plausible en ce qui concerne le vestimentum où il faut envisager un stockage sous forme de concrétions minérales. L'abondance du zinc sous forme soluble dans le trophosome peut s'expliquer par une affinité particulière de ce métal pour les protéines de l'organe. Cette hypothèse repose sur la comparaison entre les teneurs globales en zinc de la plume et du trophosome, et leur teneur respective en protéines. Pour une teneur équivalente en zinc il y a relativement moins de protéines dans le trophosome que dans la plume. Par contre le pourcentage de protéines thermo-résistantes est plus élevé dans le trophosome, notamment le pourcentage de métallothionéines par rapport aux protéines totales. Si les mécanismes de passage entre les formes soluble et insoluble sont loin d'être connus, il a été montré que dans certains cas les métallothionéines pouvaient participer à l'incorporation de certains métaux à des structures types granules (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1980 ; Viarengo *et al.*, 1985 ; Lauverjat *et al.*, 1989). Il pourrait y avoir une relation de causalité entre les abondances relatives de zinc sous forme soluble, de protéines thermo-résistantes et de MTs, et la présence majoritaire du cadmium sous forme insoluble. Dans le trophosome, cette forme de stockage du cadmium correspondrait à l'étape ultime de sa détoxification *via* des mécanismes faisant intervenir les MTs dont le zinc est

le métal constitutif. Leur présence mise en évidence précédemment (Cosson-Mannevy *et al.*, 1986) est confirmée par cette étude ainsi que leur abondance dans la plume (site privilégié des échanges avec le milieu extérieur) et dans le trophosome (au rôle métabolique prépondérant). Les teneurs en MTs dans ces deux organes sont comparables à celles rencontrées chez d'autres espèces où leur participation aux mécanismes de détoxification est admise, ce qui renforce l'hypothèse avancée plus haut.

Chez *R. pachyptila*, comme chez de nombreux invertébrés, la détoxification des métaux s'effectuerait principalement par formation de structures minérales, grâce à une participation éventuelle des MTs. Des recherches sont entreprises au niveau ultrastructural pour localiser les concrétions minérales dans les tissus et déterminer leur nature à l'aide de microsonde électronique. L'identification des ligands du sang, qui permettent le transport des métaux de la plume vers le trophosome, est aussi l'un des objectifs que nous poursuivons.

Etant données l'importance et l'irrégularité des apports particuliers dans la plume de *R. pachyptila*, la mise en œuvre des mécanismes de détoxification des éléments métalliques doit être rapide et performante. L'une des stratégies adaptatives envisageable pour répondre à ces critères serait la duplication ou l'amplification des gènes codants pour les MTs, phénomènes observés chez d'autres invertébrés (Palmiter, 1987). Une part importante des recherches

actuelles en cours est donc consacrée à une approche moléculaire de l'adaptation des vestimentifères à leur environnement, en complément à l'étude biochimique des ligands des métaux dans les différents tissus impliqués dans leur incorporation, leur transport, leur transformation et leur stockage.

Remerciements

L'auteur adresse ses sincères remerciements à Daniel Desbryères, Horst Felbeck et Jim Childress, chefs de missions qui l'ont invité à participer aux campagnes Hero 91 et 92. A bord, il a bénéficié de l'aide de Janka Jarchov, André Toulmond et Chuck Fisher pour le prélèvement et la préparation de certains échantillons. Les exemplaires de *Riftia pachyptila* non prélevés par nos soins pendant les campagnes Hero 91 et 92, ont été mis à notre disposition par Horst Felbeck et Françoise Gaill. Une partie des analyses présentées dans cet article à été effectuée par Jean-Paul Vivier lors du D.E.A. qu'il a effectué à Nantes sous la direction de l'auteur. Celui-ci remercie Mme Moré pour l'accès à son laboratoire de Biochimie, ainsi que M. et Mme Amiard pour l'aide apportée dans certaines analyses et pour la critique du manuscrit.

RÉFÉRENCES

- Amiard J.-C., A. Pineau, H.L. Boiteau, C. Metayer, C. Amiard-Triquet (1987). Application de la spectrophotométrie d'absorption atomique Zeeman aux dosages de huit éléments traces (Ag, Cd, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb et Se) dans des matrices biologiques solides, *Wat. Res.* **21**, 693-697.
- Amiard-Triquet C. (1989). Bioaccumulation et nocivité relatives de quelques polluants métalliques à l'égard des espèces marines, *Bull. Ecol.* **20**, 129-151.
- Ballan-Dufrancs C., J. Ruste, A.-Y. Jeantet (1980). Quantitative electron probe microanalysis on insects exposed to mercury. I. Methods. An approach on the molecular form of the stored mercury. Possible occurrence of metallothionein-like proteins. *Biol. Cell.* **39**, 317-324.
- Bonatti E. (1984). Hydrothermal metal deposits from the oceanic rifts: A classification, in: *Hydrothermal Processes at Sea Floor Spreading Centers*, edited by P.A. Rona, K. Bostrom, L. Laubier, and K. Smith, NATO Conf. Ser. IV, Plenum, New York, USA, 491-502.
- Bosch C., P.P. Grassé (1984 a). Cycle partiel des bactéries chimioautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (pogonophore vestimentifère). I : Le Trophosome et les Bactériocytes, *C.R. Acad. Sci., Paris*, **9**, 371-376.
- Bosch C., P.P. Grassé (1984 b). Cycle partiel des bactéries chimioautotrophes symbiotiques et leurs rapports avec les bactériocytes chez *Riftia pachyptila* Jones (Pogonophore Vestimentifère). II : L'évolution des bactéries symbiotiques et des bactériocytes, *C.R. Acad. Sci., Paris* **10**, 413-419.
- Bowers T.S., A.C. Campbell, C.I. Measures, A.J. Spivack, M. Khadem, J.M. Edmond (1988). Chemical controls on the composition of vent fluids at 13-11° N and 21° N, East Pacific Rise. *J. Geophys. Res.* **93**, 4522-4536.
- Bryan G.W., W.J. Langston, L.G. Hummerstone, G.R. Burt (1985). A guide to the assessment of heavy-metal contamination in estuaries using biological indicators, *Mar. Biol. Assoc. U.K.*, **o.p. 4**, 92 p.
- Caurant F. (1994). Bioaccumulation de quelques éléments traces (As, Cd, Cu, Hg, Se, Zn) chez le globicéphale noir (*Globicephala melas*, Delphinidé) pêché au large des îles Féroé, *Thèse de Doctorat, Université de Nantes*, 206 p.
- Cavanaugh C.M. (1983). Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulphide-rich habitats, *Nature* **302**, 58-61.
- Chassard-Bouchaud C., A. Fiala-Médioni, P. Galle (1986). Etude microanalytique de *Bathymodiolus* sp. (Mollusque Lamellibranche Mytilidé) provenant des sources hydrothermales de la Ride Pacifique orientale. *C.R. Acad. Sci., Paris* **302**, 117-124.
- Chassard-Bouchaud C., P. Boumati, F. Escaig L. Laubier, D. Desbryères, A. Fiala-Médioni, M. Outrequin, R.-L. Inglebert, P. Galle (1988). Microanalyse et hydrothermalisme océanique. Premiers résultats et perspectives dans le domaine de la biologie. *Oceanologica Acta N Sp.* **8**, 203-218.
- Corliss J.B., J. Dymond, L.I. Gordon, J.M. Edmond, R.P. von Herzen, R.D. Ballard, K. Green, D. Williams, A. Bainbridge, J. Crane, T.H. van Andel (1979). Submarine thermal springs on the Galapagos Rift, *Science* **203**, 1073-1083.
- Cosson R.P. (1994). Heavy metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the liver of carp after contamination by silver, cadmium and mercury following or not pretreatment by zinc, *Bio Metals* **7**, 9-19.
- Cosson R.P. (1995). Heavy metal intracellular balance and relationship with metallothionein induction in the gills of carp after contamination by silver, cadmium and mercury following or not pretreatment by zinc, *Biol. Trace Elem. Res.* **46**, 229-245.

- Cosson-Mannevy M.-A., R.P. Cosson, F. Gaill** (1986). Mise en évidence de protéines de type métallothionéine chez deux invertébrés des sources hydrothermales, le pogonophore vestimentifère *Riftia pachyptila* et l'annélide polychète *Alvinella pompejana*, *C.R. Acad. Sci., Paris* **302**, 347-352.
- Cosson-Mannevy M.-A., R.P. Cosson, F. Gaill, L. Laubier** (1988). Transfert, accumulation et régulation des éléments minéraux chez les organismes des sources hydrothermales, *Oceanologica Acta N Sp.* **8**, 219-226.
- Cosson-Mannevy M.-A., R.P. Cosson, C. Amiard-Triquet, J.-C. Amiard, C. Métayer** (1989). Elemental bioaccumulation in hydrothermal vent biota on the E.P.R.: organotropism and potential influence of bacteria in: *Heavy metals in the environment*, edited by J.P. Vernet, CEP Consultants Ltd. Publishers, Edinburgh U.K., 1, 73-76.
- Distel D.L., H. Felbeck** (1988). Pathways of inorganic carbon fixation in the endosymbiont bearing clam *Lucinoma aequizonata*. Part 1. Purification and characterization of the endosymbiotic bacteria, *J. Exp. Zool.* **247**, 1-10.
- Edmond J.M., K.L. von Damm, R.E. McDuff, C.I. Measures** (1982). Chemistry of hot springs on the East Pacific Rise and their effluent dispersal, *Nature* **297**, 187-191.
- Edmond J.M., K.L. von Damm** (1985). Chemistry of ridge crest hot springs. *Biol. Soc. Wash. Bull.* **6**, 43-47.
- Felbeck H., J.J. Childress** (1988). *Riftia pachyptila*: a highly integrated symbiosis, *Oceanologica Acta N Sp.* **8**, 131-138.
- Felbeck H., J.J. Childress, G.N. Somero** (1981). Calvin-Benson cycle and sulphide oxidation enzymes in animals from sulphide-rich habitats, *Nature* **292**, 291-293.
- Fisher C.R., J.J. Childress** (1984). Substrate oxidation by trophosome tissue from *Riftia pachyptila* Jones (Phylum Pogonophora), *Mar. Biol. Lett.* **5**, 171-183.
- Fisher C.R., J.J. Childress, N.K. Sanders** (1988). The role of vestimentiferan hemoglobin in providing an environment suitable for chemoautotrophic sulfide-oxidizing endosymbionts, *Symbiosis* **5**, 229-246.
- Frazier J.M., S.G. George** (1985). Cadmium kinetics in oysters- A comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*, *Mar. Biol.* **76**, 55-61.
- Gaill F., S. Halpern, C. Quintana, D. Desbruyères** (1984). Présence intracellulaire d'arsenic et de zinc associés au soufre chez une polychète des sources hydrothermales. *C.R. Acad. Sci., Paris* **298**, 331-335.
- Garnier-Laplace J.** (1991). Etude des mécanismes de transfert de l'argent-110M en eau douce, *Thèse de Doctorat*, Université de Montpellier II, 198 p.
- George S.G.** (1983 a). Heavy metal detoxification in the mussel *Mytilus edulis*. Composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Comp. Biochem. Physiol.* **76C**, 53-57.
- George S.G.** (1983 b). Heavy metal detoxification in the mussel *Mytilus edulis*. An *in vitro* study of Cd and Zn binding to isolated tertiary lysosomes. *Comp. Biochem. Physiol.* **76C**, 59-65.
- George S.G., P.-E. Olsson** (1994). Metallothioneins as indicators of trace metal pollution, in: *Biomonitoring of coastal waters and estuaries*, edited by K.J.M. Kramer, C.R.C. Press, Boca Raton, Ann Arbor, London, Tokyo, 151-171.
- Hatch W.R., W.L. Ott** (1968). Determination of sub-microgram quantities of mercury by atomic absorption spectrophotometry, *Anal. Chem.* **40**, 2085-2087.
- Jeanthon C., D. Prieur** (1990 a). Resistance to heavy metals of heterotrophic bacteria isolated from the deep-sea hydrothermal vent polychaete, *Alvinella pompejana*. *Prog. Oceanogr.* **24**, 81-88.
- Jeanthon C., D. Prieur** (1990 b). Susceptibility to heavy metals and characterization of heterotrophic bacteria isolated from two hydrothermal polychaetes annelids, *Alvinella pompejana* and *Alvinella caudata*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 3308-3314.
- Jones M.L.** (1984). The giant tube worms. *Oceanus* **3**, 47-54.
- Juniper S.K., J.A.J. Thompson, S.E. Calvert** (1986). Accumulation of minerals and trace elements in biogenic mucus at hydrothermal vents. *Deep-Sea Res.* **33**, 339-347.
- Juniper S.K.** (1988). Géochimie et écologie d'un microenvironnement hydrothermal: les sécrétions de mucus de *Paralvinella palmiformis*. *Oceanologica Acta N. Sp.* **8**, 167-172.
- Klinkhammer G., M. Bender, R.F. Weiss** (1977). Hydrothermal manganese in the Galapagos Rift, *Nature* **269**, 319-320.
- Khripounoff A., P. Alberic** (1991). Settling of particles in a hydrothermal vent field (East Pacific Rise 13° N) measured with sediment traps, *Deep-Sea Res.* **38**, 729-744.
- Lauverjat S., C. Ballan-Dufrançais, M. Wegnez** (1989). Detoxification of cadmium. Ultrastructural study and electron probe microanalysis of the midgut in a cadmium-resistant strain of *Drosophila melanogaster*, *Biol. Metals* **2**, 97-107.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, R.J. Randall** (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Martoja M., R. Martoja** (1984). La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution, *Le Courrier du CNRS* **54**, 32-37.
- Michard G., F. Albarède, A. Michard, J.-F. Minster, J.-L. Charlou, N. Tan** (1984). Chemistry of solutions from the 13° N East Pacific Rise hydrothermal site, *Earth Planet. Sci. Lett.* **67**, 297-307.
- Olafson R.W., P.-E. Olsson** (1991). Electrochemical detection of metallothionein, *Meth. Enzymol.* **205**, 205-213.
- Palmiter R.D.** (1987). Molecular biology of metallothionein gene expression in: *Metallothioneins II*, edited by J.H.R. Kägi and Y. Kojima Birkhäuser Verlag, Basel, Boston, *Experientia Supplementum*, **52**, 63-80.
- Roesijadi G., E.A. Crecelius** (1984). Elemental composition of the hydrothermal vent clam *Calymptogena magnifica* from the East Pacific Rise, *Mar. Biol.* **83**, 155-161.
- Roesijadi G., J.S. Young, E.A. Crecelius, L.E. Thomas** (1985). Distribution of trace metals in the hydrothermal vent clam, *Calymptogena magnifica*, *Bull. Biol. Soc. Wash.* **6**, 311-324.
- Smith D.R., A.R. Flegal** (1989). Elemental concentrations of hydrothermal vent organisms from the Galapagos Rift, *Mar. Biol.* **102**, 127-133.
- Taylor D.** (1981). A summary of the data on the toxicity of various materials to aquatic life. 9. Arsenic, Imperial Chem. Industries. Report **CL/A/2143**, 15 p.
- Thomson J.D., B.J.S. Pirie, S.G. George** (1985). Cellular metal distribution in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thurnberg) determined by quantitative X-ray microanalysis. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* **85**, 37-45.
- Thompson J.A.J., R.P. Cosson** (1984). An improved method for the quantification of metallothioneins in marine organisms, *Mar. Environ. Res.* **2**, 137-152.
- Viarengo A., J.A. Nott** (1993). Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* **104C**, 355-372.
- Viarengo A., M.N. Moore, M. Pertica, G. Mancinelli, G. Zanichi, R.K. Pipe** (1985). Detoxification of copper in the cells of the digestive gland of mussel/ the role of lysosomes and thioneins, *Sci. Tot. Environ.* **43**, 135-145.