

46756

UNIVERSITÉ DE NANTES - UNIVERSITÉ P. ET M. CURIE

CNRS - IFREMER - INSERM

Etude des mécanismes de transferts des éléments métalliques

dans les chaînes alimentaires aboutissant à l'Huître

et à la Moule, Mollusques filtreurs,

formes chimiques de stockage, conséquences écotoxicologiques.

Rapport final par

AMIARD J.-C., AMIARD-TRIQUET C., BERTHET B., GAUTHIER M.,

GILLOT P. et MARTOJA R.

Ministère de l'Environnement

Commande n° 83.187

IFREMER-DERO/EL



0EL04134

F24

1985

SOMMAIRE

AVANT-PROPOS	III
INTRODUCTION	1
Chapitre I - ETUDES IN SITU	5
I.1. Facteurs biologiques et écologiques contrôlant le niveau d'éléments traces (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les moules et les huîtres de la baie de Bourgneuf	5
I.1.1. Matériel et méthodes	5
I.1.2. Résultats et discussion	7
I.1.2.1. Variations saisonnières	7
I.1.2.2. Influence du poids et de l'âge	14
I.1.2.3. Organotropisme	15
I.2. Etude de la résistance aux métaux (zinc et cadmium) des Bactéries hétérotrophes de l'eau du parc et des huîtres. Accumulation de ces éléments par ces micro-organismes	17
I.2.1. Méthodologie générale utilisée	17
I.2.2. Résultats	18
I.2.2.1. Répartition de la résistance au zinc et au cadmium dans les populations bactériennes hétérotrophes de l'eau et des huîtres	18
I.2.2.2. Relations entre le degré de résistance au zinc et au cadmium des souches, leur capacité à accumuler ces éléments et leur métabolisme respiratoire	19
I.2.2.3. Relations entre la résistance aux métaux et la résistance aux antibiotiques	21
I.2.2.4. Amélioration des tests de sensibilité des bactéries marines aux métaux (Zn, Cd)	25
Chapitre II - ETUDES EXPERIMENTALES	27
II.A. Etudes en milieu semi-ouvert	27
II.1.1. Matériel et méthodes	27
II.1.2. Evolution temporelle de Cd, Pb, Cu, et Zn dans les divers compartiments	28
II.1.3. Considérations méthodologiques	30
II.2. Contamination expérimentale de Mytilus edulis par Cd, Pb, Cu et Zn introduits dans l'eau	30
II.2.1. Matériel et méthodes	30
II.2.2. Contamination par le cadmium	31
II.2.3. Contamination par le cuivre	33
II.2.4. Contamination par le zinc	33

II.3. Contamination expérimentale de Crassostrea gigas par Pb et Cu à partir de l'eau ou de la nourriture	38
II.3.1. Influence du vecteur de transfert sur l'accumulation de Pb et Cu	36
II.3.2. Localisation tissulaire et stockage. Lésions cytologiques	40
II.3.2.1. Techniques	40
II.3.2.2. Résultats sur les Huîtres soumises à la contamination par l'eau additionnée de Cu et Pb	41
II.3.2.3. Huîtres soumises à la contamination par le seul intermédiaire de la nourriture	49
II.3.2.4. Huîtres contaminées à la fois par l'eau et par la nourriture	49
II.3.3. Etudes biochimiques par FPLC des protéines liant les métaux (Pb, Cu)	50
II.3.3.1. Matériel et méthodes	50
II.3.3.2. La densité optique	50
II.3.3.3. Le plomb	52
II.3.3.4. Le cuivre	52
 PLANCHES I à V	 55
 Chapitre III - DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS	 67
III.1. Validité de l'utilisation des Mollusques filtreurs comme indicateurs biologiques de pollutions métalliques	67
III.2. Toxicité relative du cadmium, du cuivre et du zinc à l'égard des organismes marins	68
III.3. Accumulation du cadmium et du zinc par les bactéries et leur tolérance aux métaux	69
III.4. Voies de transfert des métaux du milieu vers les Mollusques filtreurs	69
III.5. Formes chimiques de transport et de stockage du plomb et du cuivre	70
III.6. Influence de la forme chimique sur la toxicité à l'égard de l'Homme	74
 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	 77
 ANNEXE I - LISTE DES PUBLICATIONS AFFERENTES TOTALEMENT OU EN PARTIE A CE CONTRAT	 83
 ANNEXE II - LISTE DES CHERCHEURS ET DES LABORATOIRES AYANT TRAVAILLE A CE CONTRAT	 85
 ANNEXE III - RESUME ABSTRACT	 87 88

AVANT-PROPOS

Une étude pluridisciplinaire est toujours une entreprise délicate. Le premier écueil à résoudre est de pouvoir réunir divers spécialistes acceptant de travailler ensemble pour aborder une problématique complexe. La deuxième difficulté, et non des moindres, est de trouver des moyens financiers pour subvenir aux besoins de ce projet. Une fois ce second problème résolu (ou tout le moins en partie), un laps de temps assez long s'est écoulé et les divers partenaires motivés, actifs se sont parfois engagés sur d'autres axes de recherche et font alors défection. Une nouvelle prospection et de nouvelles recrues sont alors envisagées pour combler les départs.

Le travail scientifique proprement dit peut alors commencer, mais les soucis du responsable scientifique ne sont nullement atténués. Il doit maintenant coordonner l'ensemble des recherches qui selon les disciplines avancent suivant des rythmes variés, il doit s'initier au langage ésotérique ou jargon de ces diverses disciplines et il doit réorienter les axes de recherche selon les dernières publications scientifiques et selon les résultats des divers membres de l'équipe.

Quand arrive la fin du contrat qui a permis de financer - totalement mais plus souvent en partie - le projet, c'est l'heure du bilan et du rapport. Bien sûr tout n'est pas parfait. Bien sûr tout n'est pas fini. Bien sûr certains aspects n'ont pu être abordé faute de temps et/ou de moyens.

Dans le cas présent, nous pensons sincèrement que le bilan est positif. Il suffit de lire l'annexe I qui rassemble les publications afférentes, totalement ou en partie, au contrat. Et d'autres sont actuellement en préparation.

Le présent rapport n'est signé que par les divers responsables de thèmes mais le nombre réel de chercheurs ayant travaillé sur ce sujet est nettement plus important. La liste des chercheurs et des laboratoires ayant collaboré figure en annexe II. Ils trouveront une plus juste récompense dans la signature des diverses publications.

D'autres personnes ont collaboré plus ou moins directement à ce travail et elles doivent en être vivement remerciées. C'est en particulier le personnel technique des divers laboratoires ainsi que les ostréiculteurs professionnels et notamment M. Pélote, et le personnel de son établissement, qui ont eu la gentillesse et la patience de nous accueillir. Nous tenons aussi à y associer Mme Racineux qui a réalisé la frappe de ce rapport.

AMIARD J.-C.

Responsable scientifique

## INTRODUCTION

Il est généralement reconnu que les organismes filtreurs (Huîtres - Moules) présentent une grande capacité de rétention pour divers polluants, de sorte qu'ils sont souvent utilisés comme indicateurs biologiques pour le contrôle de la qualité des eaux marines (N.A.S. 1980). De nombreuses données sont donc disponibles sur les teneurs en métaux dans les Mollusques filtreurs pour la plupart des zones côtières mondiales. En France, des contrôles sont effectués sur les Huîtres et les Moules par l'IFREMER (Boutier, 1982 ; Porot, 1984). Cependant, ces données acquises dans un but de protection sanitaire ne permettent pas de définir les mécanismes responsables de l'accumulation biologique des métaux ni surtout l'importance respective des sources variées de pollution métallique auxquelles sont exposés les Mollusques filtreurs, conditions indispensables pour contrôler et réduire une contamination éventuelle. Les vecteurs possibles du transfert des oligo-éléments métalliques entre le milieu marin et ces organismes sont les suivants : la phase soluble ( $< 0,45 \mu\text{m}$ ) comprenant les métaux sous forme ionique ou sous forme de complexes organiques, la phase particulaire comprenant particules inertes (sédiment) et vivantes (phytoplancton, microphytobenthos, Bactéries).

Il est maintenant bien établi que l'accumulation des métaux par les organismes marins est largement influencée par la forme chimique sous laquelle ils sont présents dans le milieu. Ainsi, diverses substances complexantes diminuent l'accumulation de cadmium par *Semibalanus balanoides* (Rainbow et al., 1980) ou, au contraire, l'augmentent chez *Mytilus edulis* (George et Coombs, 1977).

Les bactéries peuvent, dans une certaine mesure, être assimilées à des agents complexants ou des ligands organiques. De nombreuses bactéries sont en effet capables d'accumuler les métaux, à des taux parfois considérables (jusqu'à plus de 20 % de leur poids sec pour le cadmium par exemple). Ces bactéries peuvent en outre modifier la forme chimique de ces métaux et libérer des formes alkylées (Jensen et Jernelov, 1969 ; Gavis et Fergusson, 1972 ; ...) plus dangereuses car plus assimilables

pour les animaux. Certains travaux ont clairement établi le rôle synergique de la microflore bactérienne lors de l'accumulation d'ions métalliques (mercure et cadmium) par certains invertébrés marins (Sayler et al., 1975 ; Flatau et Gauthier, 1983). Il paraît donc important d'évaluer le comportement des bactéries hétérotrophes vis-à-vis des métaux dans les biotopes où se développent les lamellibranches, qui se nourrissent essentiellement de micro-organismes.

L'étude de la bioaccumulation nécessite l'emploi de techniques nombreuses et complémentaires, qui vont du dosage des métaux dans l'organisme total, jusqu'à l'identification, au niveau des cellules de tous les tissus, des concentrations métalliques et des combinaisons chimiques dans lesquelles sont engagés les éléments. La complexité de ce genre d'études explique que ces multiples aspects de la bioaccumulation métallique n'aient été envisagés que dans un nombre restreint de travaux : accumulation du cadmium par l'Huître (Martoja et Martin, 1985 ; Jeantet et al., 1985) ; stockage par la Moule de constituants d'effluents industriels (résidu de fabrication de l'oxyde de titane, Martoja et al., 1985 ; phosphogypse, Martin et al., 1985).

A l'origine de ce travail, nous pensions approfondir le problème de la bioaccumulation préférentielle du zinc chez l'Huître. Mais en cours d'étude, la publication de nombreux travaux de l'école écossaise concernant le métabolisme du zinc intracellulaire chez l'Huître (George et al., 1982 ; George et Frazier, 1982 ; Pirie et al., 1984 ; Thomson et al., 1985) nous a contraint à reviser le choix des polluants étudiés et à retenir le cuivre et le plomb.

En ce qui concerne le cuivre, les données obtenues sur les Bivalves sont fragmentaires mais très importantes, puisqu'il est démontré que *Mytilus edulis* réagit à la contamination en synthétisant une protéine de complexation du métal, de type métallothionéine, et que le système lysosomal des cellules digestives concentre cette protéine (Viarengo et al., 1981, 1985). Dans le cas de l'Huître, des amœbocytes assurent la régulation des teneurs en métal de l'organisme (George et al., 1978). Pour le plomb, l'Huître supporte bien l'intoxication et concentre le métal (Zarogian et al., 1979), mais les organes d'accumulation demeurent inconnus, alors que chez la Moule, c'est dans la lame basale des branchies que précipite un carbonate mixte de Ca et Pb (Marshall et Talbot, 1979).

Nos connaissances sur la bioaccumulation du cuivre et du plomb dans les tissus mous des Bivalves et en particulier de l'Huître sont donc très incomplètes. Il faut ajouter que toutes les études ont été réalisées par exposition des Mollusques aux formes dissoutes des métaux, de sorte que les effets d'une contamination par la nourriture restent à déterminer. Or, contrairement à une conception classique, l'assimilation des métaux par la voie alimentaire est, chez certains organismes aquatiques, insignifiante en comparaison de "l'effet de bain" (Bouquegneau et Noël-Lambot, 1977) ; il importe donc de déterminer si cette donnée originale, relative aux Poissons, peut être étendue aux Mollusques.

Si techniquement il est difficile de séparer dans une étude *in situ* les différentes sources de contamination, l'étude expérimentale en laboratoire permet d'étudier individuellement l'impact de chacun d'eux. Par contre, le milieu expérimental constitue un modèle très simplifié du milieu naturel et il est donc indispensable de s'appuyer sur des mesures *in situ*. C'est pourquoi nous avons mené la présente étude à différents niveaux d'intégration : parc ostréicole en milieu ouvert, claires ostréicoles correspondant à un milieu semi-ouvert, milieu expérimental.

CHAPITRE I

ETUDES IN SITU

I.1. FACTEURS BIOLOGIQUES ET ECOLOGIQUES CONTROLANT LE NIVEAU D'ELEMENTS TRACES (Cd, Pb, Cu, Zn) CHEZ LES MOULES ET LES HUITRES DE LA BAIE DE BOURGNEUF.

De travaux antérieurs (Amiard et al. , 1982 ; Amiard-Triquet et al. , 1983), il ressort que la Baie de Bourgneuf, zone vouée principalement à la conchyliculture et aux activités balnéaires, est peu polluée par les métaux. Dans la présente étude, nous avons recherché si ces conclusions se vérifiaient chez les Mollusques filtreurs et, si tel était le cas, quelles étaient les sources de fluctuations naturelles des concentrations métalliques observées chez ces organismes.

I.1.1. MATERIEL ET METHODES :

Des huîtres et des moules ont été sélectionnées en fonction de leur âge et/ou de leur taille et les groupes ainsi formés (Tabl. 1) ont été placés dans des poches de grillage plastique arrimées sur des tables selon les méthodes usuelles de la conchyliculture. De Mars 1982 à Mai 1984, elles ont été maintenues sur un parc de l'île Bergère en Baie de Bourgneuf. Chaque mois étaient prélevés dix individus de chaque groupe de moules et d'huîtres, de l'eau de mer et du seston qui sont les sources de métaux pour ces Mollusques filtreurs dans l'environnement.

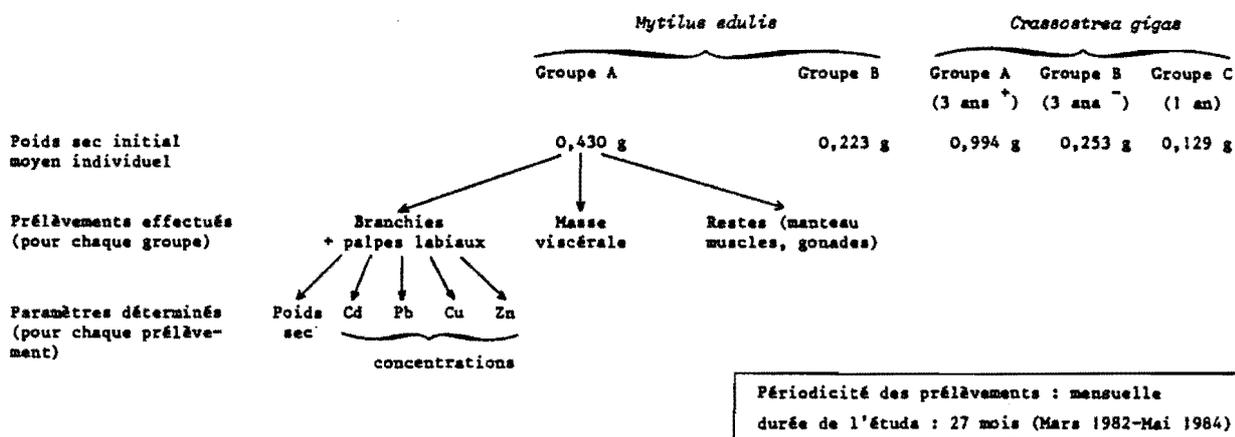


Tableau I : Récapitulation des données disponibles.

Ces échantillons étaient rapidement ramenés au laboratoire où l'eau de mer était filtrée à 0,4 µm, acidifiée et stockée à l'obscurité à 4°C. Les Mollusques étaient placés pendant 36 h. dans de l'eau de mer artificielle afin qu'ils éliminent leur contenu digestif. Les fèces étaient alors collectées. Pour chaque groupe de Mollusques, trois groupes d'organes étaient isolés par dissection (Tabl. I) et réunis en pools. Les échantillons solides étaient séchés à poids constant à l'étuve (80°C) puis pulvérisés.

Pour l'eau de mer, les tissus des moules, le seston et les fèces, les analyses étaient effectuées selon la technique de Boiteau et Métayer (1978) adaptée aux échantillons d'origine marine (Amiard et al., 1982).

Pour les tissus des huîtres, les rapports des concentrations entre les différents métaux rendaient difficile l'utilisation de cette méthode. En conséquence, les échantillons (trois fractions aliquotées de 100 mg) ont été partiellement minéralisés avec de l'acide nitrique concentré à 90°C pendant une heure puis la solution a été diluée avec de l'eau déminéralisée. Les concentrations métalliques ont été déterminées dans cette solution acide par spectrophotométrie d'absorption atomique utilisant l'effet Zeeman pour la correction du bruit de fond. La validité de cette méthode a été testée à l'aide d'échantillons standards (Tabl. II).

	Cadmium	Plomb	Cuivre	Zinc
<u>Huîtres SRM 1566</u>				
valeurs certifiées	3,5 ± 0,4	0,48 ± 0,04	63,0 ± 3,5	852 ± 14
valeurs obtenues au laboratoire				
* avec extraction à la dithizone	3,6 ± 0,6	0,47 ± 0,09	59,0 ± 7,6	869 ± 90
* sans extraction	3,6 ± 0,1	0,48 ± 0,04	63,4 ± 1,0	731 ± 8
<u>Hépatopancréas de homard TORT 1</u>				
valeurs certifiées	26,3 ± 2,1	10,4 ± 2,0	439 ± 22	177 ± 10
valeurs obtenues au laboratoire	27,8 ± 1,5	12,0 ± 1,7	434 ± 13	148 ± 2

Tableau II : Concentrations métalliques dans le matériel standard (moyennes en µg/g de tissus secs, affectées de l'intervalle de confiance à 95 %).

I.1.2. RESULTATS ET DISCUSSION :

I.1.2.1. Variations saisonnières :

Chez *M. edulis*, les concentrations de Cd, Cu et Zn dans l'ensemble des tissus mous présentent un pic en hiver et au printemps (Fig. 1). Chez *C. gigas* la période de forte concentration correspond à un plateau qui s'étend de la fin de l'été au printemps (Fig. 2).

Pour le plomb, les variations saisonnières potentielles sont masquées par des fluctuations aléatoires dont les plus importantes ont été observées en Août 1982 (Tabl. III et IV). En conséquence, nous avons analysé nos résultats en utilisant la méthode de décomposition des séries pluriannuelles recommandée par Ibanez (1983, 1984). Les courbes qui en résultent (Fig. 3) montrent une certaine similarité avec les autres métaux : chez la Moule, les valeurs maximales, très variables d'une année à l'autre sont observées en hiver et au printemps ; chez l'Huître, l'amplitude des variations est faible mais une décroissance des concentrations est cependant repérable à la fin du printemps, aboutissant à des valeurs minimales au début de l'été.

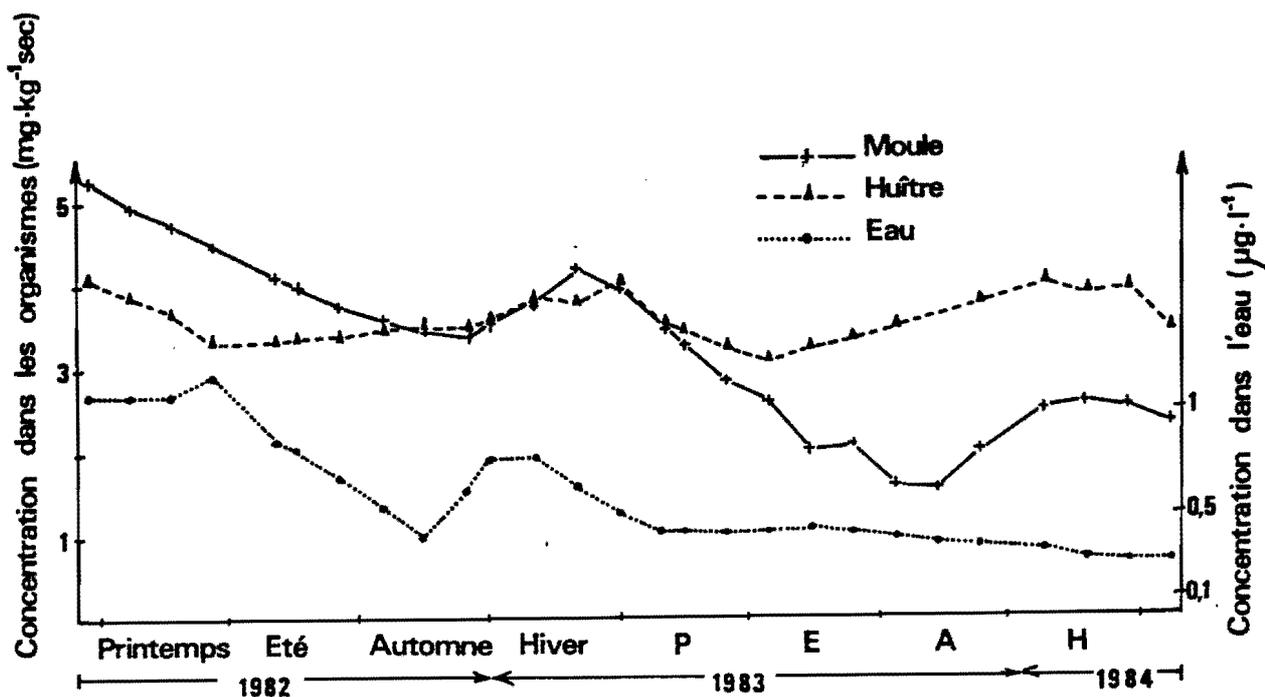


Figure 3 : Evolution au cours du temps des valeurs estimées des concentrations en plomb dans l'eau, les moules et les huîtres (données brutes d'Août 1982 éliminées).

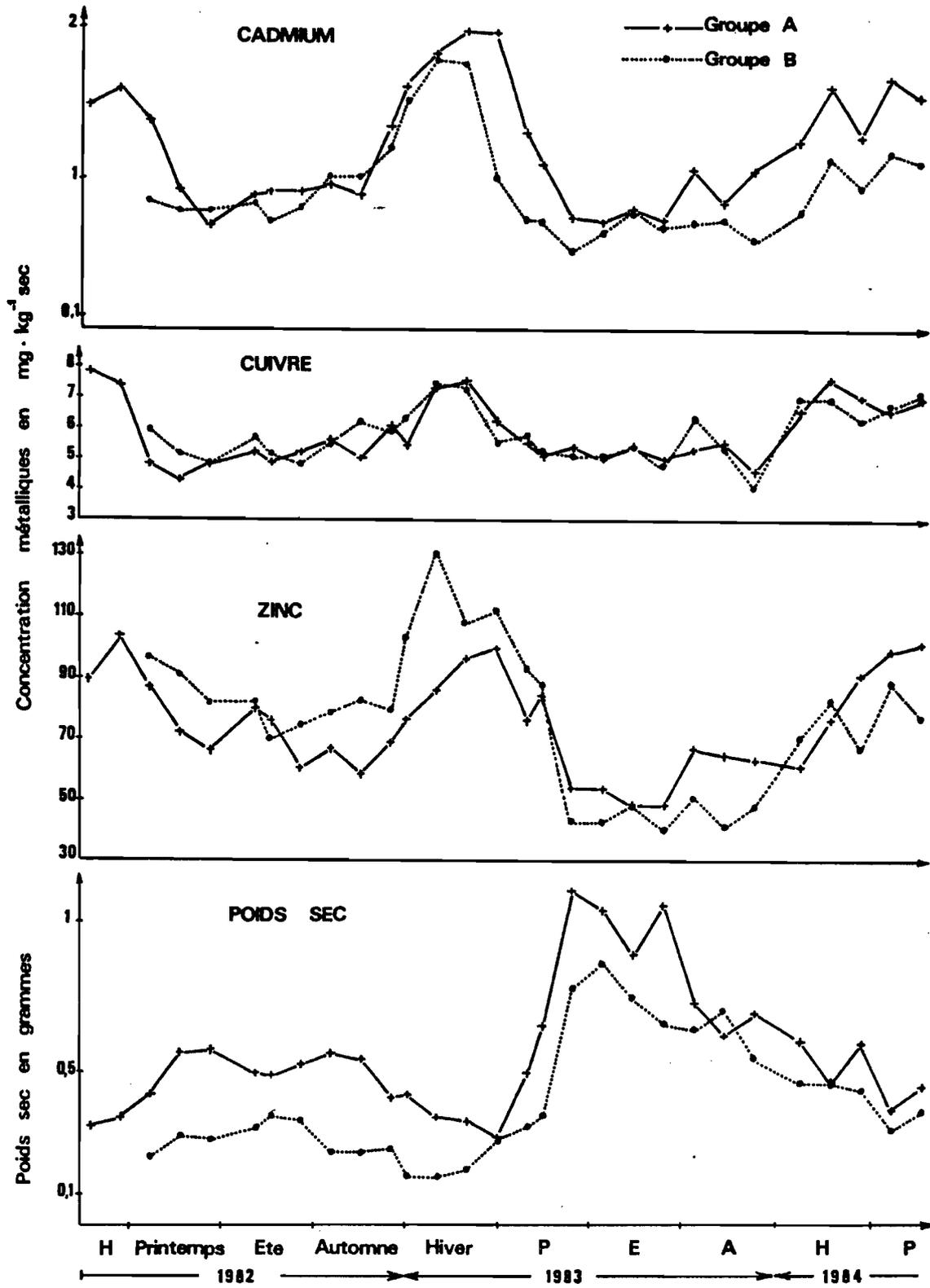


Figure 1 : Variations saisonnières des concentrations métalliques et du poids sec moyens des tissus mous des moules de deux groupes différant par l'âge.

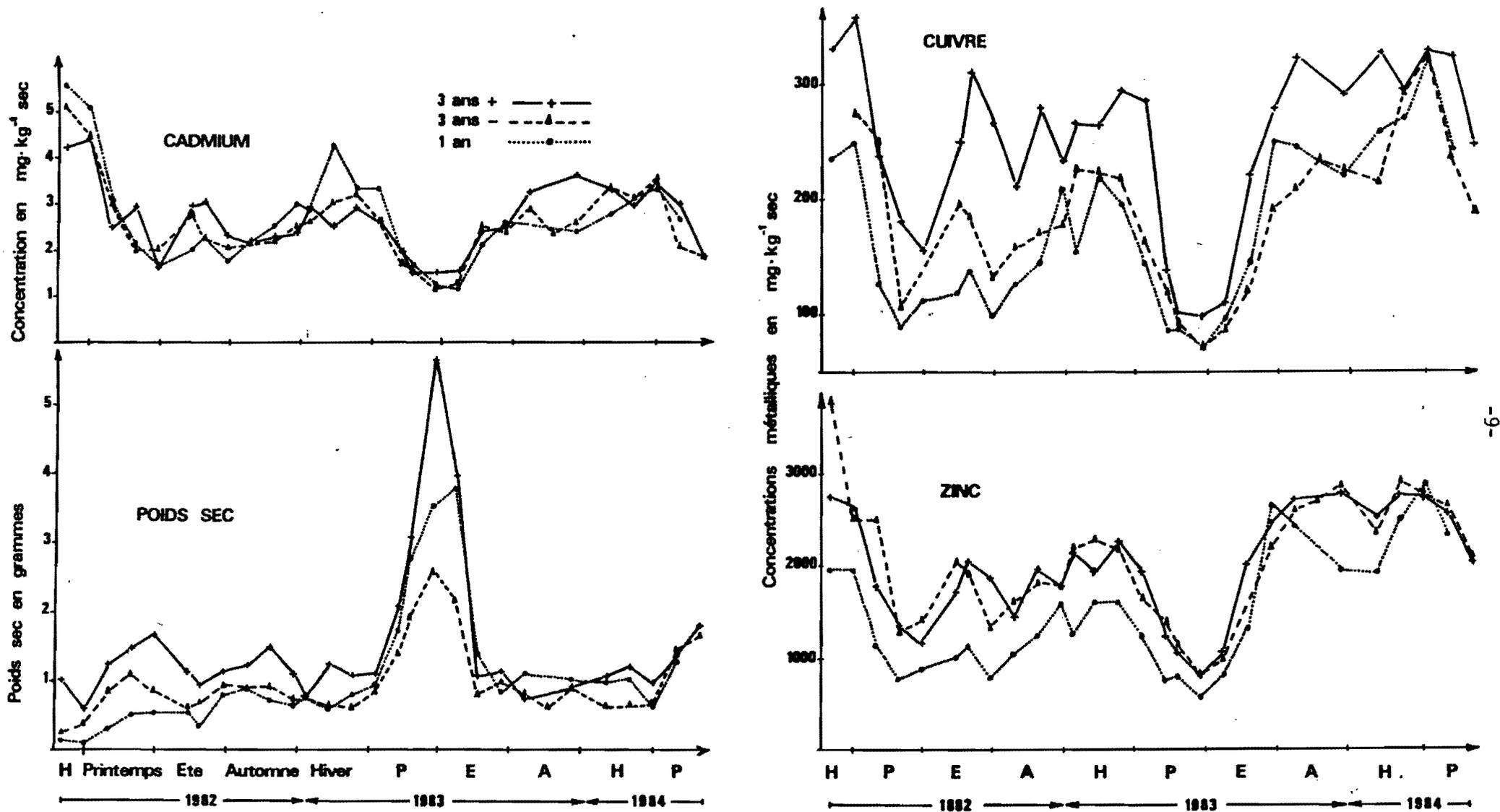


Figure 2 : Fluctuations saisonnières du poids sec et des concentrations métalliques dans l'ensemble des tissus mous de l'huître.



Des variations saisonnières similaires avaient été observées chez diverses espèces de Mollusques filtreurs : *Pecten maximus*, *Chlamys opercularis*, *M. edulis*, *M. galloprovincialis*, *M. californianus*, *C. gigas*, *C. virginica* (Bryan, 1973 ; Frazier, 1975 ; Phillips, 1976 ; Majori et al. , 1978 ; Boyden et Phillips, 1981 ; Ritz et al. , 1982 ; Farrington et al. , 1983...). Les nombreuses hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène ont été résumées par Lewis et Cave (1982).

*Hypothèse A* : Les variations observées chez les organismes sont la conséquence d'un changement saisonnier des sources environnementales de métaux.

Nous avons recherché les corrélations éventuelles entre les concentrations métalliques dans les deux Mollusques filtreurs et dans l'eau de mer filtrée et le seston qui sont des sources de métaux de ces organismes dans l'environnement. Pour Cd et Cu aucune corrélation significative n'est relevée. Pour Pb une corrélation significativement positive ( $P < 0,05$ ) est observée entre les concentrations dans l'eau filtrée et les organismes. Elle traduit la diminution de la concentration de plomb au cours de l'étude, les moyennes pour la première et la seconde année de suivi décroissant de 0,64 à 0,37  $\mu\text{g.l}^{-1}$  pour l'eau, de 4,25 à 2,79  $\text{mg.kg}^{-1}$  pour les moules, les différences étant significatives ( $P < 0,001$ ). Pour les huîtres, bien que les données estimées (Fig. 3) ne fassent pas apparaître une tendance nette, les valeurs minimales observées décroissent de 2,86 en 1982 à 0,62  $\text{mg.kg}^{-1}$  en 1983. Pour le zinc, une corrélation négative significative ( $P < 0,05$ ) est observée entre le seston et les huîtres. Elle s'explique par le fait que, tandis que les teneurs dans le seston restent sensiblement constantes au cours du temps ( $29,2 \pm 7,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ , l'intervalle de confiance étant établi avec une probabilité de 99 %), les concentrations dans les huîtres augmentent pour les trois groupes A, B, C, (Fig. 2).

L'hypothèse A ne paraît donc pas vérifiée dans le cas de la Moule et de l'Huître en Baie de Bourgneuf.

*Hypothèse B* : A l'accroissement printanier de la nourriture phyto-planctonique disponible correspond une augmentation de l'activité biologique (Fig. 4). Les métabolites induits par cette productivité accrue disposent d'un pouvoir de complexation des métaux conduisant

à un changement saisonnier de leur biodisponibilité qui serait à l'origine des fluctuations des concentrations métalliques dans les organismes. Cette hypothèse n'a pas été testée dans le cadre de la présente étude.

*Hypothèse C* : L'augmentation printanière de l'activité biologique (Fig. 4) entraîne un accroissement de la bioaccumulation. Cette hypothèse est en contradiction tant avec les observations que nous avons effectuées sur l'Huître et la Moule qu'avec les données de la littérature concernant d'autres espèces qui indiquent généralement des valeurs maximales en période froide.

*Hypothèse D* : L'augmentation printanière de l'activité biologique (Fig. 4) entraîne un accroissement de l'élimination. Chez l'Huître et la Moule, le seul mode d'élimination que nous avons étudié est l'excrétion faecale. L'élimination des quatre métaux *via* les fèces ne présente pas de fluctuations saisonnières. Si un enrichissement des fèces par rapport au seston est observé dans de nombreux cas (Tabl. V), il ne s'agit pas d'un phénomène saisonnier.

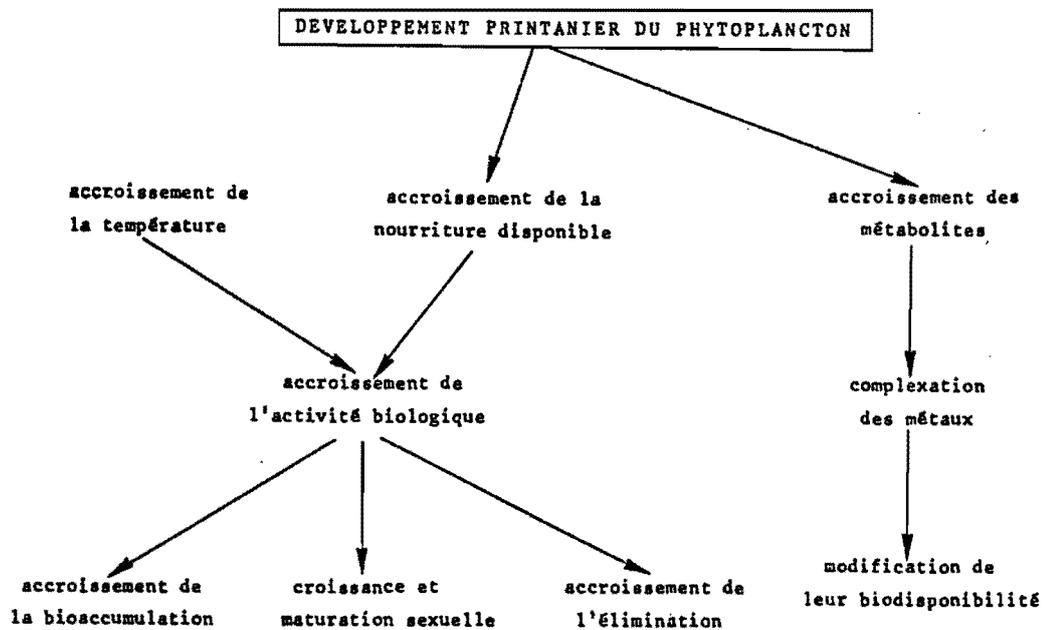


Figure 4 : Causes hypothétiques des fluctuations saisonnières des concentrations métalliques observées chez les organismes vivants.

		Cadmium	Plomb	Cuivre	Zinc
<u>Seston</u>	Moyenne	0,11	25,36	5,49	87,81
	Valeurs limites	0,04 - 0,33	12,43 - 47,22	2,55 - 30,89	65,75 - 148,95
<u>Fèces des moules</u>	: Moyenne	0,31	59,39 <sup>***</sup>	30,38 <sup>***</sup>	119,54 <sup>***</sup>
	<u>A et B</u> Valeurs limites	0,09 - 1,39	25,32 - 144,82	6,02 - 124,50	59,40 - 323,10
<u>Fèces des huîtres</u>	: Moyenne	0,30	33,18 <sup>**</sup>	23,39 <sup>***</sup>	109,80 <sup>***</sup>
	<u>A, B et C</u> Valeurs limites	0,08 - 3,26	14,40 - 144,00	4,60 - 75,00	54,50 - 208,30

<sup>\*</sup> différence significative  
<sup>\*\*</sup> différence hautement significative  
<sup>\*\*\*</sup> différence extrêmement significative  
 + valeur atteinte à la suite de la pollution d'août 82.

} avec le seston pour le même métal (test t)

TABLEAU V - Comparaison des concentrations en éléments métalliques (mg.kg<sup>-1</sup> sec) dans le seston et dans les fèces des Mollusques filtreurs (tous lots confondus).

*Hypothèse E* : Certains auteurs ont avancé l'hypothèse que les variations saisonnières des concentrations métalliques pourraient être expliquées par les fluctuations de poids (Bryan, 1973 ; Phillips, 1976 ; Majori et al. , 1978 ; Boyden et Phillips, 1981 ; Ritz et al. , 1982 Farrington et al. , 1983).

D'après les figures 1 et 2, il est évident que les concentrations métalliques les plus faibles dans les huîtres et les moules correspondent aux poids secs les plus élevés.

Effectivement, le poids des tissus et les concentrations des quatre métaux présentent généralement, à l'exception de Cu chez la Moule, des corrélations significativement négatives ( $P < 0,01$ ) dans les restes des animaux appartenant aux deux espèces de filtreurs. Ces restes comprennent les gonades et les poids les plus élevés correspondent à la maturité sexuelle. Celle-ci est plus étalée au cours du temps chez la Moule que chez l'Huître, ce qui explique que les concentrations métalliques les plus élevées correspondent à un pic pour la première espèce et à un plateau pour la seconde. Cependant, le développement des gonades n'est pas le seul phénomène explicatif des variations saisonnières observées puisque des corrélations significativement négatives sont également établies entre le poids et les concentrations des métaux (à l'exception du plomb chez la Moule) dans la masse viscérale de la Moule et l'Huître, occasionnellement des branchies.

La présente étude, menée sur des populations contrôlées de *M. edulis* et *C. gigas* avec des prélèvements fréquents pendant plus de deux cycles annuels vérifie donc statistiquement l'hypothèse E.

I.1.2.2. Influence du poids et de l'âge :

Les concentrations métalliques dans les tissus mous des différents groupes de moules et d'huîtres ont été comparées à l'aide du test t adapté aux paires de variables.

Au début de l'étude, les moules du groupe A étaient presque deux fois plus fortes que les moules B en ce qui concerne le poids sec des tissus mous (Tabl. I), mais à partir de l'automne 1983, les différences entre les deux groupes ne sont plus significatives. Sur l'ensemble de la période d'étude, les concentrations de cadmium dans les moules A sont significativement ( $P < 0,001$ ) plus élevées que dans les moules B, aucune différence significative n'apparaissant pour les autres métaux.

Chez les huîtres, au début de l'étude les groupes A, B et C étaient très distincts en fonction du poids sec des tissus mous (Tabl. I) puis ces différences se sont atténuées pour s'annuler dès la fin de l'été 1983 (Fig. 2). Rappelons de plus que les groupes A et B (3 ans au début de l'expérience) se distinguent par l'âge du groupe C (1 an). Aucune différence n'est observée entre les concentrations de cadmium (Fig. 2) et de plomb dans les groupes A, B et C. Pour le cuivre, le groupe A présente des concentrations significativement plus élevées ( $P < 0,001$ ) que les deux autres groupes (Fig. 2). Pour le zinc, les groupes A et B présentent des concentrations plus élevées ( $P < 0,001$ ) que le groupe C (Fig. 2). Il semble donc que pour le cuivre le facteur principal influençant la bioaccumulation soit le poids tandis que pour le zinc, l'âge joue un rôle prépondérant.

Les données de la littérature concernant l'influence de l'âge sur la bioaccumulation des métaux sont très contradictoires (Mackay et al., 1975 ; Boyden, 1977 ; Cossa et al., 1980 ; Boalch et al., 1981 ; Cooper et al., 1982 ; Thomson, 1982 ; Fischer, 1983...). Ceci tient au fait que les auteurs considèrent souvent que le poids de chair ou la taille de la coquille rendent compte de l'âge de l'animal. Or la taille de la coquille peut varier selon les caractéristiques du milieu (profondeur, agitation, qualité de l'eau et de la nourriture).

Quant au poids de chair, il varie considérablement au cours du cycle sexuel mais aussi selon les individus ainsi qu'en témoignent les différences que nous avons observées entre les lots A et B des huîtres de 3 ans. Le poids et l'âge peuvent d'ailleurs exercer leur influence de façon indépendante sur la concentration en éléments traces. Le cas du zinc et du cuivre chez l'Huître est particulièrement démonstratif à cet égard.

#### I.1.2.3. Organotropisme :

La répartition des métaux dans les différents groupes d'organes est présentée dans les tableaux III et IV.

Chez *M. edulis*, les concentrations de Cd et Zn sont très similaires dans la masse viscérale, les branchies et palpes labiaux, et les restes. Pour le plomb, les concentrations minimales et moyennes sont voisines dans tous les groupes d'organes mais chez les animaux exposés à une contamination *in situ* (observée les 4 et 18 Août 1982) les concentrations de Pb les plus élevées sont alors rencontrées dans les branchies et palpes suivis de la masse viscérale. Le cuivre semble s'accumuler préférentiellement dans la masse viscérale, les différences observées avec les autres organes étant d'autant plus marquées que le niveau général du cuivre dans l'organisme est plus élevé. Chez *C. gigas* les restes présentent toujours les concentrations les plus faibles pour les quatre métaux étudiés.

Pour tous les métaux, on observe des corrélations positives et significatives entre tous les groupes d'organes, ce qui traduit une évolution assez similaire des concentrations métalliques dans tous les tissus mous des deux Mollusques au cours de la période d'étude. Cependant, alors que les concentrations métalliques dans les tissus mous subissent des variations cycliques liées à la saison, les fluctuations observées pour les branchies et les palpes sont généralement plus erratiques (exemple : Fig. 5).

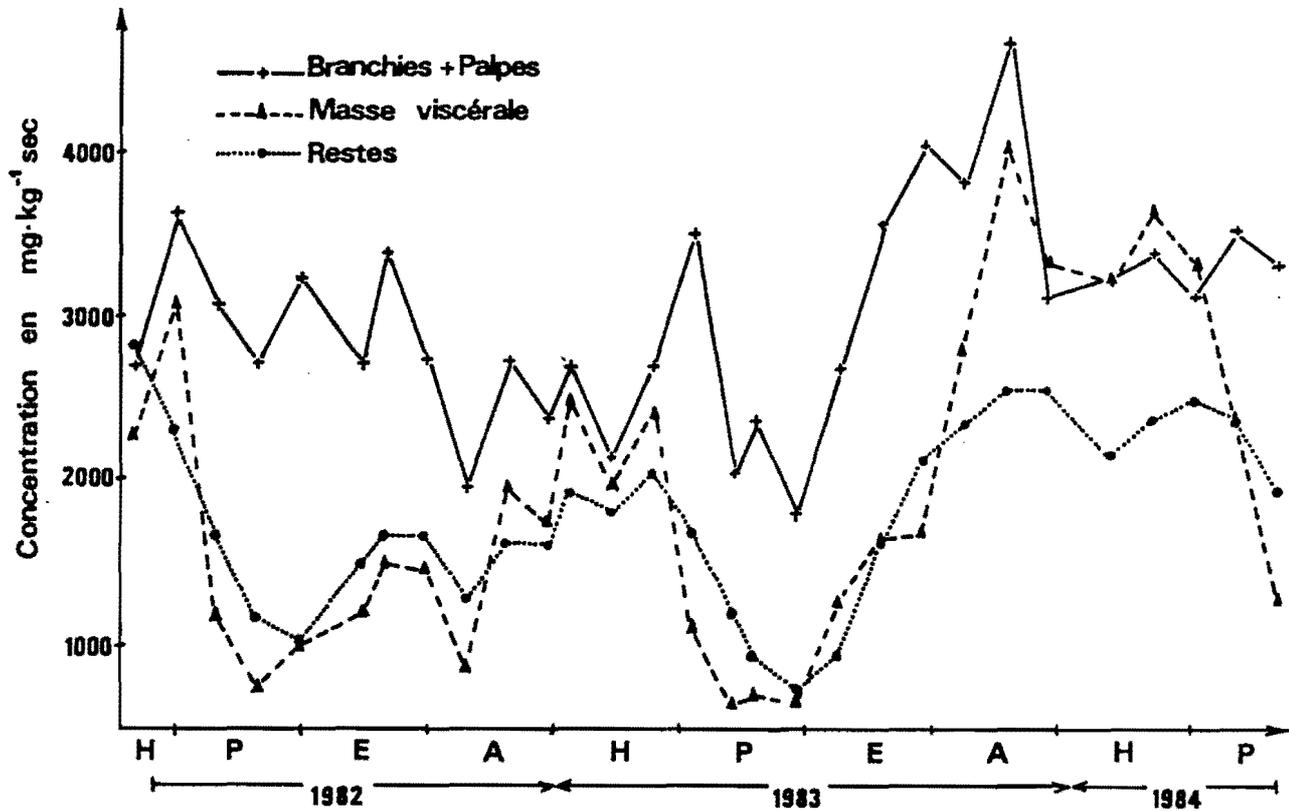


Figure 5 : Fluctuations comparées des concentrations moyennes de zinc dans les différents groupes d'organes des huîtres.

Ces fluctuations erratiques ainsi que l'accumulation préférentielle du plomb dans les branchies et palpes labiaux au cours de l'épisode de contamination d'août 1982 illustrent vraisemblablement une réaction à court terme des organes externes en contact direct avec l'environnement.

Si les concentrations de cadmium et de plomb sont du même ordre de grandeur chez les deux Mollusques, celles de zinc et de cuivre sont respectivement 25 et 35 fois plus élevées chez l'Huître que chez la Moule et ceci pour des animaux exposés aux mêmes conditions environnementales (Tabl. III et IV). Ces différences sont liées aux caractéristiques spécifiques des mécanismes de détoxification (Noel-Lambot, 1976 ; George et al. , 1978, 1982 ; George et Frazier, 1982 ; Frazier et George, 1983 ; Pirie et al. , 1984 ; Thomson et al. , 1985).

I.2. ETUDE DE LA RESISTANCE AUX METAUX (ZINC ET CADMIUM) DES BACTERIES  
HETEROTROPHES DE L'EAU DU PARC ET DES HUITRES.  
ACCUMULATION DE CES ELEMENTS PAR CES MICRO-ORGANISMES.

Cette étude comprenait trois volets :

- une analyse de la répartition de la résistance au zinc et au cadmium dans les populations bactériennes hétérotrophes de l'eau et des huîtres du parc ;
- une étude des relations entre cette résistance aux deux métaux, la capacité d'accumulation de ceux-ci et le métabolisme énergétique des bactéries ;
- une évaluation des relations éventuelles entre la résistance aux métaux et la résistance aux antibiotiques dans ces populations bactériennes.

Les principaux résultats obtenus au cours de ce travail ont fait l'objet de trois publications, l'une effectivement parue dans le *Journal Canadien de Microbiologie* (Septembre 1985), les deux autres en cours de soumission. Ces trois textes sont cités dans l'annexe I.

I.2.1. METHODOLOGIE GENERALE UTILISEE :

D'un point de vue général, l'étude a été fondée sur l'analyse de 453 souches de bacilles à Gram négatif isolés, en nombre à peu près équivalent, de l'eau et des huîtres (masse viscérale) du parc ostréicole de l'Ile Bergère au cours d'un cycle annuel (Mai 1983 à Mai 1984), à raison de 40 souches par mois (20 de l'eau, 20 des huîtres). Afin de conserver à ces "échantillons" leur représentativité par rapport aux populations bactériennes naturelles, les souches ont été isolées selon une technique de prélèvement au hasard (Bianchi et Bianchi, 1983).

La sensibilité des souches aux métaux a été évaluée grâce à deux méthodes : la diffusion en milieu gélosé (antibiogramme) et la dilution en milieu solide (mesure des concentrations minimales inhibitrices, ou CMI), dans deux conditions d'aération : aérobiose et anaérobiose (atmosphère H<sub>2</sub>-CO<sub>2</sub>, procédé GasPak, Mérieux).

La sensibilité aux antibiotiques a été étudiée par la technique de l'antibiogramme, standardisée selon Chabbert (1963).

L'accumulation du zinc et du cadmium par les bactéries a été analysée à l'aide d'un nombre plus restreint de souches (48 pour Cd, 38 pour Zn) et dans deux conditions :

- en culture dans un bouillon nutritif (Marine Broth Difco) ;
- en suspension non proliférante dans une eau de mer artificielle, à partir de cultures dans le milieu précédent.

Dans les deux cas, les métaux ont été ajoutés sous forme ionique (chlorure), à la concentration finale de 1 mg/litre.

Le cadmium a été dosé par voltamétrie de redissolution anodique sur les culots cellulaires rincés et lyophilisés, après minéralisation en mélange nitro-perchlorique.

Le zinc a été dosé par spectrophotométrie d'absorption atomique, après minéralisation des culots cellulaires et extraction à la dithizone.

### I.3.2. RESULTATS :

I.2.2.1. Répartition de la résistance au zinc et au cadmium dans les populations bactériennes hétérotrophes de l'eau et des huîtres (Voir Can. J. Microbiol., Annexe I).

Aucune corrélation n'est apparue entre les variations du taux de zinc et de cadmium dans le milieu d'origine des souches et celles de la fréquence des souches résistantes (R) à ces métaux au cours de l'année étudiée, ou bien entre les variations annuelles des souches R issues de l'eau et celles des souches R provenant des huîtres. Par contre, les profils de répartition des souches R au cours de l'année étaient très voisins pour les deux métaux dans les deux milieux, avec un minimum aux mois de Décembre et Janvier.

Bien que les huîtres aient concentré le zinc et le cadmium environ  $10^5$  fois par rapport à l'eau, le nombre de souches résistantes était en moyenne, chaque mois, à peu près du même ordre dans ces deux milieux, ce qui laisse supposer une certaine relation entre leurs micro-

flores bactériennes, tout au moins en ce qui concerne le profil de tolérance aux métaux. Il faut par ailleurs souligner le haut degré de similitude observée entre la résistance au zinc et la résistance au cadmium dans ces populations bactériennes, signe vraisemblable d'une grande analogie d'activité des deux éléments au niveau des cellules bactériennes.

1.2.2.2. Relations entre le degré de résistance au zinc et au cadmium des souches, leur capacité à accumuler ces éléments et leur métabolisme respiratoire. (Voir Annexe I, Publ. 6 et 7) :

L'analyse de la répartition des souches par classes de CMI de ces deux métaux et selon le type respiratoire (aérobies strictes ou AS, aérobies facultatives ou AF) a mis en évidence une plus grande sensibilité des souches AS, indépendamment du milieu d'origine (eau ou huîtres). Pour les souches AF, cette résistance a augmenté en anaérobiose (test du Chi<sup>2</sup> significatif au seuil  $10^{-4}$ ).

Ces observations montrent, avec quelques restrictions développées et discutées en Annexe I, qu'il existe chez les bacilles à Gram négatif marins (soit plus de 90 % de la flore hétérotrophe de ce milieu) un lien de nature métabolique entre la résistance au cadmium et au zinc et l'activité respiratoire. Ainsi, les souches AS, dont le métabolisme énergétique dépend plus étroitement de la respiration aérobie et des phosphorylations oxydatives, étaient les plus sensibles à l'action toxique des deux métaux.

En ce qui concerne l'accumulation du zinc (Publ. 6) — : une relation hautement significative a été mise en évidence entre le type respiratoire des 38 souches sélectionnées et leur capacité à accumuler le métal : les souches AS ont en moyenne fixé trois fois plus de zinc que les souches AF. En outre, les souches sensibles ont accumulé environ 2,5 fois plus de métal que les souches R.

Le cas du cadmium (Publ. 7) a été étudié plus en détail. En premier lieu, l'accumulation de ce métal s'est avérée systématiquement plus faible en milieu organique (Marine Broth).

Par ailleurs, en aérobiose, cette accumulation était plus élevée pour les souches AF, aussi bien pour les cultures en milieu organique que pour les suspensions non proliférantes. Ces mêmes souches accumulaient cependant moins de métal en anaérobiose, indépendamment de leur niveau de résistance. Par ailleurs, la quantité de métal accumulée était significativement corrélée à la sensibilité des souches : en culture comme en suspension non proliférante, la quantité de métal accumulée a décliné selon la même séquence que pour le zinc : souches sensibles > souches tolérantes > souches résistantes. Ceci était particulièrement net dans le cas des souches AS, parmi lesquelles les souches sensibles ont accumulé plus de métal que les tolérantes et les résistantes.

Ici encore il y a donc une relation entre les mécanismes qui assurent la résistance des bactéries au cadmium, ceux qui gouvernent l'accumulation du métal et le métabolisme énergétique. Il est donc en définitive probable que, pour la plupart des bactéries marines, la fixation du zinc et du cadmium soit un processus dépendant de l'énergie.

Sur le plan écotoxicologique, les deux faits les plus significatifs sont :

- l'influence de la matière organique sur l'accumulation du cadmium (fait abondamment retrouvé dans la littérature) ;
- l'évolution de la résistance au zinc et au cadmium, ou de la capacité à accumuler ces deux éléments par les bactéries selon le degré d'aération du milieu. L'évolution vers l'anaérobiose se traduit en effet par la disparition des espèces aérobies strictes au profit des anaérobies facultatives dont le comportement vis-à-vis du cadmium et du zinc est différent. Il serait évidemment très intéressant de comparer les voies de pénétration des deux métaux dans les cellules dans les deux conditions, et surtout d'analyser la forme chimique sous laquelle ils sont fixés par les bactéries AF en présence ou en l'absence d'oxygène, de manière à connaître l'importance et l'impact du phénomène au plan qualitatif.

I.2.2.3. Relations entre la résistance aux métaux et la résistance aux antibiotiques :

La résistance aux antibiotiques des bactéries isolées de l'eau du parc et de la masse viscérale des huîtres a montré des variations importantes au cours de l'année étudiée (Fig.6). Aucune relation significative n'a été observée entre les variations de cette résistance et celles des concentrations en métaux trouvées dans les deux milieux. Aucune corrélation n'a également été trouvée entre les variations de la résistance aux antibiotiques et celles de la résistance aux métaux cationiques (Hg, Cd, Zn, Cu, Pb), également pour les deux milieux (Fig. 7 et Fig. 8). L'examen de la répartition annuelle de la polyrésistance des souches isolées aux antibiotiques (Fig. 9) et aux métaux cationiques (Fig. 10) montre même une certaine opposition entre les deux types de résistance croisée ; on constate en effet que la polyrésistance aux métaux cationiques, maximale en Mai et Juin, passait par un minimum au cours des mois de Janvier et Février, ce qui était l'inverse pour la polyrésistance aux antibiotiques dont le maximum se situait de Janvier à Avril. Cet examen global à l'aide d'un "indice moyen de polyrésistance" est évidemment relativement grossier et peut cacher un éventuel couplage entre la résistance à certains antibiotiques et la résistance à certains métaux. Il suggère cependant une dissociation des deux phénomènes dans les populations bactériennes analysées.

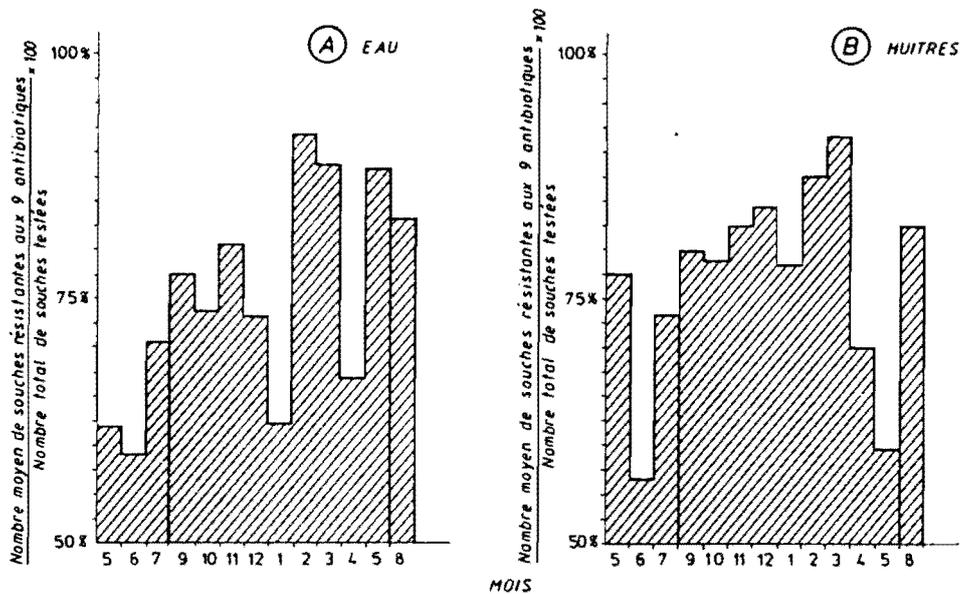


Fig. 6. Variations annuelles de la polyrésistance aux antibiotiques (pénicilline G, céphaloridine, tétracycline, bacitracine, colistine, streptomycine, kanamycine, érythromycine, spiramycine) dans les populations bactériennes hétérotrophes de l'eau du parc (A) ou des huîtres (B).

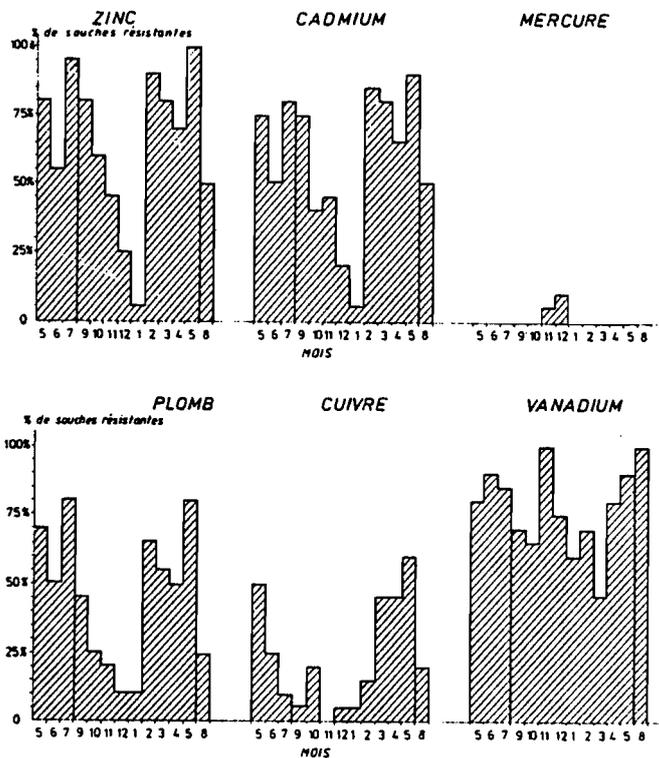


Fig. 7 - Variations du pourcentage de souches résistantes aux métaux dans la population bactérienne hétérotrophe de l'eau du parc au cours de l'année.

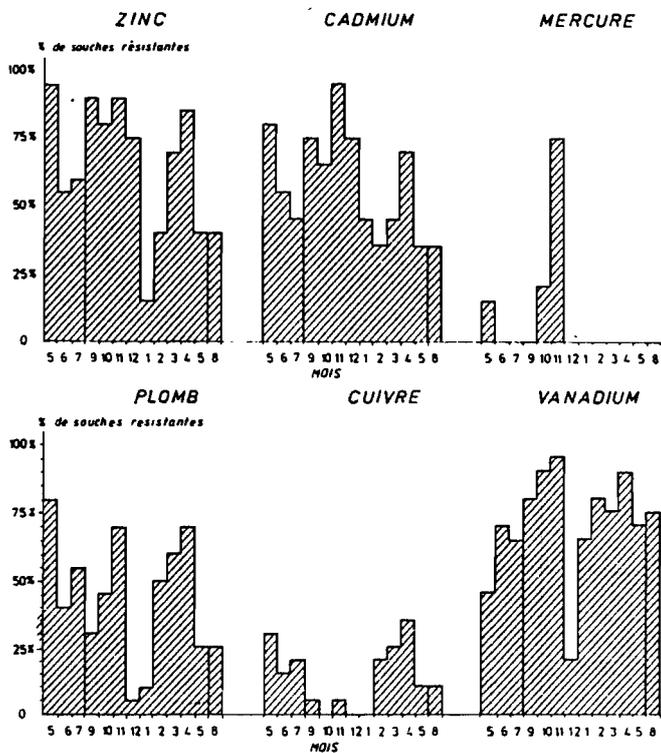


Fig. 8 - Variations du pourcentage de souches résistantes aux métaux dans la population bactérienne hétérotrophe des huîtres (masse viscérale) au cours de l'année.

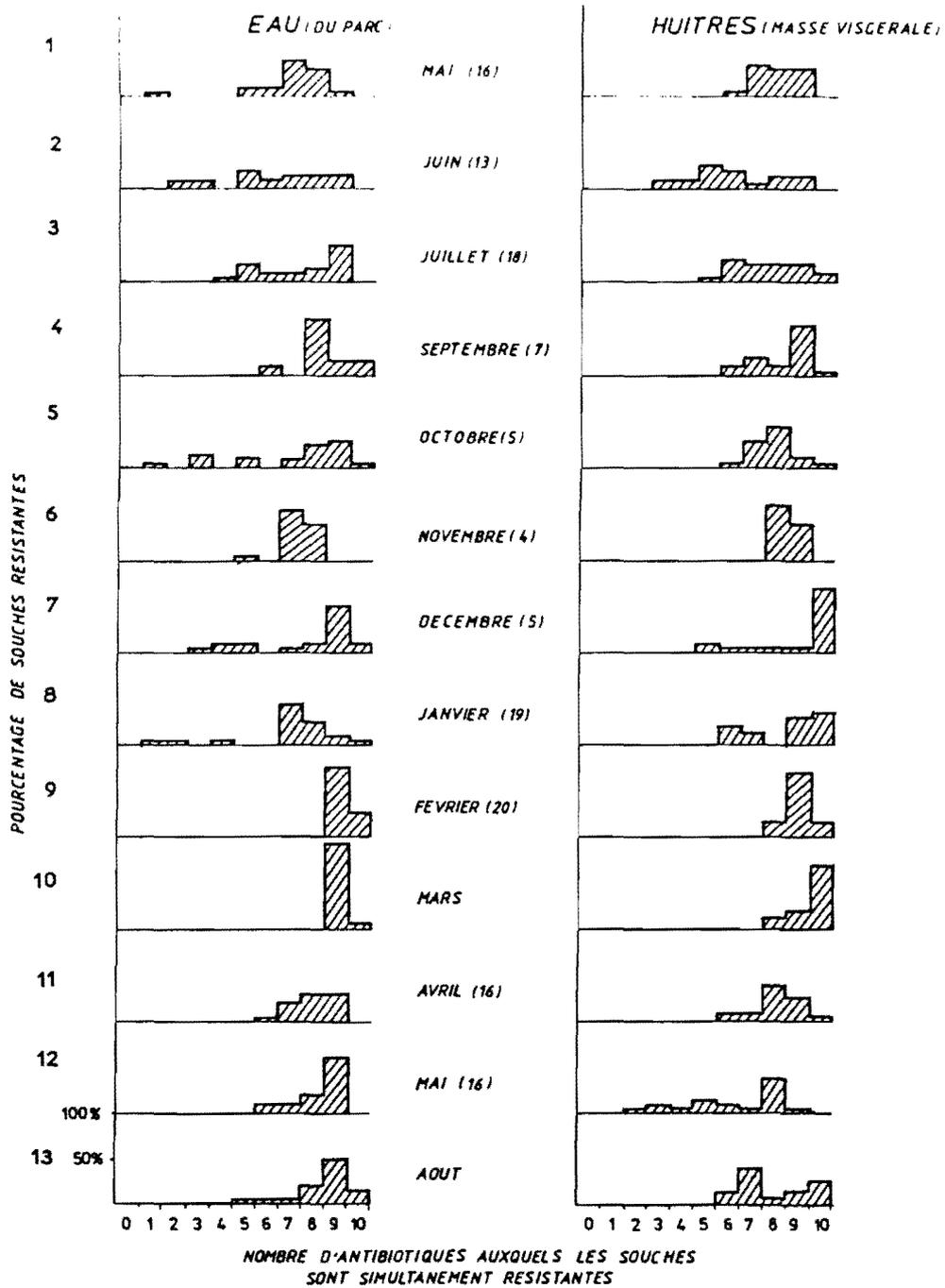


Fig. 9 - Répartition au cours de l'année de la polyrésistance aux antibiotiques (voir Fig. 6 + chlortétracycline) chez les bactéries provenant de l'eau du parc ou de la masse viscérale des huîtres.

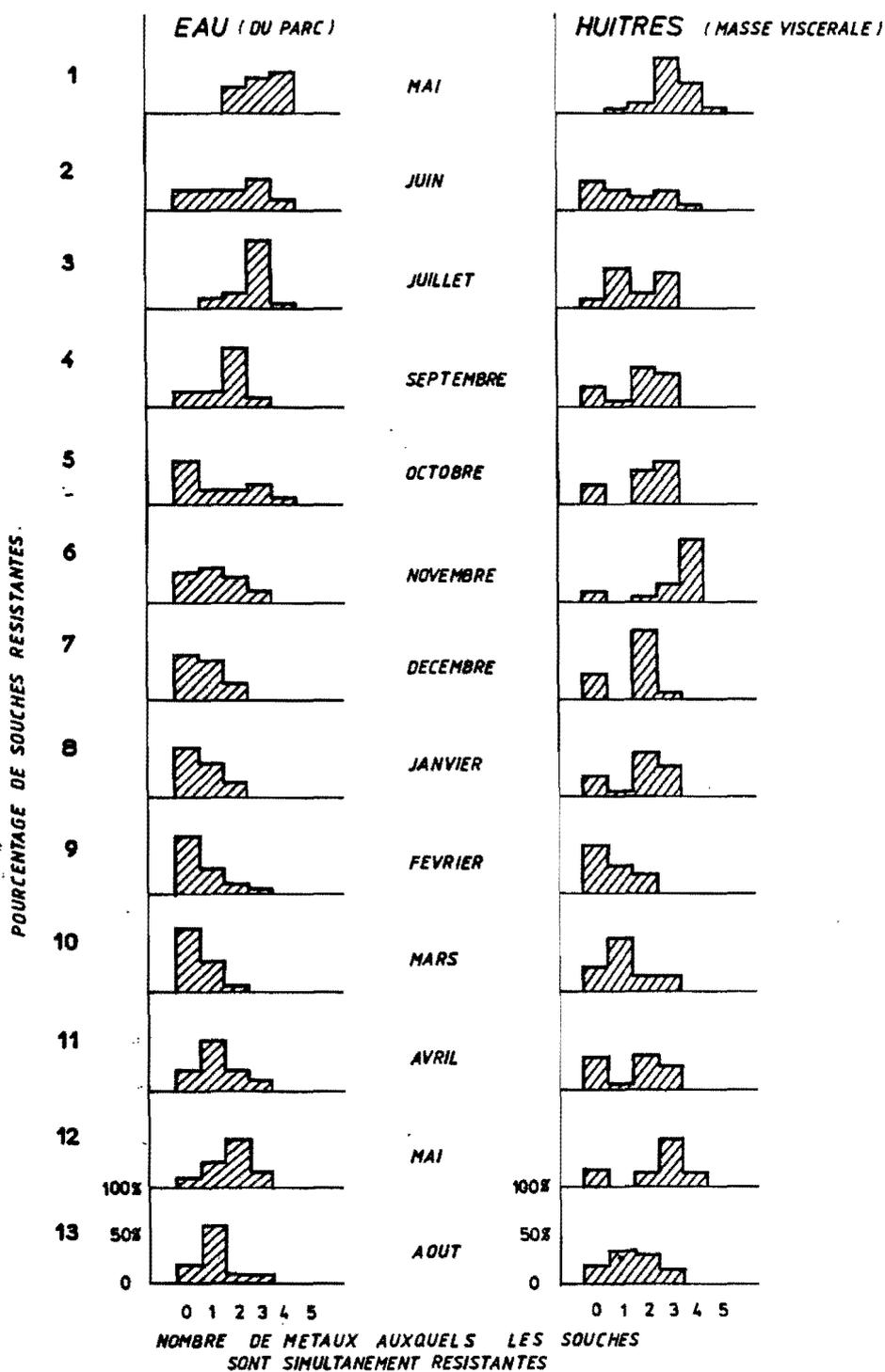


Fig. 10 - Répartition au cours de l'année de la polyrésistance aux métaux cationiques (Cd, Zn, Hg, Cu, Pb) chez les bactéries provenant de l'eau du parc ou de la masse viscérale des huîtres.

I.2.2.4. Amélioration des tests de sensibilité des bactéries marines aux métaux (Zn, Cd) (Publ. 8) :

Il s'agit d'une mise au point technique qui a été rendue possible par la comparaison des nombreuses mesures de sensibilité des bactéries marines aux deux métaux à l'aide de deux techniques différentes: la diffusion et la dilution en milieu solide.

L'ensemble des tests de sensibilité au cadmium et au zinc effectués au cours de ce travail a en effet permis de comparer, pour un nombre élevé de souches, les résultats obtenus par la méthode de l'antibiogramme et ceux fournis par la technique des dilutions et d'analyser la concordance entre les CMI et les zones d'inhibition. Il a ainsi été possible de standardiser l'antibiogramme dans le cas précis de l'étude de la sensibilité des bactéries marines au cadmium et au zinc. Cette étude a montré que le mode de lecture des antibiogrammes influe fortement sur la signification des résultats qu'ils fournissent et sur la concordance avec les CMI. La relation entre CMI et largeur des zones d'inhibition était log-linéaire pour les deux métaux dans certaines conditions bien précises de lecture.

## CHAPITRE II

### ETUDES EXPERIMENTALES

#### II.1. ETUDES EN MILIEU SEMI-OUVERT.

Cette partie de notre étude a été effectuée dans des claires ostréicoles qui constituent un milieu semi-ouvert où l'eau de mer naturelle de la baie de Bourgneuf peut être apportée de façon contrôlée. Le fonctionnement de ces installations ayant été décrit dans de précédents travaux (Robert, 1975), nous n'en représenterons ici que les caractéristiques principales. Les bassins que nous avons utilisés sont d'anciennes salines creusées dans un sol argilo-sableux, d'une superficie d'environ 200 m<sup>2</sup>, situées en bordure du port du Collet. L'alimentation en eau, provenant de la baie de Bourgneuf, se fait durant une période d'environ cinq jours à une semaine à partir d'un coefficient de marée supérieur à 70. Pendant les périodes de mortes eaux, les eaux stagnent dans les bassins qui restent ainsi isolés de la zone néritique. Des chenaux, qui peuvent être obturés, assurent les échanges d'eau entre les claires. Une hauteur d'eau d'environ 60 cm est maintenue dans chaque bassin. Cette faible hauteur d'eau provoque un développement important du phytoplancton dans lequel la Diatomée planctonique *Skeletonema costatum* peut représenter une biomasse importante. Dans ces claires, les ostréiculteurs placent en stabulation, près des installations où se fait le "travail" des huîtres, les animaux élevés dans les parcs ostréicoles situés en mer, dans la baie de Bourgneuf.

##### II.1.1. MATERIEL ET METHODES :

Nous avons suivi les fluctuations des concentrations en éléments métalliques (Cd, Pb, Cu, Zn) des eaux et des huîtres en fonction des cycles de remplissage des bassins pendant une période de 11 jours au mois de mai 1984, suivant le calendrier indiqué dans le Tableau VI. Les huîtres qui ont été déposées dans les bassins provenaient d'autres claires ostréicoles où elles étaient en stabulation depuis plusieurs jours. Un pluviomètre destiné à recueillir les eaux de pluie en vue de doser le cadmium, le plomb, le cuivre et le zinc et de quantifier les apports à chaque bassin a été installé entre les deux claires. L'ensemble des eaux recueillies a

été filtré afin de déterminer les concentrations métalliques de la phase soluble et les prélèvements ont été traités comme indiqués précédemment. Les huîtres ont été disséquées et un feuillet branchial de chacune a été isolé en vue d'une analyse individuelle après une dépuratation de 36 h ou de 72 h, ou sans aucune épuration préalable.

Dates	Mouvements d'eau	Prélèvements	Observations
30 - 04 - 84	- mise à sec des claires A et B - remplissage des deux bassins	- eau de remplissage - eau en fin de remplissage	pluie
02 - 05 - 84	- vidange partielle - remplissage	- eau avant vidange (stagnation 48 h) - eau après le remplissage - pluviomètre relevé ( > 1000 ml )	pluie
04 - 05 - 84	- stagnation des eaux	- eau après stagnation 48 h - eau 1 heure après apport d'huîtres - pluviomètre relevé (275 ml) - huîtres (J 0)	mise en place d'environ 3600 huîtres dans la claire B
05 - 05 - 84	- stagnation des eaux	- eaux après stagnation 48 + 24 h. - huîtres (J 1)	pluie
06 - 05 - 84	- stagnation des eaux	- eau après stagnation 48 + 48 h. - huîtres (J 2 ) - pluviomètre non relevé (500 ml)	pluie
07 - 05 - 84	- stagnation des eaux	- eau après stagnation 48 + 72 h. - pluviomètre relevé (1000 ml)	
10 - 05 - 84	- vidange des claires	- eau après stagnation 48 + 144 h. - huîtres (J 6)	

TABLEAU VI - Récapitulatif du calendrier des études en milieu semi-ouvert.

II.1.2. EVOLUTION TEMPORELLE DE Cd, Pb, Cu et Zn DANS LES DIVERS COMPARTIMENTS (cf. BERTHET, 1986, Publ. 4) :

L'eau de mer qui parvient dans les claires présente des concentrations métalliques solubles comprises dans la gamme de celles que nous avons observées en baie de Bourgneuf, et inférieures à leur moyenne pour le cadmium, le plomb et le zinc. Les apports par l'eau de pluie peuvent représenter une fraction non négligeable des concentrations métalliques dans l'eau des claires. Il a été calculé qu'ils provoquaient un accroissement approximatif des concentrations en Cd, Pb, Cu et Zn respectivement de 0,005 à 0,01  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , 0,12 à 0,18  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , 0,08 à 0,13  $\mu\text{g.l}^{-1}$  et 0,49 à 0,65  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , c'est à dire respectivement environ 23 %, plus de 220 %, 9 et 6 % des concentrations initialement présentes. Ces données peuvent

expliquer en partie les variations des concentrations métalliques des eaux des claires qui, dans l'ensemble, augmentent après une période de pluie, et tendent à décroître après une vidange partielle suivie d'un remplissage. Par ailleurs, ces divers événements peuvent provoquer des modifications du pH et des potentiels d'oxydo-réduction qui modifient les équilibres physico-chimiques du milieu et les réactions de sorption-désorption à partir de la phase particulaire et du sédiment.

L'introduction d'une forte biomasse d'huîtres dans la claire B ne provoque pas de modification significative (test t de Student adapté aux variables appariées) des concentrations en cadmium, en plomb, en cuivre ou en zinc solubles des eaux des bassins. Pour le cadmium et surtout pour le plomb, nous remarquons un accroissement significatif des concentrations des éléments solubles après 144 heures (6 jours) de stagnation, alors qu'aucune différence n'est notée pour le zinc et pour le cuivre.

Nous avons recherché si ces modifications avaient un lien avec diverses caractéristiques physico-chimiques (température, salinité, teneurs en sels nutritifs) ou biologiques (teneurs en chlorophylle a et en phéopigments) à partir des données communiquées par J.M. Robert, pour les eaux demeurées en stagnation (à partir du 04-05-84). Aucune corrélation n'apparaît entre les teneurs métalliques solubles dans les eaux et leurs caractéristiques physico-chimiques ou biologiques.

Dans les conditions de ce travail, les fluctuations observées dans les concentrations métalliques ne paraissent donc pas liées aux caractéristiques physico-chimiques testées, tandis que les variations des populations phytoplanctoniques n'influent pas significativement sur les teneurs en métaux des eaux des claires. Ce dernier résultat apparaît en contradiction avec les résultats de Knauer et Martin (1973) qui font état d'une diminution du cadmium des eaux corrélée avec une augmentation dans les Diatomées. Par contre, Förstner et Wittmann (1979) estiment que le taux d'élément incorporé par le phytoplancton n'est pas suffisant pour modifier les teneurs des eaux.

Dans cette étude, nous n'avons dosé les éléments métalliques que dans les feuillets branchiaux des huîtres. Le temps de séjour dans la claire (0 à 6 jours) ou le temps de dépuración (0 à 72 h) n'ont que fort peu d'influence sur la teneur en éléments traces.

### II.1.3. CONSIDERATIONS METHODOLOGIQUES :

Le milieu semi-ouvert, constitué par les claires ostréicoles apparaît théoriquement comme un site d'étude intéressant pour suivre l'évolution des concentrations métalliques en fonction d'apports contrôlés.

En réalité, dans ce milieu de petite taille où les masses d'eau sont peu importantes et les hauteurs d'eau réduites, les variations des paramètres physico-chimiques sont rapides et parfois très brutales. C'est ainsi le cas des pluies abondantes survenues début mai 1985 qui ont provoqué de fortes dilutions et des apports atmosphériques importants notamment en plomb. A l'inverse, des périodes de forts ensoleillement ou de vent provoquent une intense évaporation.

Par ailleurs, l'introduction d'une forte biomasse, comparative-ment au volume d'eau des bassins, peut influencer considérablement sur les formes physico-chimiques des éléments métalliques.

Il apparaît donc, contrairement à l'hypothèse initiale, que l'observation des phénomènes à moyen ou à long terme et leur interprétation est mal aisée en raison des perpétuelles modifications du milieu qui demeurent incontrôlables et sont difficilement mesurables à cause de leurs fréquences et de leurs caractères très aléatoires.

### II.2. CONTAMINATION EXPERIMENTALE DE *MYTILUS EDULIS* PAR Cd, Cu et Zn INTRODUITS DANS L'EAU :

Le but de cette étude était de comparer le mode d'accumulation de deux éléments traces essentiels, le cuivre et le zinc, et d'un élément trace non essentiel le cadmium.

#### II.2.1. MATERIEL ET METHODES :

Des moules sélectionnées (groupe B de l'étude *in situ*) selon leur taille ont été exposées à une large gamme de concentrations de Cd (0,0025 à 2,5 mg/l), Cu (0,01 à 1 mg/l) et Zn (0,05 à 5 mg/l) pendant 4, 8 ou 16 jours dans des conditions constantes de salinité (35 ‰), température ( $15,5 \pm 0,5^\circ \text{C}$ ) et d'éclairement. L'eau et les polluants étaient renouvelés tous les deux jours. Dans ces conditions, la décroissance des concentrations métalliques dans le milieu

d'élevage était négligeable. Les animaux n'ont pas reçu de nourriture mais l'expérience s'est déroulée en Novembre, à une période où dans les conditions naturelles la nourriture est peu abondante et où les animaux s'amaigrissent.

Pour chaque temps de contamination et chaque concentration de chaque métal, les concentrations ont été déterminées dans les tissus de dix moules selon la méthode sans extraction décrite dans le paragraphe I.1.1.

#### II.2.2. CONTAMINATION PAR LE CADMIUM (Fig. 11) :

Les apports expérimentaux de cadmium induisent un accroissement de la concentration de ce métal dans les tissus mous des moules (Fig. 11). Les différences entre les concentrations dans les moules contaminées et témoins sont généralement significatives pour la plus faible surcharge expérimentale ( $2,5 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) et la plus faible durée d'exposition (4 jours). Pour l'apport expérimental le plus élevé sans être léthal à court terme ( $250 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) et pour le temps de contamination le plus long (16 jours), le niveau de cadmium dans les restes est 136 fois plus élevé que la normale, 190 fois pour les deux autres groupes d'organes.

Pour l'ensemble des organes et des temps d'exposition, l'index de concentration<sup>(a)</sup> décroît des témoins jusqu'aux animaux contaminés par  $25 \mu\text{g.l}^{-1}$  puis reste stable ou du moins ne décroît que légèrement (Fig. 11). Cela signifie que les concentrations de Cd dans l'eau et les organismes ne sont pas proportionnelles pour la contamination la plus faible puis qu'elles deviennent pratiquement proportionnelles pour les surcharges expérimentales supérieures à  $25 \mu\text{g.l}^{-1}$ .

---

$$\text{I.C.} = \frac{\text{FC}_1 \times 100}{\text{FC}_2}$$

$$\text{avec } \text{FC}_1 = \frac{\text{concentration du métal dans l'organisme contaminé (mg.kg}^{-1} \text{ sec)}}{\text{concentration du métal dans l'eau contaminée (mg.l}^{-1})}$$

$$\text{et } \text{FC}_2 = \frac{\text{concentration du métal dans l'organisme témoin (mg.kg}^{-1} \text{ sec)}}{\text{concentration du métal dans l'eau du témoin (mg.l}^{-1})}.$$

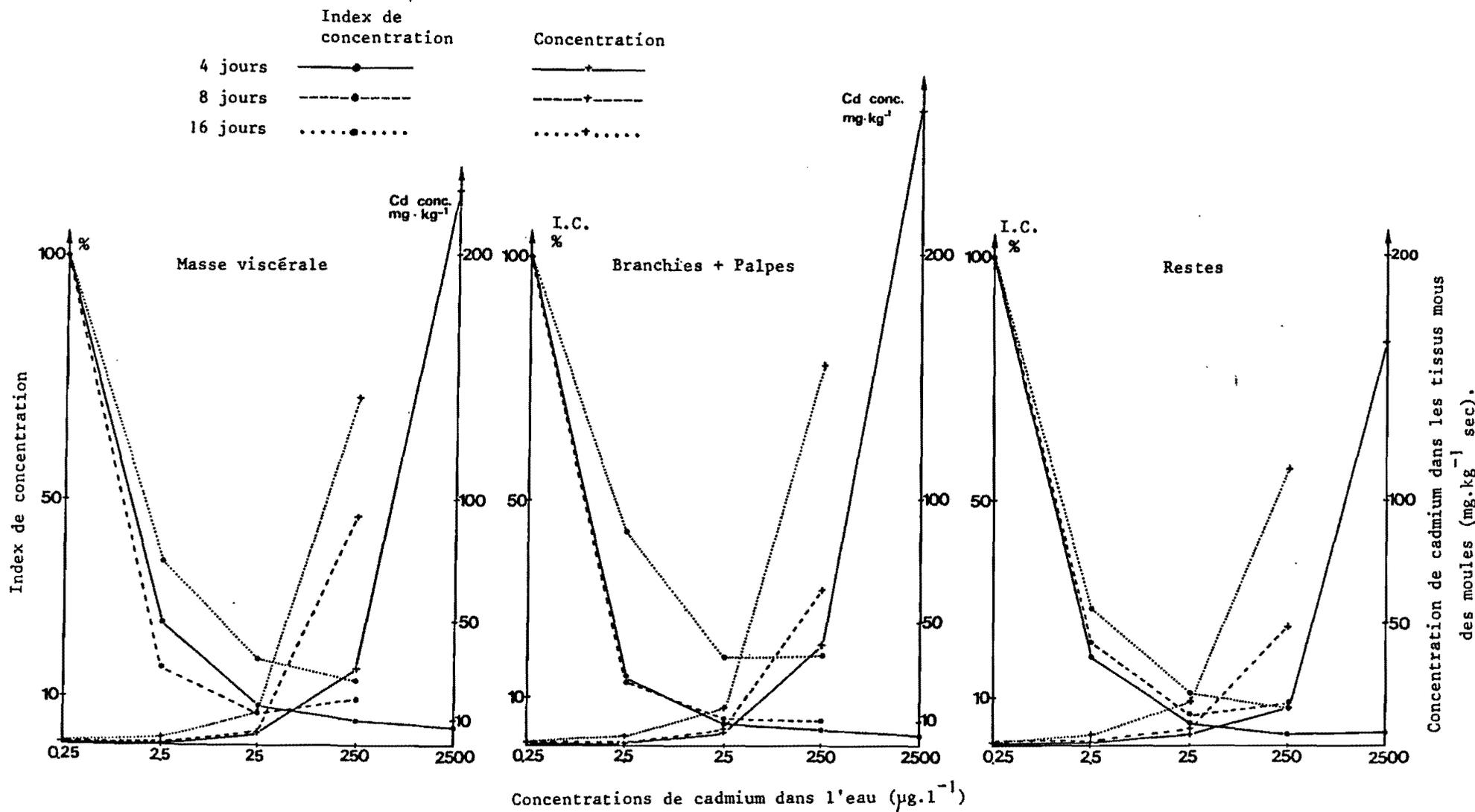


Fig. 11 - Contamination expérimentale de *Mytilus edulis* par le cadmium introduit dans l'eau.

### II.2.3. CONTAMINATION PAR LE CUIVRE (Fig. 12) :

Dans tous les groupes d'organes des moules exposées pendant 4 jours à la plus faible surcharge expérimentale ( $10 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) se produit une légère décroissance de la concentration de cuivre qui est encore observée après 8 jours d'exposition pour la masse viscérale. Lorsque la durée de l'exposition ou les apports expérimentaux augmentent, les concentrations de cuivre dans les organismes s'accroissent, à partir de seuils différents selon les groupes d'organes (cf. publ. 4).

L'index de concentration décroît pour tous les groupes d'organes pour des apports expérimentaux croissant dans l'eau mais il reste pratiquement stable après 4 jours d'exposition à  $500$  à  $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$  et après 16 jours d'exposition à 6 (témoin) à  $10 \mu\text{g.l}^{-1}$  (Fig. 12). Dans ces derniers cas, cela signifie que l'augmentation des concentrations de cuivre dans l'eau et les organismes sont proportionnelles. Cependant, à la fin de l'expérience, le niveau du cuivre est seulement 5 fois supérieur à la normale dans les branchies et les palpes des moules exposées à la plus forte dose sub-léthale ( $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ ), ce rapport atteignant 2,6 et 3,8 respectivement pour la masse viscérale et les restes.

### II.2.4. CONTAMINATION PAR LE ZINC (Fig. 13) :

Après 4 jours de contamination, le niveau de zinc dans les trois groupes d'organes considérés ne s'accroît pas significativement pour des concentrations inférieures ou égales à  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Pour les mêmes surcharges expérimentales, cette stabilité est maintenue dans la masse viscérale et les restes après 8 jours d'exposition, dans les restes seuls après 16 jours. De façon concomitante, l'index de concentration décroît rapidement du témoin à la surcharge expérimentale de  $500 \mu\text{g.l}^{-1}$ . Pour le temps de contamination le plus long et la surcharge sub-léthale la plus forte ( $1000 \mu\text{g.l}^{-1}$ ) qui est 200 fois plus élevée que le niveau témoin, les concentrations de zinc sont 2,3 - 5 et 6,1 fois plus élevées que la normale dans les restes, la masse viscérale et les branchies + palpes respectivement.

### II.3. CONTAMINATION EXPERIMENTALE DE *CRASSOSTREA GIGAS* PAR Pb et Cu A PARTIR DE L'EAU OU DE LA NOURRITURE.

Le protocole de contamination étant relativement complexe, nous avons schématisé dans la figure 14 les sources de Cu et Pb auxquelles ont été exposés les différents lots d'huîtres. Pour plus de détails, le lecteur pourra se reporter à la publication 4.

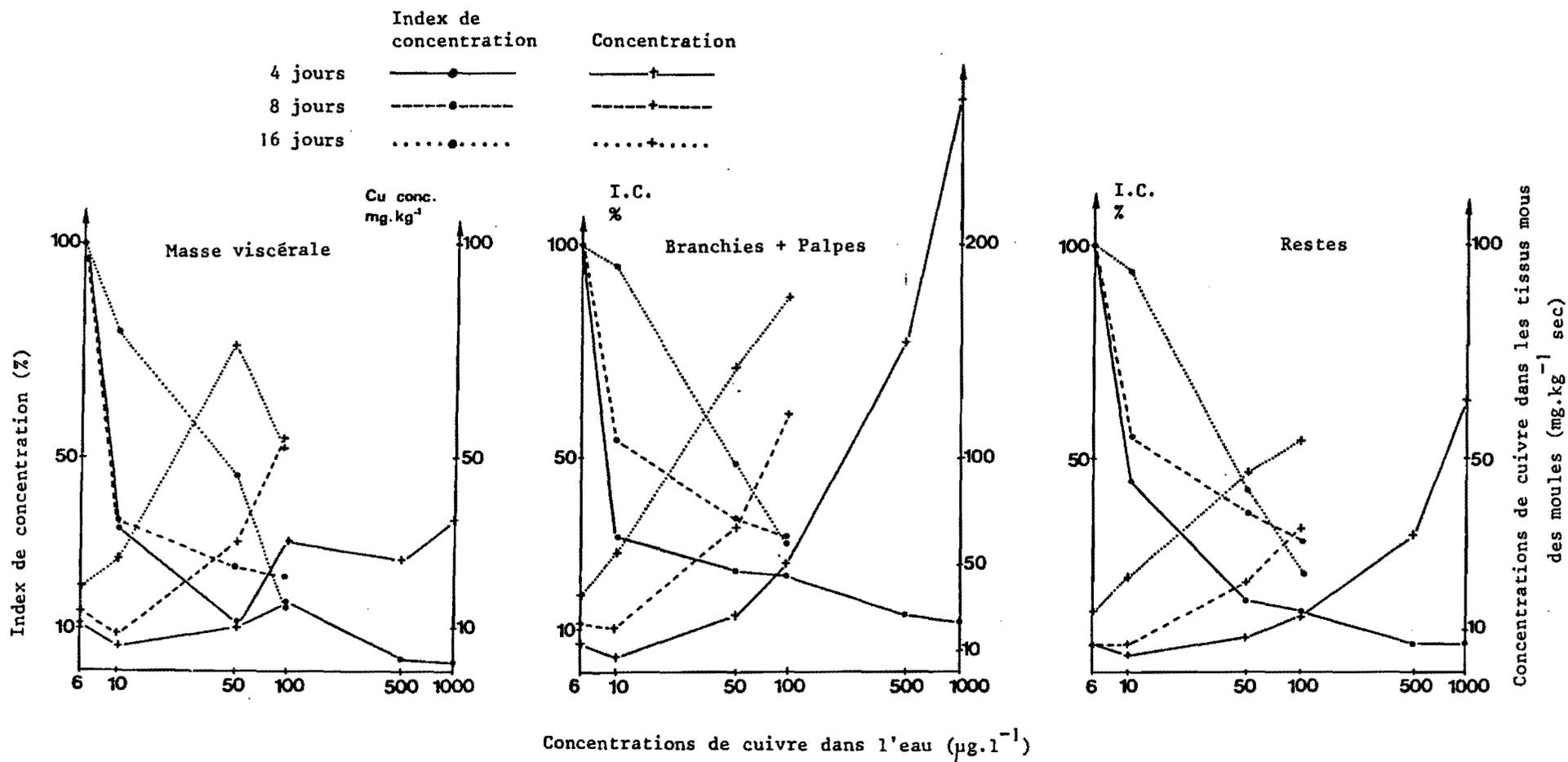


Figure 12: Contamination expérimentale de *Mytilus edulis* par le cuivre introduit dans l'eau.

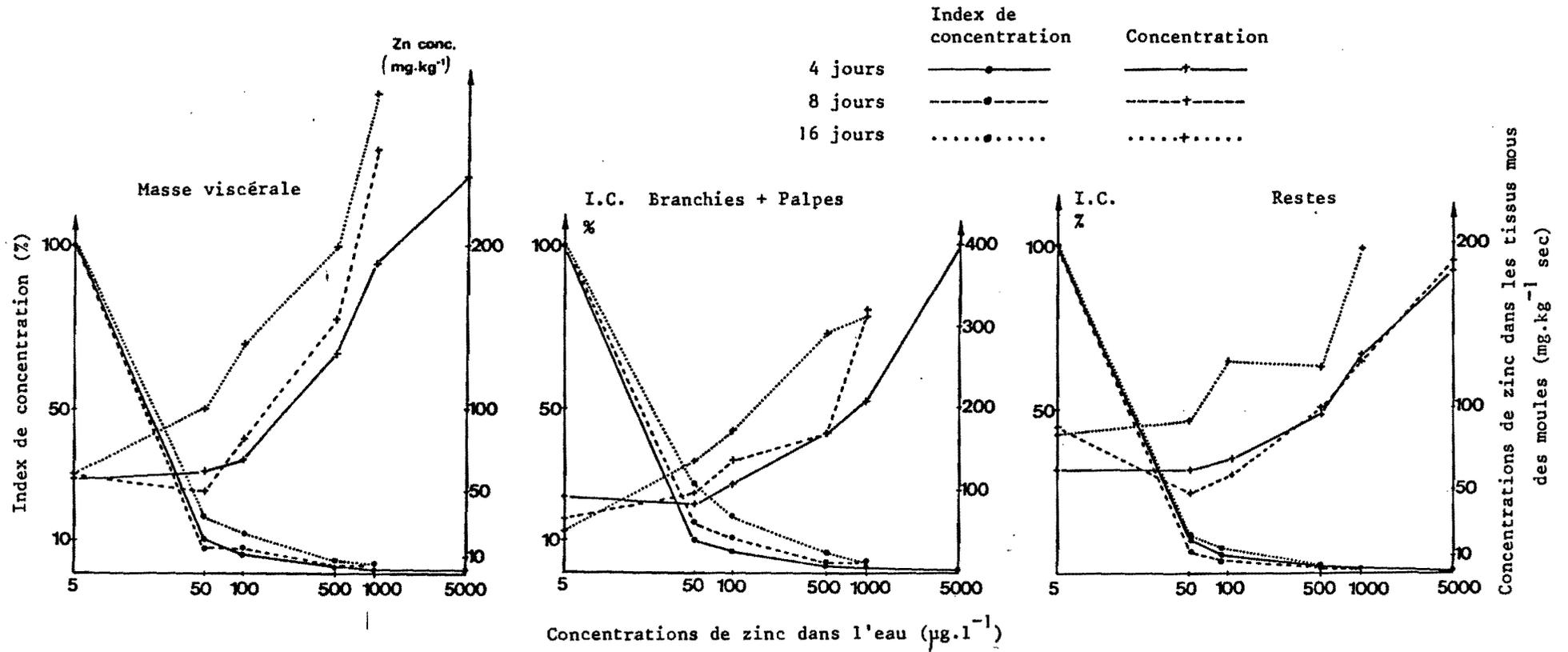


Fig. 13- Contamination expérimentale de *Mytilus edulis* par le zinc introduit dans l'eau.

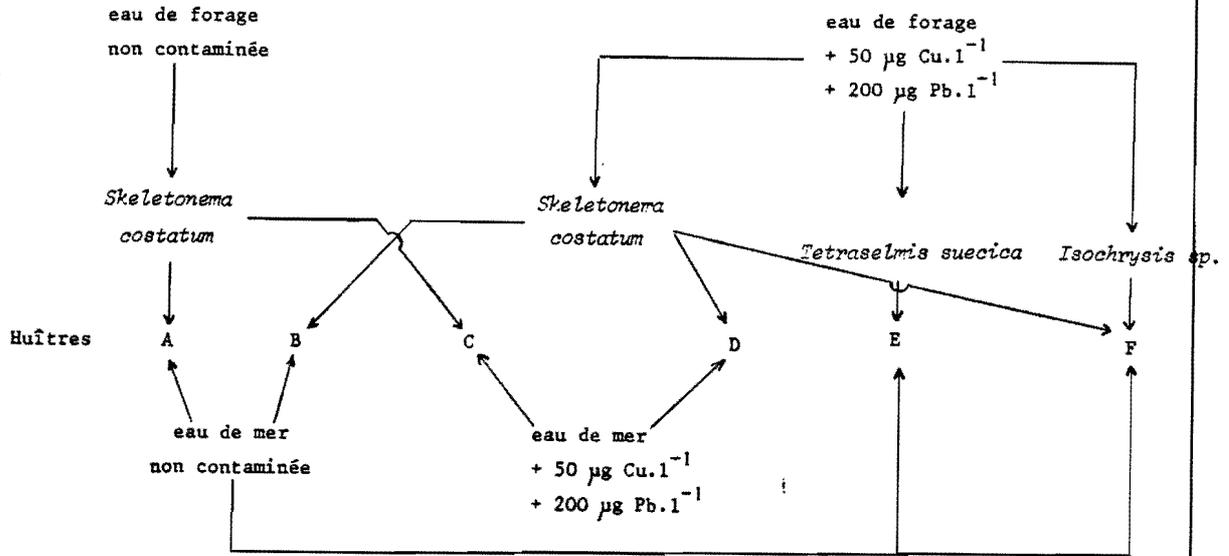


Fig. 14 - Modes d'exposition des différents lots d'huîtres contaminées par Pb et Cu.

II.3.1. INFLUENCE DU VECTEUR DE TRANSFERT SUR L'ACCUMULATION DE Pb et Cu.

Les dosages effectués tous les deux jours sur les organismes phytoplanctoniques nous ont permis de calculer les apports de plomb ou de cuivre associés à la nourriture pour chaque aquarium. En fonction du nombre d'huîtres par aquarium, nous avons pu établir la quantité théorique de chaque métal apportée par huître entre deux prélèvements successifs (Tabl. VII).

	Aquariums A et C	Aquariums B et D	Aquarium E	Aquarium F
<b>Plomb</b>				
Avant 1er prélèvement (13 apports)	0,003	6,6	4,0	5,9 <sup>a</sup>
Entre 1er et 2ème (8 apports)	0,007	9,2	13,3	10,9 <sup>b</sup>
Entre 2ème et 3ème (8 apports)	0,002	6,2	15,7	24,9 <sup>b</sup>
<b>Cuivre</b>				
Avant 1er prélèvement	5,2	206,1	223,3	49,9 <sup>a</sup>
Entre 1er et 2ème	21,4	230,1	429,3	467,3 <sup>b</sup>
Entre 2ème et 3ème	12,1	219,1	738,3	872,7 <sup>b</sup>

a - 10 apports d'*Isochrysis sp.*

b - 6 apports de *S. costatum*.

TABLEAU VII - Quantités de métaux (ng) apportées aux huîtres par la nourriture entre deux prélèvements successifs (moyenne théorique par individu).

Pour chaque temps de contamination (fig. 15), des analyses individuelles ont porté sur l'ensemble des tissus mous de 10 huîtres de chaque lot, traitées selon le protocole décrit pour l'étude *in situ*.

La figure 15 indique une décroissance des teneurs en plomb des huîtres témoins (bac A) durant les 28 jours de l'expérimentation. Toutefois les différences observées ne sont pas significatives. Pour les huîtres des lots B et E vivant dans de l'eau non contaminée et recevant respectivement les Algues *S. costatum* et *T. suecica* contaminées, aucune différence statistiquement significative n'est observée entre les animaux des prélèvements successifs. L'accroissement des concentrations en plomb des tissus des huîtres des bacs C (eau contaminée + *S. costatum* non contaminée) et D (eau contaminée + *S. costatum* contaminée) est extrêmement significatif entre deux prélèvements successifs.

Cependant, si on considère non plus les concentrations, mais la quantité totale de plomb présente en moyenne dans un individu, on observe généralement une décroissance au cours du temps pour les huîtres qui n'ont pas subi de contamination par l'eau à l'exception du lot F (Tabl. VIII).

Un accroissement des concentrations de cuivre est observé pour les huîtres témoins (fig. 15), mais entre deux prélèvements successifs cette augmentation n'est pas statistiquement significative. Les augmentations des concentrations de cuivre dans les tissus mous des huîtres des différents lots sont statistiquement significatives entre deux prélèvements successifs pour tous les lots recevant une nourriture contaminée ou non, et baignant dans une eau ayant ou non reçu une surcharge métallique. Deux exceptions sont toutefois observées : d'une part pour le lot B, entre 12 et 20 jours de contamination, d'autre part pour les Mollusques du lot F, entre 16 et 22 jours. Contrairement à ce que nous avons observé pour le plomb, les quantités totales de cuivre par individu augmentent au cours du temps (Tabl. VIII).

Des deux voies de contamination étudiées, eau et nourriture, l'eau est à la fois pour le plomb et le cuivre, la voie largement prépondérante et ce, que les résultats soient exploités en concentrations (fig. 15) ou en quantités totales de métal (Tabl. VIII).

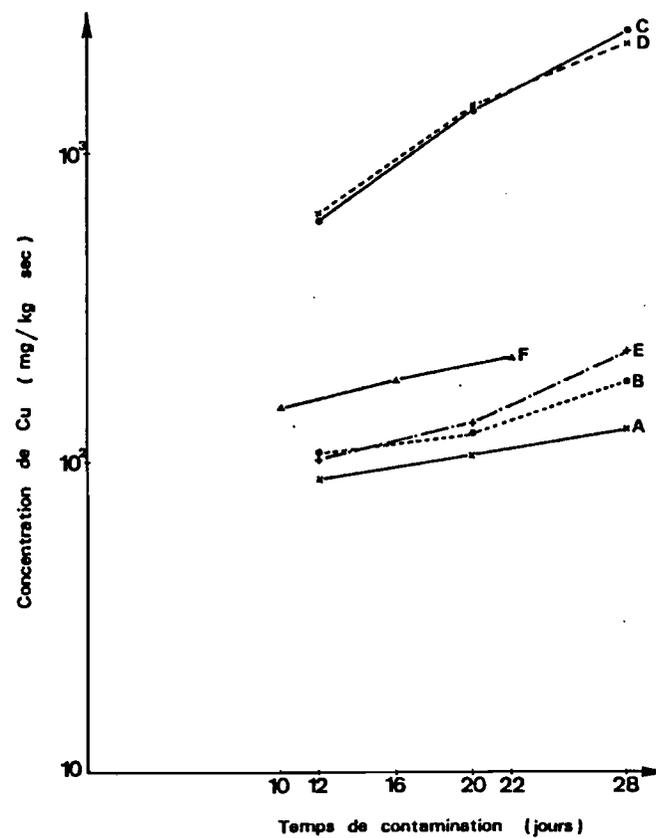
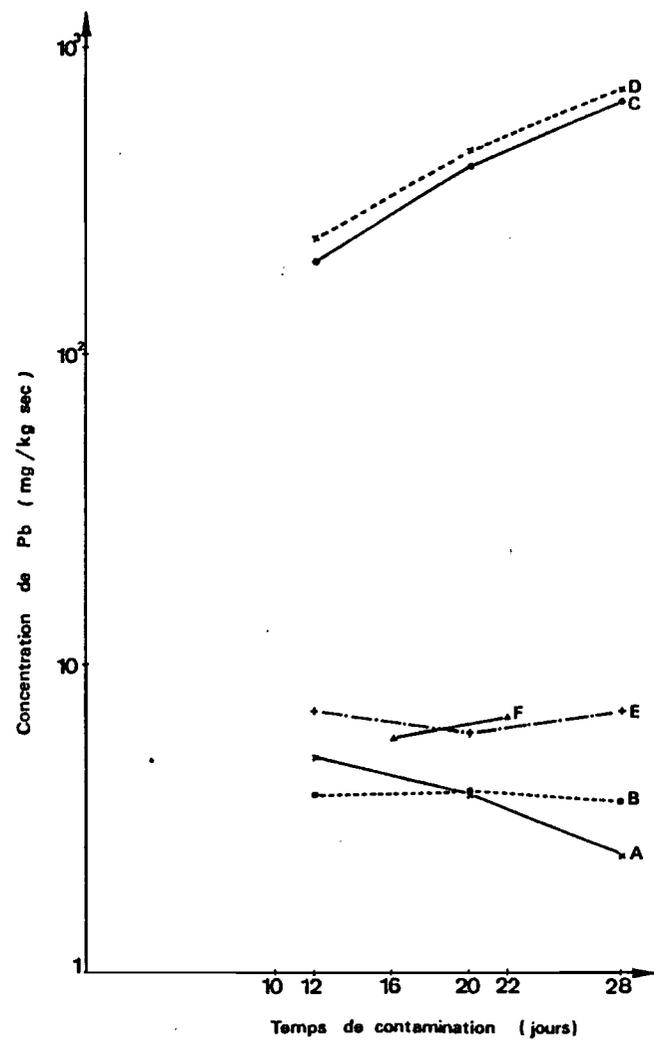


Fig. 15 : Contamination expérimentale des huîtres par le cuivre et le plomb.

Lot	Plomb			Cuivre		
	12 j	20 j	28 j	12 j	20 j	28 j
A	500,6	310,6	185,8	8612	8537	9535
B	287,9	282,4	205,0	8090	9123	10414
C	19953,9	35055,9	39974,3	60692	121623	150888
D	24859,2	35594,5	49894,3	67176	113833	157270
E	716,6	498,8	462,4	10492	11080	15107
F	-	439,9 <sup>b</sup>	565,6 <sup>c</sup>	12519 <sup>a</sup>	13728 <sup>b</sup>	18904 <sup>c</sup>

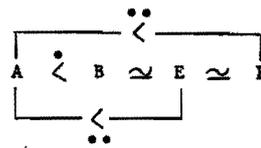
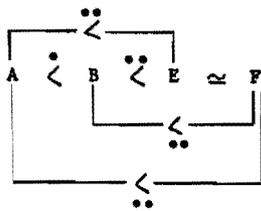
Durée de la contamination : (a) 10 j, (b) 16 j et (c) 22 j.

TABLEAU VIII - Evolution temporelle de la quantité totale de métal (ng) contenue par huître.

PLOMB

CUIVRE

Hiérarchie selon la concentration métallique



Hiérarchie selon la quantité de métal par individu

A < B < E < F

A < B < E < F

Hiérarchie selon la quantité de métal apportée avec la nourriture

A < B < E < F

A < B < E < F

• différence significative (P < 0,05)

•• différence hautement significative (P < 0,01)

TABLEAU IX - Hiérarchisation à la fin de l'expérience des différents lots d'huîtres témoin et contaminés par la nourriture.

Chez les huîtres exposées à la contamination par l'eau seule (lot C), les facteurs de concentration moyens du plomb et du cuivre sont respectivement de 3259 et 49205. Ils indiquent la très grande capacité des Mollusques à accumuler les métaux présents dans l'eau, nettement plus forte même que celle du phytoplancton pour lequel les facteurs de concentration étaient loin d'atteindre de telles valeurs. Les quantités de métaux disponibles pour les huîtres immergées directement dans l'eau de mer contaminée sont donc considérablement plus fortes que celles apportées (Tabl. VII) indirectement par le phytoplancton exposé à des concentrations métalliques identiques dans son milieu de culture. Cependant, le tableau IX nous indique, pour les deux métaux, une même hiérarchie des lots d'huîtres en fonction de leurs concentrations métalliques croissantes, de la quantité totale de métal par individu et de la quantité de métal apportée avec la nourriture.

#### II.3.2. LOCALISATION TISSULAIRE ET STOCKAGE. LESIONS CYTOLOGIQUES :

L'assimilation des deux métaux par l'huître peut aboutir d'une part à une contamination, c'est à dire à une complexation par les macromolécules de tissus qui habituellement ne sont pas impliqués dans un stockage de métaux, d'autre part à un stockage dans des tissus présentant des structures naturelles de bioaccumulation. C'est dans la première éventualité surtout que la surcharge en un métal essentiel mais présentant un seuil de toxicité (Cu) et en un métal non essentiel et toxique (Pb) peut entraîner des lésions cytologiques. La comparaison des divers lots d'huîtres montre que c'est à la suite d'exposition aux formes dissoutes des deux métaux que les effets sont les plus importants. Ce sont donc les mollusques soumis à l'effet de bain qui serviront de référence pour l'évaluation des conséquences les plus nettes de la contamination.

##### II.3.2.1. Techniques :

###### . Microscopie photonique et microanalyse à l'échelle structurale :

La fixation des échantillons pour la microscopie photonique, l'analyse par émission X (microsonde Cameca MS 46) et l'analyse par émission ionique secondaire (analyseur Cameca SMI 300), a été effectuée par le liquide de Carnoy. Les coupes à la paraffine de 7  $\mu\text{m}$  ont été colorées par l'hémalum-picroindigocarmin. Les phosphates ont été révélés par substitution à l'argent selon Von Kossa, le glycogène par la réaction

à l'acide périodique - Schiff, les polyanions par le bleu alcian à pH 0,5 pour les groupes sulfatés et à pH 2,5 pour l'ensemble des groupes acides. La microanalyse par émission X a été effectuée en dispersion de longueur d'onde, à l'aide d'une sonde Cameca MS 46, avec les cristaux suivants : LIF pour Cu et Zn, PET pour P, S, Ca, Fe et Pb, KAP pour Mg. Elle a porté sur des coupes normales ou soumises à divers tests d'extraction de Cu et Pb (voir résultats). La microanalyse par émission ionique secondaire a été réalisée à l'aide d'un analyseur Cameca SMI 300.

. Microscopie électronique et microanalyse à l'échelle ultrastructurale :

Pour l'étude ultrastructurale, des fragments d'organes ont été fixés par le glutaraldehyde à 3 % tamponné par le cacodylate de Na 0,2 M, additionné de saccharose 0,35 M et postfixés ou non par le tétroxyde d'osmium à 2 %. La microanalyse de coupes ultrafines de matériel non osmié, déposées sur grilles de titane carbonées, a été effectuée sur une microsonde électronique Cameca MBX type Camebax en dispersion de longueur d'onde avec les cristaux Lif pour Cu et Pb, PET pour S, TAP pour P.

II.3.2.2. Résultats sur les huîtres soumises à la contamination par l'eau additionnée de cuivre et de plomb :

. Contamination des tissus (Pl. IV et V) :

L'analyse par émission ionique secondaire révèle une contamination diffuse de tous les tissus par Cu et Pb, avec les intensités d'émission les plus élevées pour l'ovaire et le testicule. Dans l'ovaire, le cuivre est localisé à la fois dans le noyau et le cytoplasme des ovocytes, avec prédominance dans le noyau ; le plomb est surtout fixé dans le cytoplasme. Pour le testicule, il est impossible, en raison de la petite taille des cellules germinales, de préciser la localisation des deux métaux et les images ioniques montrent une distribution homogène dans les cystes testiculaires ; la fixation de cuivre y est si importante que, contrairement aux autres organes, le métal peut être identifié par analyse à la microsonde électronique sur coupes à la paraffine, donc dans des conditions de faible sensibilité.

. Bioaccumulation dans des structures naturelles de stockage :

Huit tissus ou organes assurent le stockage des deux contaminants (fig. 16). Il s'agit des épithéliums assurant des échanges directs avec l'eau de mer (branchies, épithélium palléal interne), des épithéliums ou des cellules isolées assimilant les composés de la lumière du tube digestif (cellules des diverticules digestifs, épithélium intestinal, amœbocytes), des cellules ou organes d'épuration du sang (cellules à pores, rein), enfin l'épithélium palléal externe bordant la coquille. Dans les cellules épithéliales ciliées des branchies, l'analyse à la sonde électronique de coupes à la paraffine de témoins révèle un faible stockage naturel

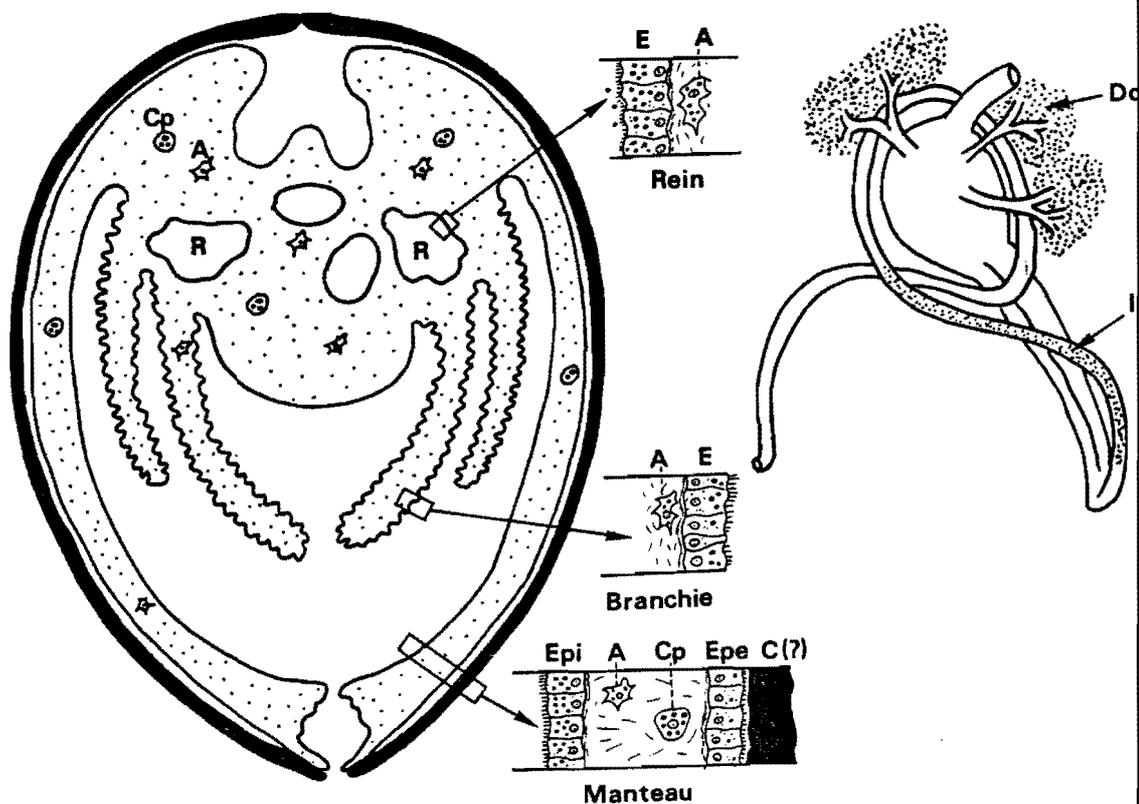


Fig. 16 - Localisation des cellules ou organes de bioaccumulation de Cu et Pb sur un diagramme d'Huître (à gauche) et sur un schéma de tube digestif (à droite).

- A : amœbocyte
- C : coquille (accumulation envisagée mais non démontrée)
- Cp : cellule à pores
- Dd : diverticules digestifs
- E : épithélium du rein
- Epe : épithélium palléal externe
- Epi : épithélium palléal interne
- I : intestin
- R : rein

de cuivre et de soufre, alors que le plomb est indécélable. A la suite de la contamination, il y a amplification importante des signaux Cu et S, et le plomb devient décelable (fig. 17). L'examen ultrastructural montre, chez les témoins, des lysosomes dont le nombre est très variable d'une cellule à l'autre (Pl. I) et dans lesquels Cu et S sont décelables par microanalyse de coupes ultrafines. Après contamination, certains lysosomes sont plus volumineux et renferment un contenu granuleux où les deux contaminants (Cu, Pb) sont concentrés. Mais l'effet le plus important est l'augmentation du nombre des lysosomes qui envahissent l'ensemble des cellules (Pl. I). Le stockage du plomb et l'amplification de celui du cuivre sont donc la conséquence d'une augmentation du nombre des lysosomes, les deux polluants coexistant dans ce type d'organite.

L'épithélium palléal interne est un important tissu de stockage minéral naturel, sous forme de sphérocristaux de phosphates de calcium (voir Wilbur, 1972) ; au stockage minéral est associée, dans certaines régions, une bioaccumulation de pigments bruns ou noirs. L'analyse à la microsonde électronique confirme l'importance du stockage de Ca et de P ; elle révèle également la présence de Mg, de Zn, fréquent dans les épithéliums de Mollusques dont le métabolisme requiert de l'anhydrase carbonique (Roinel et al., 1973), et aussi de Cu. Le stockage minéral est beaucoup plus important dans les régions pigmentées, et c'est dans ces régions que Cu est le plus facilement décelable. Mais quel que soit le type d'épithélium analysé, le plomb n'est jamais identifiable chez les témoins. Comme pour la branchie, la contamination provoque un stockage de Pb et une amplification de l'accumulation de cuivre et de soufre (fig. 18). Les effets sont d'autant plus importants que l'épithélium est riche en pigments (Pl. IV).

Les cellules digestives des diverticules digestifs des Bivalves suspensivores sont sujettes à de grandes variations de composition chimique puisqu'elles absorbent les éléments dissous dans le fluide alimentaire et assurent également un biocaptage de particules et de colloïdes. Les processus de digestion intracellulaire se déroulent dans les lysosomes dont la particularité est de renfermer des quantités importantes de mucopolysaccharides à la fois carboxylés et sulfatés et des phosphates d'origine enzymatique. Dans les conditions d'alimentation des huîtres ayant servi à l'étude, les lysosomes des témoins contiennent, outre le soufre et le phosphore, un peu de calcium et de zinc, parfois du cuivre et jamais de plomb. La contamination provoque une accumulation de cuivre et de plomb

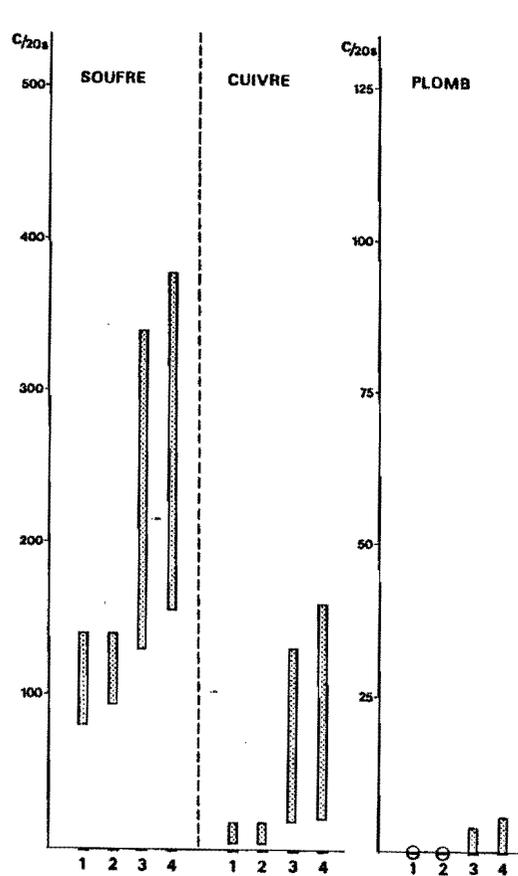


Figure 17 - Epithélium branchial

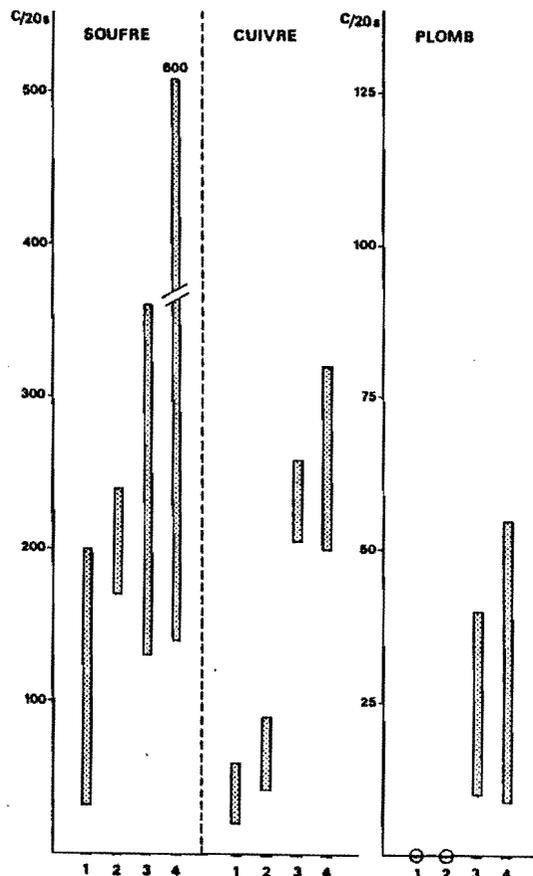


Figure 18 - Epithélium pigmenté

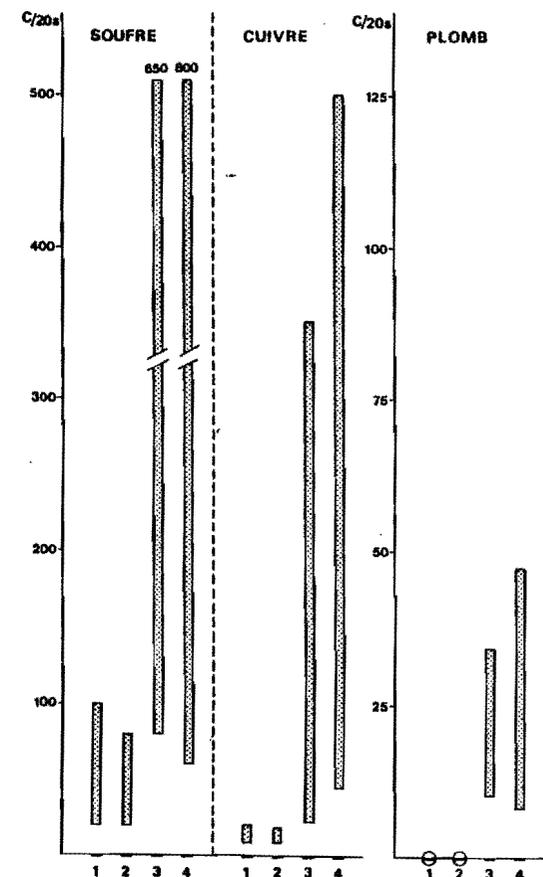


Figure 19 - Amœbocytes

Figures 17, 18 et 19 - Echelle des intensités des signaux X de S, Cu et Pb (en coups/20 secondes) dans des épithéliums et les amœbocytes de quatre lots d'Huîtres :

- 1 - Huîtres témoins
- 2 - Huîtres contaminées par la nourriture
- 3 - Huîtres contaminées par l'eau
- 4 - Huîtres contaminées simultanément par l'eau et la nourriture.

Mesures effectuées sur des coupes à la paraffine de 7  $\mu$ m d'épaisseur, à la microsonde M 546.

	Témoins	eau contaminée
P	70 - 240	170 - 780
S	140 - 600	180 - 440
Cu	0 - 9	20 - 80
Pb	0	4 - 25

TABLEAU X . Valeurs extrêmes des signaux X de P, S, Cu et Pb dans les cellules digestives des diverticules d'Huîtres témoins et d'Huîtres contaminées par l'eau. Les valeurs sont exprimées en coups/20 secondes, à la microsonde MS 46 sur coupes à la paraffine.

(Tabl. X). En raison de la variabilité de concentration en mucopolysaccharides sulfatés des cellules digestives, il est impossible de rechercher une éventuelle augmentation de la teneur en soufre ; en revanche, l'amplification des signaux P à la microsonde électronique est très importante au point que la méthode cytochimique de Von Kossa, qui démontre que ce phosphore est imputable à des phosphates, permet de distinguer les diverticules digestifs des témoins de ceux des mollusques contaminés (Pl. V).

Les cellules épithéliales de l'intestin contiennent, à leur apex, des lysosomes. Chez les témoins, les éléments majeurs sont P, S, Ca, Fe et Zn ; Cu et Pb sont indécélables par analyse à la sonde électronique de coupes à la paraffine. Après contamination, ces granules contiennent des quantités très importantes de cuivre et de plomb ; cette addition des polluants aux constituants naturels est accompagnée d'une augmentation du phosphore et surtout du soufre (Tabl. XI, Pl. IV).

Chez l'huître *Crassostrea gigas*, il n'existe qu'une catégorie d'amoebocytes accumulant des métaux, les amoebocytes à Cu et Zn (Pirie et al., 1984). Pour les animaux ayant servi à l'étude, le cuivre et le soufre sont décelables de façon constante dans ce type cellulaire,

	Témoins	Eau contaminée	Nourriture contaminée
P	90 - 170	100 - 230	N.R.
S	100 - 120	200 - 1.350	N.R.
Ca	140 - 240	120 - 240	N.R.
Fe	15 - 40	10 - 35	N.R.
Zn	0 - 10	0 - 14	N.R.
<b>Cu</b>	0	50 - 460	20 à 30
<b>Pb</b>	0	5 - 58	0

TABLEAU XI . Eléments majeurs des granules de l'épithélium intestinal d'Huîtres témoins, d'Huîtres contaminées par l'eau et d'Huîtres contaminées par la nourriture. Pour chaque élément sont indiquées les valeurs extrêmes des signaux X, en coups/20 secondes, mesures à la microsonde électronique MS 46 sur coupes à la paraffine. N.R. = éléments non recherchés.

mais les animaux étant jeunes, les signaux recueillis à la sonde électronique sont relativement faibles, surtout pour Cu. Après contamination, l'augmentation simultanée du stockage des deux éléments est si importante qu'il est possible d'établir une corrélation entre les signaux X de Cu et de S par analyse à la microsonde de coupes à la paraffine. Le plomb est également fortement accumulé (fig. 19).

Parmi les cellules d'épuration du sang, les cellules à pores, disséminées dans l'organisme, accumulent de façon naturelle les métaux provenant de la dégradation de protéines hémolympatiques. Le composé minéral le plus caractéristique de ces cellules est le phosphate de fer, mais la microanalyse montre que chez les témoins, il existe également un faible stockage de cuivre. La contamination provoque, comme dans les autres types cellulaires précédemment décrits, une accumulation de cuivre et de plomb ; mais les signaux X émis à la microsonde électronique

sont beaucoup plus faibles, et la présence des polluants ne peut être décelée dans toutes les cellules du système. Si l'on admet que le stockage naturel du fer n'est pas influencé par la contamination, la comparaison du rapport signal X de Cu/signal X de Fe des témoins et des contaminés montre que ce rapport est fortement augmenté par la contamination ; de plus, le plomb n'est décelable que dans les cellules où ce rapport est supérieur à la normale (fig. 20).

L'épithélium du rein élabore de façon naturelle des lysosomes à phosphates de calcium et de fer, avec, pour certains d'entre eux, des traces de cuivre ; la matière organique de ces inclusions contient du soufre. La contamination provoque l'accumulation de cuivre et de plomb, mais les signaux X émis à la sonde électronique sont beaucoup plus faibles que pour les amœbocytes ou les lysosomes intestinaux ; les valeurs sont sensiblement les mêmes que pour les cellules à pores. L'épithélium palléal interne, non pigmenté, accumule, comme l'épithélium externe, le cuivre et le plomb (Pl. IV) ; le stockage a vraisemblablement lieu dans des sphérocristaux phosphocalciques. Enfin, il convient de noter que dans les épithéliums branchial et palléal, les mucocytes fixent le cuivre et le plomb, mais que cette fixation est moins importante que dans les autres cellules épithéliales.

La recherche des formes chimiques de stockage ne peut être envisagée que pour les cellules où la contamination provoque un stockage important de plomb et une surcharge élevée en cuivre. Elle n'a donc été effectuée que pour les amœbocytes et l'épithélium palléal pigmenté. Dans les amœbocytes, la corrélation entre les signaux X de Cu et de S suggère une complexation du cuivre par un ligand soufré ; la rupture de la liaison du métal avec ce ligand par un simple abaissement du pH (élimination complète de Cu à pH 2, sans diminution des signaux X de S) indique que, comme pour le cadmium (Martoja et Martin, 1985), le cuivre est complexé par une protéine à haute teneur en soufre. Pour le plomb de l'épithélium palléal, son élimination par l'eau ammoniacquée démontre que le métal est stocké sous forme de phosphate, vraisemblablement dans les sphérocristaux phosphocalciques. Il en est sans doute de même dans les amœbocytes, en raison de leur aptitude à stocker un phosphate naturel (Zn) (George et al., 1978 ; Martoja et Martin, 1985). Sur la base de ces données, on peut admettre que dans les branchies, l'augmentation des concentrations en soufre traduit également l'existence d'une

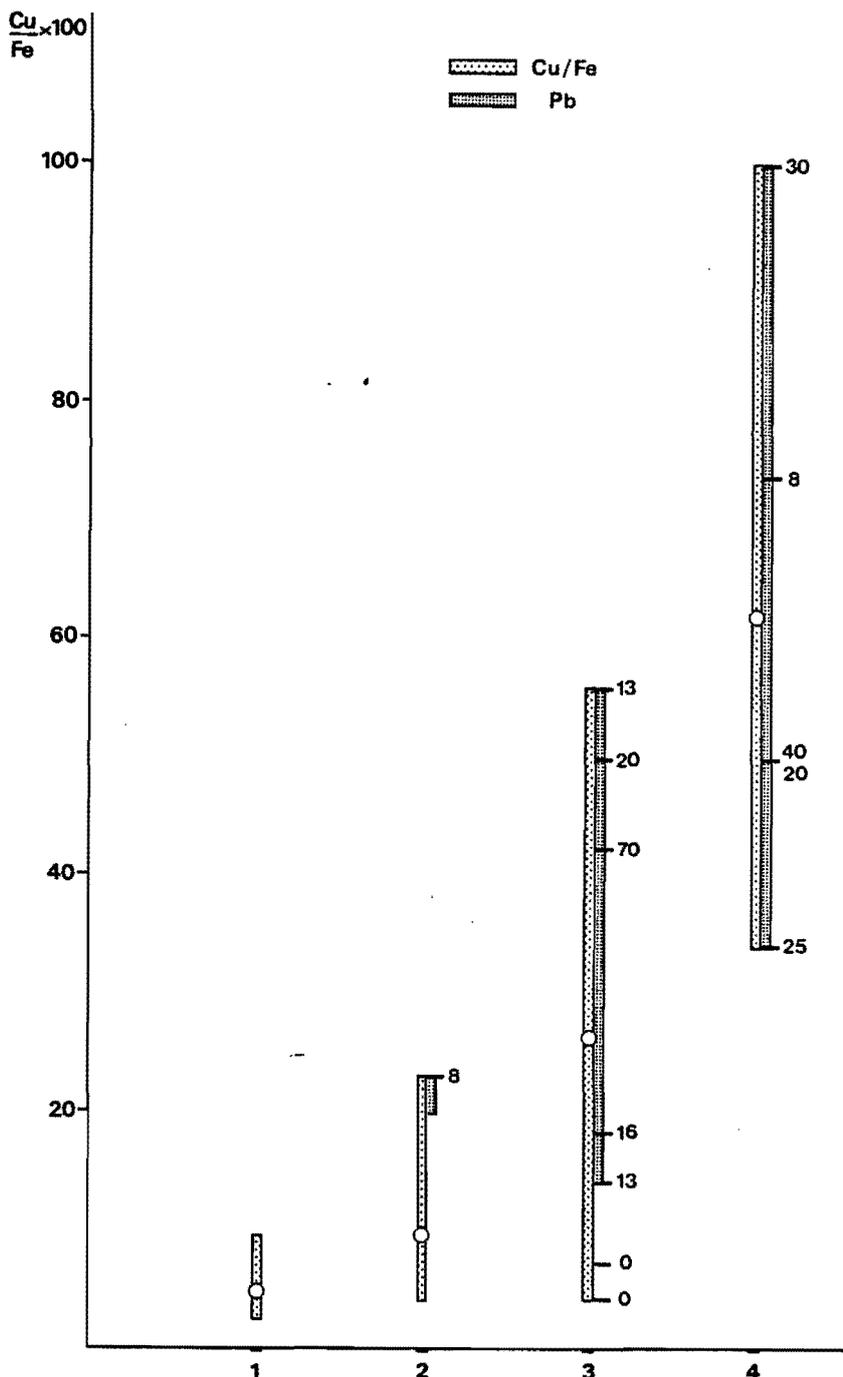


Figure 20 : Valeurs du rapport Cu/Fe dans les cellules à pores des quatre lots d'Huîtres (le cercle indique la moyenne des rapports. Relation avec l'identification du plomb (en nombre de coups/20 secondes).

1. Huîtres témoins
2. Huîtres contaminées par la nourriture
3. Huîtres contaminées par l'eau
4. Huîtres contaminés simultanément par l'eau et la nourriture.

On voit que la proportion du cuivre augmente dans les huîtres contaminées, et que le plomb n'est identifiable que dans les cellules enrichies en cuivre. Mesures effectuées sur des coupes à la paraffine de 7 um d'épaisseur, à la microsonde MS 46.

protéine de complexation du cuivre, et que dans les cellules digestives, l'augmentation des groupes phosphates signifie que le plomb est stocké sous cette forme. Si ces données étaient confirmées pour les autres sites de stockage, on pourrait conclure à l'accumulation générale du cuivre sous forme d'un complexe métalloprotéique et à celle du plomb sous forme de phosphate. Cette hypothèse est confortée par le fait que dans toute structure accumulant les deux métaux, il existe à la fois des phosphates naturels et des protéines soufrées ; les cellules d'accumulation n'auraient donc pas à élaborer de ligands différents de ceux qu'elles synthétisent normalement.

A l'examen histologique, tous les tissus des huîtres contaminées sont d'apparence saine. En particulier, les glandes génitales sont normales (Pl. V) et, dans le tissu vésiculeux, le stockage de glycogène est identique dans tous les lots. L'examen ultrastructural montre, lors de contaminations par l'eau, quelques images d'extrusion holocrine dans l'épithélium branchial.

Hormis ces rares aspects de cytotoxicité, toutes les ultra-structures en particulier celles qui sont très sensibles aux effets des métaux lourds (systèmes membranaires, mitochondries) sont normales.

#### II.3.2.3. Huîtres soumises à la contamination par le seul intermédiaire de la nourriture (Fig. 17 à 20 ; Tabl. XI) :

Dans ces conditions expérimentales, le plomb n'est décelable que dans quelques cellules à pores. Les signaux Cu obtenus à la microsonde électronique sont un peu plus élevés dans les cellules à pores, dans les épithéliums pigmentés et dans les granules de l'épithélium intestinal ; quelques cellules digestives contiennent des granules de phosphate (Pl. V). De ce fait, les huîtres contaminées par la seule nourriture diffèrent peu des témoins.

#### II.3.2.4. Huîtres contaminées à la fois par l'eau et par la nourriture (Fig. 17 à 20) (Pl. II) :

Qu'il s'agisse de la contamination générale des tissus ou de la bioaccumulation, les mollusques soumis à ce protocole expérimental sont très semblables à ceux contaminés par l'eau additionnée de Cu et Pb.

Tout au plus note-t-on à l'analyse par microsonde électronique, une intensité plus forte des signaux X de Cu et Pb dans les cellules à pores et dans les épithéliums pigmentés. Les mucus de la lumière du tube digestif sont également plus abondants et complexent du cuivre et du plomb (Pl. IV). Il existe quelques aspects d'extrusion de cellules branchiales (Pl. III).

### II.3.3. ETUDES BIOCHIMIQUES PAR FPLC\* DES PROTEINES LIANT LES METAUX (Pb, Cu) :

#### II.3.3.1. Matériel et méthodes :

Les tissus mous des huîtres des lots A à F (à raison de 9 à 15 individus par lot) sont broyés dans un potter à main en présence de TRIS HCl pH $\approx$ 8,6 (volume à volume). L'agitation est poursuivie pendant 2 heures à 4°C. Le broyat est alors centrifugé pendant 1 h à 4°C et à 100 000 g. La partie surnageante est recueillie et lyophilisée, puis conservée au congélateur. Le culot est séché à 80°C jusqu'à poids constant ( $\approx$  36 h) et stocké dans des piluliers en polyéthylène.

Le lyophilisat est repris par de l'eau distillée, filtré à 0,22  $\mu$ m et injecté dans une colonne de type Superose analytique 12<sup>HR</sup> 10/30 (Pharmacia) à raison de 200  $\mu$ l. Cette colonne sépare linéairement les protéines d'un poids moléculaire compris entre 1000 et 300000 et peut être éluée jusqu'à des pressions de 30 bars. La perfusion de la colonne est réalisée par du TRIS HCl/NaCl à 60 ml/h. Des fractions d'un ml (au total environ 35 fractions) sont recueillies et leurs densités optiques sont mesurées en général à la longueur d'onde de 254 nm.

Le plomb et le cuivre de chaque fraction de l'éluat (après dilution avec de l'eau déminéralisée et de l'acide nitrique) et de chaque culot après digestion nitrique sont dosés par spectrométrie d'absorption atomique avec effet Zeeman.

#### II.3.3.2. La densité optique :

Les principaux résultats sont résumés dans la figure 21. A 254 nm, l'éluat permet de distinguer cinq pics importants :  $\alpha$  (pic d'exclusion PM  $\gg$  2000000),  $\beta$  (PM 70000 à 100000),  $\gamma$  (PM 5000 à 8000),  $\delta$  (PM 2500 à 4000) et  $\epsilon$  (PM  $<$  1000). A 280 nm, pour les témoins, seulement deux pics restent

---

\* Fast Protein Liquid Chromatography

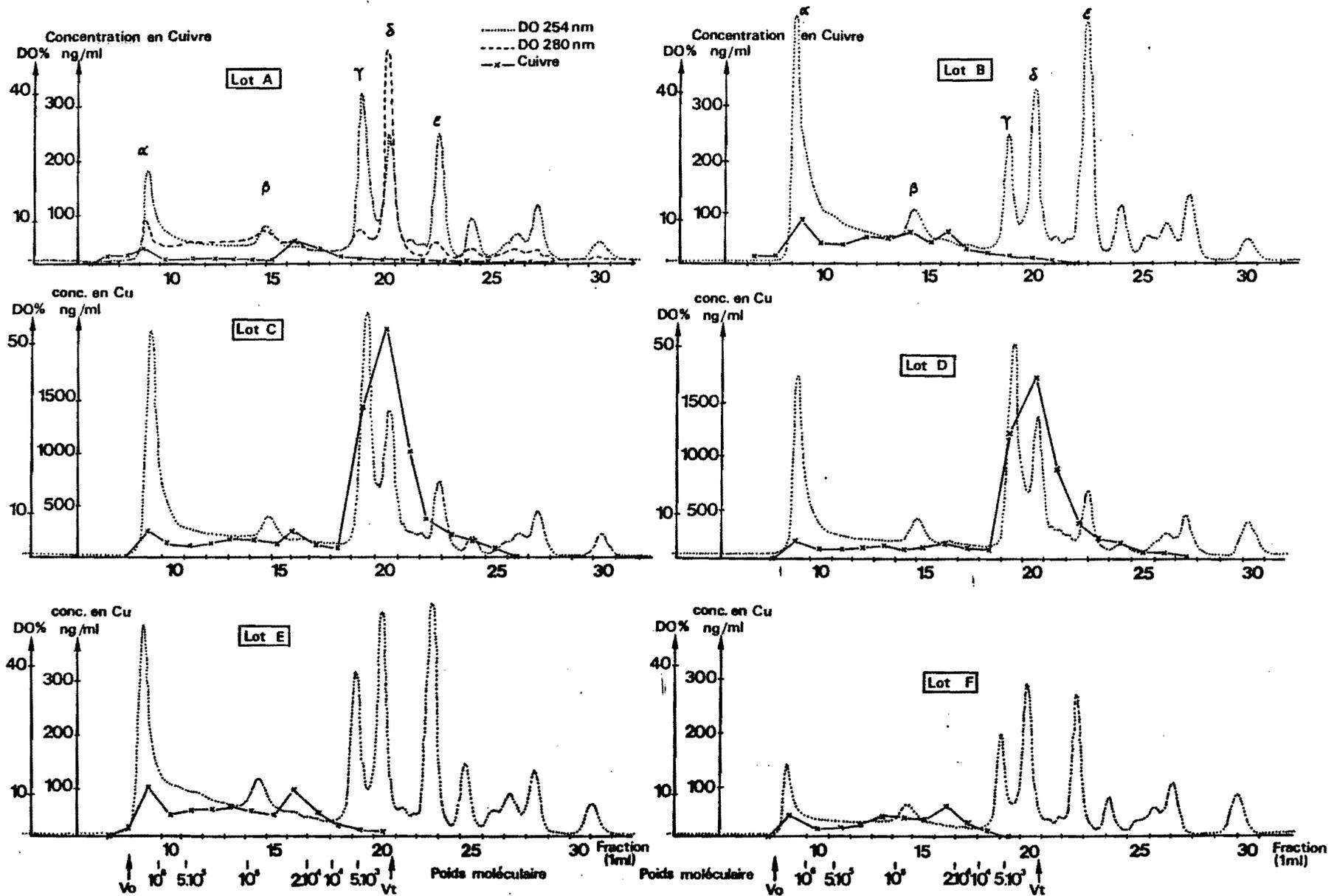


Fig. 21 - Profil d'élution sur sépharose 12 des surnageants des tissus mous des Huîtres des lots A à F. Densité optique à 254 nm (et 280 nm pour le lot A) et concentration en cuivre (en ng/ml). (  $V_0$  = volume d'exclusion;  $V_t$  = volume total de la colonne).

importants : le pic  $\alpha$  qui présente une densité optique (D.O.) plus faible qu'à 254 nm et le pic  $\delta$  qui a au contraire une densité optique plus forte. Le pic  $\gamma$  est très faible à 280 nm et le rapport des densités à 254 et 280 nm est d'environ 5. Pour les trois lots recevant une nourriture contaminée (B, E et F), le pic  $\delta$  a une D.O. plus importante que le pic  $\gamma$ ; l'inverse s'observe pour le lot témoin (A) et les deux lots subissant une contamination *via* l'eau (C et D).

#### II.3.3.3. Le plomb :

Parmi les fractions éluées (formes solubles), seules les fractions 26 et 27, qui correspondent aux pics de sels, renferment des traces de plomb, les autres fractions en sont totalement dépourvues. Il y a donc une accumulation préférentielle du plomb dans les culots (formes insolubles) ce qui explique les concentrations plus élevées rencontrées dans les culots comparés aux tissus *in toto*. (Tableau XII).

#### II.3.3.4. Le cuivre :

La concentration en cuivre dans les culots est très voisine (légèrement supérieure à l'exception du lot F) à la concentration des tissus mous *in toto*. (Tableau XII).

Parmi les fractions éluées des six lots (A à F), nous détectons du cuivre uniquement dans les quatre premiers pics ( $\alpha$  à  $\delta$ ). Pour le pic  $\beta$  le cuivre apparaît décalé d'une fraction (pic  $\beta'$  de PM 35000 à 70000). Chez le lot témoin (A), les concentrations sont faibles dans ces quatre pics (15,0 à 44,6 ng/ml). Pour les lots ayant reçu une nourriture contaminée (B, E et F), les concentrations sont souvent plus fortes que chez les témoins et toujours pour les pics  $\alpha$  (46,2 à 96,0 ng/ml) et  $\beta'$  (58,2 à 91,8 ng/ml). Les lots contaminés par l'eau (C) et l'eau et la nourriture (D) présentent des concentrations considérablement plus élevées pour les quatre pics et notamment pour les pics  $\gamma$  (1197,9 à 1406,7 ng/ml) et  $\delta$  (1761,3 à 2174,4 ng/ml) (Tableau XIII). Signalons que ces deux pics protéiniques sont thermorésistants.

Le pourcentage de cuivre retenu par les protéines et extrait par le TRIS est très faible et généralement inférieur à 1 % en comparaison de la quantité totale de ce métal contenu dans les tissus mous d'une huître. Remarquons (tableau XII) que le pourcentage associé aux protéines

Lot n°	Voie de contamination	PLOMB			CUIVRE			
		Tissus mous in toto	Formes insolubles	Formes solubles	Tissus mous in toto	Formes insolubles	Formes solubles	% formes solubles
A	aucune	2,4	5,6	0,0	125,0	138,8	0,7	0,56
B	nourriture a	3,6	20,5	0,0	182,7	207,3	1,4	0,77
C	eau	651,8	1985,9	0,0	2460,3	2892,1	26,7	1,09
D	eau + nourriture a	718,1	2316,3	0,0	2263,5	2663,6	21,8	0,96
E	nourriture b	6,9	48,8	0,0	228,2	328,8	1,4	0,63
F	nourriture c	6,5	57,1	0,0	218,7	194,0	0,9	0,41

nourriture a : *S. costatum* 5000 µ/ml (28 jours d'exposition)  
 b : *T. suecica* 5000 µ/ml (28 jours d'exposition)  
 c : *S. costatum* 25000 µ/ml (22 jours d'exposition).

Tableau XII - Concentrations (en mg/kg sec) du plomb et du cuivre dans les tissus mous, les formes solubles (extraites par le TRIS) et les formes insolubles dans les divers lots d'Huîtres contaminées expérimentalement.

pic (PM)	Lot	A témoin	B nourr. contaminée	C eau contaminée	D nourr. + eau contam.	E nourr. cont.	F nourr. cont.
α (exclusion = PM > 2000000)		26,4	86,4	236,4	180,6	96,0	46,2
β' (35000 à 40000)		44,6	58,2	185,7	133,2	91,8	62,7
γ (5000 à 8000)		15,6	32,7	1406,7	1197,9	15,6	9,9
δ (3000 à 4800)		15,0	26,1	2174,4	1761,3	12,3	9,9

Tableau XIII - Concentrations (en ng/ml) du cuivre dans les quatre pics principaux d'élution dans les divers lots d'Huîtres contaminées expérimentalement.

est plus important chez les huîtres contaminées par rapport aux huîtres témoins (à l'exception du lot F pour lequel la durée de la contamination a été plus courte) et cela est surtout vrai pour les huîtres contaminées par l'eau (lots C et D).

**PLANCHES**

PLANCHE I

Epithélium branchial

Figures 1 et 2 : Huître témoin.

1. Les cellules contiennent de rares lysosomes (flèches).
2. Détail de la région apicale.

Figures 3 et 4 : Huître contaminée par l'eau.

3. Nombreux lysosomes apicaux.
4. Détail de l'apex. Les lysosomes d'aspect granuleux contiennent du cuivre et du plomb (flèche).

Remarquer, sur les figures 3 et 4, l'absence de lésions.

C = cils ; G = appareil de Golgi ; Ly = lysosomes ; M = mitochondries ;  
mv = microvillosités ; m = grains de mucus ; N = noyau ; RE = reticulum  
endoplasmique granulaire ; T = témoin

PLANCHE I

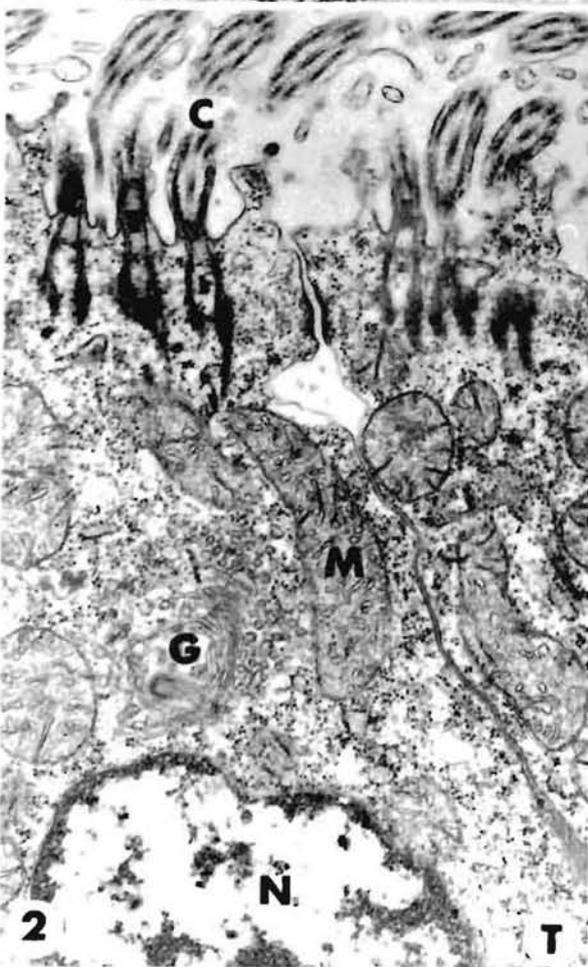
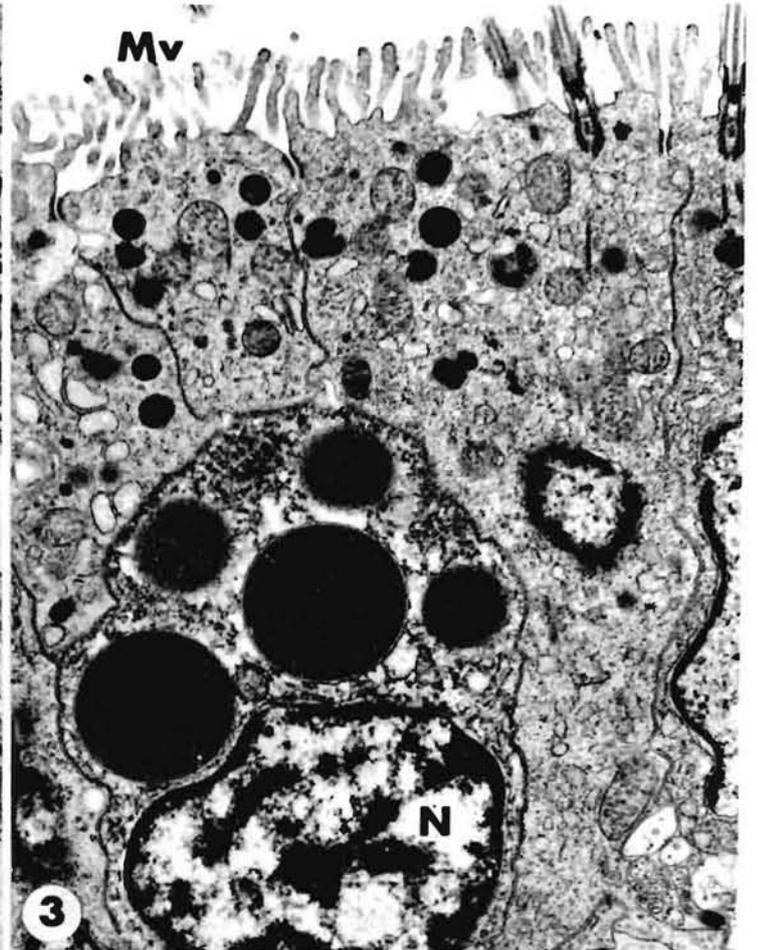
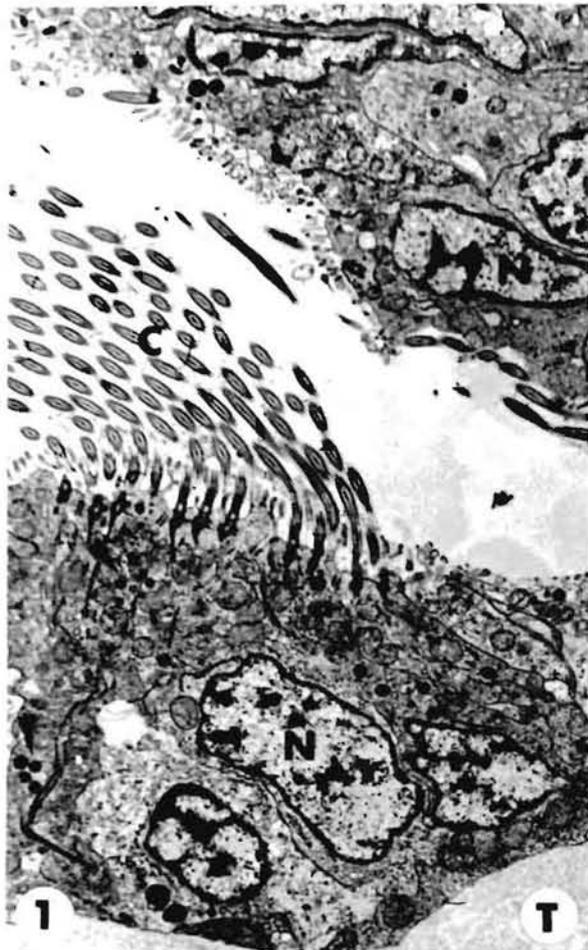


PLANCHE II

Epithélium branchial

Figures 1, 2, 3 et 4 : Huître contaminée par l'eau et par la nourriture.

1 et 2. Vue d'ensemble de l'épithélium. Les cellules ne présentent aucune lésion.

3 et 4. Détail de lysosomes d'aspect granuleux ou hétérogène renfermant du cuivre et du plomb, à l'apex (fig. 3) ou à la base (fig. 4) des cellules.

C = cils ; G = appareil de Golgi ; Ly = lysosomes ; M = mitochondries ;  
N = noyau

PLANCHE II

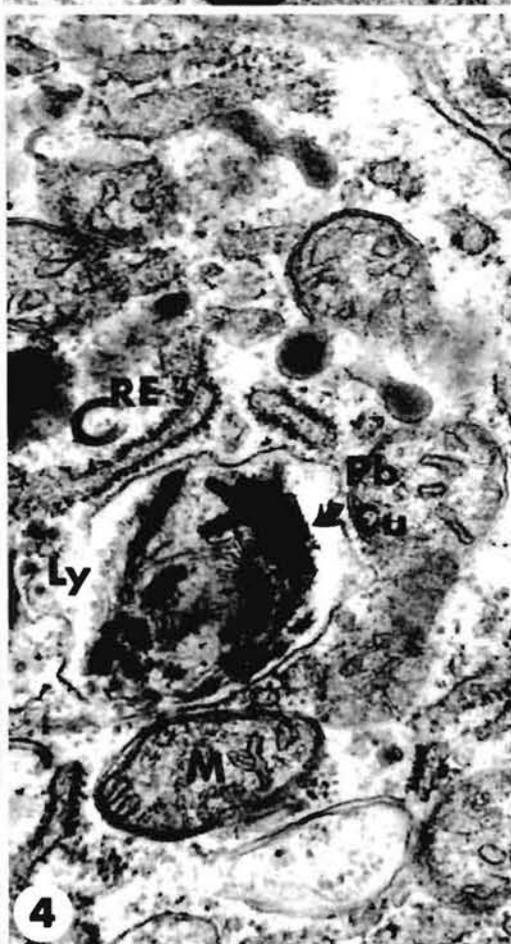
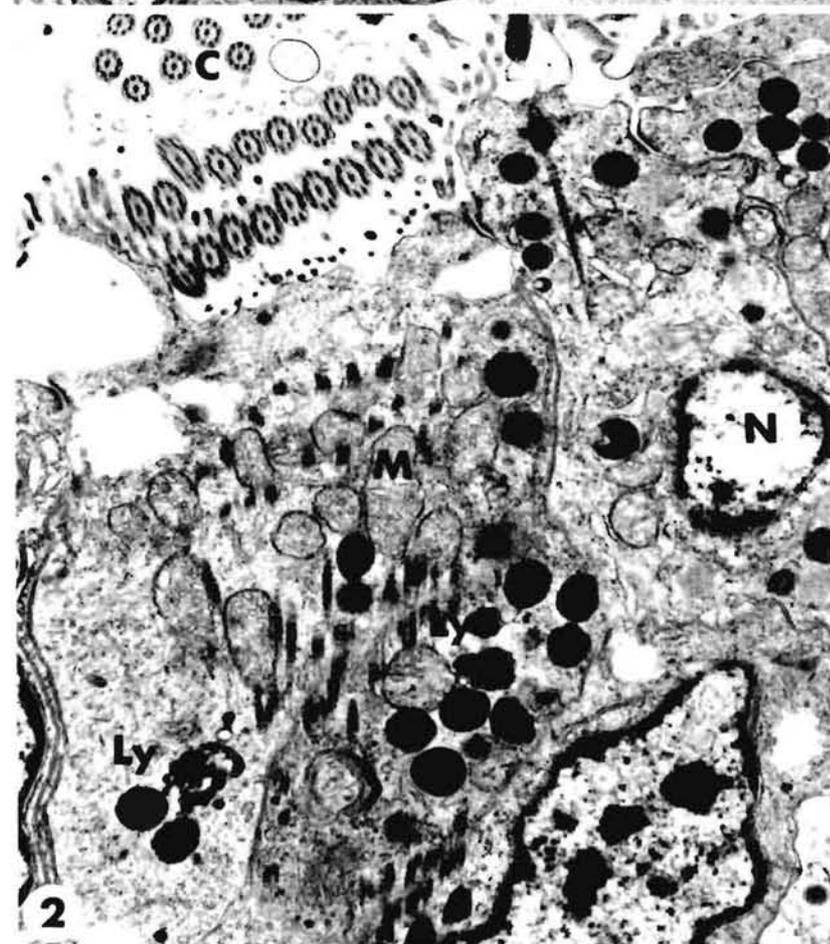
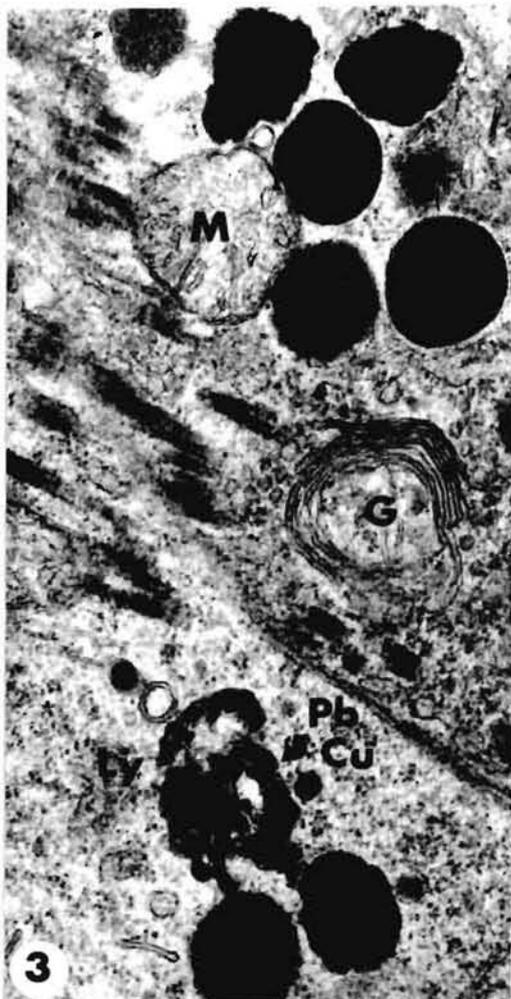
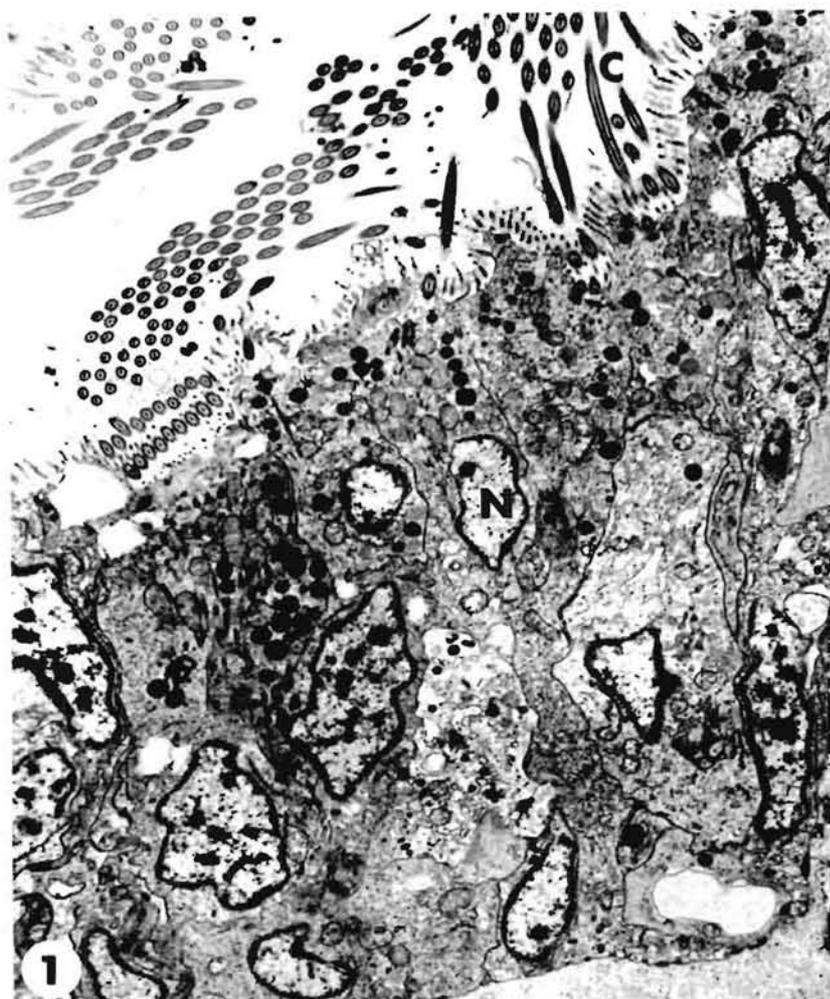


PLANCHE III

Epithélium branchial

Figures 1 et 2 : Huître contaminée par l'eau et par la nourriture.

1. Quelques cellules de l'épithélium ont un aspect lytique.
2. La totalité du contenu cellulaire de certaines cellules branchiales est rejetée à l'extérieur.

Ly = lysosomes ; m = grains de mucus ; N = noyau

PLANCHE III

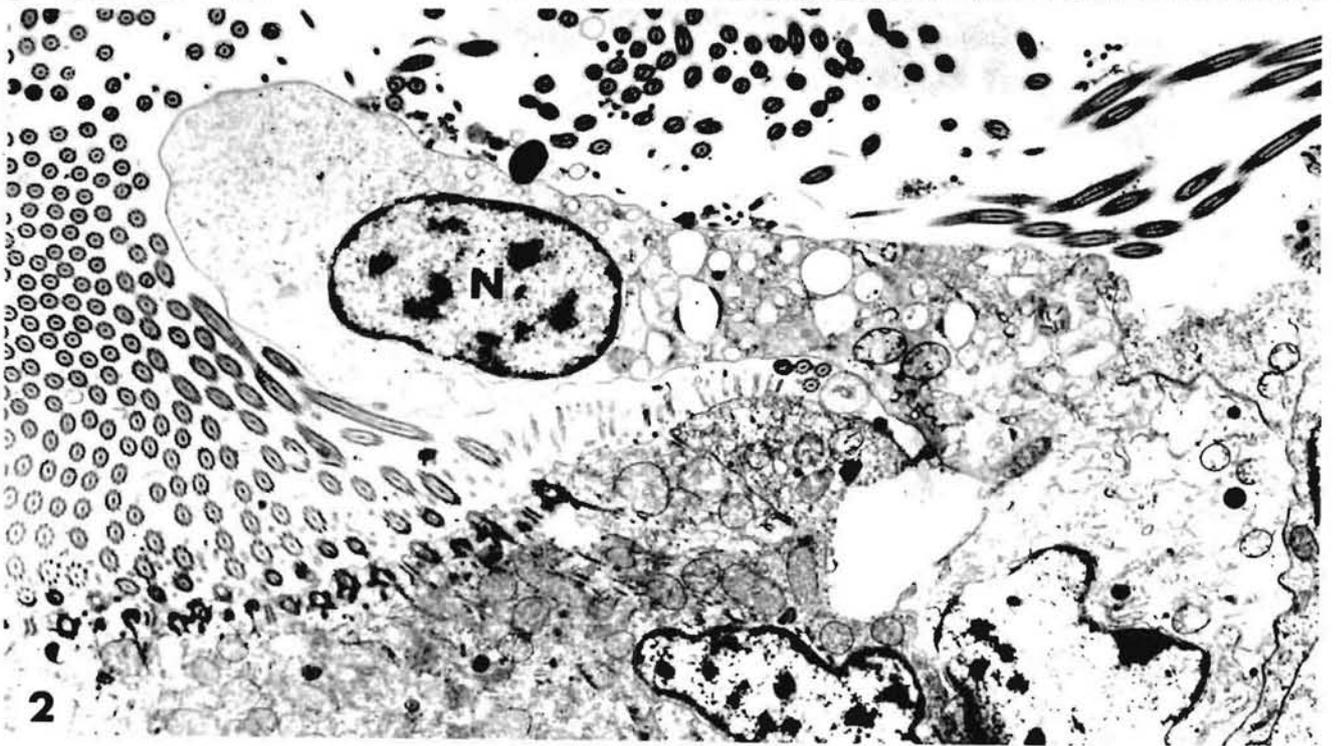


PLANCHE IV

Figures 1, 2 et 3 : Epithélium palléal interne pigmenté d'une Huître contaminée par l'eau.

1. Image topographique.
2. Image d'émission ionique de Cu.
3. Image d'émission ionique de Pb.

Remarquer, sur la figure 2, la localisation diffuse du cuivre dans les cellules du tissu vésiculeux situé sous l'épithélium, alors que le métal est fortement concentré dans les cellules épithéliales.

Figures 4 et 5 : Epithélium palléal externe de la même Huître que précédemment.

4. Image topographique (E, épithélium palléal externe ; T, tissu vésiculeux).
5. Image d'émission de Pb. Le plomb est moins concentré que dans l'épithélium interne (fig. 3); il est diffus dans le tissu vésiculeux.

Figure 6 : Nappes muqueuses dans la lumière intestinale d'une Huître contaminée par l'eau et la nourriture.

Figures 7, 8 et 9 : Epithélium intestinal d'une Huître contaminée par l'eau.

7. Image topographique. L, lumière intestinale.
8. Réaction de von Kossa montrant l'alignement apical des lysosomes (flèches).
9. Image d'émission de Pb. Le cliché montre deux alignements de lysosomes (flèches) correspondant aux deux sections de la paroi intestinale bordant la lumière (L). A = amœbocyte.

PLANCHE IV

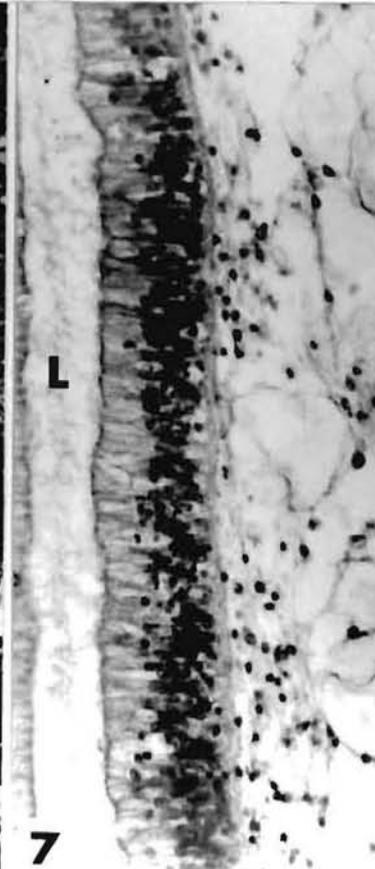
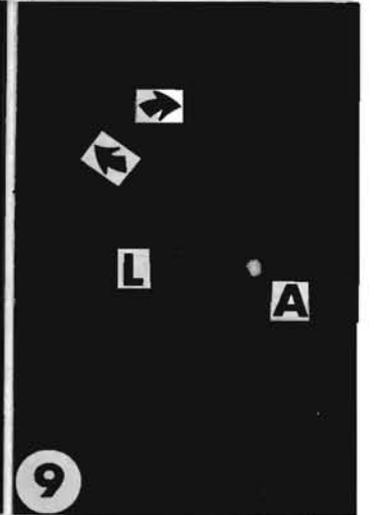
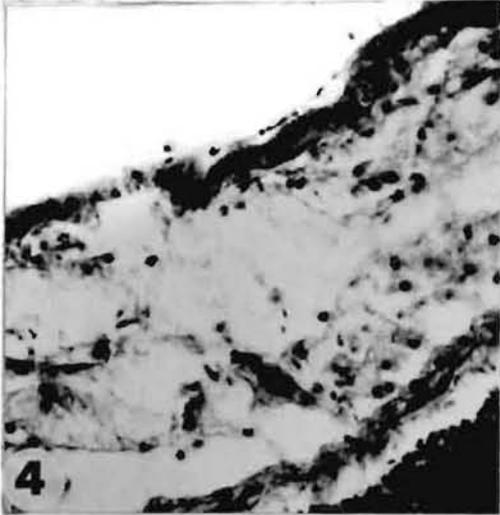
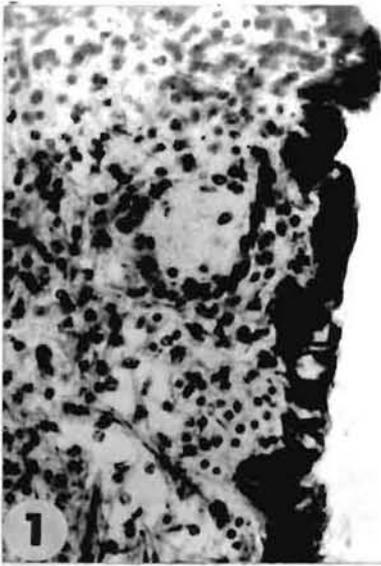


PLANCHE V

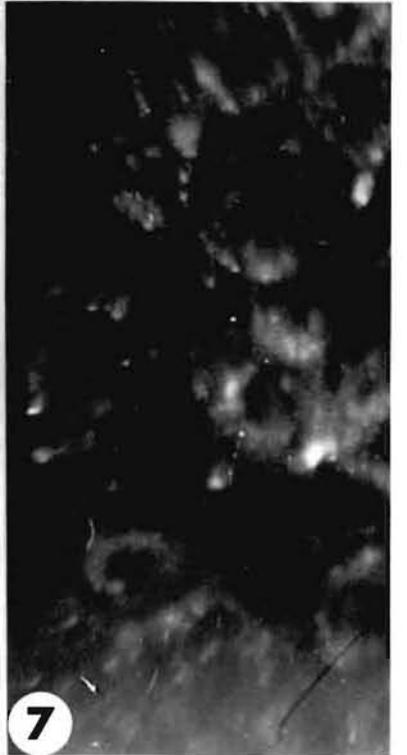
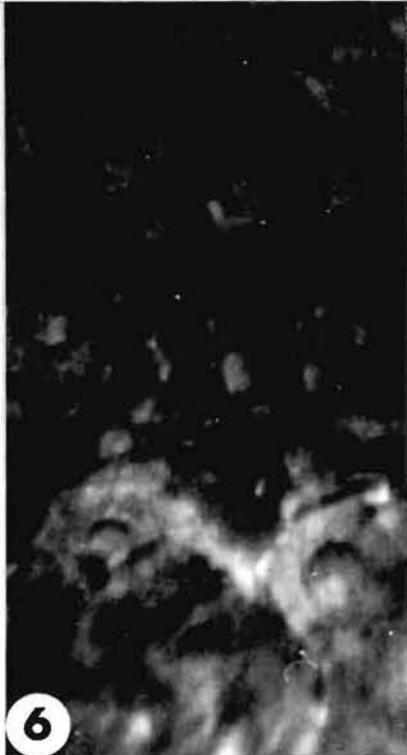
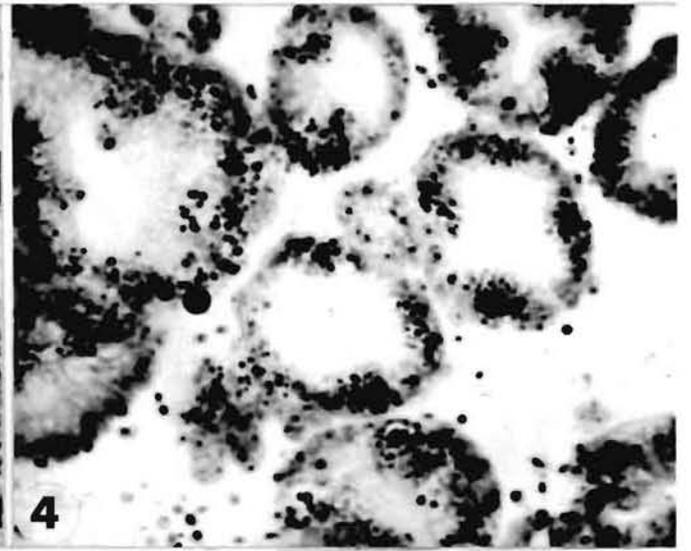
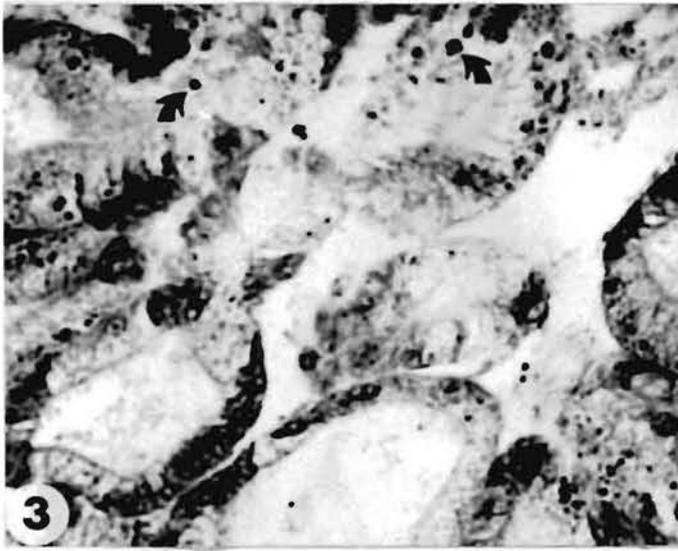
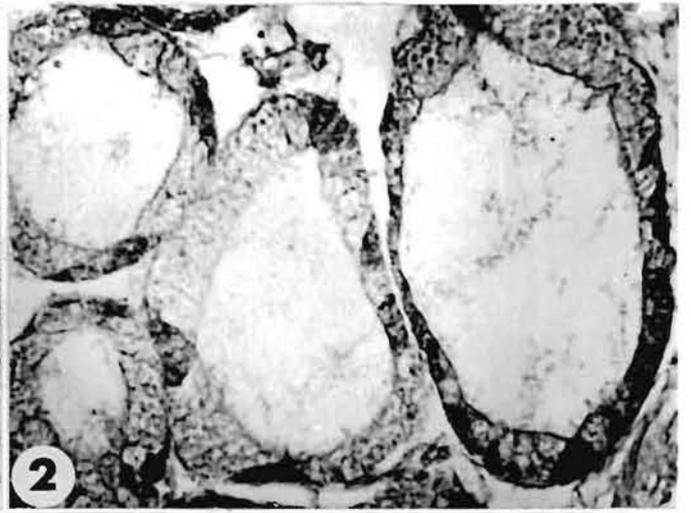
Figures 1, 2, 3 et 4 : Diverticules digestifs.

1. Mise en évidence des mucopolysaccharides sulfatés (grains noirs).  
L'aspect est identique pour tous les lots d'Huîtres.
2. Mise en évidence des phosphates (réaction de von Kossa) chez un témoin. La réaction est entièrement négative.
3. Mise en évidence des phosphates chez une Huître contaminée par la seule nourriture. Le cliché a été pris sur les très rares cellules digestives contenant des phosphates (flèches).
4. Mise en évidence des phosphates chez une Huître contaminée par l'eau. Les granules de phosphates sont très nombreux dans toutes les cellules digestives.

Figures 5, 6 et 7 : Ovaire d'une Huître contaminée par l'eau.

5. Image topographique montrant l'absence de lésions dans les ovocytes.
  6. Image ionique de Cu.
  7. Image ionique de Pb.
- Les deux métaux ont une localisation diffuse.

PLANCHE V



## CHAPITRE III

### DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS

#### III.1. VALIDITE DE L'UTILISATION DES MOLLUSQUES FILTREURS COMME INDICATEURS BIOLOGIQUES DE POLLUTIONS METALLIQUES .

Afin d'établir le degré de pollution métallique relatif de la baie de Bourgneuf, nous avons comparé les concentrations de Cd, Pb, Cu et Zn déterminées dans cette étude chez la Moule et l'Huître avec celles établies pour ces mêmes organismes dans des localités réparties dans le monde entier (cf. Annexe I, publ. 10). A l'exception de la contamination ponctuelle par le plomb observée en Août 1982, les Mollusques filtreurs de la baie de Bourgneuf présentent des teneurs en métaux parmi les plus faibles établies chez ces organismes.

La baie de Bourgneuf constitue de ce fait un site très favorable pour l'étude des fluctuations naturelles des concentrations métalliques chez les organismes vivants. Les caractéristiques de la bioaccumulation et l'organotropisme établis dans ces conditions peuvent être considérés dans une large mesure comme la conséquence du métabolisme normal des éléments traces :

- les fluctuations saisonnières des concentrations métalliques chez les organismes dépendent principalement des variations de poids des tissus mous, liées elles-mêmes en grande partie au cycle de la reproduction ;
- le poids et/ou l'âge exercent une influence sur l'accumulation biologique de certains éléments traces (augmentation de la concentration de Cd chez la Moule adulte et du Cu chez l'Huître en fonction du poids, augmentation de la concentration de Zn chez l'Huître en fonction de l'âge).

Les fluctuations dépendant de la saison et de la taille (âge ou poids) des moules et des huîtres induisent seulement des différences modérées entre les concentrations métalliques minimales et maximales rencontrées chez ces organismes (Fig. 1 et 2). Elles sont cependant suffisantes pour masquer les effets de pollutions chroniques faibles, excepté pour les sites où les niveaux normaux et leurs fluctuations naturelles sont bien connues. Cependant, l'usage des Mollusques filtreurs comme indicateurs biologiques est d'un grand intérêt pour détecter des pollutions chroniques relativement fortes. Toutefois, même

des pollutions aiguës peuvent passer inaperçues des programmes de contrôle si le taux de renouvellement du polluant est suffisamment rapide pour que la contamination et la décontamination se produisent entre deux prélèvements successifs. Par exemple, des niveaux normaux de plomb ont été enregistrés à trois mois d'intervalle (Juin et Septembre 1982) alors que dans la période intermédiaire (4 et 18 août 1982) une contamination intense des Mollusques était mise en évidence.

Chez les moules contaminées expérimentalement nous avons montré que, même pour les plus fortes doses sub-léthales, les niveaux de cuivre et de zinc dans les tissus n'étaient pas beaucoup plus élevés que la normale (2,3 à 6,1 fois) tandis que la bioaccumulation du cadmium n'était pas aussi limitée. Les fluctuations saisonnières des concentrations de zinc et de cuivre dans les moules induisent des différences entre minimum et maximum (N.A.S., 1980 ; présente étude) qui sont du même ordre de grandeur que celles observées expérimentalement entre animaux témoins et contaminés. Pour le zinc, les études *in situ* indiquent généralement des rapports contaminé/bruit de fond inférieurs à 10, même dans les zones les plus fortement polluées (Bloom et Ayling, 1977 ; Cooper et al., 1982). Dans ces conditions, les programmes de contrôle peuvent mettre en évidence des niveaux sub-normaux des métaux essentiels dans la matière vivante alors même que leurs concentrations dans l'eau sont néfastes.

### III.2. TOXICITE RELATIVE DU CADMIUM, DU CUIVRE ET DU ZINC A L'EGARD DES ORGANISMES MARINS.

Le rapport entre les surcharges expérimentales tolérées par les moules après 16 jours d'exposition et les concentrations normales dans l'eau de mer est plus élevé pour le cadmium que pour le zinc et surtout pour le cuivre. En conséquence, la marge entre les concentrations inoffensives et néfastes est étroite pour le cuivre et même pour le zinc. Ceci conduit à repenser, la notion de toxicité relative entre ces trois métaux d'autant que la régulation d'un métal par un organisme ne signifie pas son innocuité. En effet, nous avons vu que pour les éléments essentiels il n'existe qu'une très faible différence entre les surcharges régulées et celles qui ne le sont plus et deviennent toxiques. Par ailleurs, même si une régulation est observée dans les concentrations métalliques des tissus, les métaux peuvent induire des perturbations physiologiques, par exemple

au niveau enzymatique (AMIARD et coll., 1982 b) ou hormonal (AMIARD-TRIQUET et coll., 1986). Enfin la régulation elle-même peut être considérée comme une perturbation du métabolisme habituel quand les surcharges dans le milieu externe deviennent très importantes, provoquant une accélération des flux et une dépense accrue d'énergie (WHITE et RAINBOW, 1982-1984).

### III.3. ACCUMULATION DU CADMIUM ET DU ZINC PAR LES BACTERIES ET LEUR TOLERANCE AUX METAUX.

En ce qui concerne les Bactéries, il ne semble pas y avoir de corrélations entre la concentration en zinc et en cadmium de l'eau de mer ou des huîtres et la fréquence d'apparition des souches résistantes à ces métaux au cours de l'année. De même, aucune corrélation n'existe entre l'apparition des souches résistantes dans l'eau et dans les huîtres. Par contre, de grandes similitudes apparaissent pour ces deux milieux entre les deux métaux étudiés (Cd, Zn) en ce qui concerne le type respiratoire des souches et leur résistance ou leur capacité d'accumulation du zinc et du cadmium. Ainsi, lorsque le nombre de souches sensibles augmente en hiver (novembre à février), corrélativement la bioaccumulation du cadmium et du zinc est la plus forte dans les souches bactériennes. Ceci est à rapprocher des fortes concentrations de ces mêmes métaux dans les huîtres *in toto* à cette époque de l'année. Toutefois, la concentration importante du zinc détectée dans les huîtres ne peut être due à la présence de Bactéries, puisque ces dernières, contaminées artificiellement à 100 µg Zn/l (cf. Publ. 6), concentrent environ 10 fois moins le zinc que les Mollusques.

### III.4. VOIES DE TRANSFERT DES METAUX DU MILIEU VERS LES MOLLUSQUES FILTREURS.

*In situ*, il n'est apparu aucun appauvrissement en métaux (Cd, Pb, Cu, Zn) des fèces des Mollusques filtreurs par rapport au seston ce qui aurait traduit une accumulation sélective chez ces organismes. Chez les huîtres contaminées expérimentalement par Pb et Cu, les différentes techniques d'investigation (analyses globales, histocytologie, biochimie) mettent en évidence un certain effet de l'ingestion de nourriture contaminée mais une nette prépondérance du vecteur eau dans le transfert de ces deux métaux.

Le très faible transfert de Cu et Pb des Algues à l'Huître montre que la fixation des métaux par le phytoplancton peut jouer un "effet de piège" protégeant le Mollusque. L'hypothèse pourrait être étendue au seston pour d'autres métaux et d'autres espèces de filtreurs. Toutefois, dans notre étude en milieu semi-fermé, nous n'avons pas observé d'influence significative des variations des populations phytoplanctoniques sur les teneurs en métaux des eaux des claires. Le taux d'éléments incorporés par le phytoplancton ne serait donc pas suffisant pour modifier la biodisponibilité des métaux à partir de l'eau (Förstner et Wittmann, 1979, Jouany et al., 1985). Cependant Knauer et Martin (1973) ont relevé une correspondance entre une augmentation de la population de Diatomées et la décroissance des teneurs en cadmium dans l'eau. Quoi qu'il en soit, nos résultats démontrent que la mise en évidence d'importantes concentrations métalliques dans des Algues ou le seston, ne saurait constituer un critère d'évaluation des risques encourus par les Mollusques.

### III.5. FORMES CHIMIQUES DE TRANSPORT ET DE STOCKAGE DU PLOMB ET DU CUIVRE.

La présence de métallo-protéines, et dans certains cas de métallothionéines voisines de celles isolées chez les Mammifères, ont été signalées chez les moules (Noël-Lambot, 1976 ; George et al., 1979 ; Marshall et Talbot, 1979 ; Frankenne et al., 1980 ; Carpène et al., 1980 ; Viarengo et al., 1981 ; Köhler et Riisgard, 1982 ; Roesijadi et al., 1982 ; Nolan et Duke, 1983) et chez les huîtres (Ridlington et Fowler, 1979 ; Squibb et al., 1982 ; Cosson et Thomson, 1983 ; Sharma, 1983 ; Thomson et Cosson, 1984). Ces protéines sont généralement induites par une surcharge en cadmium du milieu où vivent ces Mollusques filtreurs ; quelques expériences montrent une induction possible ou une fixation probable de Hg, de Zn et de Cu mais jamais de Pb sur ces protéines de faible poids moléculaire. Nous avons observé nous-même l'absence totale de plomb dans les fractions protéiniques extraites des huîtres contaminées par le plomb et le cuivre. Nous constatons au contraire une fixation importante du cuivre sur les protéines de faible poids moléculaire (5000-8000 et 2500-4000) lorsque la voie de contamination est l'eau. Il est à noter que le poids moléculaire moyen du pic  $\gamma$  (environ 6500) est identique à celui avancé par certains auteurs (In = Hunziker et Kägi, 1985) comme étant celui de la métallothionéine ou d'une isométallothionéine. De plus, l'étude histocytologique nous a montré que la présence de cuivre est liée

à celle de soufre dans les amœbocytes suggérant une complexation du cuivre par un ligand soufré ; le fait que la liaison Cu-ligand est rompue à pH 2 suggère que le ligand est une protéine à haute teneur en soufre. Le fait que la protéine du pic  $\gamma$  a un rapport 254 nm/280 nm élevé et qu'elle est thermorésistante, nous amène tout naturellement à penser avoir affaire à une métallothionéine. Toutefois des études complémentaires seraient nécessaires pour connaître la nature exacte de ces métalloprotéines.

L'absence quasi-totale de lésions chez les Huîtres contaminées, même dans les conditions qui assurent l'assimilation la plus importante des deux métaux, s'explique par la bioaccumulation d'une fraction des toxiques dans des compartiments cellulaires qui les placent à l'écart des réactions du métabolisme général. Deux types de structure assurent ainsi une détoxification : les sphérocristaux et surtout les lysosomes.

Le système lysosomal est bien connu pour accumuler des métaux excédentaires. Parmi les organes qui assimilent directement les métaux dissous dans l'eau, les cellules digestives ont été surtout étudiées ; la variété des ligands contenus dans les lysosomes des cellules digestives rend possible *a priori* la capture de tout métal pénétrant dans l'organisme et c'est ainsi qu'on observe un stockage de métaux "durs" ( $Pb^{2+}$ ) et de métaux "intermédiaires" :  $Cd^{2+}$  (Jeantet et al., 1985),  $Cu^{2+}$ . Pour le cuivre, la complexation que nous observons chez l'Huître est identique à celle qui a été reconnue chez la Moule (Viarengo et al., 1981). Les lysosomes des cellules intestinales ont été peu étudiés à ce jour, alors qu'ils constituent pourtant des sites importants de bioaccumulation de métaux ; leur présence confère à la paroi intestinale un rôle de barrière de diffusion aussi bien à l'égard de Cu et de Pb qu'à celui de Cd (Jeantet et al., 1985). Pour les branchies, il existe certainement de grandes différences spécifiques dans les réactions de l'organe aux métaux exogènes. Ainsi, chez l'Huître, ce sont les mêmes organites cellulaires (lysosomes) qui concentrent à la fois un métal dur (Pb) et deux métaux intermédiaires (Cu et Cd) ; chez la Moule en revanche, le stockage du plomb a lieu dans les lames basales (Marshall et Talbot, 1979). Parmi les organes d'épuration du sang, le rein a été souvent étudié et tous les auteurs s'accordent pour reconnaître, dans les lysosomes des cellules

de diverses espèces, une capacité de stockage de polluants métalliques (Carmichael et al., 1979 ; George, 1983 ; Jeantet et al., 1985). Pour les cellules à pores, le système lysosomal a été décrit (voir Simkiss et Mason, 1983) et il est connu pour accumuler des composés métalliques naturels (Martoja et al., 1980, 1985). Nos résultats démontrent une incorporation intracellulaire des deux contaminants.

Les sphérocristaux ont été reconnus, dans d'autres groupes zoologiques (Insectes, Crustacés), comme des structures d'accumulation de métaux "toxiques", mais les données manquent chez les Mollusques. Comme les lysosomes, les sphérocristaux peuvent, *à priori*, complexer des métaux très divers puisque leur organisation fait alterner des strates de ligands minéraux (phosphates, carbonates) et des strates de protéines. On peut donc admettre, sous réserve d'un examen ultérieur en microscopie électronique, que pour l'Huître, le plomb est incorporé dans les strates minérales, le cuivre dans les strates protéiques.

Quant aux structures d'accumulation des amoebocytes, leur identification n'a pas été effectuée à ce jour, en raison de la dissolution de leurs inclusions lors de la préparation des échantillons destinés à l'examen ultrastructural (Pirie et al., 1984). Nous ignorons donc si ce sont les mêmes organites qui accumulent, dans des conditions naturelles, le phosphate de zinc et le composé indéterminé du cuivre. Cette lacune est d'autant plus regrettable que les amoebocytes constituent les cellules les plus importantes de complexation du plomb et du cuivre excédentaire, de même qu'elles sont les cellules principales d'immobilisation du cadmium (Martoja et Martin, 1985). Pour le cuivre, des observations analogues ont été faites par George et al., (1978) sur des Huîtres provenant d'un estuaire pollué.

Les données classiques de physiologie des Bivalves permettent d'envisager de la façon suivante le cycle des deux métaux dans l'organisme. Le cuivre et le plomb dissous dans l'eau de mer pénètrent dans l'organisme par plusieurs voies :

- un transit par l'épithélium branchial, avec immobilisation partielle dans les lysosomes,
- une absorption par l'épithélium palléal interne, avec incorporation dans les sphérocristaux,
- un passage, par la bouche, dans la lumière du système digestif ; il est suivi d'un transit avec immobilisation, par les cellules intestinales

et par les cellules digestives des diverticules et d'une capture par les amoebocytes associés au tube digestif.

La fraction des métaux qui n'est pas retenue dans les cellules absorbantes circule dans le sang dans des états chimiques inconnus ; les métaux peuvent être assimilés par toutes les catégories cellulaires, produisant ainsi une contamination diffuse. Leur passage, dans l'épithélium palléal externe, est suivi d'une immobilisation dans des sphérocristaux. Le rein excrète une faible partie des métaux circulants, alors que les cellules à pores assurent l'endocytose de complexes hémolympatiques Cu-protéine et Pb-protéine.

Dans le cas d'une contamination par la seule nourriture, les voies de pénétration des polluants sont évidemment moins nombreuses et réduites au transit par les cellules digestives, les amoebocytes et l'épithélium intestinal. La détection des deux métaux dans les cellules à pores démontre effectivement leur passage préalable dans le sang.

A propos de ce cycle se pose la question de la place de la protéine de complexation du cuivre et celle de la permanence du stockage métallique. Nous en sommes évidemment réduits à des hypothèses. Il est probable que, comme c'est le cas général, tout tissu autre que le tissu musculaire réagit à l'intoxication par les métaux des groupes I B et II B de la classification périodique, par la synthèse d'une protéine de complexation soufrée de type métallothionéine. Les organes absorbant le cuivre (branchie, épithélium intestinal, cellules digestives des diverticules, amoebocytes) élaboreraient donc la protéine de complexation, qui serait ensuite concentrée dans le système lysosomal ; les lysosomes joueraient donc le rôle, comme chez un Insecte (Bouquegneau et al., 1985) d'organites d'excrétion de la métallothionéine. Nous étendons donc à un ensemble d'organes, l'hypothèse de Viarengo et al., (1985) qui considèrent que les lysosomes de cellules digestives de la Moule accumulent une métallothionéine polymérisée. En ce qui concerne la permanence du stockage métallique, plusieurs cas sont à considérer. Il est certain que les cellules digestives rejettent leurs lysosomes

et que ce processus équivaut à une épuration ; il n'est donc pas surprenant que, dans la même espèce, Zarogian et al. (1979) aient constaté une décroissance de la teneur en plomb d'huîtres contaminées et replacées en milieu non pollué. Les lysosomes du rein sont eux aussi soumis à extrusion. Mais nous ignorons tout de la permanence des structures d'accumulation des branchies, de l'intestin, des amœbocytes et des cellules à pores. Pour ces dernières, le fait que la teneur en fer augmente avec l'âge de l'animal (inédit) indique une durée de vie cellulaire très longue, sinon aussi longue que celle de l'animal ; dans ces conditions, la rétention des métaux peut être considérée comme quasi définitive. Le cas des sphérocristaux de l'épithélium palléal est particulier. On sait en effet (voir Wilbur, 1972) que dans les zones d'accroissement de la coquille, les sphérocristaux sont dissous et leurs constituants réutilisés pour la synthèse des matériaux de la coquille. On peut donc prévoir que le cuivre soit complexé par la matrice organique de la coquille lors de sa synthèse par des cellules épithéliales, et que le plomb soit incorporé dans les cristaux de carbonate de calcium lors de la nucléation de la phase minérale. La coquille des huîtres contaminées est donc certainement chargée de plomb, comme celle de moules soumises au même type d'expérimentation (Sturesson, 1976).

### III.6. INFLUENCE DE LA FORME CHIMIQUE SUR LA TOXICITE A L'EGARD DE L'HOMME.

Le cuivre qui est présent à l'état diffus dans tous les tissus est vraisemblablement complexé par les macromolécules protéiques. Une partie du métal est stocké sous forme d'une protéine de complexation à haute teneur en soufre ; la liaison entre le cuivre et son ligand étant facilement rompue par abaissement du pH, il est certain que dans l'éventualité d'une ingestion d'huîtres contaminées, la digestion stomacale, qui se déroule à pH 1 en milieu chlorhydrique, rendrait le cuivre assimilable pour tout Vertébré dont l'Homme.

Pour le plomb, dont l'essentiel est stocké sous forme de phosphate, il est impossible de se prononcer sur une éventuelle libération du métal lors de la digestion d'huîtres contaminées. Il conviendrait au préalable de déterminer la nature exacte du phosphate,

en particulier s'il s'agit, comme l'hypothèse en a été avancée pour la Moule, d'un sel mixte Ca-Pb (Marshall et Talbot, 1979). On notera simplement que les liaisons entre le plomb et les groupes phosphates sont plus fortes qu'entre le cuivre et les groupes sulfhydriles des protéines de complexation, et que, de ce fait, la libération du plomb est moins facile que celle du cuivre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMIARD J.-C., AMIARD-TRIQUET C., et METAYER C., 1982a. Distribution de quelques métaux (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les organismes vivants de l'estuaire de la Loire et des zones adjacentes. Bull. Soc. Sc. nat. ouest Fr., 4 (4), 153-168.
- AMIARD J.-C., AMIARD-TRIQUET C. et DENUIT C., 1982b. Variations de l'activité de quelques enzymes de l'hémolymphe et de l'hépatopancréas de Carcinus maenas in situ et expérimentalement sous l'effet de polluants métalliques (Cd, Pb, Cu, Zn). In: Indices biochimiques et milieux marins. Publ. CNEXO (Actes Colloq.) n°14, 385-398.
- AMIARD-TRIQUET C., AMIARD J.-C., ROBERT J.-M., METAYER C., MARCHAND J. et MARTIN J.-L., 1983. Etude comparative de l'accumulation biologique de quelques oligo-éléments métalliques dans l'estuaire interne de la Loire et les zones néritiques voisines (Baie de Bourgneuf). Cah. Biol. Mar., 24, 105-118.
- AMIARD-TRIQUET C., AMIARD J.-C., FERRAND R., ANDERSEN A.C. et DUBOIS M.P., 1986. Disturbance of a met-enkephalin-like hormone in the hepatopancreas of crabs contaminated by metals. Ecotoxicol. Environ. Saf. (sous presse).
- BIANCHI M.A. et BIANCHI A.J., 1982. Statistical sampling of bacterial strains and its use in bacterial diversity measurement. Microb. Ecol., 8, 61-69.
- BLOOM H. et AYLING G.M., 1977. Heavy metals in the Derwent estuary. Env. Geol., 2, 3-22.
- BOALCH R., CHAN S. et TAYLOR D., 1981. Seasonal variation in the trace metal content of Mytilus edulis. Mar. Pollut. Bull., 12 (8), 276-280.
- BOITEAU H.L. et METAYER C., 1978. Microdosage du plomb, du cadmium, du zinc et de l'étain dans les milieux biologiques par spectrométrie d'absorption atomique après minéralisation et extraction. Analusis, 6, 350-358.
- BOUQUEGNEAU J.M. et NOEL-LAMBOT F., 1977. L'accumulation du mercure à partir de l'eau et de la nourriture chez les poissons marins. Rev. Intern. Océanogr. Méd., 48, 107-116.
- BOUQUEGNEAU J.M., BALLAN-DUFRAICAIS C. et JEANTET A.Y., 1985. Storage of Hg in the ileum of Blatella germanica: biochemical characterization of metallothionein. Comp. Biochem. Physiol., 80 C, 95-98.

- BOUTIER B., 1982. Synthèse des résultats de la surveillance des micropolluants dans la matière vivante en 1979. Bull. RNO n° 17.
- BOYDEN C.R., 1977. Effect of size upon metal content of shellfish. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 57, 675-714.
- BOYDEN C.R. et PHILLIPS D.J.H., 1981. Seasonal variation and inherent variability of trace elements in oysters and their implications for indicator studies. Mar. Ecol. (Progr. Ser.), 5, 29-40.
- BRYAN G.W., 1973. The occurrence and seasonal variation of trace metals in the scallops Pecten maximus (L.) and Chlamys opercularis (L.). J. Mar. Biol. Ass. U. K., 53, 145-166.
- CARMICHAEL N.G., SQUIBB K.S. et FOWLER B.A., 1979. Metals in the molluscan kidney: a comparison of two closely related bivalve species (Argopecten), using X-ray microanalysis and atomic absorption spectroscopy. J. Fish. Res. Board Can., 36, 1149-1155.
- CARPENE E., CORTESI P., CRISSETIG G., et SERRAZANETTI G.P., 1980. Cadmium-binding proteins from the mantle of Mytilus edulis (L.) after exposure to cadmium. Thalassia Jugosl., 16 (2-4), 317-323.
- CHABBERT Y.A., 1963. L'antibiogramme. Ed. La Tourelle, Saint-Mandé, pp. 78-81.
- COOPER R.J., LANGLOIS D. et OLLEY J., 1982. Heavy metals in Tasmanian shellfish. 1. Monitoring heavy metal contamination in the Derwent estuary: Use of oysters and mussels. J. Applied Toxicol., 2, 99-109.
- COSSA D., BOURGET E., POULIOT D., PIUZE J. et CHANUT J.P., 1980. Geographical and seasonal variations in the relationship between trace metal content and body weight in Mytilus edulis. Mar. Biol., 58, 7-14.
- COSSON R.P. et THOMPSON J.A.J., 1983. Utilisation de l'électrode PAR 303 pour la détection et le dosage des métallothionéines dans les tissus d'invertébrés marins. Analisis, 11 (1), 33-35.
- FARRINGTON J.W., GOLDBERG E.D., RISEBROUGH R.W., MARTIN J.H. et BOWEN V.T., 1983. U. S. "Mussel Watch" 1976-1978: an over view of the trace-metal, DDE, PCB, hydrocarbon, and artificial radionuclide data. Environ. Sci. Technol., 17, 490-496.
- FISCHER H., 1983. Shell weight as an independent variable in relation to cadmium content of molluscs. Mar. Ecol. (Progr. Ser.), 12, 59-75.
- FLATAU G.N. et GAUTHIER M.J., 1983. Accumulation du cadmium par Mytilus edulis en présence de souches bactériennes sensibles ou résistantes à ce métal. Can. J. Microbiol., 29, 210-217.
- FORSTNER U. et WITTMANN G.T.W., 1979 Metal Pollution in the Aquatic Environment. Springer-Verlag, Berlin, 486 p.

- FRANKENNE F., NOEL-LAMBOT F. et DISTECHE A., 1980. Isolation and characterization of metallothioneins from cadmium-loaded mussel Mytilus edulis. Comp. Biochem. Physiol., 66C, 179-182.
- FRAZIER J.M., 1975. The dynamics of metals in the American oyster, Crassostrea virginica. I. Seasonal effects. Chesapeake Sci., 16, 162-171.
- FRAZIER J.M. et GEORGE S.G., 1983. Cadmium kinetics in oysters. A comparative study of Crassostrea gigas and Ostrea edulis. Mar. Biol., 76, 55-61.
- GAVIS J.F. et FERGUSON J.F., 1972. The cycling of mercury through the environment. Wat. Res., 6, 989-1008.
- GEORGE S.G., 1983. Heavy metal detoxication in Mytilus kidney. An in vitro study of Cd- and Zn-binding to isolated tertiary lysosomes. Comp. Biochem. Physiol., 76 C, 59-65.
- GEORGE S.G. et COOMBS T.L., 1977. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by Mytilus edulis. Mar. Biol., 39, 261-268.
- GEORGE S.G. et FRAZIER J.M., 1982. Some aspects of the relationship between tolerance to heavy metal pollution and metabolism of Cd, Cu and Zn in oysters. Thalassia Jugosl., 18 (2-4), 202-219.
- GEORGE S.G., PIRIE B.J.S., CHEYNE A.R., COOMBS T.L. et GRANT P.T., 1978. Detoxication of metals by marine bivalves: an ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster Ostrea edulis. Mar. Biol., 45, 147-156.
- GEORGE S.G., CARPENE E., COOMBS T.L., OVERNELL J. et YOUNGSON A., 1979. Characterization of cadmium-binding proteins from mussels, Mytilus edulis (L.), exposed to cadmium. Bioch. Biophys., 580, 225-233.
- GOLDBERG E.W., BOWEN V.T., FERRINGTON J.W., HARVEY G., MARTIN J.H., PARKER P.I., RISEBROUGH R.W., ROBERTSON W., SCHNEIDER P. et GANBLE E., 1978. The mussel watch. Environ. Conser., 5, 1-25.
- HUNZIKER P.E. et KAGI J.H.R., 1985. Metallothionein. In: Metallo-proteins. Part 2: Metal Proteins with Non-redox Roles, Harrison P; ed., Topics in Molecular and Structural Biology 7, Verlag Chemie, Weimheim, 4, 149-181.
- IBANEZ F., 1983. La segmentation des séries chronologiques océanographiques multivariées. J. Rech. Oceanogr., 8 (4), 67-70.
- IBANEZ F., 1984. Une technique de décomposition des séries chronologiques planctoniques pluri-annuelles. J. Rech. Oceanogr., 9 (2), 85-87.
- JEANTET A.Y., BALLAN-DUFRANCAIS C. et MARTIN J.L., 1985. Recherche des mécanismes de détoxication du cadmium par l'Huître Crassostrea gigas. II. Sites intracellulaires d'accumulation du métal dans les organes absorbants et excréteurs. C. R. Acad. Sc., sér. III, 301, 177-182.

- JENSEN S. et JERNELOV A., 1969. Biological methylation of mercury in aquatic organisms. Nature (London), 223, 753.
- JOUANY J.M., VASSEUR P., FERRARD J.F., LELANDAIS D. et TRUHAUT R., 1985. Modèle d'étude de l'écotoxicité à moyen terme des substances chimiques. C. R. Acad. Sc., sér. III, 301, 615-620.
- KNAUER G.A. et MARTIN J.H., 1973. Seasonal variations of cadmium, copper, manganese, lead and zinc in water and phytoplankton in Monterey Bay, California. Limnol. Oceanogr., 18, 597-604.
- KOHLER K. et RIISGARD H.U., 1982. Formation of metallothioneins in relation to accumulation of cadmium in the common mussel Mytilus edulis. Mar. Biol., 66, 53-58.
- LEWIS A.G. et CAVE W.R., 1982. The biological importance of copper in oceans and estuaries. Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev., 20, 471-695.
- MACKAY N.J., WILLIAMS R.J., KACPRZAC J.L., KAZACOS M.N., COLLINS A.J. et AUTY E.H., 1975. Heavy metals in cultivated oysters (Crassostrea commercialis = Saccostrea cucullata) from the estuaries of New South Wales. Aust. J. Mar. Freshwater Res., 26, 31-46.
- MAJORI L., NEDOCLAN G., MODONUTTI G.B. et DARIS F., 1978. Study of the seasonal variations of some trace elements in the tissues of Mytilus galloprovincialis taken in the Gulf of Trieste. Rev. Intern. Océanogr. Méd., 39, 37-50.
- MARSHALL A.T. et TALBOT V., 1979. Accumulation of cadmium and lead in the gills of Mytilus edulis: X-ray microanalysis and chemical analysis. Chem. Biol. Interactions, 27, 111-123.
- MARTIN J.L., MARTOJA M., TRUCHET M. et MARTOJA R., 1985. Effets de composés fluorés (NaF, CaF<sub>2</sub> et phosphogypse) sur un gastéropode et un bivalve marins. Oceanol. Acta (sous presse).
- MARTOJA R. et MARTIN J.L., 1985. Recherche des mécanismes de détoxification du cadmium par l'huître Crassostrea gigas (Mollusque, Bivalve). I. Mise en évidence d'une protéine sulfhydrylée de complexation du métal dans les améboocytes à zinc et cuivre. C. R. Acad. Sc., sér. III, 300, 549-554.
- MARTOJA M., ELKAIM B. et VU THAN TUE, 1980. Bioaccumulation du cuivre chez Littorina littorea L. (Gastéropode Prosobranchie): signification physiologique et écologique. J. exp. mar. Biol., 43, 251-270.
- MARTOJA R., BALLAN-DUFRANCAIS C., JEANTET A.Y., MARTIN J.L. et TRUCHET M., 1985. Effets d'un effluent de fabrication du bioxyde de titane sur un Mollusque (Mytilus edulis). Comparaison d'animaux traités expérimentalement et prélevés à proximité d'un rejet d'usine. Mar. Environ. Res. (sous presse).

- MARTOJA M., BOUQUEGNEAU J.M., TRUCHET M. et MARTOJA R., 1985 . Recherche de l'argent chez quelques Mollusques marins, dulcicoles et terrestres. Formes chimiques et localisation histologique. Vie Milieu (sous presse).
- N.A.S., 1980. The international mussel watch. National Academy of Sciences, Washington, D.C., 248 p.
- NOEL-LAMBOT F., 1976. Distribution of Zinc and Copper in the Mussel Mytilus edulis. Existence of Cadmium-Binding Proteins similar to Metallothioneins. Experientia, 32, 324-325.
- NOLAN C.V. et DUKE E.J., 1983. Cadmium-binding proteins in Mytilus edulis: relation to mode of administration and significance in tissue retention of cadmium. Chemosphere, 12 (1), 65-74.
- PHILLIPS D.J.H., 1976. The common mussel Mytilus edulis as an indicator of pollution by zinc, cadmium, lead and copper. I. Effects of environmental variables on uptake of metals. Mar. Biol., 38, 59-69.
- PIRIE B.S.J., GEORGE S.G., LYTTON D.G. et THOMSON J.D., 1984. Metal-containing blood cells of oysters: ultrastructure, histochemistry and X-ray microanalysis. J. mar. biol. Ass. U. K., 64, 115-123.
- POROT V., 1984. Les métaux toxiques Hg, Cu, Cd, Zn, Pb dans les moules et les huîtres du littoral français (1979-1982). Bull. RNO n°20, 99-133.
- RAINBOW P.S., SCOTT A.G., WIGGINS E.A. et JACKSON R.W., 1980. Effect of chelating agents on the accumulation of cadmium by the barnacle Semibalanus balanoides and complexation of soluble Cd, Zn and Cu. Mar. Ecol. (Progr. Ser.), 2, 143-152.
- RIDLINGTON J.W. et FOWLER B.A., 1979. Isolation and partial characterization of a cadmium-binding protein from the american oyster (Crassostrea virginica). Chem.-Biol. Interactions, 25, 127-138.
- RITZ D.A., SWAIN R. et ELLIOTT N.G., 1982. Use of the mussel Mytilus edulis planatus (Lamarck) in monitoring heavy metals in sea water. Aust. J. Mar. Freshwater Res., 33, 491-506.
- ROESIJADI G., DRUM A.S., THOMAS J.M. et FELLINGHAM G.W., 1982. Enhanced mercury tolerance in marine mussels and relationship to low molecular weight, mercury-binding proteins. Mar. Pollut. Bull. 13 (7), 250-253.
- ROINEL N., MOREL F. et ISTIN M., 1973. Etude des granules calcifiés du manteau des Lamellibranches à l'aide de la microsonde électronique. Calc. Tis. Res., 11, 163-170.
- SAYLER G.S., NELSON J.D. et COLWELL R.R., 1975. Role of bacteria on bioaccumulation of mercury in the oyster Crassostrea virginica. Appl. Microbiol., 30, 91-96.

- SHARMA R.P., 1983. Ligands Binding Cadmium, Zinc and Copper in a Species of New Zealand Oyster (Ostrea lutaria). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30, 428-434.
- SIMKISS K. et MASON A.Z., 1983. Metal ions: metabolic and toxic effects. In: The Mollusca, Wilbur K.M., ed., Academic Press, N.-Y., 2, 101-163.
- SQUIBB K.S., CHIGNELL C.F. et FOWLER B.A., 1982. Characterization of oyster cadmium-binding protein: structural studies. Fed. Proc., 41, 644.
- STURESSON U., 1976. Lead enrichment in shells of Mytilus edulis. Ambio, 5, 253-256.
- THOMPSON J.A.J. et COSSON R.P., 1984. An Improved Electrochemical Method for the Quantification of Metallothioneins in Marine Organisms. Mar. Env. Res., 11, 137-152.
- THOMSON J.D., 1982. Metal concentration changes in growing Pacific oysters, Crassostrea gigas, cultivated in Tasmania, Australia. Mar. Biol., 67, 135-142.
- THOMSON J.D., PIRIE B.J.S. et GEORGE S.G., 1985. Cellular metal distribution in the Pacific oyster, Crassostrea gigas (Thun.) determined by quantitative X-ray microprobe analysis. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 85, 37-45.
- VIARENGO A., PERTICA M., MANCINELLI G., PALMERO S., ZANICCHI G. et ORUNESU M., 1981. Synthetis of Cu-binding proteins in different tissus of mussels exposed to the metal. Mar. Pollut. Bull., 12 (10), 347-350.
- VIARENGO A., ZANICCHI G., MOORE M.N. et ORUNESU M., 1981. Accumulation and detoxication of copper by the mussel Mytilus galloprovincialis Lam.; a study of the subcellular distribution in the digestive gland cells. Aquat. Toxicol., 1, 147-157.
- VIARENGO A., MOORE M.N., PERTICA M., MANCINELLI G., ZANICCHI G. et PIPE R.K., 1985. Detoxication of copper in the cells of the digestive gland of mussel: the role of lysosomes and thioneins. The Sc. Tot. Environ., 44, 136-145.
- WILBUR K.M., 1972. Shell formation in Mollusks. In: Chemical zoology, Florkin M. et Scheere B.T., eds., Academic Press, N.-Y., 7, 103-145.
- WHITE S.L. et RAINBOW P.S., 1982. Regulation and accumulation of copper, zinc and cadmium by the shrimp Palaeomon elegans. Mar. Ecol. (Progr. Ser.), 8, 95-101.
- WHITE S.L. et RAINBOW P.S., 1984. Regulation of zinc concentration by Palaeomon elegans (Crustacea: Decapoda): zinc flux and effects of temperature, zinc concentration and moulting. Mar. Ecol. (Progr. Ser.), 16, 135-147.
- ZAROOGIAN G.E., MORRISON G. et HELTSHE J.F., 1979. Crassostrea virginica as an indicator of lead pollution. Mar. Biol., 52, 189-196.

ANNEXE I

LISTE DES PUBLICATIONS AFFERENTES TOTALEMENT  
OU EN PARTIE A CE CONTRAT

- 1 AMIARD J.C., AMIARD-TRIQUET C., BERTHET B. et METAYER C., 1986.  
Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. I. Field study. Mar. Biol. (sous presse).
- 2 AMIARD-TRIQUET C., BERTHET B. et AMIARD J.C., 1985. Ecotoxicological studies of the bioaccumulation of essential and non essential trace metals in various estuarine and coastal organisms. In : Heavy Metals in the Environment, Lekkas T.D. ed., Athens, Sept. 1985, vol. 1, 688-690.
- 3 AMIARD-TRIQUET C., BERTHET B., METAYER C. et AMIARD J.C., 1986.  
Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. II. Experimental study. Mar. Biol. (sous presse).
- 4 BERTHET B., 1986 - Etudes *in situ* et expérimentales du devenir de quelques éléments métalliques (Cd, Pb, Cu, Zn) dans un écosystème de zone conchylicole. Thèse de Doctorat d'Etat, Université de Rennes I, 204 p. + VII.
- 5 BERTHET B., AMIARD-TRIQUET C., METAYER C. et AMIARD J.C., 1984.  
Etude écologique de l'accumulation de quelques éléments traces chez la moule et dans certains composants d'un écosystème de zone conchylicole. J. Rech. Oceanogr., 9(2), 75-77.
- 6 GAUTHIER M.J., BREITTMAYER V., CLEMENT R., FLATAU G.N. et AMIARD J.C., 1985. Tolérance au zinc et au cadmium et accumulation du zinc par les bactéries marines à gram négatif. Relations avec leur type respiratoire. Can. J. Microbiol., 31(8), (sous presse).
- 7 GAUTHIER M.J., CLEMENT R.L., FLATAU G.N. et AMIARD J.C.. Accumulation du cadmium par les bactéries marines à gram négatif selon leur sensibilité au métal et leur type respiratoire. Oceanologica Acta (sous presse).
- 8 GAUTHIER M.J., BREITTMAYER J.P., BREITTMAYER V.A. et CLEMENT R.L..  
Mesure de la sensibilité des bactéries marines hétérotrophes au zinc et au cadmium. Analyse de la concordance entre les concentrations minimales inhibitrices et les zones d'inhibition sur milieu solide. (soumis à Zentralblatt für Mikrobiol.)

- 9 METAYER C., AMIARD J.C., AMIARD-TRIQUET C., BERTHET B. et CONFAIS J., 1985. Variations saisonnières et pluri-annuelles des concentrations métalliques chez l'huître *Crassostrea gigas*. Thunberg. J. Rech. Oceanogr., 10(2), 66-68.
- 10 METAYER C., AMIARD J.C., AMIARD-TRIQUET C. et BERTHET B., 1985. Facteurs biologiques et écologiques contrôlant le niveau d'éléments traces (Cd, Pb, Cu, Zn) chez les moules et les huîtres de la baie de Bourgneuf. Bull. Soc. Sc. nat. Ouest Fr., 7(2), 53-69.
- 11 CLEMENT R.L., 1985. Etude écophysiological de la résistance et de l'accumulation du cadmium par les bactéries hétérotrophes marines à gram négatif. Thèse EPHE, 51 p. + VIII.

ANNEXE II

LISTE DES CHERCHEURS ET DES LABORATOIRES AYANT TRAVAILLE A CE CONTRAT

AMIARD J.-C. Responsable scientifique

Bioaccumulation - Etude in situ

BERTHET B.<sup>+</sup> (1)  
AMIARD J.-C. (1)  
AMIARD-TRIQUET C. (1)  
METAYER C. (1)

Bioaccumulation - Etudes expérimentales

AMIARD-TRIQUET C.<sup>+</sup> (1)  
AMIARD J.-C. (1)  
BERTHET B. (1)  
BAUD J.-P. (5)  
DRENO J.-P. (5)  
HOMMEBON P. (5)

Microbiologie

GAUTHIER M.J.<sup>+</sup> (4)  
FLATAU G.N. (4)  
CLEMENT R.L. (4)

Histocytologie

MARTOJA R.<sup>+</sup> (3)  
BALLAN-DUFRANCAIS C. (3)  
JEANTET A.Y. (3)  
TRUCHET R. (3)

Biochimie

GILLOT P.<sup>+</sup> (2)  
AMIARD J.-C. (1)  
MORE P. (2)  
MORE M.-T. (2)

+ Responsable du thème

- (1) Centre de Dosage des Eléments Traces - Université de Nantes
- (2) Laboratoire de Physiologie et Biologie cellulaire - Université de Nantes
- (3) Laboratoire d'Histophysiologie fondamentale et appliquée, ERA 570 CNRS -  
Université P. et M. Curie (Paris 6)
- (4) INSERM - Unité 40 - Nice
- (5) IFREMER - Station expérimentale de Bouin

ETUDE DES MECANISMES DE TRANSFERT DES ELEMENTS METALLIQUES DANS LES CHAINES ALIMENTAIRES ABOUTISSANT A L'HUITRE ET A LA MOULE, MOLLUSQUES FILTREURS; FORMES CHIMIQUES DE STOCKAGE; CONSEQUENCES ECOTOXICOLOGIQUES.

Résumé

La première partie de ce rapport décrit une étude *in situ* qui a été réalisée en baie de Bourgneuf pendant plus de deux ans. Dans cette zone, les concentrations métalliques dans les Mollusques filtreurs sont généralement faibles comparées à celles déterminées dans d'autres sites de par le monde. Dans ces conditions, les caractéristiques de la bioaccumulation (fluctuations saisonnières et pluri-annuelles) et l'organotropisme peuvent être considérés dans une large mesure, comme la conséquence du métabolisme normal des éléments traces.

Une analyse statistique des relations entre le type respiratoire des bacilles à Gram négatif marins et leur résistance au zinc et au cadmium, ou leur capacité d'accumulation du zinc a été réalisée sur 453 souches isolées mensuellement de l'eau et des huîtres d'un parc ostréicole de la baie de Bourgneuf pendant un cycle annuel. Une relation hautement significative a été mise en évidence entre le type respiratoire des souches et les deux caractéristiques toxicologiques.

La deuxième partie rend compte d'études expérimentales sur le mode d'accumulation des métaux chez les Mollusques filtreurs à partir de l'eau ou de différentes nourritures. Pour le cuivre et le plomb chez l'Huître, la bioaccumulation a été étudiée en utilisant des techniques nombreuses et complémentaires afin d'évaluer les concentrations métalliques dans l'organisme entier ou dans des organes isolés, d'identifier les niveaux de métaux et leurs formes chimiques de stockage dans les cellules de différents tissus.

La troisième partie est une discussion générale sur :

- la validité d'utiliser les Mollusques filtreurs comme indicateurs biologiques de pollutions métalliques;
- la toxicité relative du cadmium, du cuivre et du zinc à l'égard des organismes marins;
- les relations entre l'accumulation du cadmium et du zinc dans les Bactéries, leur tolérance aux métaux et leur type respiratoire;
- les voies de transfert des métaux de l'environnement aux Mollusques filtreurs;
- les formes chimiques de transport et de stockage du plomb et du cuivre;
- l'influence de la forme chimique des métaux dans les organismes marins sur leur toxicité à l'égard de l'Homme.

STUDY OF THE MECHANISMS OF TRANSFER OF TRACE ELEMENTS IN THE FOOD CHAINS OF OYSTERS AND MUSSELS, FILTER-FEEDING MOLLUSCS; CHEMICAL FORMS OF STORAGE; ECOTOXICOLOGICAL CONSEQUENCES.

Abstract

The first part of this report describes a field study which took place in the Bay of Bourgneuf during more than two years. In this area, the filter-feeding molluscs show metal concentrations which are generally low compared to those determined in other worldwide sites. In these conditions, the characteristics of bioaccumulation (seasonal and pluri-annual fluctuations) and organotropism can be considered, to a large extent, as the consequence of the normal metabolism of trace elements.

A statistical analysis of relations between the respiratory type of marine Gram negative bacilli and their resistance to zinc and cadmium, or their ability to concentrate zinc was carried out on 453 strains isolated monthly from seawater and oysters of the Bay of Bourgneuf during an annual cycle. A highly significant relation is shown between the respiratory type and both the toxicological characteristics.

The second part gives an account of experimental studies about the patterns of accumulation of metals in filter-feeding molluscs *via* water or *via* different kinds of food. For copper and lead in oysters, the bioaccumulation was studied using numerous and complementary techniques in order to evaluate the metal concentrations in the whole organisms or in separated organs, to identify the levels of metals and their chemical forms of storage in cells of different tissues.

The third part is a general discussion about :

- the validity of using filter-feeding molluscs as biological indicators of metal pollutions;
- the comparative toxicity of cadmium, copper and zinc to marine organisms;
- the relations between the accumulation of cadmium and zinc in bacteria, their tolerance to metals and their respiratory type;
- the pathways of metals from the environment to the filter-feeding molluscs;
- the chemical forms of transport and storage of lead and copper;
- the influence of the chemical form of metals in marine organisms on their toxicity to man.