

RAPPORT DE CONTRAT n° 73/7288

Rapport de contrat n° 73/7288

Janvier 1985

EFFETS DU CHLORURE DE CADMIUM ET DU CHROMATE DE PLOMB
SUR DEUX MOLLUSQUES BIVALVES

C. BALLAN-DUFRANÇAIS, A.Y. JEANTET, R. MARTOJA et M. TRUCHET

Laboratoire d'Histophysiologie fondamentale et appliquée,
Université PARIS VI,
Unité associée au C.N.R.S. n°680
"Bioaccumulations naturelles et induites".

R E S U M E

- La contamination expérimentale d'huîtres par le chlorure de cadmium (500 µg/l pendant 7 et 26 jours) ne cause aucune lésion histologique ou cytologique, mais elle accélère la déplétion testiculaire et, dans quelques cas, s'oppose au stockage du glycogène. L'excellente résistance des huîtres est due à l'efficacité de deux types de mécanismes de détoxification. Le premier consiste en une immobilisation du cadmium, dans les organes absorbants, dans un état chimique stable et inerte sur le plan métabolique (phosphate ?). Le second, le plus important, fait intervenir les amœbocytes à stockage naturel de zinc dans la synthèse d'une métallothionéine qui complexe le cadmium. Les huîtres de sites pollués de l'estuaire de la Gironde contiennent moins de cadmium que celles soumises à la contamination expérimentale. Elles ne présentent aucune lésion et leur activité reproductrice est normale.

La contamination expérimentale de moules par le chromate de plomb montre que le biocaptage, et par suite la bioaccumulation, de particules du polluant par les organes digestifs est très faible. Les moules réagissent contre le chromate en l'incorporant aux sécrétions muqueuses du conduit digestif. En revanche, la dissociation d'une partie du composé libère du chrome et du plomb assimilables, qui provoquent une contamination générale des tissus, une lyse des cellules germinales femelles et une hypertrophie du rein. Le chromate de plomb n'a donc d'effets préjudiciables aux mollusques que par le chrome et le plomb qu'il libère, grâce à une dissociation dont les modalités restent à déterminer.

INTRODUCTION

TECHNIQUES

CONTAMINATION EXPERIMENTALE D'HUITES PAR LE CHLORURE DE CADMIUM

I. MATERIEL BIOLOGIQUE - CONDITIONS DE LA CONTAMINATION

II. RESULTATS

A. SITES D'ACCUMULATION DU CADMIUM

1. Epithélium intestinal
2. Cellules des diverticules digestifs
3. Epithélium branchial
4. Amœbocytes
5. Rein
6. Autres organes

B. EFFETS DU CADMIUM SUR LE METABOLISME INTERMEDIAIRE ET SUR L'ACTIVITE REPRODUCTRICE

1. Accumulation du glycogène
2. Etat des gonades
 - a) ovaire
 - b) testicule

III. CONCLUSION

ANIMAUX RECOLTES EN MILIEU POLLUE PAR LE CADMIUM (ESTUAIRE DE LA GIRONDE)

I. RESULTATS

A. RECHERCHE DES ORGANES ET CELLULES D'ACCUMULATION DU CADMIUM

1. Ultrastructure de l'intestin, des diverticules digestifs, des branchies et du rein
2. Amœbocytes

B. ASPECT HISTOLOGIQUE DES ANIMAUX

II. CONCLUSION

CONTAMINATION EXPERIMENTALE DE MOULES PAR LE CHROMATE DE PLOMB

I. MATERIEL BIOLOGIQUE. COMPORTEMENT DU POLLUANT DANS L'EAU DE MER. CONDITIONS TECHNIQUES PARTICULIERES.

II. RESULTATS

A. TRANSIT ET ABSORPTION DE LA FORME PARTICULAIRE DU POLLUANT

1. Réaction de la paroi du tube digestif
2. Absorption par les cellules digestives

B. ABSORPTION DE CHROME ET DE PLOMB ASSIMILABLES

1. Contamination générale des tissus
2. Excrétion par le rein et par les amœbocytes

III. CONCLUSION

I N T R O D U C T I O N

Les apports fluviatiles enrichissent les estuaires en de nombreux oligo-éléments. Les entrées se font essentiellement sous forme particulaire, alors que les sorties vers la mer concernent surtout des formes dissoutes, de sorte que les eaux estuariennes contiennent à la fois des formes dissoutes assimilables et des formes particulières du même élément. L'estuaire de la Gironde n'échappe pas à cette règle, ni aux conséquences du rejet dans les fleuves qui l'alimentent, de produits d'origine anthropique. C'est ainsi que le déversement de déchets d'anciennes exploitations minières de zinc crée une pollution par le zinc et des nombreux métaux qui lui sont associés, comme le plomb, le cuivre et surtout le cadmium. Il est donc nécessaire d'évaluer les risques que présentent ces apports sur la faune sédentaire de l'estuaire, en particulier sur les huîtres des installations d'ostréiculture.

Il est bien connu que les huîtres résistent aux pollutions par le cuivre et le zinc assimilables, grâce aux mécanismes de détoxification dont elles disposent (GEORGE *et al.*, 1978), mais leur comportement à l'égard du cadmium est encore mal connu. Ce métal est pourtant considéré comme le plus potentiellement toxique pour l'Homme. Il cause de très graves lésions aux organismes aquatiques, Algues et Poissons par exemple (voir WEBB, 1979). Cependant, de nombreux Crustacés et Mollusques d'estuaires supportent une pollution par le cadmium sans en paraître affectés, bien que le métal soit assimilé, puis fortement concentré dans les tissus (NICKLESS *et al.*, 1972 ; PEDEN *et al.*, 1973), et que sa demi-vie biologique soit longue (FOWLER et BENAYOUN, 1974). Chez la Moule, le cadmium s'accumule dans les cellules épithéliales et les amœbocytes des branchies (MARSHALL et TALBOT, 1976). A l'échelle moléculaire, des coordinats non identifiés contenus dans les lysosomes du rein sont capables de le complexer *in vitro* (GEORGE, 1983), et des protéines apparentées aux métallothionéines ont été isolées à partir d'animaux contaminés expérimentalement (MARSHALL et TALBOT, 1979 ; GEORGE *et al.*, 1979). Chez l'huître, en revanche, l'existence de telles

protéines est controversée, et les sites histologiques d'une éventuelle accumulation de cadmium exogène restent à découvrir (RIDLINGTON et FOWLER, 1979 ; GEORGE *et al.*, 1983).

Ainsi, nous ignorons, à l'heure actuelle, si les Huîtres possèdent des moyens de détoxification suffisamment efficaces pour les préserver de contaminations naturelles. Nous manquons également de données de cytopathologie démontrant les effets du polluant, alors que les effets sur le métabolisme du glycogène d'un milieu fortement pollué par le cadmium est maintenu reconnu dans une espèce de Mollusque (Patelle) dont l'intérêt économique est moindre que celui de l'Huître (SHORE *et al.*, 1975).

Il s'avérerait donc nécessaire de mettre en évidence, par une étude de toxicologie expérimentale, les principaux effets causés par le cadmium sur l'huître, puis d'examiner comparativement des animaux récoltés en des sites de l'estuaire différant les uns des autres par leur degré de pollution.

En ce qui concerne les effets des polluants particulaires, des études précédentes (MARTOJA *et al.*; MARTIN *et al.*, inéd.) ont démontré la forte capacité des suspensivores à biocapter les particules ou les colloïdes non biodégradables d'effluents industriels. C'est ainsi que les moules, au contact de phosphogypses ou de l'effluent de fabrication de l'oxyde de titane, accumulent des quantités importantes de fluor, d'hydroxyde de fer, d'oxyde de titane et d'aluminium sans que ces éléments interfèrent dans le métabolisme du mollusque. Cependant, ce phénomène de biocaptage ne concerne certainement pas tous les composés particulaires qui pénètrent dans le tube digestif ; il est en effet démontré que les particules d'oxyde d'uranium, bien que d'une taille compatible avec leur biocaptage, induisent dans la lumière du tube digestif des réactions de défense qui les empêchent de pénétrer dans la lumière des diverticules digestifs où elles devraient être absorbées (SECCHI, 1984). Il devenait donc nécessaire d'éprouver les capacités de captage et de concentration, de divers composés qui forment des suspensions en milieu aqueux et qui sont réputés non biodégradables. Nous avons choisi comme polluant le chromate de plomb $PbCrO_4$, dont la taille des particules est compatible avec un biocaptage cellulaire et qui, dans l'éventualité d'une dissociation de la molécule par la moule elle-même ou par des microorganismes du milieu, produirait deux éléments

toxiques, le plomb et le chrome hexavalent.

Dans un souci de cohérence, nous avons préféré à l'Huître la Moule (*Mytilus edulis*), espèce sur laquelle toutes les études précédentes sur le biocaptage de particules ont été réalisées.

T E C H N I Q U E S

Les mollusques soumis à une contamination, ceux récoltés *in situ*, ainsi que les témoins ont été l'objet d'examen histologiques et cytologiques, et ont été analysés par les techniques de la microscopie analytique.

I. Les échantillons destinés à l'étude structurale ont été fixés par le liquide de Carnoy (alcool absolu, chloroforme, acide acétique, 6/3/1). Après inclusion à la paraffine, ils ont été coupés à 7 μm d'épaisseur.

Pour l'examen histologique et histopathologique, les coupes ont été colorées par l'hémalum-picroindigocarmin. Les mucus ont été colorés par le bleu alcian ; le glycogène par la réaction à l'acide periodique-Schiff ; les phosphates par le méthode de Von Kossa ; les groupes SH par le Red Sulhydryl Reagent, le 2,2'-dihydroxy-6,6'-disulfure de dinaphtyle (D.D.D.) et le ferricyanure ferrique.

La microanalyse a été effectuée à la microsonde Cameca MS 46 en dispersion de longueur d'onde, sur des coupes normales ou soumises à divers tests d'extraction (voir Résultats), et au microanalyseur par émission ionique secondaire. Pour l'analyse à la microsonde électronique, les comptages ont été faits en 1 seconde.

II. Les échantillons destinés à l'étude ultrastructurale ont été fixés par le glutaraldéhyde à 3% tamponné, soit par le cacodylate de sodium 0,2 M, soit par la pipérazine 0,2 M (PIPES). L'osmolarité du fixateur a été ajustée à 1050 mOs par addition de saccharose 0,35 M. Certaines pièces ont subi une post-fixation par le tétroxyde d'osmium à 2% dans le même tampon, en vue de l'examen au microscope électronique. Après déshydratation, l'inclusion a été effectuée dans l'epon araldite.

La microanalyse de coupes ultrafines de matériel non osmié, déposées sur grilles de titane carboné, a été effectuée sur un Cameca MBX, type Camebax équipé en TEM, en système WDS, sous une tension de 45 KV, un

courant d'échantillon de 150 nA et un diamètre de sonde de 500 nm environ.

Les cristaux suivants ont été utilisés :

- LIF : Fe (K α) ; Ni (K α) ; Cu (K α) ; Zn (K α) ; Br (K α) ; Pb (L α)
- PET : S (K α) ; Ca (K α) ; Cr (K α) ; Mn (K α) ; Ag (L α) ; Cd (L α)
- TAP : Al (K α) ; P (K α).

Les comptages ont été faits en 100 secondes.

CONTAMINATION EXPERIMENTALE D'HUITRES PAR LE CHLORURE DE CADMIUM

I. MATERIEL BIOLOGIQUE - CONDITIONS DE CONTAMINATION

Les contaminations d'Huîtres (*Crassostrea gigas*) ont été réalisées par J.L. MARTIN. Une expérience préliminaire, avec des doses variées de CdCl_2 pour une durée d'exposition de 7 jours (fig. 1), nous a conduits à choisir la dose de 500 $\mu\text{g}/\text{l}$ de Cd et deux durées d'exposition (7 jours et 26 jours). Pour les doses inférieures, en effet, la concentration du cadmium dans les tissus est insuffisante pour une caractérisation à la microsonde sur coupes à la paraffine, alors que la dose la plus forte (1,25 mg/l) produit des lésions histologiques importantes. L'expérience a été effectuée du 18 avril au 14 mai 1984.

II. RESULTATS

Aucune mortalité n'a été constatée pendant la durée de l'expérience. Certains animaux ont été étudiés après 7 jours de contamination, les autres après 26 jours. Selon J.L. MARTIN, les huîtres contaminées accumulent fortement le cadmium ($275 \pm 74 \mu\text{g}/\text{g}$ /poids sec après 26 jours).

A. SITES D'ACCUMULATION DU CADMIUM

1. Epithélium intestinal

L'examen ultrastructural ne révèle aucune lésion des cellules intestinales des animaux contaminés. L'aspect des microvillosités et des cils de la bordure apicale, ainsi que celui des divers organites contenus dans le hyaloplasme (noyau, mitochondries, reticulum endoplasmique, dictyosomes) est identique à celui des témoins (Pl. I). A l'apex des cellules, les

FIG. 1. Teneur en Cd (en $\mu\text{g/g/poids sec}$) d'Huîtres contaminées pendant 7 jours par des doses de Cd de 2 à 10.000 $\mu\text{g/l}$ (courbe) et concentration en Cd d'Huîtres contaminées pendant 26 jours à la dose de 500 $\mu\text{g/l}$ (d'après J.L. MARTIN).

S : seuil de détection du Cd par microsonde sur coupes à la paraffine.

A droite : teneur en Cd des huîtres de l'estuaire de la Gironde (d'après J.L. MARTIN) et par comparaison des Patelles du Canal de Bristol (d'après SHORE *et al.*).

CONCENTRATION (Cd)
DES TISSUS

400

320

240

160

80

0

2

10

50

250

500

1250

10000

Dose

7 jours →

★ 26 jours

← S

537

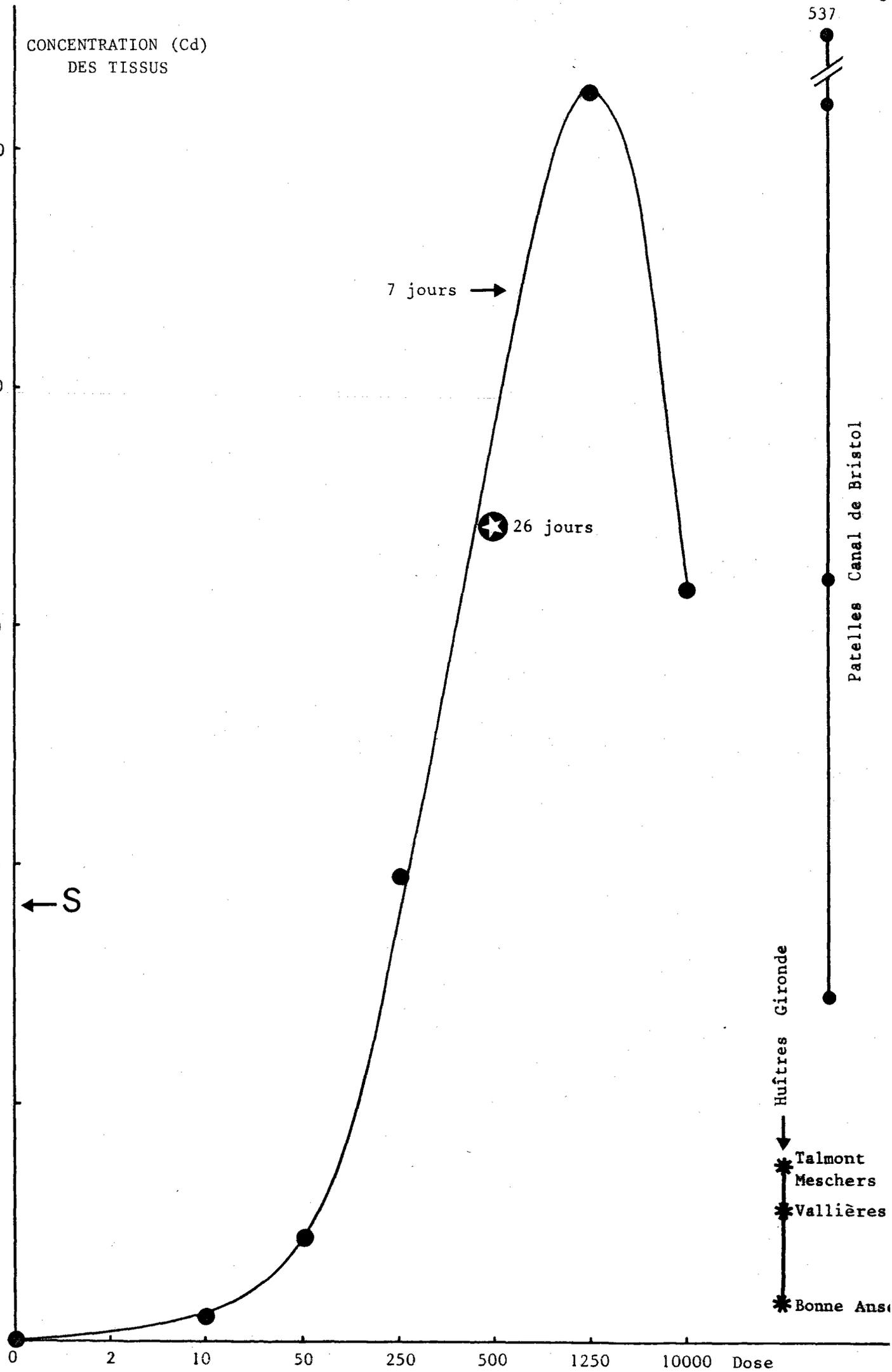
Patelles Canal de Bristol

Huîtres Gironde

* Talmont
Meschers

* Vallières

* Bonne Anse



lysosomes, dont le nombre n'est pas supérieur à celui des témoins, contiennent des composés opaques aux électrons. La microanalyse X y décèle du cadmium qui s'ajoute à de nombreux autres éléments (S, P, Ca, Cu, Zn, Al, Fe) concentrés de façon régulière par les lysosomes des cellules intestinales des témoins (Tableau I).

2. Cellules des diverticules digestifs

La contamination ne provoque aucune altération cytologique au niveau des deux types cellulaires, cellules digestives et cellules basophiles, des diverticules de la glande digestive. L'aspect des microvillosités apicales et des organites hyaloplasmiques (noyau, mitochondries, reticulum endoplasmique granulaire, dictyosomes) est semblable à celui des témoins (Pl. I et II).

Chez les témoins, les cellules basophiles ne renferment pas de structures riches en éléments minéraux. Les cellules digestives en revanche contiennent de nombreuses vacuoles lysosomales, de morphologie variée et d'un diamètre de 0,6 à 1,7 µm, qui sont impliquées dans les processus de digestion intracellulaire et sont riches en particules opaques aux électrons dispersées au sein d'un stroma homogène (Pl. I). L'analyse révèle la présence d'éléments variés (Al, P, S, Ca, Fe, Cu, Zn, Br, voir tableau I), au niveau des particules et du stroma des diverses vacuoles lysosomales des témoins.

Chez les animaux contaminés, le cadmium est rarement décelé dans ces vacuoles à contenu hétérogène, mais se rencontre de préférence dans de petites vésicules lysosomales d'une taille voisine de celle des sections de mitochondries (0,5 µm, Pl. II et III), fréquemment situés à l'apex des cellules. Le cadmium est toujours associé aux 8 éléments habituels des témoins. On ne note pas de différence notable dans le nombre de lysosomes contenant du cadmium entre les deux lots d'animaux ayant subi 7 jours ou 26 jours de contamination (Pl. III). En raison de la dispersion des lysosomes et de leur faible taille, le cadmium est rarement décelable par microanalyse X de coupes de la paraffine.

| Lysosomes et concrétions intracellulaires | Huîtres témoins | | | Huîtres intoxiquées (7 jours, 500 ppb) | | | Huîtres intoxiquées (26 jours, 500 ppb) | | |
|---|---------------------------------------|----------|----------|---|-----------|----------|--|------------|-----------|
| | Intestin et glande digestive | Branchie | Rein | Intestin et glande digestive | Branchie | Rein | Intestin et glande digestive | Branchie | Rein |
| Cd | n.s. | n.s. | n.s. | n.s.-200 | n.s. | n.s. | n.s.-450 | n.s.-175 | n.s.-225 |
| S | 75-500 | 280 | 100-300 | 100-350 | 10-400 | 125-350 | 80-600 | n.s.-900 | 25-500 |
| P | 500-1800 | 1500 | 600-1600 | 150-2000 | 700-7000 | 200-600 | 100-1800 | 150-50000 | 600-15000 |
| Ca | 200-500 | 1700 | n.s.-100 | 30-150 | n.s.-3600 | 100-200 | 100-300 | 100-900000 | 2500 |
| Cu | n.s.-40 | 300 | n.s.-150 | n.s.-200 | 50-300 | n.s.-300 | 50-350 | 150-7000 | 150-600 |
| Zn | 50-100 | 40 | n.s.-90 | n.s.-80 | n.s.-1000 | n.s.-200 | n.s.-150 | n.s.-2000 | 80-160 |
| Al | 120-200 | 130 | n.s.-90 | n.s.-100 | n.s.-400 | n.s.-125 | 60-150 | 50-1000 | n.s.-80 |
| Fe | 1000-2000 | 1500 | 500-2500 | 80-2000 | n.s.-8000 | 75-1300 | 50-3000 | 30-8000 | 300-6000 |

TABLEAU I. Composition élémentaire des particules contenues dans les lysosomes des cellules intestinales et des cellules digestives, ainsi que dans les concrétions des cellules branchiales et rénales. Valeurs extrêmes des signaux caractéristiques pour chaque élément (n.s. : valeurs non significatives). Analyse de coupes ultrafines par sonde électronique.

Pour chaque élément, les comptages ont été effectués en 100 s. sur la raie caractéristique (I_p) et sur les bruits de fond mesurés de part et d'autre du pic (I_{BF}). Les valeurs des intensités calculées (I_C) sont obtenues en défalquant les deux mesures d'intensité au pic ($I_C = I_p - I_{BF}$). L'erreur statistique sur la mesure du signal caractéristique I_C est estimée comme

$$\sigma = \sqrt{I_p + I_{BF}}$$

Les valeurs chiffrées des comptages présentés dans les tableaux, obtenues pour une structure déterminée et pour un élément, ont été retenues dans un intervalle de confiance $I_C \pm 2\sigma$, et sont donc hautement significatives.

Nb. La présence de cadmium dans les lysosomes ou les concrétions ne provoque pas de modification significative dans les valeurs des signaux S et P. En particulier, les très forts signaux phosphore enregistrés dans les branchies et les reins des animaux contaminés sont imputables à la minéralisation calcique des lysosomes des concrétions contenant le cadmium ; de ce fait, une éventuelle liaison du cadmium au phosphore est impossible à déceler par la simple comparaison des valeurs des signaux phosphore des témoins et des huîtres contaminées.

* en nombre de coups/100 sec.

3. Epithélium branchial

Après contamination, l'aspect ultrastructural des cellules épithéliales n'est pas altéré, de même que celui des cellules à mucus. Les microvillosités et les cils de la bordure apicale, les organites contenus dans le hyaloplasme (noyau, mitochondries, reticulum endoplasmique lisse et granulaire, dictyosomes) ont un aspect identique à celui des témoins (Pl. III). A l'apex cellulaire, les vésicules lysosomales sont rares chez les témoins, et renferment les mêmes éléments que les lysosomes des cellules digestives (voir tableau I). Après une contamination de 26 jours, on observe la présence de petits lysosomes apicaux de 0,3 μm de diamètre, dans lesquels le cadmium est décelable (Pl. III, tableau I) ; ces lysosomes sont parfois très richement minéralisés et contiennent d'importantes quantités de phosphore et de calcium. Le cadmium n'a pas été décelé par microanalyse X de coupes à la paraffine.

4. Amoebocytes

Contrairement aux cellules intestinales, digestives ou branchiales, le cadmium est toujours identifiable par analyse de coupes à la paraffine, dans les amoebocytes des huîtres contaminées, et de ce fait, l'étude de ces cellules n'a pas été abordée au niveau ultrastructural.

Le cadmium a été décelé dans les amoebocytes des branchies, des palpes labiaux, de la paroi du tube digestif et du tissu conjonctif vésiculeux. Les signaux X de Cd sont d'intensité très variable (fig. 2). Ils coexistent avec des signaux P, Zn et S importants, parfois avec de faibles signaux Cu. La présence constante de P et Zn indique que Cd est concentré dans des amoebocytes à phosphate de zinc (PIRIE *et al.*, 1984). Le stockage du phosphate est intéressant pour le repérage topographique de ces amoebocytes, puisque Zn est substituable par Ag et qu'ainsi ces cellules réagissent positivement à la méthode de Von Kossa (Pl. IV).

Forme chimique de stockage de Cd. - Alors que la contamination par Cd n'entraîne aucun changement d'intensité pour les signaux X de P et Zn, l'élévation d'intensité des signaux S est très forte et corrélée à celle des signaux Cd (fig. 2). Le coordinaat de Cd est donc soufré. Bien que

l'analyse de coupes de 7 μm convienne mal à un calcul précis du rapport $\frac{\text{signaux S}}{\text{signaux Cd}}$, il apparaît que celui-ci ($5,92 \pm 0,73$) est supérieur à celui d'un échantillon de référence de CdS ($1,88 \pm 0,11$) et assez proche du rapport théorique (5,64) caractéristique d'une liaison entre 1 Cd et 3 S. L'éventualité d'un sulfure, sel fréquent chez les Mollusques, est donc exclue, ce que confirme d'ailleurs la sensibilité au pH de la liaison entre Cd et son coordinat. Ainsi, à pH 6 (tampon acétate), l'émissivité X de Cd est conservée, alors qu'elle est plus faible à pH 3,5 (tampon acétate) et nulle à pH 2 (tampon citrate). Dans les trois cas, l'émission S est inchangée ; un traitement acide par HCl à pH 1 la diminue par extraction d'une fraction du coordinat. L'acide éthylène diamine tétraacétique (EDTA) 10^{-2} M et AgNO_3 libèrent également Cd de son coordinat. Après un traitement acide (HCl à pH 1) qui élimine à la fois Cd et le phosphate de Zn, le coordinat soufré résiduel conserve son aptitude à complexer de nouveau Cd ou Ag, lorsque les coupes déminéralisées sont traitées par CdCl_2 ou AgNO_3 (fig. 2). Enfin, la digestion du coordinat par les enzymes protéolytiques, pronase et trypsine, n'est possible qu'après élimination de Cd par l'EDTA.

Ces résultats qui se rapprochent de ceux obtenus *in vitro* sur une métallothionéine de Mammifère (KAGI et VALLEE, 1960, 1961), nous conduisent à l'hypothèse d'une liaison entre le cadmium et une protéine de ce type, dont la haute teneur en soufre serait imputable à des résidus cystéine. Le choix des méthodes de caractérisation des groupes SH est malheureusement restreint. En effet, le coordinat est extrait par le traitement prolongé à 60°C dans la méthode au D.D.D., et la méthode au R.S.R. est trop peu sensible. Seules les méthodes de réduction du ferri-cyanure ferrique, qui ont une bonne sensibilité, qui agissent à froid, en un temps court et à un pH assez bas (2,4 à 3) pour dissocier un nombre important de liaison Cd-SH, donnent des résultats fortement positifs sur les amœbocytes des seules huîtres contaminées (Pl. IV). L'implication des groupes SH dans la réaction est confirmée par leur blocage électif par la N-éthylmaléimide, qui n'est efficace, comme pour la MT de Mammifère, qu'après élimination de Cd par l'EDTA. Le cadmium concentré dans les amœbocytes est donc lié à une protéine qui, comme les métallothionéines, doit ses capacités de complexation à ses résidus cystéine.

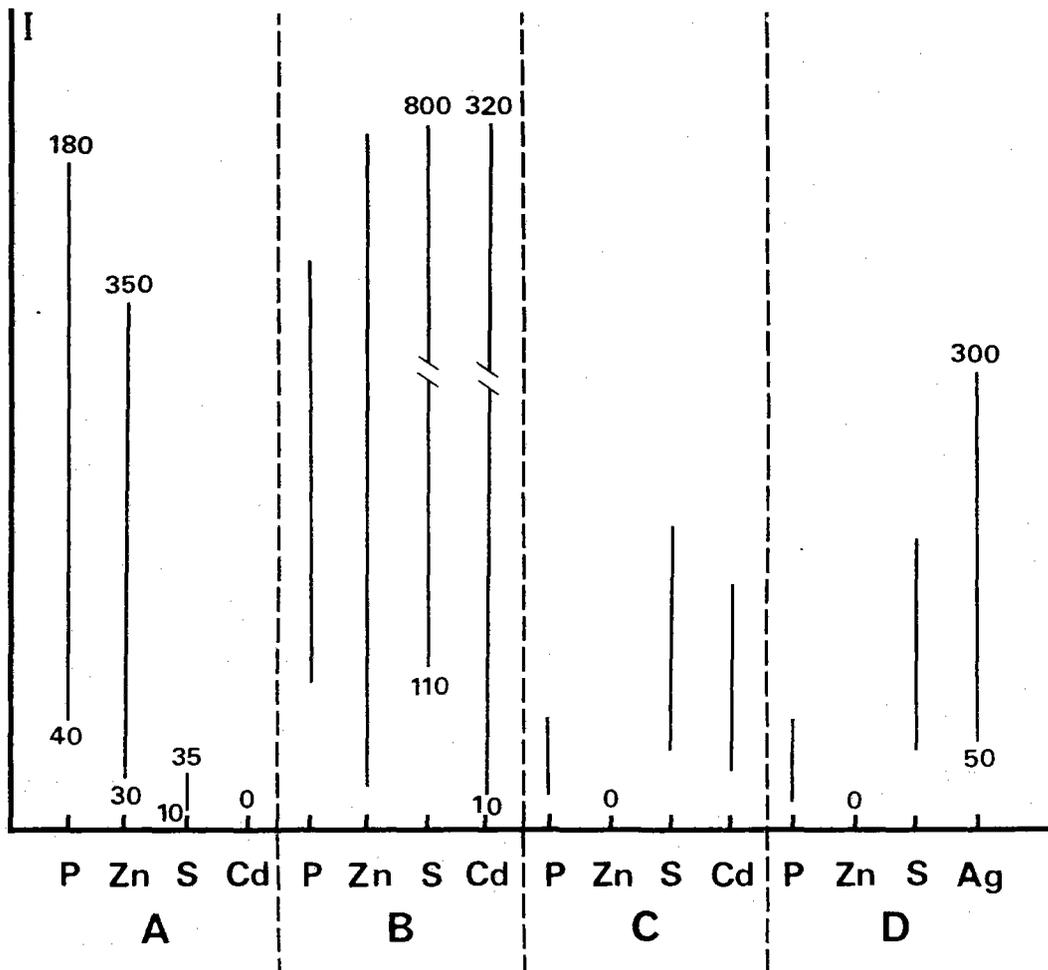


FIG. 2. Intensités (en coups/sec.) des signaux X de P, Zn, S, Cd et Ag d'amoebocytes (cristaux : KAP pour P et S ; LiF pour Zn ; PET pour Cd et Ag).

A : Huître témoin

B, C et D : Huître contaminée (coupes voisines du même animal pour toutes les mesures).

B : coupe n'ayant subi aucun traitement. Remarquer la forte intensité des signaux S (110 à 800 coups/sec.)

C : coupe traitée par HCl à pH 1 pendant 10 mn, puis par CdCl₂

D : coupe traitée par HCl à pH 1 pendant 10 mn, puis par AgNO₃

5. Rein

Les cellules de l'épithélium rénal des animaux contaminés ont un aspect ultrastructural proche de celui des témoins et aucune altération pathologique n'est à signaler au niveau des systèmes membranaires apicaux et des organites hyaloplasmique (Pl. V). A l'apex des cellules rénales des témoins, les lysosomes sont nombreux et de morphologie variée ; ils contiennent les mêmes éléments que ceux des lysosomes de la glande digestive et des branchies et sont parfois très richement minéralisés, prenant alors l'aspect de concrétions. C'est parfois dans ces concrétions, mais plus fréquemment dans des lysosomes peu opaques, que le cadmium est décelé, après 26 jours de contamination (Pl. V et tableau I).

Comme pour les branchies, le cadmium n'est pas identifiable par micro-analyse de coupes à la paraffine.

6. Autres organes

Les cellules du manteau renferment de très nombreux lysosomes, riches en éléments (S, P, Ca, Cu, Zn, Al, Fe), mais qui ne contiennent jamais de cadmium.

B. EFFETS DU CADMIUM SUR LE METABOLISME INTERMEDIAIRE ET SUR L'ACTIVITE REPRODUCTRICE

Il est bien connu que, chez les Vertébrés, le cadmium active le système enzymatique de la glycogénolyse et, de ce fait, s'oppose à un stockage du glycogène (voir WEBB, 1979). Cet effet est sans doute responsable de l'impossibilité de stocker le glycogène qu'ont les Insectes intoxiqués par Cd (MARTOJA *et al.*, 1983), ou de l'élévation de la teneur en glucose du sang que subissent les Patelles vivant en milieu pollué par Cd (SHORE *et al.*, 1975). L'effet du polluant sur le métabolisme des sucres pourrait donc être assez général, et doit être pris en considération dans une étude portant sur l'Huître, espèce stockant de très importantes quantités de glycogène.

L'étude du métabolisme glucidique ne peut être séparée de celle du cycle génital femelle. Dans les espèces animales dont les ovocytes accu-

mulent du vitellus et du glycogène, comme c'est le cas de l'Huître, les ovocytes doivent synthétiser leur glycogène et importer, à partir d'autres organes, les précurseurs glucidiques des plaquettes vitellines. De ce fait, lorsque la synthèse de ces précurseurs est bloquée, les ovocytes ne peuvent se développer (Insectes, MARTOJA *et al.*, 1983). A cet effet indirect du cadmium sur l'activité génitale femelle, s'oppose l'action directe du métal sur les cellules germinales mâles. Cependant, cette action directe qui provoque la nécrose testiculaire des Mammifères (voir WEBB, 1979) n'est pas générale puisqu'elle n'affecte pas les testicules d'Insectes (MARTOJA *et al.*, 1983). Dans le cas des Mollusques, en particulier de l'Huître, aucune étude ne fait état d'effets indirects du cadmium sur l'ovaire et d'effets directs du métal sur le testicule.

1. Accumulation du glycogène

L'accumulation a été estimée par la charge en glycogène des cellules vésiculeuses du tissu conjonctif qui, comme les cellules hépatiques des Vertébrés, assurent le stockage du polymère et sa remise en circulation sous forme de glucose (BARGETON, 1941). La méthode utilisée est cytochimique : après réaction à l'acide periodique - Schiff, le glycogène se colore d'autant plus intensément que sa concentration est élevée ; une évaluation comparative des charges en glycogène est donc possible, et les cellules vésiculeuses ont pu ainsi être classées en 4 catégories selon leur charge (0, +, ++, +++).

Les résultats (tableau II, lignes 1 et 2, voir page suivante) montrent que les 9 huîtres témoins possèdent des cellules à charge importante en glycogène (++ et +++). Sur les 18 mollusques contaminés, en revanche, 4 ont des cellules à charge faible (+), 3 n'ont pas de glycogène cytochimiquement décelable.

2. Etat des gonades

Les lésions des gonades ont été recherchées par l'examen de coupes colorées par l'hémalun - picroindigocarmin et de coupes traitées par l'acide periodique - Schiff. L'état sexuel des individus a été déterminé par référence à l'échelle des stades de développement des gonades établie par LE DANTEC (1968) (tableau III, lignes 1 et 2).

| | Nombre d'animaux | Glycogène | | | |
|-------------------------------------|---------------------|-----------|---|----|-----|
| | | 0 | + | ++ | +++ |
| Témoins | 9 | | | 2 | 7 |
| CdCl ₂ 500 µg/l 26 jours | 18 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| Talmont | 15 | 1 | 6 | 6 | 2 |
| Meschers | 15 | 2 | 5 | 5 | 3 |
| Vallières | 12 | | | 3 | 9 |
| Bonne Anse | 13 | 1 | 4 | 6 | 2 |

TABLEAU II. Estimation de la teneur en glycogène (de 0 à +++) des cellules vésiculeuses des Huîtres témoins, contaminées expérimentalement et récoltées en quatre sites de l'estuaire de la Gironde (mai 1984).

| | Nombre d'animaux | Etat sexuel | | | | | | | |
|---------------------------------|---------------------|-------------|---|---|---|---|--------------------|--------------------|------------------|
| | | ♂ | | | | | ♀ | | |
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | petits ovocytes | ovocytes moyens | gros ovocytes |
| Témoins | 9 | | | 3 | | | | 6 | |
| CdCl ₂ 500 µg/l 26j. | 18 | | 1 | 3 | 1 | 6 | 5 | 2 | |
| Talmont | 10 | | 2 | 4 | | | | 3 | 1 |
| Meschers | 14 | | 1 | 6 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 |
| Vallières | 11 | | | 7 | | 2 | 1 | 1 | 1 |
| Bonne Anse | 12 | | | 4 | 1 | 1 | | 2 | 4 |

TABLEAU III. Etat sexuel des Huîtres témoins, contaminées expérimentalement et récoltées en quatre sites de l'estuaire de la Gironde (mai 1984).

- Mâles. - Stades. 1 : début de la gamétogenèse
 2 : follicules bien développés ; gamètes immatures
 3 : états moyen et maximum de réplétion de la gonade ; gamètes murs abondants
 4 : début de déplétion de la gonade
 5 : déplétion presque complète

a) ovaire. Les six femelles témoins sont toutes au stade des ovocytes de taille moyenne ; la charge en glycogène et en vitellus est normale pour ce stade, c'est à dire très faible. Deux des 7 femelles contaminées sont semblables aux témoins, à la fois pour leur maturation génitale et la charge de leurs cellules vésiculeuses en glycogène. Les cinq autres femelles contaminées montrent un retard de croissance ovocytaire ; trois d'entre elles ont une charge des cellules vésiculeuses en glycogène plus faible, une est dépourvue de glycogène cytochimiquement décelable.

b) testicule. Les trois témoins sont tous au stade 3 de l'échelle de LE DANTEC (gamètes très abondants et mûrs), avec des cellules vésiculeuses riches en glycogène. Les testicules des 11 animaux contaminés ne montrent aucun aspect de nécrose. En revanche, les stades d'évolution de la gonade sont très variés. Trois huîtres ont un testicule au même stade que celui des témoins, une autre a un retard de la gamétogenèse. Dans les 7 autres, la déplétion testiculaire est partielle (stade 4) ou complète (stade 5), et dans ce dernier cas, les cellules vésiculeuses sont pauvres ou dépourvues de glycogène.

En résumé, la contamination provoque, dans un nombre appréciable d'animaux, une baisse, voire une suppression des réserves de glycogène. Des femelles subissent un retard de maturation ovocytaire, sans qu'il soit possible de dire, en raison du stade de maturation des huîtres mises en expérience, si la vitellogenèse aurait été normale. Les testicules ne sont pas, à l'inverse de ceux des Mammifères, atteints de nécrose. Mais l'état déplétif de la plupart d'entre eux nous conduisent à envisager une émission des gamètes plus précoce que chez les témoins. Les expériences n'ont toutefois pas été réalisées sur un nombre suffisant d'échantillons pour que ces résultats puissent être considérés comme définitifs.

III. CONCLUSION

Bien que la dose de Cd utilisée soit supérieure à celle habituellement employée pour la contamination des Bivalves (500 µg/l au lieu de 100 µg/l), aucun effet létal n'est apparent. Les organes chargés de l'absorption et

par lesquels pénètre le polluant (épithéliums des branchies, de l'intestin et des diverticules digestifs) ne présentent pas de lésion cytologique. Ce fait est d'autant plus remarquable que des organites comme les mitochondries sont généralement très sensibles au cadmium et subissent une évolution qui conduit à leur dégénérescence (voir WEBB, 1979).

C'est à deux types de processus de détoxification qu'il convient d'attribuer l'excellente résistance des huîtres. Dans les épithéliums absorbants, le cadmium est immobilisé dans un état chimique stable (phosphate ?) et inerte sur le plan métabolique. Dans les amœbocytes, qui représentent les cellules les plus actives dans la détoxification, le métal est complexé par une métallothionéine.

Les amœbocytes à zinc représentent le site de synthèse et de stockage de la protéine de complexation du cadmium découverte précédemment par biochimie (RIDLINGTON et FOWLER, 1979). Elle en possède la richesse en cystéine et, comme l'ont constaté RIDLINGTON et FOWLER, sa concentration doit augmenter avec la durée d'exposition, si l'on en juge par sa facilité de détection au terme de 26 jours d'exposition. La présence d'agrégats d'amœbocytes sous les épithéliums absorbants, leur infiltration dans l'épithélium du tube digestif, et par contraste, l'absence de Cd dans les cellules à pores chargées de l'épuration du sang, suggèrent que le métal est absorbé directement par les amœbocytes. L'absorption induisant alors la synthèse de la protéine, puis son stockage, il n'est pas surprenant que la demi-vie biologique de Cd soit longue. Le cadmium et le zinc naturel ou excédentaire sont stockés dans des états chimiques différents, de sorte qu'on retrouve, au niveau cytologique, une donnée biochimique bien établie dans un autre groupe de Mollusques, selon laquelle les coordinats des deux métaux ne sont pas identiques (IRELAND, 1981).

En raison de l'immobilisation, par les cellules des organes absorbants et par les amœbocytes, d'une fraction importante du cadmium ajouté au milieu, le cadmium "actif", capable d'influer sur le métabolisme, ne doit représenter qu'une faible partie de la quantité du métal absorbé ; la faible participation du rein à l'excrétion du polluant en constitue d'ailleurs une preuve. Ce cadmium non soumis à détoxification est responsable d'effets sur l'appareil génital et sur le cycle du glycogène, mais sa teneur est insuffisante pour causer ces effets sur l'ensemble des mollusques soumis à la contamination.

Avec toute la prudence dont il convient de faire preuve dans la transposition aux milieux naturels des données de toxicologie expérimentale, on peut prévoir que les huîtres récoltées dans l'estuaire de la Gironde s'avèrent capables d'atténuer, voire d'annuler, les effets sur leur propre organisme de la pollution par le cadmium.

ANIMAUX RECOLTES EN MILIEU
POLLUE PAR LE CADMIUM
(ESTUAIRE DE LA GIRONDE)

Les résultats obtenus expérimentalement montrent que les critères d'évaluation de l'état des individus récoltés *in situ* ne peuvent être nombreux et qu'ils sont difficilement applicables en raison du faible degré de contamination de ces individus. En effet, les dosages globaux effectués par J.L. MARTIN sur les huîtres de quatre stations, récoltées en mai 1984 (fig. 3), font apparaître les degrés de contamination suivants :

| Station | Concentration des tissus mous en Cd ($\mu\text{g/g/poids sec}$) |
|---------------------|--|
| Talmont | $56,2 \pm 4,8$ |
| Pointe de Meschers | $57,6 \pm 9,7$ |
| Pointe de Vallières | $44,6 \pm 15,1$ |
| Bonne Anse | $13,5 \pm 5,7$ |
| Témoins (Brest) | $1,76 \pm 0,38$ |

Si l'on considère que les huîtres contaminées expérimentalement, dont la concentration en Cd ($275 \pm 7,4$ ppm) était 5 fois supérieure à celles des échantillons de Talmont, ne présentaient aucune lésion histologique ou cytologique, il paraît exclu qu'un examen en microscopie photonique ou électronique puisse révéler des lésions imputables à la pollution par Cd. De même, la recherche ultrastructurale de sites d'accumulation de Cd paraît *a priori* vouée à l'échec, même pour les huîtres les plus contaminées (site de Talmont). Le stockage de la métallothionéine à cadmium dans les amœbocytes à zinc s'avère d'une mise en évidence facile sur les coupes à la paraffine des huîtres contaminées expérimentalement. Mais les données de l'expérience préliminaire montrent que le cadmium n'est révélabile par sonde électronique qu'à partir d'une concentration en Cd des huîtres légèrement inférieure à 160 ppm, conditions qui ne sont

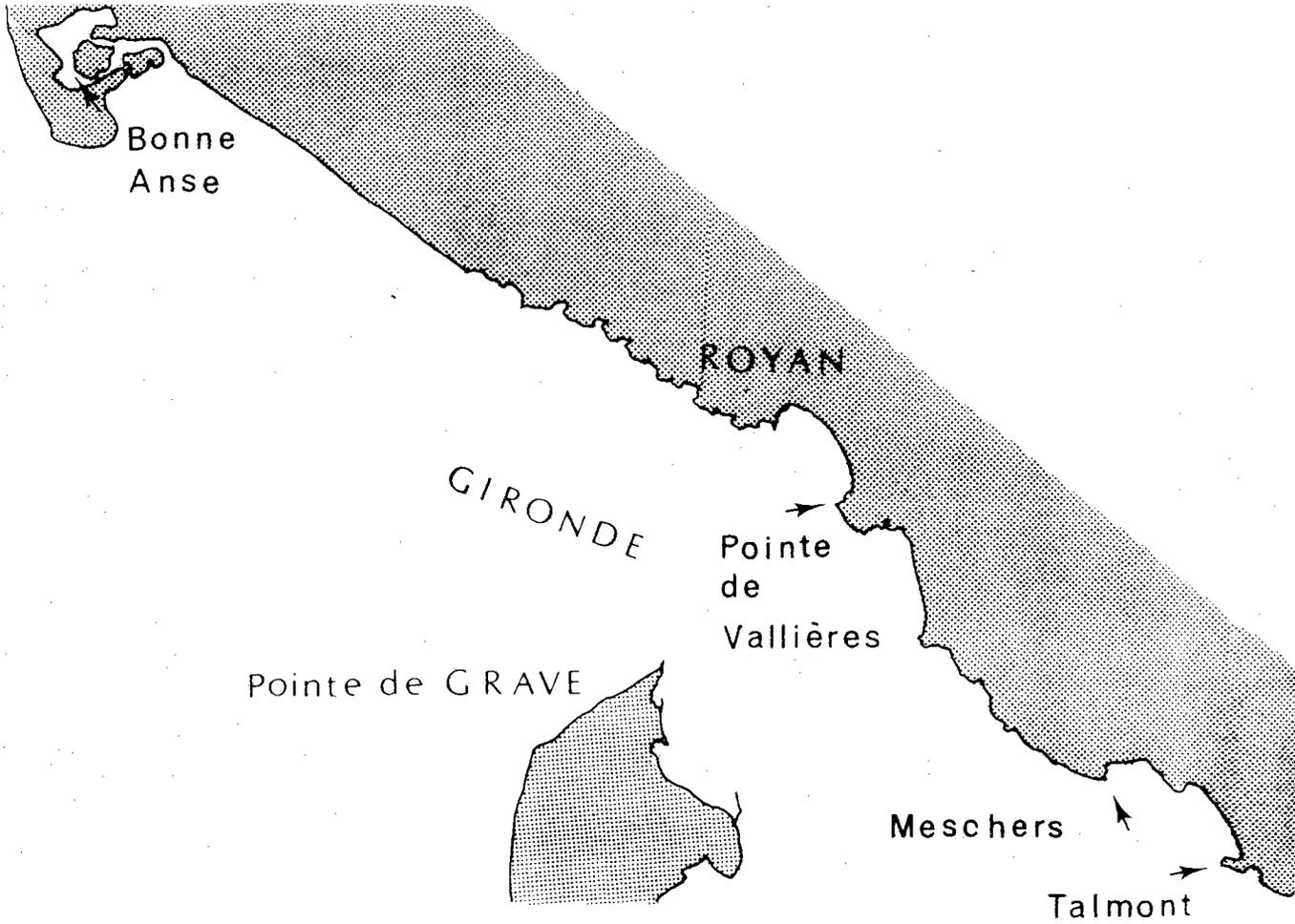


FIG. 3. Sites de prélèvement des huîtres dans l'estuaire de la Gironde (flèches).

jamais réalisées en Gironde ; de plus, à cette concentration, les groupes sulfhydrilés des amoebocytes ne sont pas suffisamment importants pour réduire le réactif qui permet de les caractériser (ferricyanure ferrique).

Enfin, les effets sur le métabolisme du glycogène ne seront certainement pas perceptibles puisqu'une exposition de 26 jours à 500 µg/l est insuffisante pour provoquer une diminution sensible du glucide dans la totalité d'un lot d'huîtres dont la concentration en Cd s'élevait pourtant à 275 µg/g. D'ailleurs, dans une autre espèce de mollusque, la Patelle, une perturbation du métabolisme des glucides n'est décelable, en milieu naturel pollué, que chez des animaux dont la concentration en Cd atteint 250 µg/g (SHORE *et al.*, 1975).

En dépit de ces conditions *a priori* très défavorables, il nous a paru opportun d'examiner les échantillons récoltés *in situ*, dans l'hypothèse où une synergie avec d'autres polluants ou bien la durée d'exposition très longue, amplifieraient les effets reconnus expérimentalement. Nous avons donc réalisé l'étude ultrastructurale des organes des huîtres les plus riches en Cd (station de Talmont) et pour les mollusques de toutes les stations, nous avons effectué l'analyse des amoebocytes, un examen d'histologie générale, une mise en évidence du glycogène et la détermination de l'état sexuel.

I. RESULTATS

A. RECHERCHE DES ORGANES ET CELLULES D'ACCUMULATION DU CADMIUM

1. Ultrastructure de l'intestin, des diverticules digestifs, des branchies et du rein

L'aspect ultrastructural des cellules intestinales, digestives, branchiales et rénales des huîtres de Talmont ne présente aucune altération particulière ; il est identique à celui des témoins étudiés lors des contaminations expérimentales (Pl. VI).

Toutes ces cellules contiennent des lysosomes ou des concrétions riches en éléments variés (S, P, Ca, Cu, Z, Al, Fe, tableau IV). Les teneurs en ces divers éléments diffèrent peu de celles des témoins (tableau I), à l'exception des teneurs en fer qui sont nettement inférieures. L'importante teneur en fer des huîtres témoins est vraisemblablement en relation avec la qualité de la nourriture fournie dans les bacs expérimentaux.

Le cadmium n'est décelé dans aucun lysosome ni organite cytoplasmique.

| Lysosomes et concrétions intracellulaires | Huîtres récoltées à TALMONT | |
|---|---------------------------------|------------|
| | Intestin et glande digestive | Rein |
| Cd | n.s. | n.s. |
| S | 40 - 125 | 80 |
| P | 150 - 350 | 1500 |
| Ca | | n.s. - 220 |
| Cu | 50 - 325 | 300 |
| Zn | n.s. - 75 | 150 - 600 |
| Al | 50 - 300 | 150 - 400 |
| Fe | 50 - 650 | 100 |

TABLEAU IV. Composition élémentaire des particules contenues dans les lysosomes des cellules intestinales, des cellules digestives, ainsi que dans les concrétions des cellules rénales. Mêmes conditions d'analyse que pour le tableau I.

2. Amoebocytes

Quelle que soit l'origine des huîtres, les amoebocytes à phosphate de zinc n'émettent pas, en microanalyse de coupes à la paraffine, de signaux X de soufre supérieurs à ceux des amoebocytes d'huîtres témoins, et le cadmium est indécelable. S'ils contiennent une métallothionéine de complexation du cadmium, elle n'est donc pas en quantité suffisante pour que ses deux éléments caractéristiques (S et Cd) soient identifiables dans nos conditions techniques. Cette absence de concentration de soufre n'exclut pas l'existence, dans certaines huîtres en particulier celles de

Talmont, d'un composé fortement réducteur (réduisant le ferricyanure ferrique) et que nous n'avons jamais observé dans les huîtres témoins, ayant séjourné de 1 à 4 semaines en aquarium. Ce composé ne doit donc pas être confondu avec la métallothionéine ; il s'agit vraisemblablement d'acide urique, stocké dans les amœbocytes lors des périodes d'exondation des animaux, mais cette interprétation demande à être confirmée.

B. ASPECT HISTOLOGIQUE DES ANIMAUX

Les huîtres ne sont atteintes d'aucune lésion histologique. En ce qui concerne le stockage du glycogène, dont on sait qu'il présente un cycle saisonnier (RUSSEL, 1923), les 55 animaux étudiés à la même période de l'année présentent tous les degrés entre un stockage nul et une accumulation très importante du glucide, sans qu'il y ait de relation nette entre le site de prélèvement et le degré du stockage (tableau II, lignes 3 à 6). Il n'est donc pas possible d'incriminer le cadmium dans les cas où le glycogène est peu abondant ou indécélable.

Les gonades de tous les individus sont d'apparence normale. Les seules différences avec les témoins examinés à l'occasion de l'étude expérimentale, sont imputables aux conditions géographiques et saisonnières ; chez les femelles en particulier, la maturité sexuelle est plus avancée, ce qui permet d'ailleurs de constater que la vitellogenèse est normale (tableau III, lignes 3 à 6). Dans l'ensemble, l'état sexuel des huîtres est identique à celui reconnu par LE DANTEC pour l'huître *Crassostrea angulata* de la rive gauche de la Gironde.

II. CONCLUSION

L'étude ultrastructurale des huîtres du milieu le plus pollué (Talmont) ne révèle aucune anomalie cytologique. Dans les conditions techniques où ont été effectuées les analyses ultrastructurales, avec une excellente sensibilité, nous pouvons affirmer qu'aucune accumulation de cadmium n'est réalisée par les cellules digestives, la branchie ou le

rein. La question de la localisation du cadmium révélé par dosage (J.L. MARTIN) est donc posée. La comparaison des teneurs en Zn et en Cd des huîtres des diverses stations laisse penser que, comme chez les animaux contaminés expérimentalement, les amoebocytes représentent le site majeur de rétention du polluant, mais que la métallothionéine et le cadmium associé ne peuvent être révélés dans nos conditions techniques (faible sensibilité de la sonde électronique sur coupes à la paraffine). En effet, parmi les organes analysés par J.L. MARTIN (fig. 4), la branchie, le manteau et la glande digestive représentent ceux où les agrégats d'amoebocytes à zinc sont les plus importants, et peuvent être considérés comme essentiellement responsables des concentrations importantes en Zn. C'est certainement à la pollution de la Gironde par du zinc assimilable qu'est due l'élévation de la teneur en Zn de ces organes dans les sites de Bonne Anse et surtout de Meschers ; on doit alors conclure, d'après les données de GEORGE *et al.*, (1978), que ce zinc excédentaire est immobilisé dans les amoebocytes. Or cette augmentation de la concentration en Zn est corrélative d'une augmentation de la teneur en Cd (fig. 4). Sachant, d'après nos données expérimentales, que les deux métaux sont stockés dans les mêmes amoebocytes, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une complexation du cadmium par les amoebocytes des huîtres de sites pollués.

Le point important de cet examen des huîtres récoltées *in situ* est l'absence d'effets de la pollution sur les grandes fonctions de l'organisme que sont la nutrition et la reproduction.

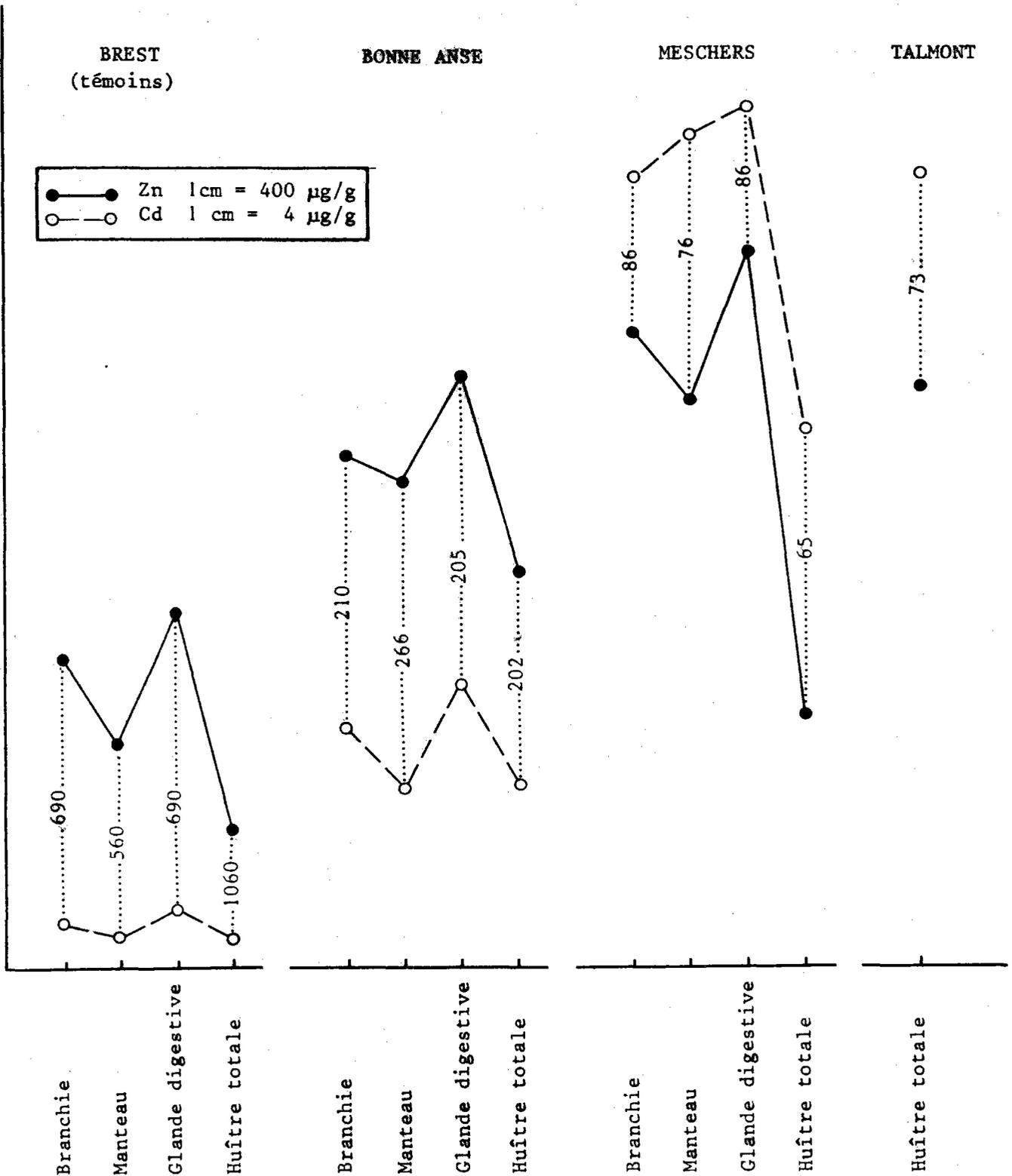


FIG. 4

Concentrations en Zn et Cd de divers organes et d'huîtres totales (d'après les données de J.L. MARTIN).

Les valeurs figurant entre deux dosages du même organe ou du même animal indiquent le rapport $\frac{\text{concentration Zn}}{\text{concentration Cd}}$.

On constate que la concentration de Cd augmente parallèlement à celle de Zn, mais que le rapport $\frac{\text{Zn}}{\text{Cd}}$ tend à dominer en fonction du degré de pollution.

CONTAMINATION EXPERIMENTALE
DE MOULES PAR LE CHROMATE
DE PLOMB

I. MATERIEL BIOLOGIQUE. COMPORTEMENT DU POLLUANT DANS L'EAU DE MER.
CONDITIONS TECHNIQUES PARTICULIERES.

La contamination des Moules (*Mytilus edulis*) a été réalisée par J.L. MARTIN, en bacs d'eau de mer saturée de chromate de plomb. Les durées d'exposition ont été de 7 jours et 26 jours.

Comportement du polluant en milieu marin : Le chromate de plomb forme des particules de taille inférieure à 2,3 μm , donc compatibles avec un biocaptage par les cellules digestives de la Moule. Sa solubilité est, selon les données chimiques, insignifiante (50 à 60 $\mu\text{g/l}$) ; le produit ne peut libérer qu'au maximum 8 $\mu\text{g/l}$ de Cr et 30 $\mu\text{g/l}$ de Pb en eau distillée, et ces valeurs sont certainement plus faibles en eau de mer.

La dissociation de l'échantillon commercial utilisé (Prolabo, réf. 26.516.361) a été déterminée par spectrophotométrie d'absorption atomique, après 1 heure, 24 heures et 8 jours de contact avec l'eau de mer. Pour un seuil de sensibilité de la méthode de 5 $\mu\text{g/l}$, aucune libération de Cr n'a été constatée. En revanche, l'eau s'enrichit immédiatement en Pb, dont la concentration s'établit à 1 mg/l pour une suspension de 50 g/l de chromate de plomb. En conclusion, la dissociation du produit n'est pas décelable après sa mise en suspension dans l'eau de mer ; mais un composé soluble de plomb (sulfate ?) présent à l'état d'impureté, libère du plomb dont l'assimilation doit être envisagée dans les expériences de contamination.

Conditions techniques particulières :

A l'analyseur par émission ionique secondaire, le plomb a été identifié sur les spectres en basse résolution en masse, par ses trois isotopes majeurs (206, 207 et 208). Pour le chrome, le signal 52^+ des spectres en basse résolution en masse, a du être traité en haute résolution pour éliminer les interférents MgC_2H_4 et surtout CaC.

II. RESULTATS

A. TRANSIT ET ABSORPTION DE LA FORME PARTICULAIRE DU POLLUANT

1. Réaction de la paroi du tube digestif

Les particules de chromate sont ingérées par la Moule ; elles constituent dans la lumière digestive, des amas très importants conservant la couleur naturelle jaune du composé et dans lesquels la microsonde électronique met en évidence les signaux X de Cr et Pb, avec des rapports d'intensité d'émission Cr/Pb caractéristiques du chromate. Tous ces amas sont enrobés de nappes muqueuses qui les isolent de la paroi du tube digestif.

2. Absorption par les cellules digestives

A l'observation au microscope photonique, aucun amas de particules de chromate n'est visible dans la lumière des diverticules digestifs, et à la microsonde électronique les cellules digestives n'émettent aucun signal Cr ou Pb.

L'aspect ultrastructural des cellules des diverticules ne présente aucune lésion. Les différenciations membranaires apicales, ainsi que les organites hyaloplasmiques sont semblables à ceux des témoins. Le polluant est décelé par microanalyse X dans les particules contenues dans la lumière des tubules digestifs des animaux contaminés. Le chrome et le plomb sont détectés simultanément aux mêmes points. Les cellules digestives contiennent de nombreuses vacuoles lysosomales intervenant dans les processus de digestion intracellulaire, et dont le contenu offre un aspect hétérogène (Pl. VII). Certaines vacuoles contiennent des particules volumineuses "en tortillon" et sont très riches en fer provenant probablement de la nourriture fournie dans les bacs expérimentaux. D'autres vacuoles renferment des microgranules dispersés au sein d'un stroma ou reportés à sa périphérie ; elles correspondent au stade terminal d'évolution des lysosomes. C'est au niveau de ces microgranules que l'on décèle la présence simultanée de plomb et de chrome avec un rapport

des intensités des signaux Cr/Pb identique à celui des particules de chromate situées dans la lumière digestive.

Il existe donc un biocaptage de particules de chromate par les cellules digestives ; mais il est peu important et n'est, de ce fait, décelable qu'à l'échelle ultrastructurale.

B. ABSORPTION DE CHROME ET DE PLOMB ASSIMILABLES

L'identification de Cr et de Pb dans des organes ou tissus qui n'ont pas le pouvoir d'absorber des particules de chromate, ainsi que l'absence fréquente de concordance entre les localisations des deux éléments, démontrent que du chrome et du plomb transitent dans l'organisme sous une forme chimique différente du chromate de Pb.

1. Contamination générale des tissus

Le chrome et le plomb ont été recherchés dans tous les tissus par émission ionique secondaire.

Les masses musculaires et l'épithélium du manteau (Pl. VIII) émettent des signaux Cr⁺ suffisamment intenses pour fournir des images de répartition de l'élément ; le chrome apparaît alors uniformément réparti dans les tissus. En revanche, les signaux Pb⁺ sont très faibles et aucune image de répartition du métal ne peut être obtenue. Dans l'épithélium des branchies, Cr et Pb fournissent des signaux intenses et les deux éléments ont une répartition uniforme (Pl. IX) ; dans les cellules digestives, une telle répartition uniforme coexiste avec des points d'émission très intense qui correspondent aux particules de chromate captées par ces cellules (Pl. IX).

Les gonades mâle et femelle subissent différemment les effets du polluant. Le testicule est surtout contaminé par Cr, alors que les signaux Pb sont extrêmement faibles (Pl. VII) ; l'aspect histologique des follicules testiculaires est normal et la gamétogenèse ne paraît pas perturbée. Cet aspect contraste avec celui de l'ovaire où les ovocytes sont, dans leur ensemble, très chargés en Cr et en Pb dont les localisations cytologiques sont uniformes ; certains ovocytes sont lysés (Pl. X).

2. Excrétion par le rein et par les amoebocytes

L'épithélium du rein est hypertrophié. En plus d'une localisation diffuse de Cr et Pb analogue à celle des autres tissus, les deux éléments sont très fortement concentrés dans les granules d'excrétion de phosphates situés dans l'épithélium et dans la lumière de l'organe. L'étude des points d'émission par l'ensemble des techniques de microanalyse sur coupes à la paraffine (émission X, émission ionique secondaire) montre une absence de concordance entre les points d'émission de Cr et de Pb (Pl. VIII).

Il en est de même des amoebocytes situés sous l'épithélium du rein, qui concentrent Cr et Pb sans concordance de localisation.

Les deux éléments sont donc concentrés et excrétés indépendamment l'un de l'autre, et dans des états chimiques différents (phosphate pour le plomb ?).

III. CONCLUSION

Le captage de particules de chromate de plomb par les cellules de digestion intracellulaire est très faible chez la Moule. Le mollusque réagit à l'égard du chromate de la même façon qu'en présence d'oxyde d'uranium, par enrobage des particules dans une abondante sécrétion muqueuse. Il s'avère donc capable d'effectuer un choix parmi les matières en suspension, acceptant les oxydes ou hydroxydes de fer, de titane ou d'aluminium, les fluorures, mais excluant l'oxyde d'uranium et le chromate de plomb. Dans ce dernier cas, les concentrations en Pb et Cr qui seraient déterminées par dosage des tissus mous, après élimination obligatoire du bol alimentaire, ne seraient que pour une très faible part imputables aux particules de chromate captées par les cellules.

La contamination générale des tissus par Pb et surtout par Cr, l'excrétion indépendante des deux éléments par le rein, démontrent que des formes assimilables des deux éléments transitent dans l'organisme. Le plomb assimilable peut évidemment avoir pour origine l'impureté du

produit, mais cette interprétation ne peut s'appliquer au chrome puisqu'aucune libération de chrome n'a pu être mise en évidence dans l'eau de mer. Il nous faut donc admettre que le chromate de plomb subit une dissociation, produisant, sous forme disponible, du chrome ainsi que du plomb qui s'ajoute à celui de l'impureté ; cette dissociation ne pouvant résulter de la simple mise en suspension, l'éventualité d'une intervention de la moule, des algues servant de nourriture ou de bactéries du milieu d'élevage, doit donc être considérée.

Le transit, dans l'organisme de la moule, de deux formes toxiques du chrome et du plomb, n'entraîne pas de mortalité dans les délais de l'expérience, mais produit des lésions histologiques. Comme dans le cas d'hyperexcrétion de fer (MARTOJA *et al.*, inéd.), l'épithélium du rein s'hypertrophie. Les ovocytes, en raison de leur intense métabolisme qui les conduit à puiser activement les constituants organiques et minéraux du sang, représentent les cellules non excrétrices les plus chargées en Cr et Pb, si l'on en juge par les images d'émission ionique. Corrélativement, les cellules sont lésées et l'on peut penser que pour une exposition de plus longue durée, l'ovaire pourrait subir une nécrose totale. Dans ces deux cas, rein et ovaire, il est impossible de faire la part dévolue à chacun des éléments dans la responsabilité de ces effets cytopathologiques.

R E F E R E N C E S B I B L I O G R A P H I Q U E S

- BARGETON M., *Bull. Mus.* 13, 1941, p. 119-125.
- FOWLER S.W. et BENAYOUN G. in *Comparative Studies of Food and Environmental Contamination*, Inter. Atom. En. Ag., 1974, p. 159-178.
- GEORGE S.G., *Comp. Biochem. Physiol.*, 76 C, 1983, p. 59-65.
- GEORGE S.G., PIRIE B.J.S., CHEYNE A.R., COOMBS T.L. et GRANT P.T., *Mar. Biol.*, 45, 1978, p. 147-156.
- GEORGE S.G., CARPENE E., COOMBS T.L., OVERNELL J. et YOUNGSTON A., *Biochim. biophys. Acta*, 580, 1979, p. 225-233.
- GEORGE S.G., PIRIE B.J.S. et FRAZIER J.M., *Mar. Biol.*, 76, 1983, p. 63-66.
- IRELAND M.P., *Comp. Biochem. Physiol.*, 68 A, 1981, p. 37-41.
- KAGI J.H.R. et VALLEE B.L., *J. Biol. Chem.*, 235, 1960, p. 3460-3465.
- KAGI J.H.R. et VALLEE B.L., *J. Biol. Chem.*, 236, 1961, p. 2435-2442.
- LE DANTEC J., *Thèse Université Bordeaux*, 1968.
- MARSHALL A.T. et TALBOT V., *Chem. Biol. Interactions*, 27, 1979, p. 111-123.
- MARTIN J.L., MARTOJA M., TRUCHET M. et MARTOJA R. *Oceanologica acta*, sous presse.
- MARTOJA R., BOUQUENEAU J.M. et VERTHE C., *J. Invert. Pathol.*, 42, 1983, p. 17-32.
- MARTOJA R., MARTIN J.L., BALLAN-DUFRAŒAIS C., JEANTET A.Y. et TRUCHET M. *Mar. Environm. Res.*, sous presse.
- NICKLESS G., STENNER R. et TERRILLE N. *Mar. Poll. Bull.*, 3, 1972, p. 188-190.
- PEDEN J.D., CROTHERS J.M., WETERFALL C.E. et BEASLEY J. *Mar. Poll. Bull.*, 4, 1973, p. 7-9.
- PIRIE B.J.S., GEORGE S.G., LYTTON D.G. et THOMSON J.D., *J. Mar. Biol., Ass. U.K.*, 64, 1984, p. 115-123.
- RIDLINGTON J.W. et FOWLER B.A., *Chem. Biol. Interactions*, 25, 1979, p. 127-138.
- RUSSEL E.J., *Fish. Inv. B. S. Agric.* (London), sér. II, 6, 1923, n° 1.
- SECCHI F., *Thèse 3ème cycle, Université Paris 6*, 1984.
- SHORE R., CARNEY G. et STYGALL T., *Mar. Poll. Bull.*, 6, 1975, p. 187-189.
- WEBB, M., *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*, 1979, Elsevier Ed.

PLANCHES

PLANCHE I

HUITRE TEMOIN

Fig. 1 et 2. Intestin.

Fig. 1. Les cellules intestinales renferment des lysosomes (flèches)
x 9200 .

Fig. 2. Les lysosomes ont un contenu riche en éléments variés
(S, P, Ca, Cu, Zn, Al, Fe). x 54000 .

Fig. 3 et 4. Glande digestive.

Fig. 3. Cellule digestive. x 9200 .

Fig. 4. Les lysosomes des cellules digestives contiennent de nombreux
éléments (S, P, Ca, Cu, Zn, Al, Fe, Br). x 26000 .

C : cils

Ly : lysosomes

M : mitochondries

Mv : microvillosités de la membrane apicale

N : noyau

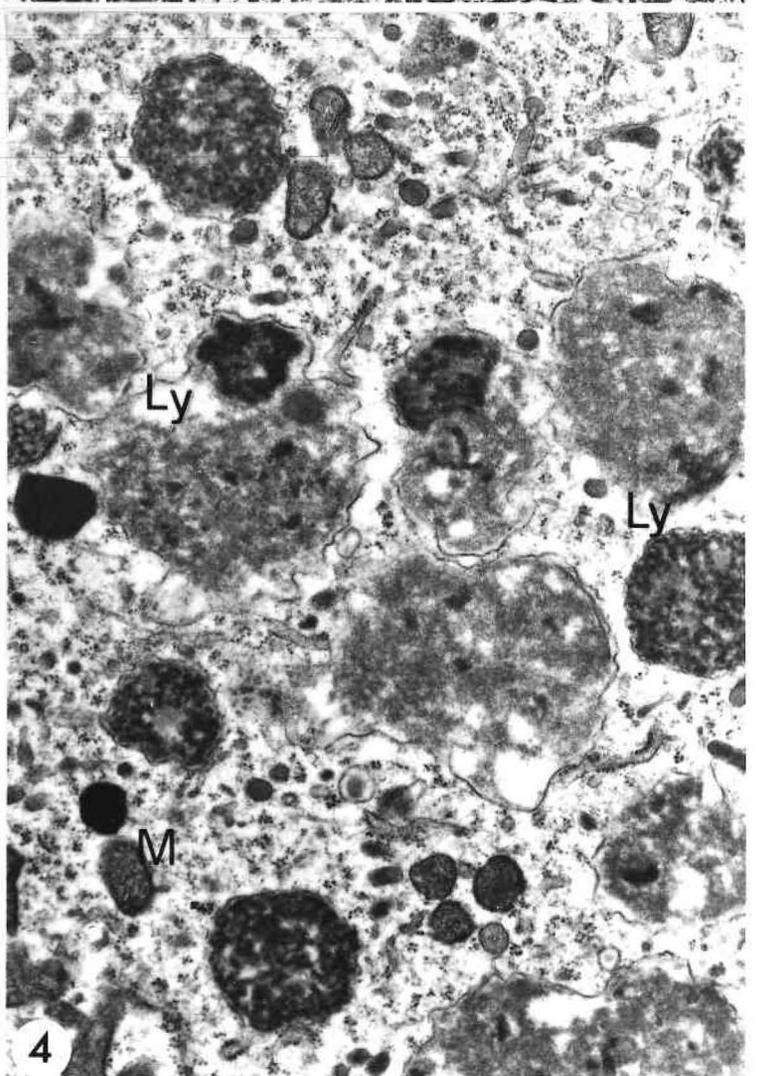
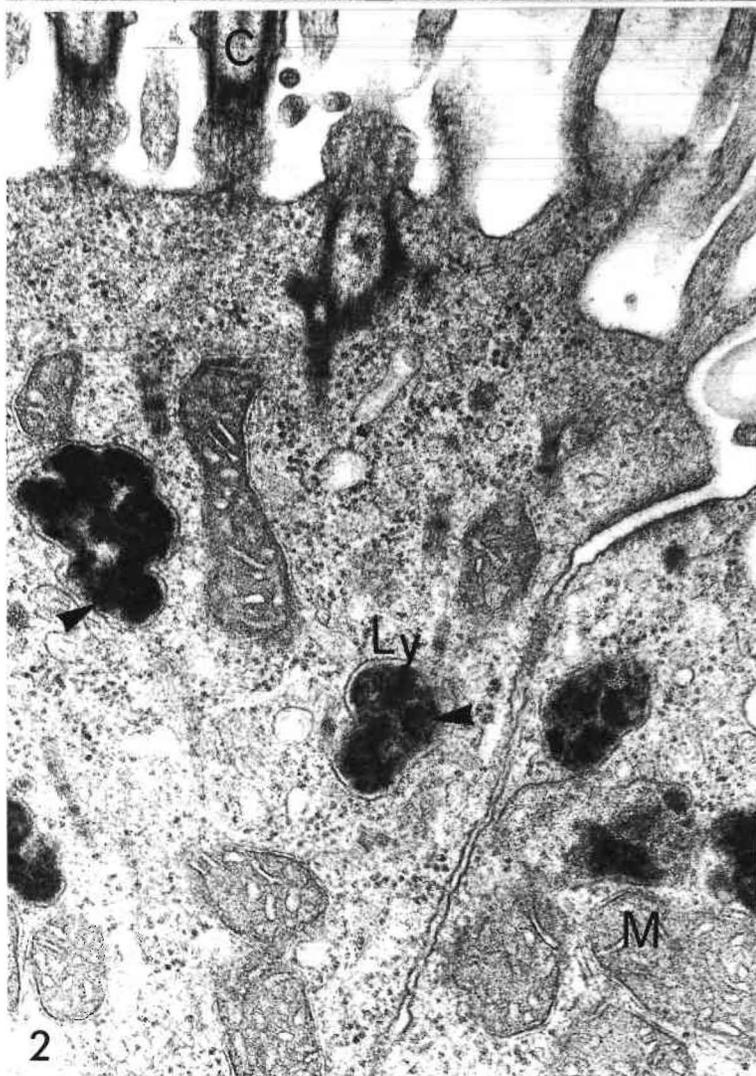
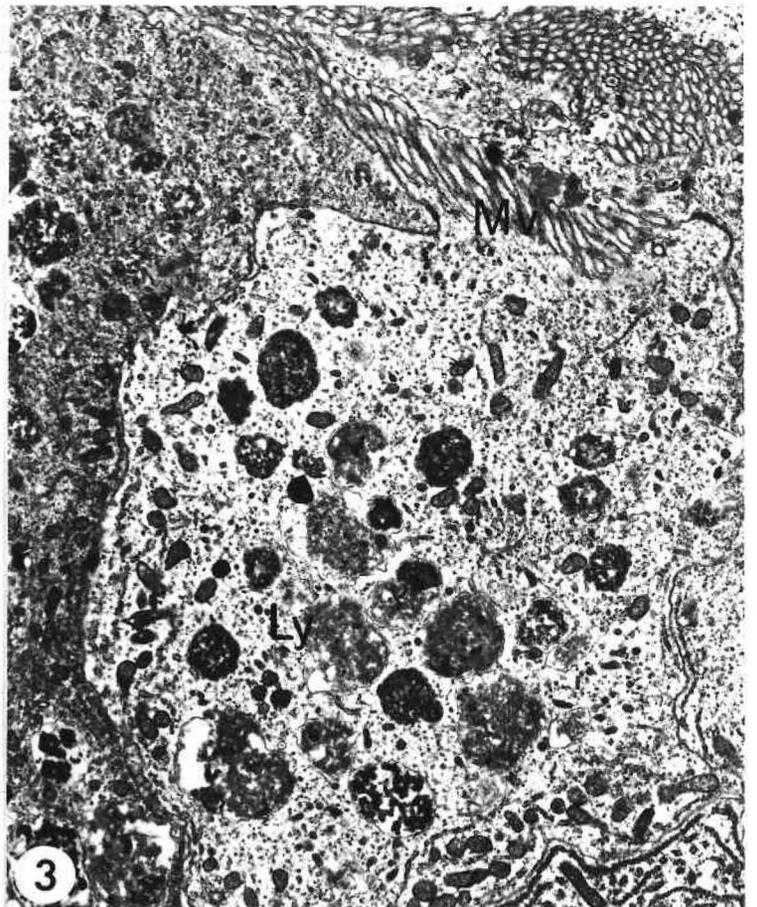
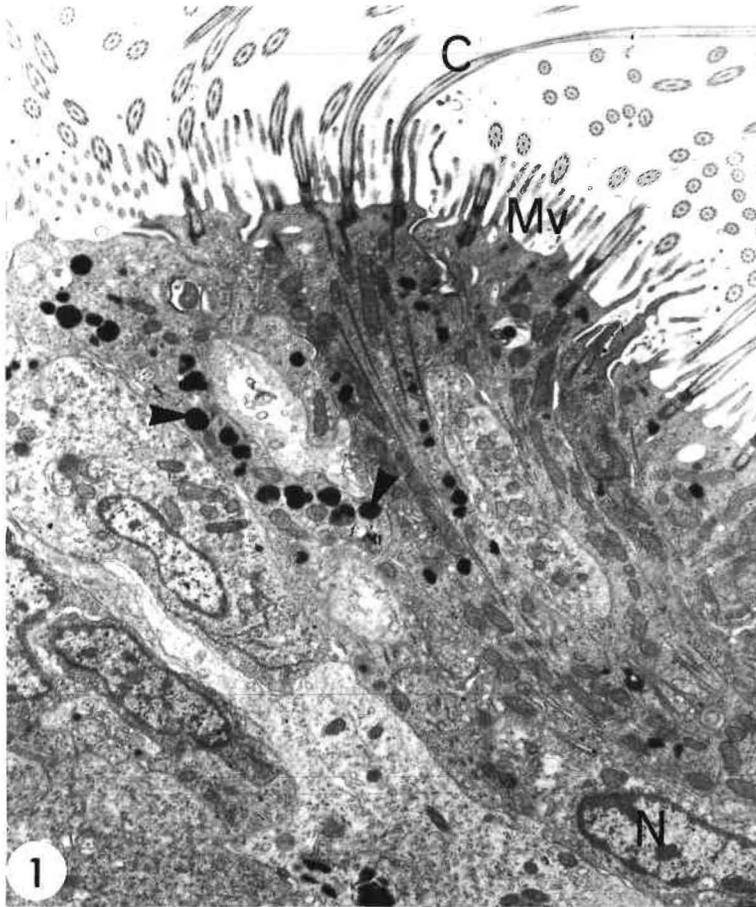


PLANCHE II

HUITRE CONTAMINEE PAR CdCl_2 (26 JOURS). GLANDE DIGESTIVE.

Fig. 1. L'aspect ultrastructural des cellules digestives et cellules basophiles ne présente aucune lésion. x 7200.

Fig. 2. Le cadmium est décelé dans des vésicules lysosomales dont le contenu est plus ou moins opaque (flèches). x 26000.

CD : cellules digestives

CB : cellules basophiles

Ly : lysosomes

M : mitochondries

N : noyau

RE : reticulum endoplasmique

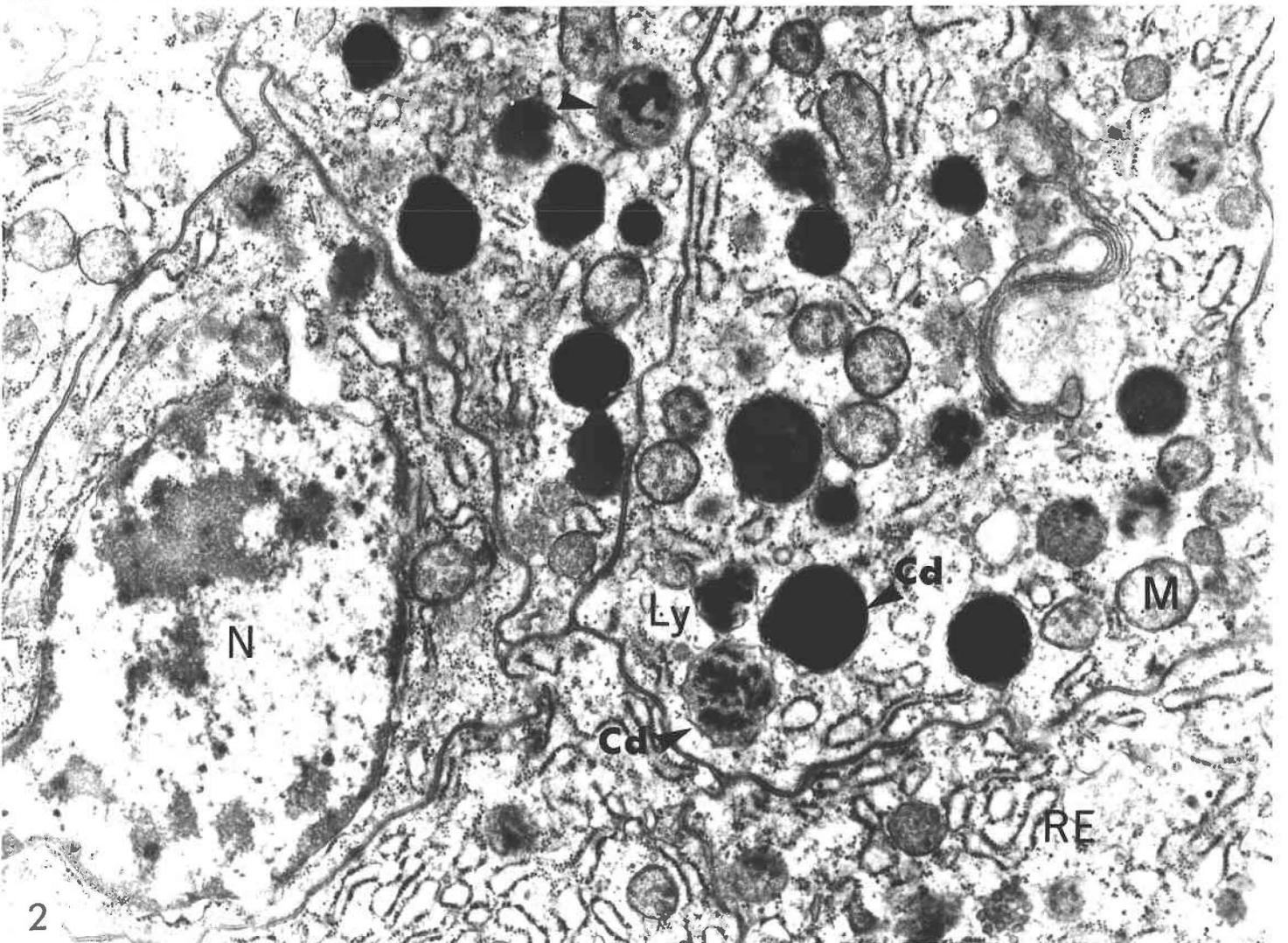
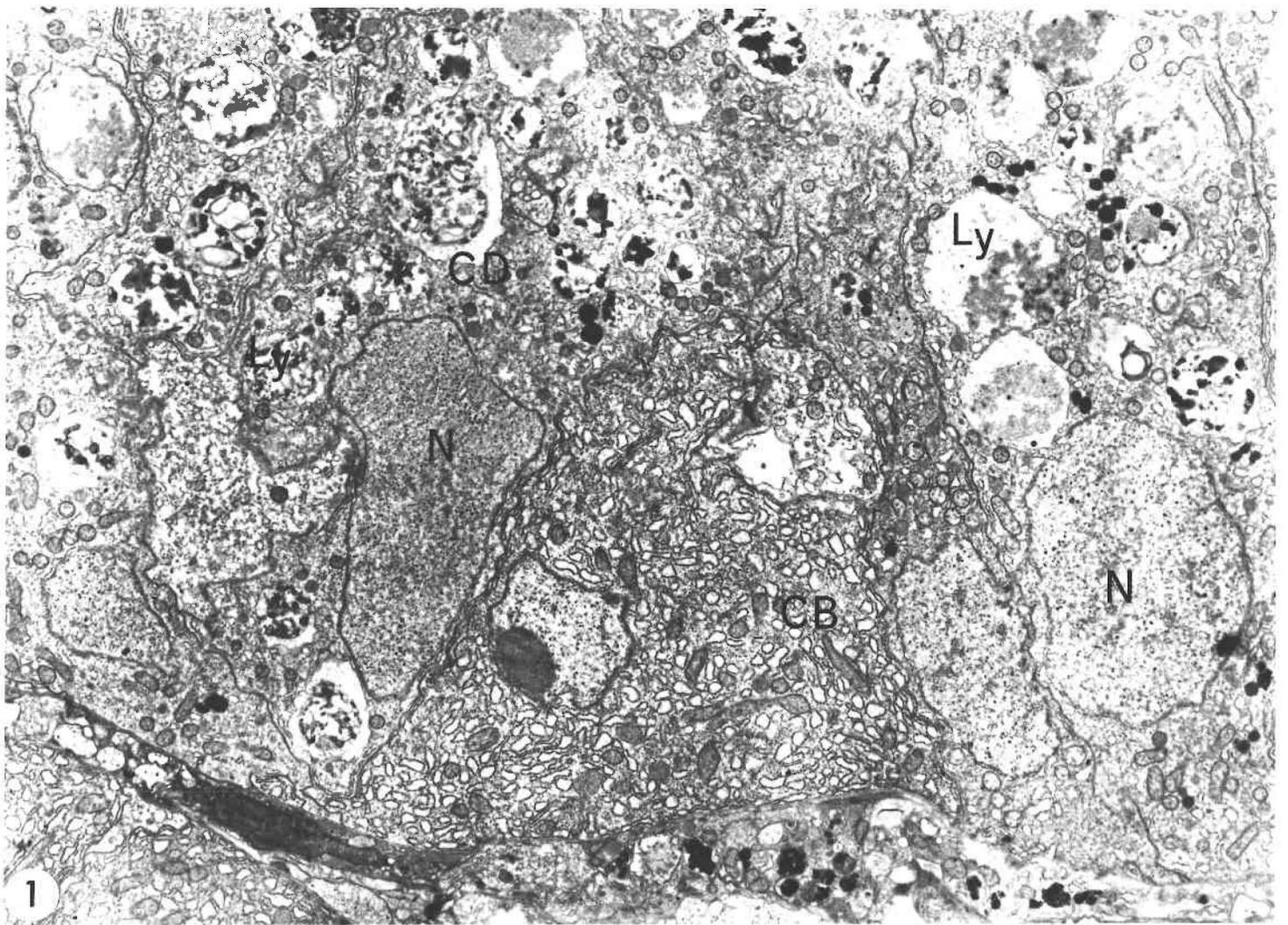


PLANCHE III

HUITRE CONTAMINEE PAR $CdCl_2$ (Fig. 1, 3 et 4) ET HUITRE TEMOIN (Fig. 2).
GLANDE DIGESTIVE ET BRANCHIE.

Fig. 1 et 2. Cellules des diverticules de la glande digestive. Le cadmium est décelé dans les lysosomes (flèches).

Fig. 1. Contamination 7 jours. x 16400.

Fig. 2. Contamination 26 jours. x 26000.

Fig. 3 et 4. Cellules branchiales.

Fig. 3. Huître témoin. x 54000.

Fig. 4. Huître contaminée 26 jours. Le cadmium est décelé dans les lysosomes (flèche). x 40000.

Ly : lysosomes

M : mitochondries

Mv : microvillosités

N : noyau

R : ribosomes

RE : reticulum endoplasmique

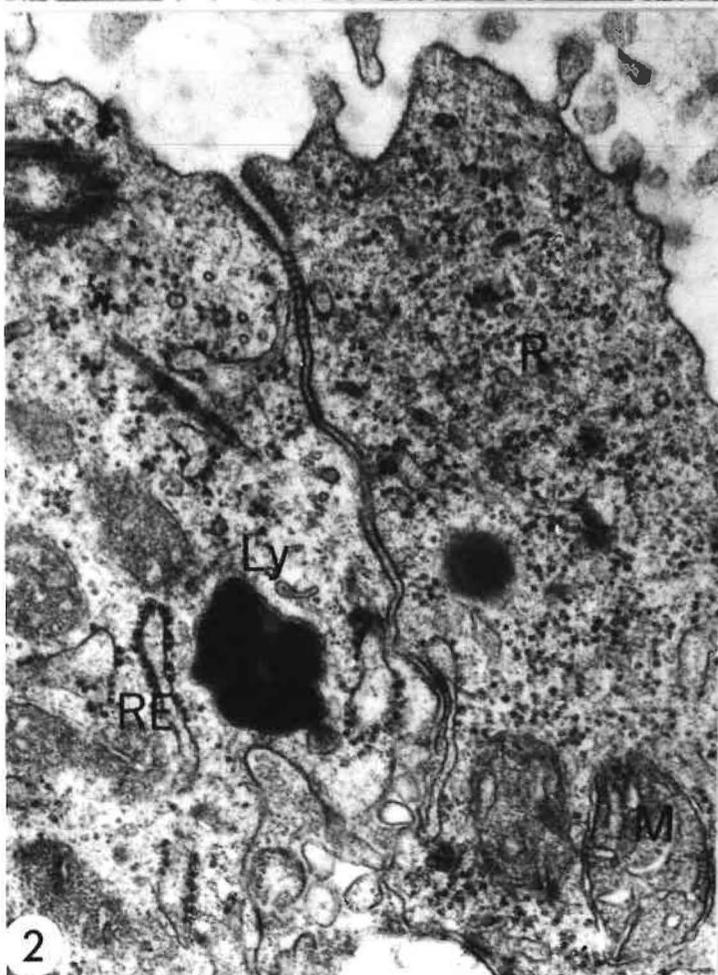
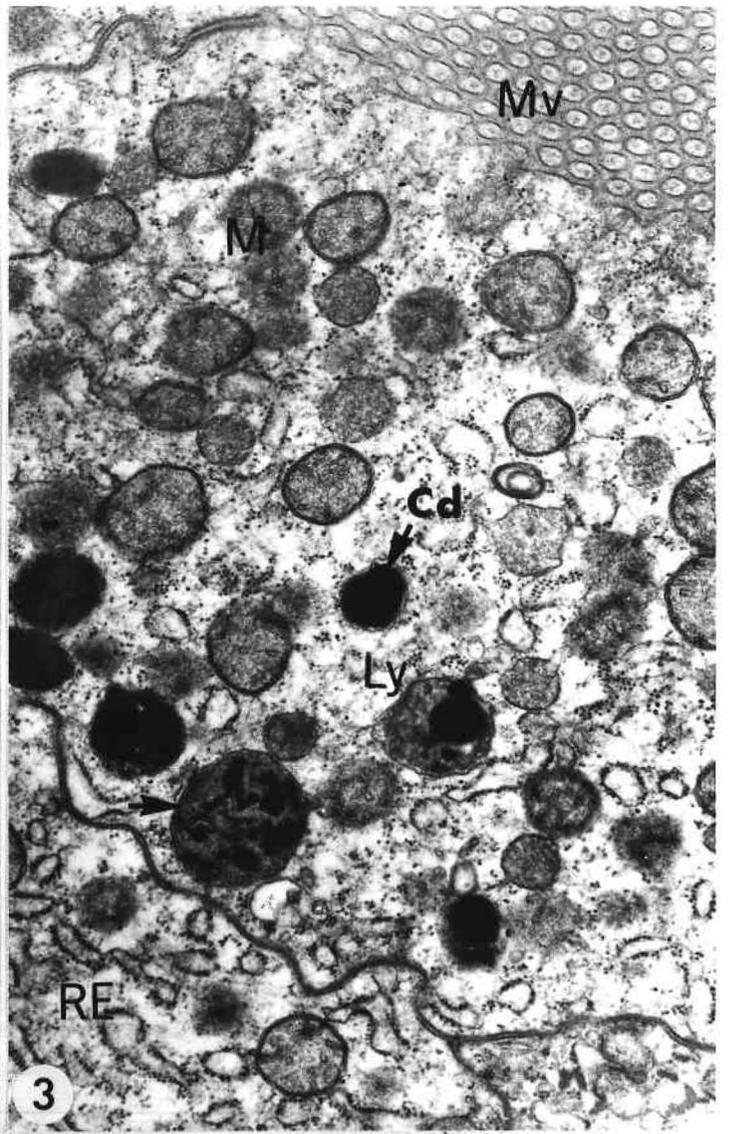
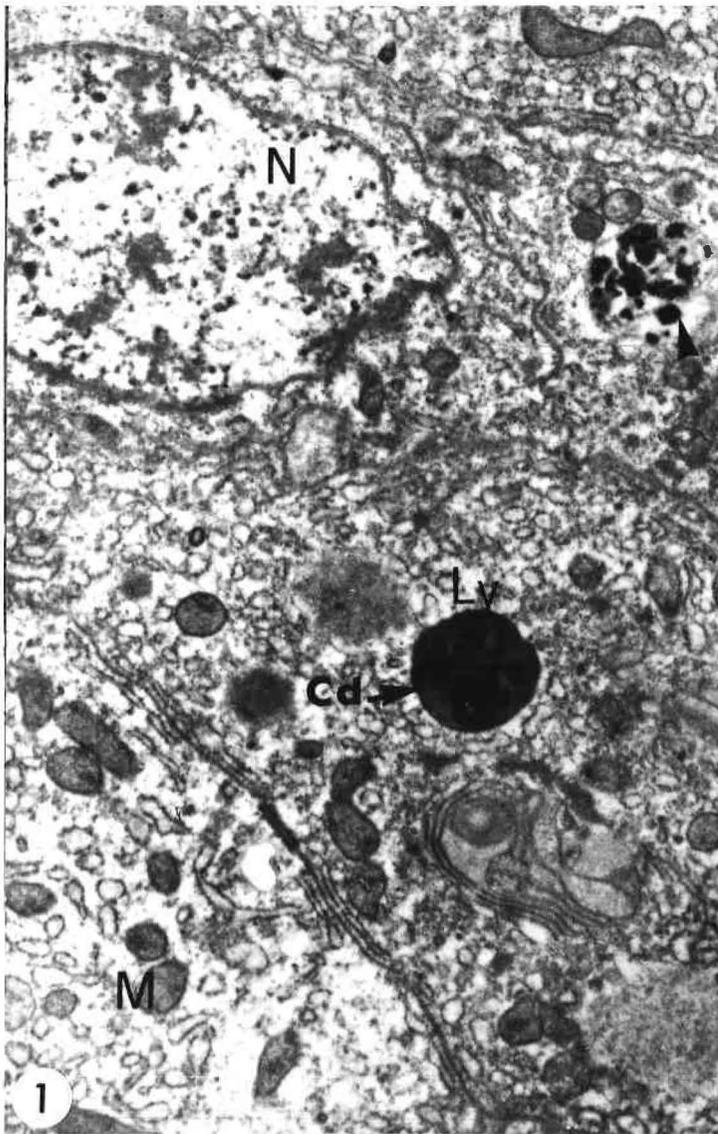


PLANCHE IV

HUITRE TEMOIN (fig. 1 et 2) ET HUITRE CONTAMINEE PAR CdCl_2 (fig. 3 et 4).

Fig. 1. Localisation des amoebocytes d'un palpe labial par la réaction de Von Kossa.

Fig. 2. Chez ce témoin, les amoebocytes ne réduisent pas le ferricyanure ferrique.

Fig. 3. Localisation des amoebocytes de la paroi de l'estomac par la réaction de Von Kossa.

Fig. 4. Chez cette huître contaminée, les amoebocytes réduisent le ferricyanure ferrique, grâce à leur métallothionéine.

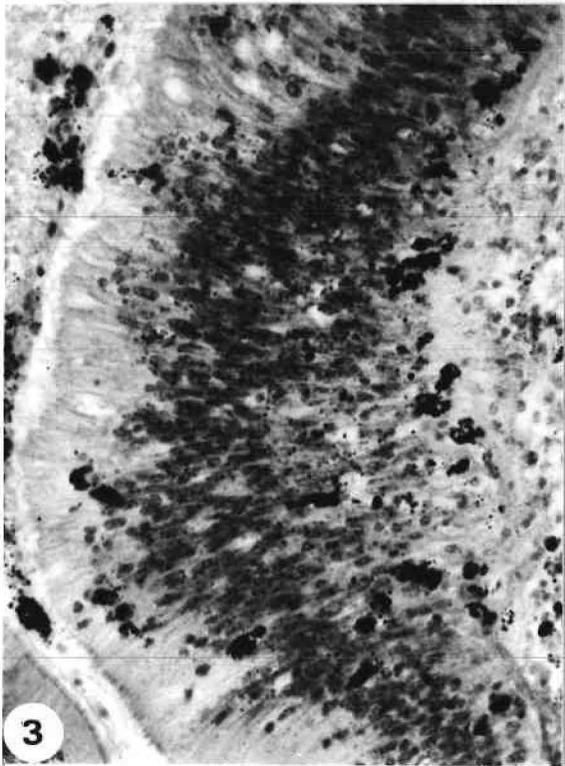
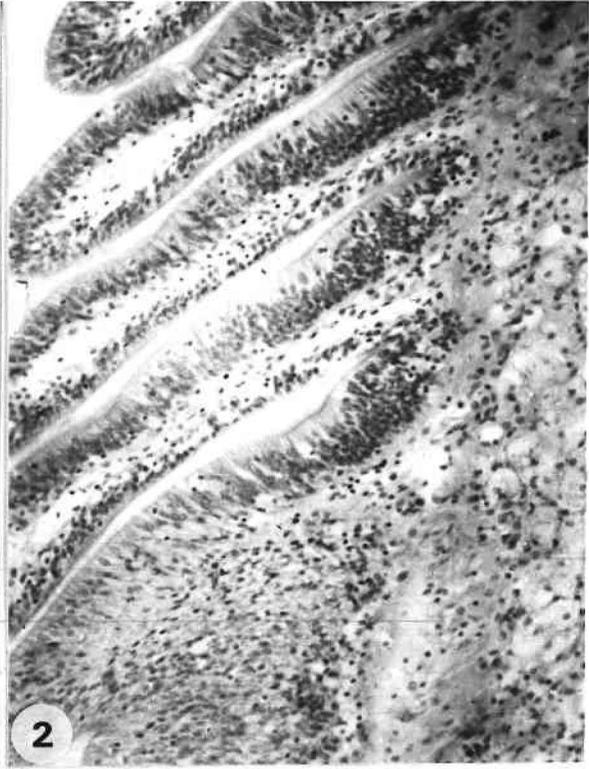
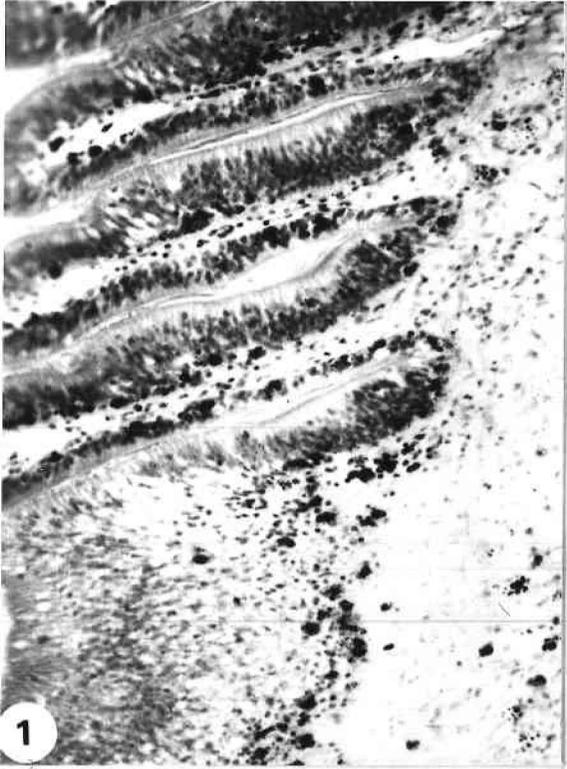


PLANCHE V

HUITRE TEMOIN (FIG. 1 et 2) ET HUITRE CONTAMINEE PAR CdCl_2 (FIG. 3 ET 4).
REIN.

Fig. 1. Epithélium rénal. x 6600.

Fig. 2. Les cellules rénales renferment des lysosomes (Ly) et des concrétions (flèches). x 26000.

Fig. 3. Epithélium rénal. x 6600.

Fig. 4. Apex des cellules rénales. Le cadmium est décelé dans des lysosomes à contenu peu opaque. x 20000.

C : cils

Ly : lysosomes

M : mitochondries

Mv : microvillosités

N : noyau

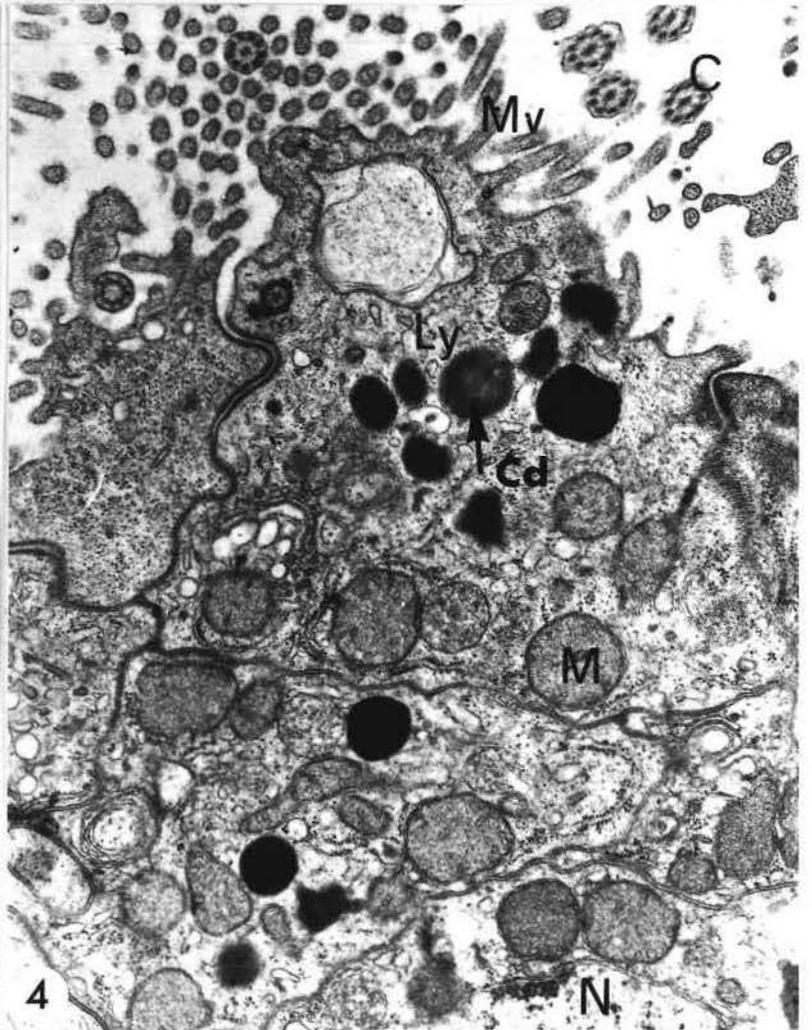
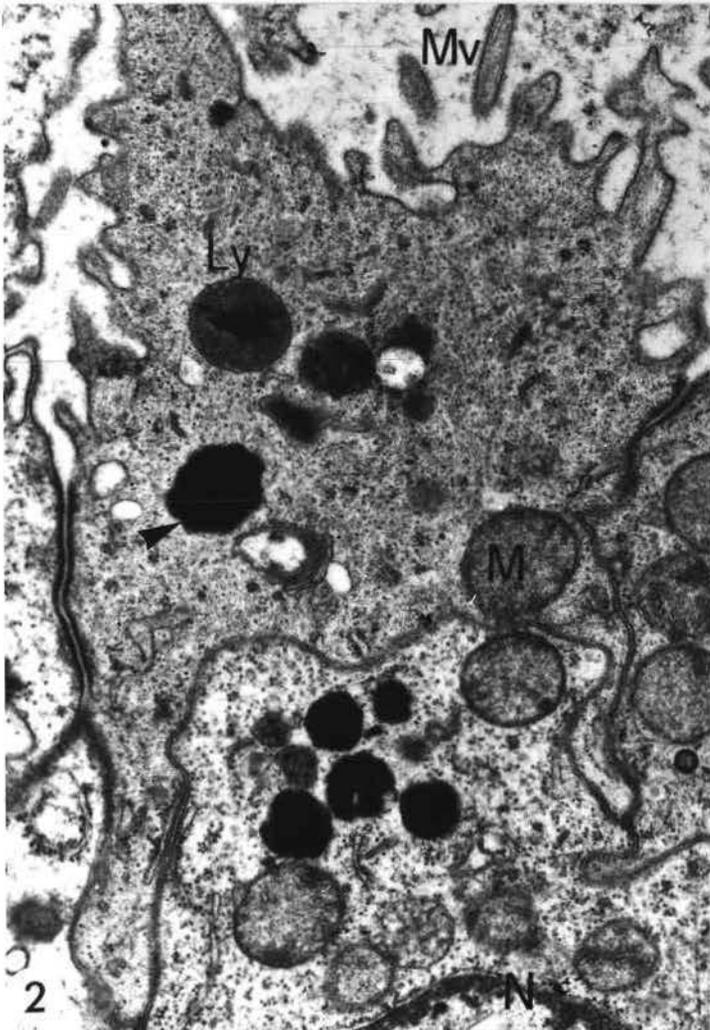
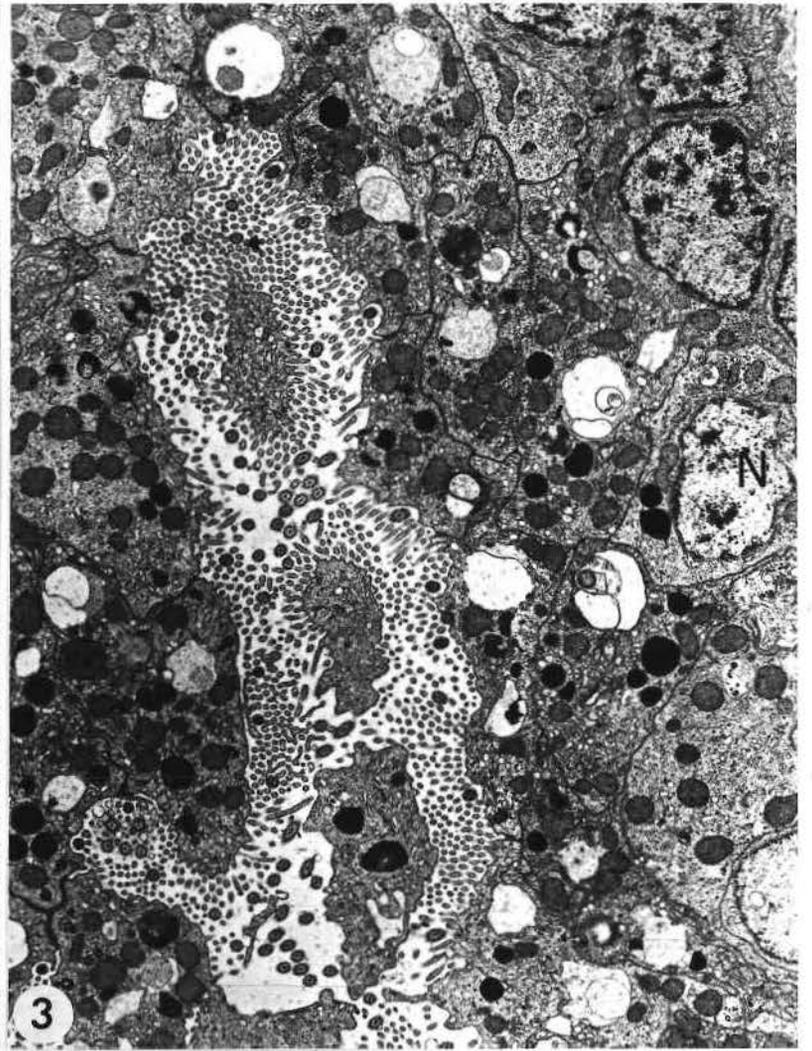
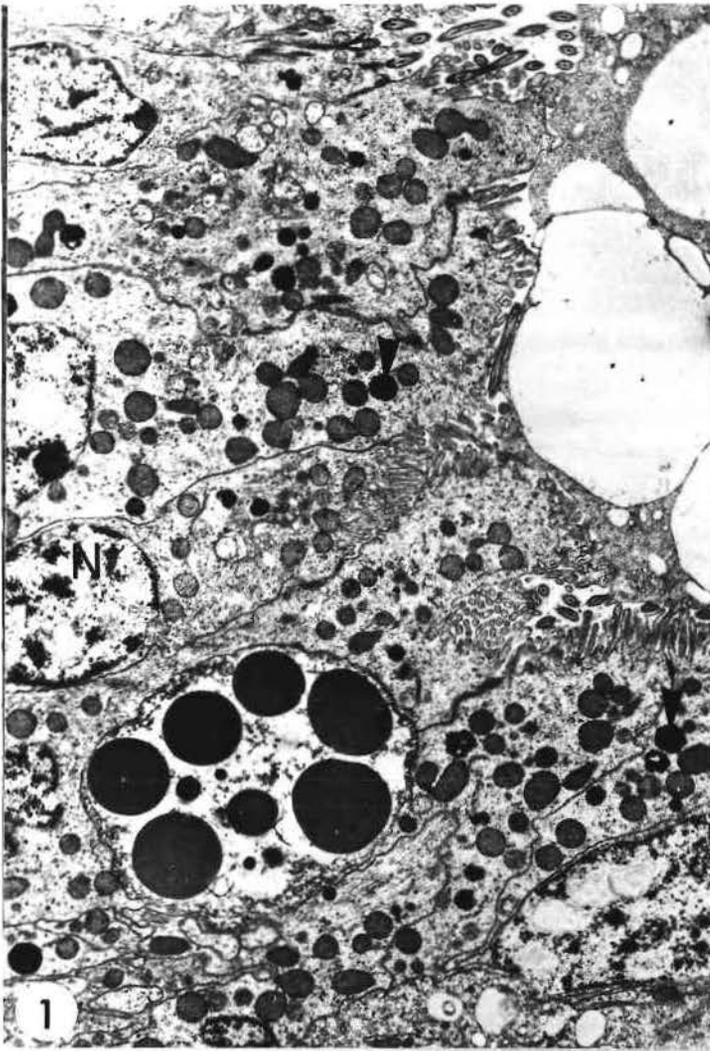


PLANCHE VI

HUITRE DE TALMONT.

Fig. 1 et 2. Epithélium intestinal.

Fig. 1. x 78000.

Fig. 2. x 26000.

Fig. 3. Cellule des diverticules digestifs. x 26000.

Fig. 4. Cellule branchiale. x 26000.

Dans ces différents types cellulaires, les lysosomes Ly contiennent de nombreux éléments (S, P, Ca, Cu, Zn, Al, Fe), mais sont dépourvus de cadmium.

C : cils

Ly : lysosomes

M : mitochondries

Mv : microvillosités

N : noyau

R : ribosomes

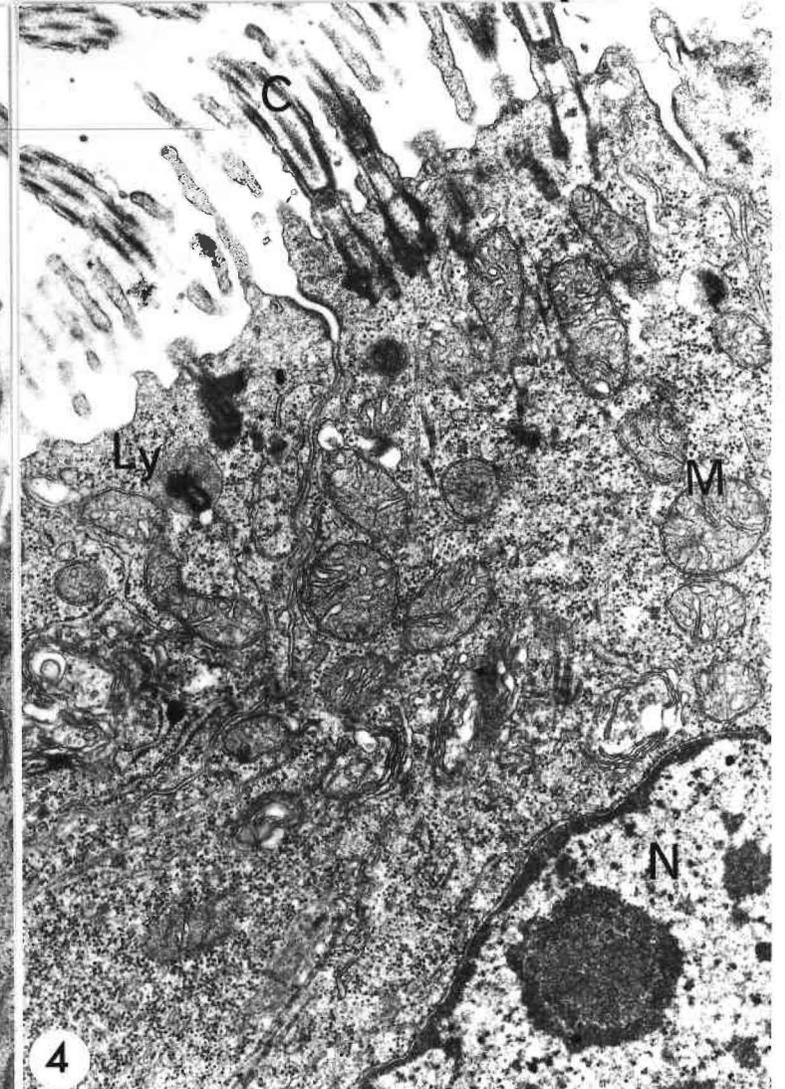
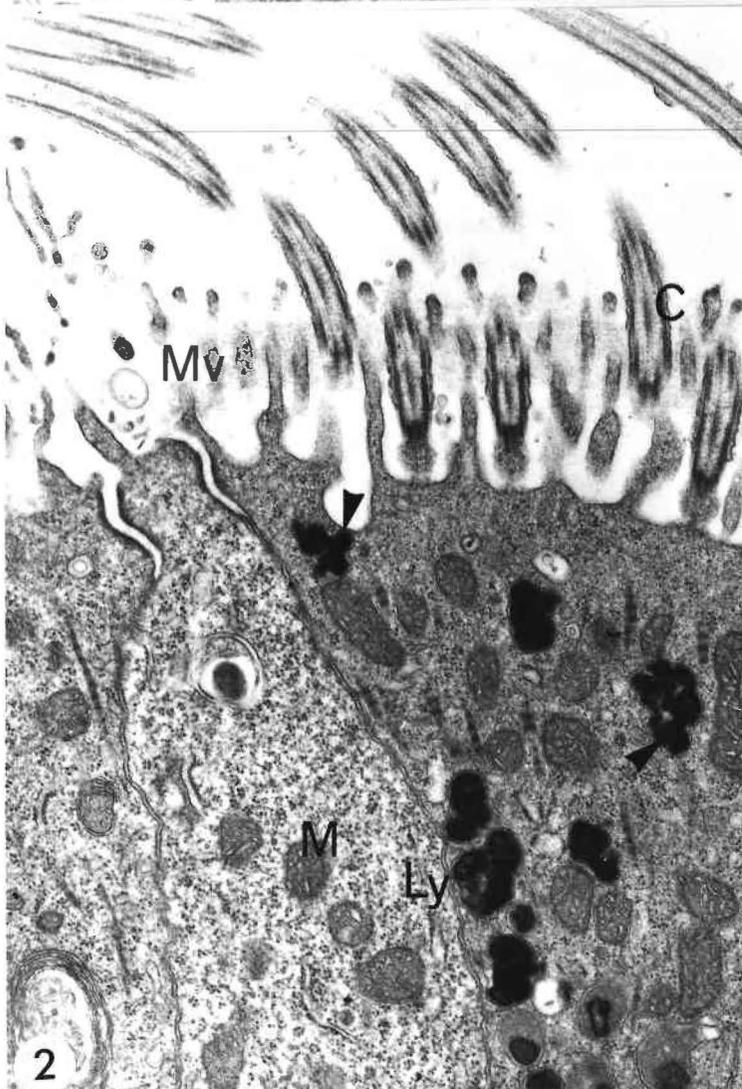
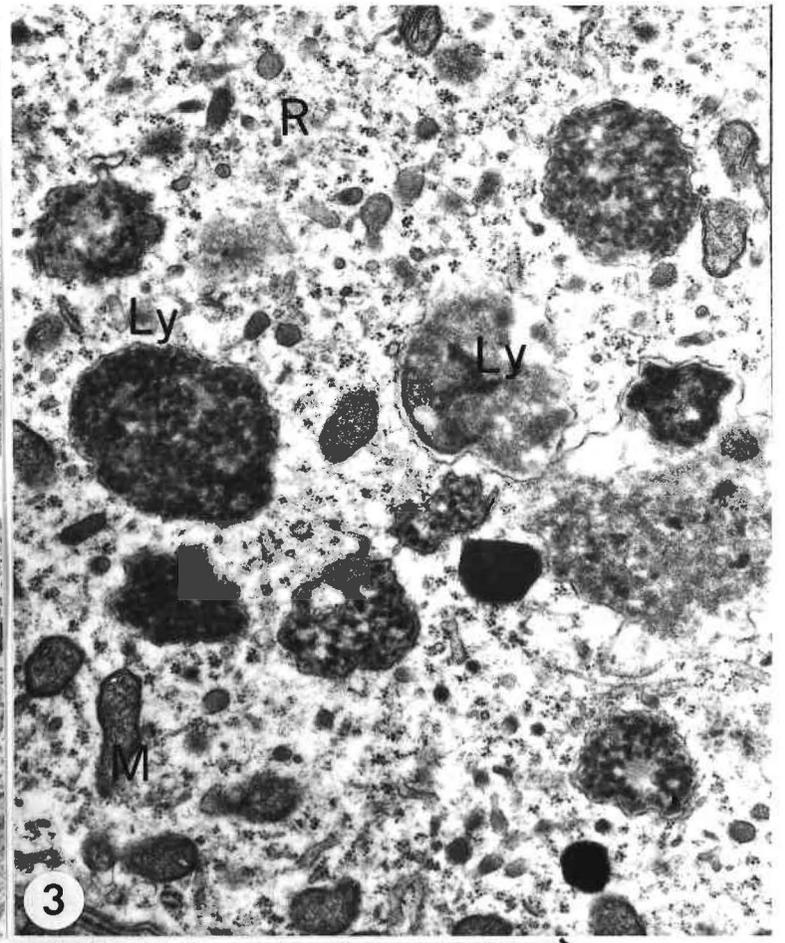
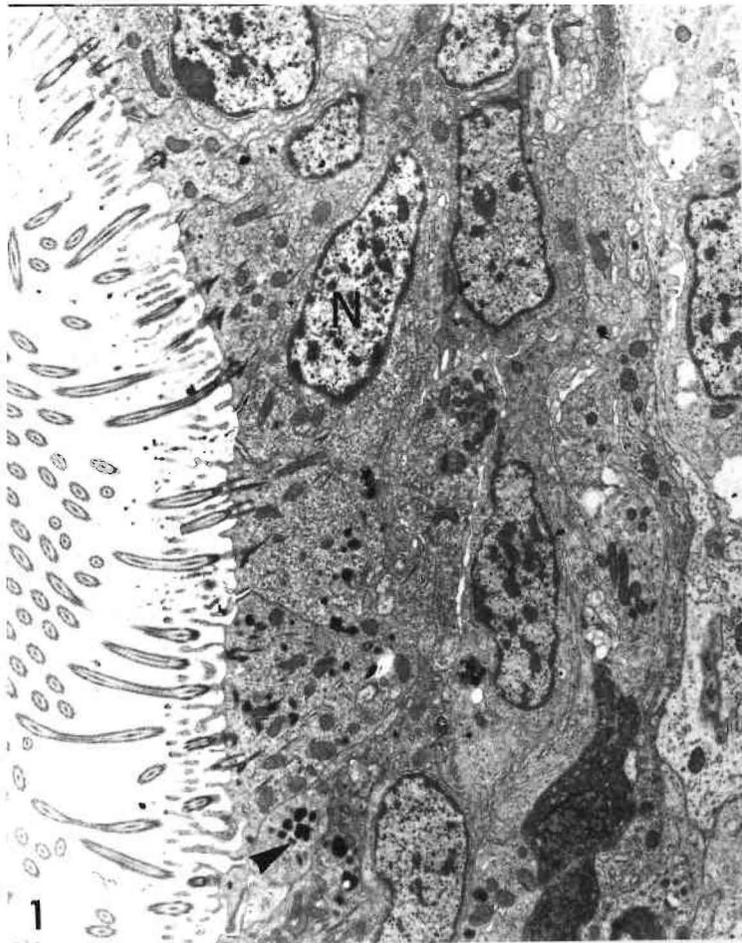


PLANCHE VII

MOULES CONTAMINEES PAR LE CHROMATE DE PLOMB.

A gauche :

Fig. 1 et 2. Cellule des diverticules digestifs. Le chrome et le plomb sont décelés dans les corps résiduels des lysosomes (Ly).

Fig. 1. x 26000.

Fig. 2. x 40000.

Ly : lysosomes (corps résiduels)

M : mitochondries

V : vacuoles lysosomales.

A droite :

Aspect histologique d'un follicule testiculaire et images de distribution de Ca et Cr.

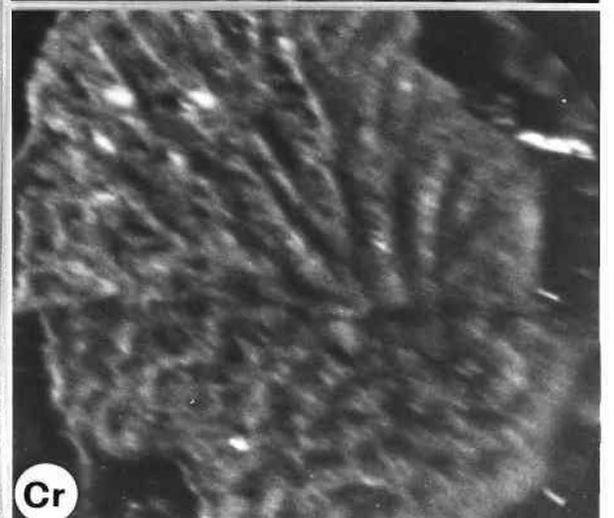
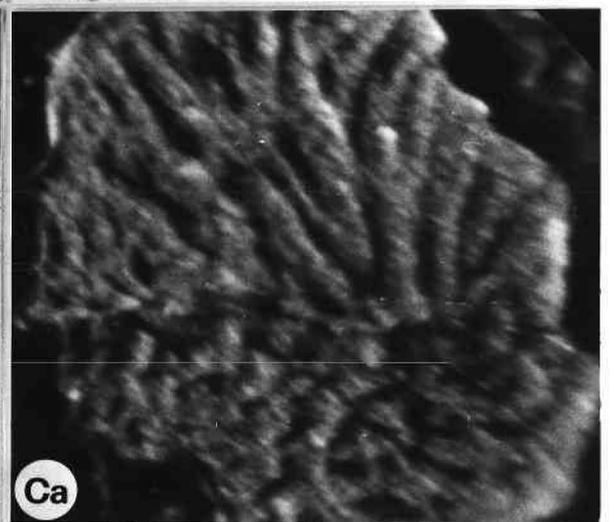
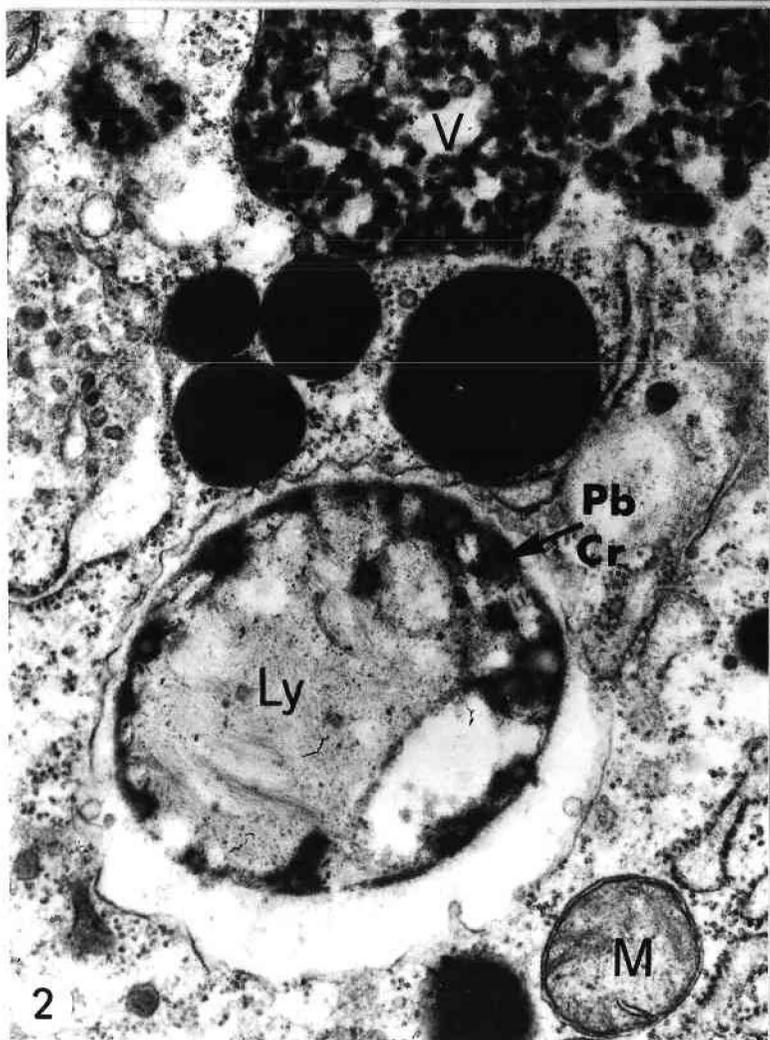
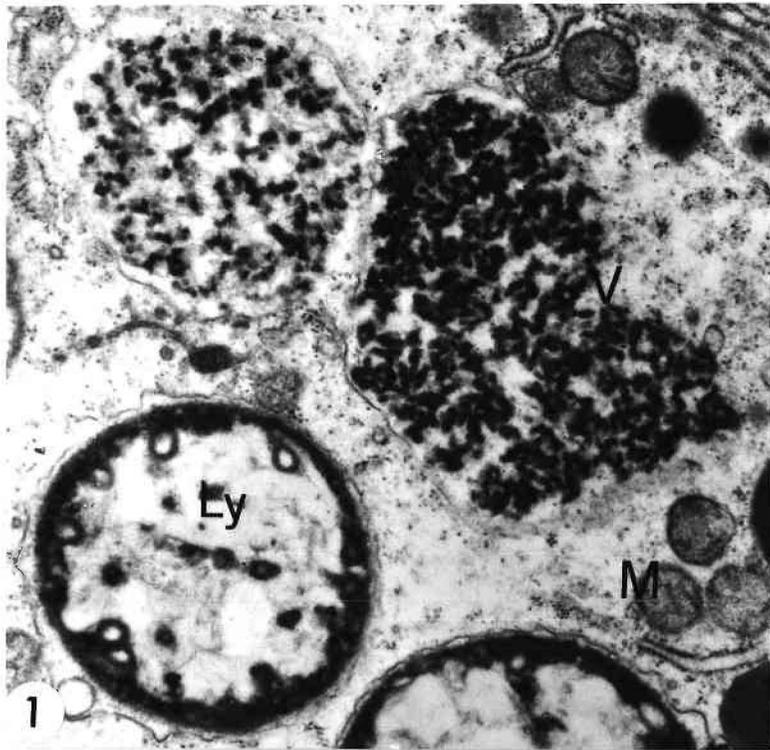


PLANCHE VIII

MOULE CONTAMINEE PAR LE CHROMATE DE PLOMB

A gauche : Images de localisation de Ca et Cr dans l'épithélium du manteau.

A droite : Images de localisation de Ca, Cr et Pb dans l'épithélium du rein, et pour le chrome, dans des amœbocytes (flèche du bas) et dans des concrétions rejetées dans la lumière de l'organe (flèche du haut).

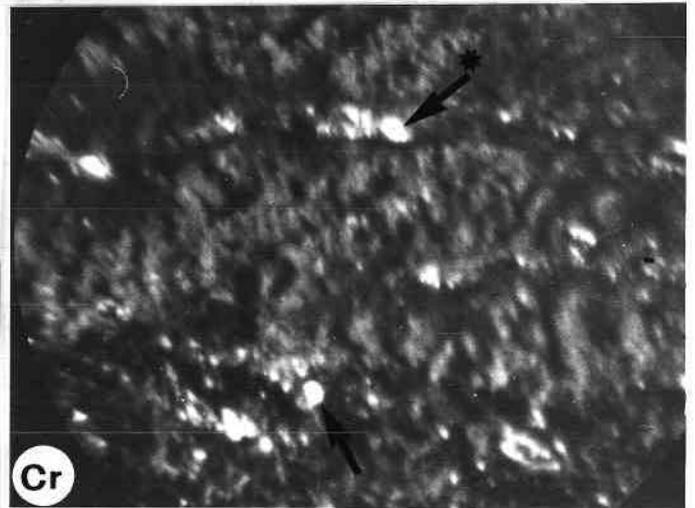
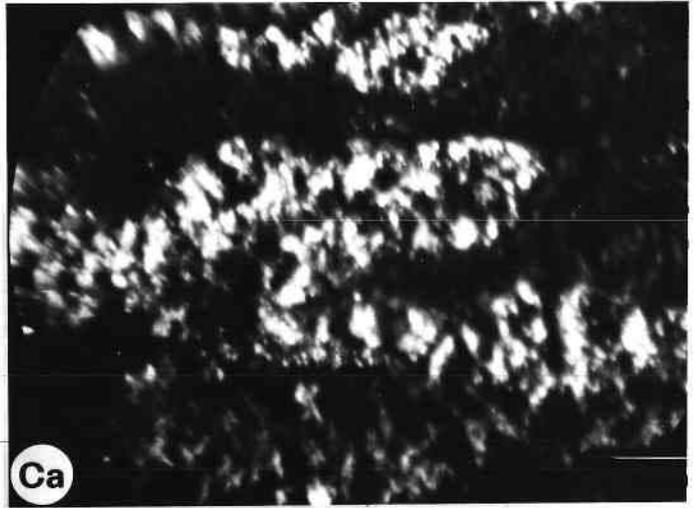
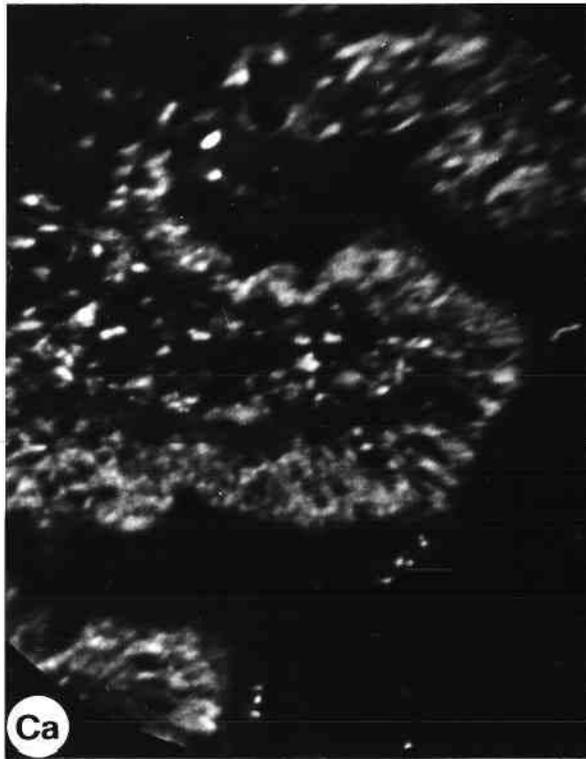


PLANCHE IX

MOULE CONTAMINEE PAR LE CHROMATE DE PLOMB.

A gauche : Images de répartition de Ca, Cr et Pb dans l'épithélium branchial.

A droite : Images de répartition de Ca, Cr et Pb dans l'épithélium des diverticules digestifs.

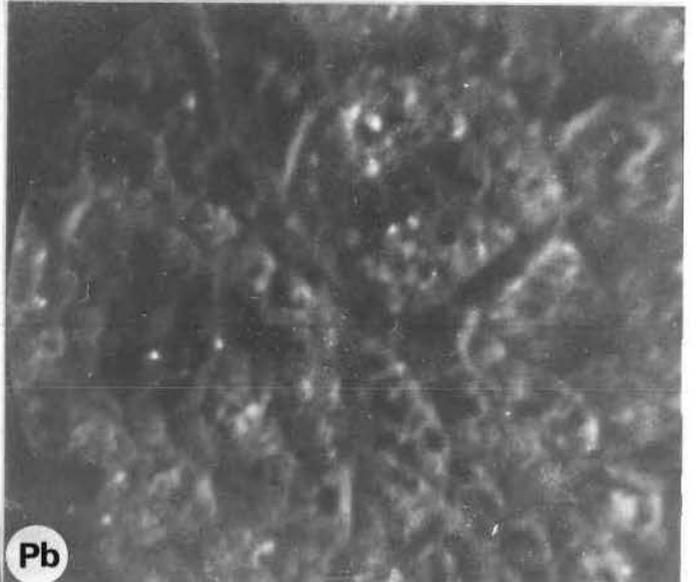
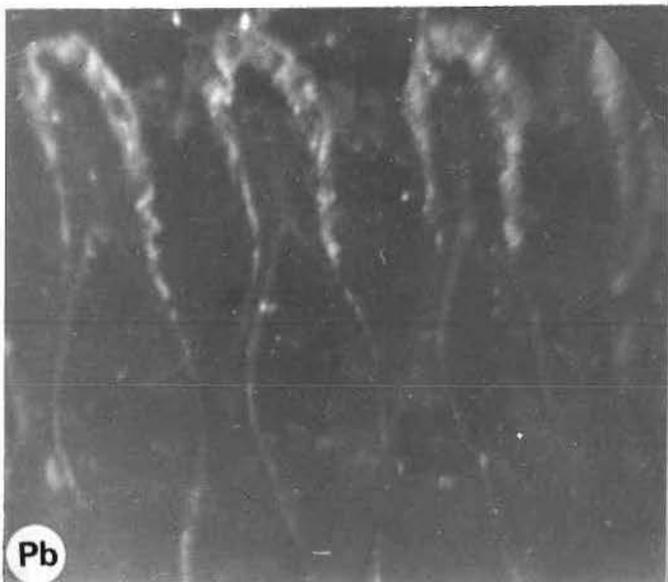
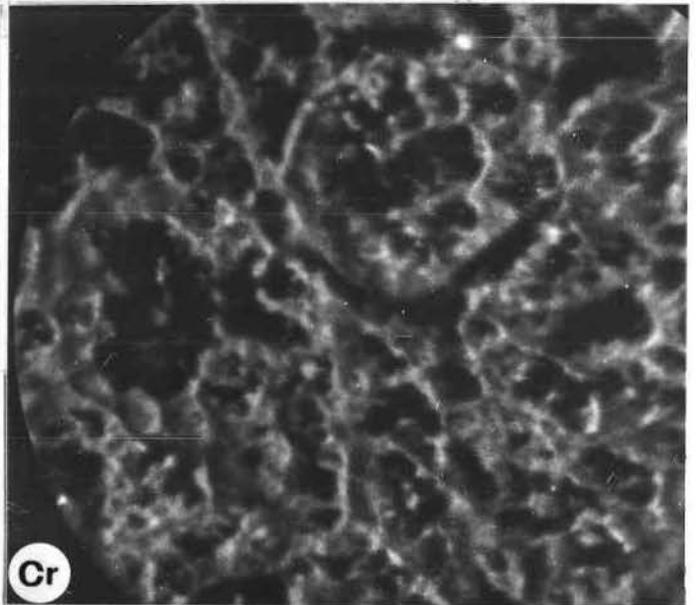
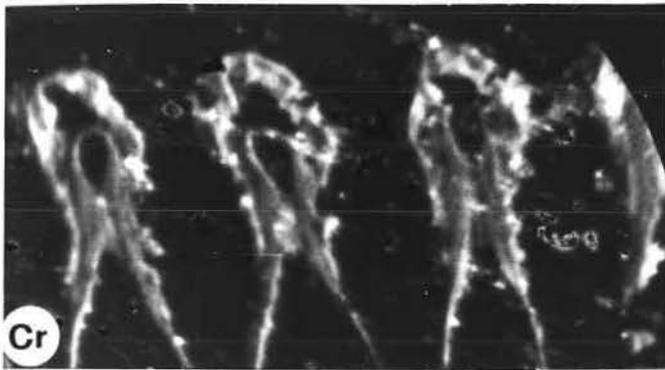
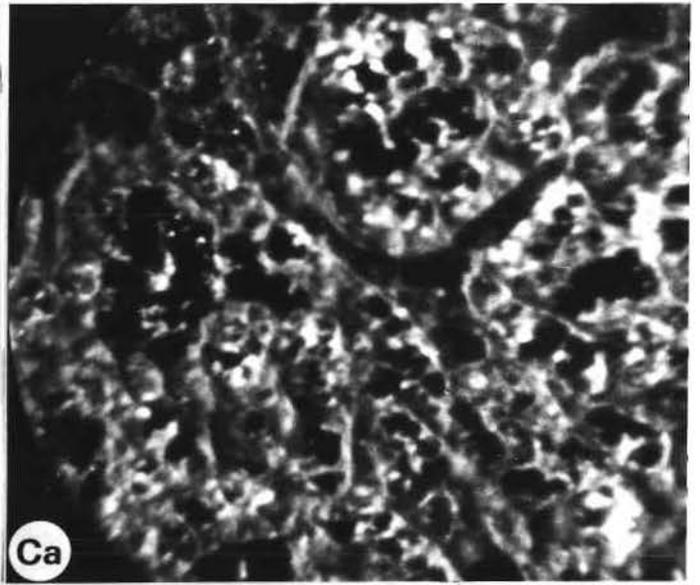


PLANCHE X

MOULE CONTAMINEE PAR LE CHROMATE DE PLOMB

Fig. 1. Cyste ovarien contenant des ovocytes sains sur lesquels ont été réalisées les images de distribution de Ca, Cr et Pb (rangée de photos de droite).

Fig. 2. Cyste ovarien contenant des ovocytes lysés.

