



**HAL**  
open science

**Etude des mécanismes de transport et de détoxification  
des métaux lourds chez la moule d'eau douce *Dreissena  
polymorpha*: rôle des hémocytes et des organes du  
système excréteur (histologie, ultrastructure,  
microanalyse)**

Laure Giamberini

► **To cite this version:**

Laure Giamberini. Etude des mécanismes de transport et de détoxification des métaux lourds chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*: rôle des hémocytes et des organes du système excréteur (histologie, ultrastructure, microanalyse). Biologie animale. Université Paul Verlaine - Metz, 1993. Français. NNT: 1993METZ021S . tel-01775467

**HAL Id: tel-01775467**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01775467v1>**

Submitted on 24 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

Présentée à l'Université de Metz en vue de l'obtention du grade de:

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention: Sciences de la vie  
Spécialité: Toxicologie de l'environnement

par

Laure GIAMBERINI

Titre

ETUDE DES MECANISMES DE TRANSPORT ET DETOXICATION DES METAUX  
LOURDS CHEZ LA MOULE D'EAU DOUCE *Dreissena polymorpha*. RÔLE DES  
HEMOCYTES ET DES ORGANES DU SYSTEME EXCRETEUR (HISTOLOGIE,  
ULTRASTRUCTURE, MICROANALYSE)

Soutenue le 20 décembre 1993 devant la commission d'examen:

Président: Jean-Claude PIHAN

Professeur à l'Université de Metz  
Directeur de thèse

Rapporteurs: Jean-Claude AMIARD  
Christiane BALLAN-DUFRANÇAIS

Directeur de recherches, CNRS de Nantes  
Maître de Conférences à l'Université de Paris VI

Examinateur

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420358 2

Professeur à l'Université de Metz, co-directeur de

Maître de conférence à l'Université de Bretagne  
Occidentale

Maître de Recherche CNRS à l'Université de  
Nancy

**THESE**

Présentée à l'Université de Metz en vue de l'obtention du grade de:

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ**Mention: Sciences de la vie  
Spécialité: Toxicologie de l'environnement

par

**Laure GIAMBERINI**

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19930655
Cote	S/M <sub>3</sub> 93/21
Loc	Magasin

Titre

**ETUDE DES MECANISMES DE TRANSPORT ET DETOXICATION DES METAUX  
LOURDS CHEZ LA MOULE D'EAU DOUCE *Dreissena polymorpha*. RÔLE DES  
HEMOCYTES ET DES ORGANES DU SYSTEME EXCRETEUR (HISTOLOGIE,  
ULTRASTRUCTURE, MICROANALYSE)**

Soutenue le 20 décembre 1993 devant la commission d'examen:

Président: Jean-Claude PIHAN

Professeur à l'Université de Metz  
Directeur de thèseRapporteurs: Jean-Claude AMIARD  
Christiane BALLAN-DUFRANÇAISDirecteur de recherches, CNRS de Nantes  
Maître de Conférences à l'Université de Paris VI

Examineurs: Denyse BAGREL

Professeur à l'Université de Metz, co-directeur de  
thèse

Michel AUFFRET

Maître de conférence à l'Université de Bretagne  
Occidentale

Jean-Marie KELLER

Ingénieur de Recherche CNRS à l'Université de  
Nancy

## REMERCIEMENTS

A l'issue de ce travail, je tiens à remercier très chaleureusement le professeur Jean Claude PIHAN, directeur du Centre de Recherches Ecologiques pour mon initiation à un sujet de recherche très passionnant, pour les compétences qu'il m'a apportées et pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées tout au long de mes années d'étude.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Michel NOURISSON, professeur Emérite et ancien directeur du laboratoire qui m'a accueilli dans son laboratoire au début de mon D. E. A.

J'exprime toute ma reconnaissance au professeur Denyse BAGREL pour l'aide et les conseils qu'elle m'a apportés et pour l'intérêt qu'elle a porté à mon travail de recherche en acceptant d'être co-directrice de thèse.

Je suis très sensible à l'honneur que me font Madame Christiane BALLAN-DUFRANCAIS, Maître de conférence à l'Université de Paris VI et Monsieur Jean-Claude AMIARD, Directeur de Recherches CNRS à Nantes en acceptant de juger ce travail.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Jean-Marie KELLER, ingénieur de recherches à l'Université de Nancy qui m'a accueilli très chaleureusement dans son laboratoire et a été toujours disponible pour m'accorder aide et soutien et me faire profiter des ses connaissances de la microanalyse de rayons-X. et pour l'honneur qu'il me fait en participant au jury.

Mes plus vifs remerciements à Monsieur Michel AUFFRET pour l'accueil qu'il m'a réservé dans son laboratoire à l'Université de Bretagne Occidentale et pour l'honneur qu'il me fait en acceptant de siéger dans mon jury.

Il m'est très agréable de remercier François GUEROLD, compagnon d'études et meilleur ami pour son soutien permanent, sa disponibilité sans limite, son sens critique et surtout pour son humour décapant.

J'exprime tous mes remerciements et ma gratitude aux personnes, qui à divers titre m'ont aidé dans la réalisation des mes recherches:

- à Monsieur Claude Crochard, Directeur de l'UFR Sci-Fa à l'Université de Metz, qui a suivi et dirigé mon travail de DEA avec intérêt.

- à Madame Marie-Noëlle BEAUVAIS qui m'a fait partager son intérêt pour l'histologie et m'a fait aussi profiter de ses connaissances dans cette matière parfois laborieuse. Merci également pour tous les mètres de rubans de coupes histologiques qu'elle a réalisé pour moi.

- à Monsieur Serge DOMINIAC de l'I.S.G.M.P. de Metz, pour la connaissance de l'utilisation des microscopes électroniques qu'il m'a apportée, pour sa disponibilité et son aide et enfin pour le libre accès aux appareils de microscopie qu'il m'a accordé.

- à Monsieur Jaafar GHANBAJA du service de microscopie électronique de l'Université de Nancy pour sa collaboration et sa disponibilité lors des études microanalytiques.

- à Monsieur Etienne MOHRIN pour la réalisation des dosages en spectrométrie d'absorption atomique et pour sa contribution très active et ses idées originales lors de la mise en place des dispositifs expérimentaux.

- à Jacques MERSCH pour la communication des données concernant le taux de contamination des populations naturelles de Dreissènes.

- à Mesdames Danielle BEUFILS, Mireille OLLIVIER, Nathalie KLEINEN et Antoinette MEYER pour leur gentillesse et leur disponibilité.

C'est avec un grand plaisir que je remercie mes camarades du laboratoire pour leur bonne humeur permanente et leurs discussions fructueuses: P. ROUSELLE, M.C. PELTRE, L. LEGLIZE, P.WAGNER, M. GIGLEUX, M. BENYAHIA, A. MOUABAD, B. CLAVERI, R. MARZOU

Enfin, à ma famille et mes amis qui m'ont toujours soutenus et supportés pendant ces années de recherches.

## SOMMAIRE

	Page
<b>AVANT-PROPOS</b>	18
<b>INTRODUCTION GENERALE</b>	19

<b>PREMIERE PARTIE : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>
--

<b>I : LES HEMOCYTES CHEZ LES MOLLUSQUES</b>	23
<b>1. Types hémocytaires chez les mollusques bivalves</b>	23
1. 1. Les hémocytes non granuleux	34
1. 1. 1. Les hyalinocytes	
1. 1. 2. Les hémocytes agranuleux	
1. 2. Les hémocytes granuleux	37
1. 2. 1. Morphologie	
1. 2. 2. Nature et fonction des granulations cytoplasmiques	
<b>2. Origine et formation des hémocytes</b>	40
2. 1. Origine	40
2. 2. Hémocytogénèse	40
<b>3. Fonctions des hémocytes</b>	42
3. 1. Cicatrisation des tissus et de la coquille	42
3. 2. Transport et digestion des aliments	43
3. 3. Défense interne de l'organisme	43
3. 3. 1. La phagocytose	
3. 3. 1. 1. Moyens d'étude	
3. 3. 1. 2. Chimiotactisme, reconnaissance et adhérence	
3. 3. 1. 3. Endocytose	

3. 3. 1. 4. Dégradation intracellulaire	
3. 3. 2. Facteurs humoraux	
3. 3. 2. 1. Enzymes lysosomales	
3. 3. 2. 2. Facteurs cytotoxiques	
3. 3. 2. 3. Lectines	
3. 4. Transport et excrétion	50
<b>II : LE SYSTEME EXCRETEUR</b>	<b>50</b>
<b>1. Les glandes péricardiales</b>	<b>51</b>
1. 1. Localisation des glandes péricardiales chez les bivalves	51
1. 2. Morphologie	53
1. 3. Ultrafiltration et sécrétion	55
<b>2. Les reins chez les bivalves</b>	<b>57</b>
2. 1. Localisation, morphologie et physiologie	58
2. 2. Nature et fonction des concrétions rénales	59
<b>III : LES MECANISMES DE LA BIOACCUMULATION ET DE LA DETOXIFICATION METALLIQUE CHEZ LES MOLLUSQUES</b>	<b>62</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>62</b>
1. 1. Eléments essentiels, éléments non essentiels	62
1. 2. Notion de détoxification et de bioaccumulation	64
<b>2. Prise du métal</b>	<b>65</b>
2. 1. Prise à partir de la phase dissoute	67
2. 2. Prise à partir de la phase particulaire	68
2. 3. Devenir des métaux dans les organes	69
<b>3. Stockage et transport des métaux par les constituants de l'hémolymphe</b>	<b>70</b>
3. 1. Capacité d'accumulation des métaux par les hémocytes	71
3. 2. Capacité de transport des métaux par les hémocytes	72
3. 3. Localisation et forme de stockage métallique	73
3. 4. Transport des métaux par le sérum	75
<b>4. Sites et mécanismes d'accumulation, de détoxification et d'excrétion des métaux dans les organes excréteurs</b>	<b>76</b>



4. 1. Concentration métallique dans les glandes péricardiales	76
4. 2. Distribution subcellulaire des métaux dans les reins des bivalves	77
4. 2. 1. Stockage des métaux par liaison à des protéines spécifiques	
4. 2. 2. Stockage des métaux dans les vésicules membranaires	
4. 2. 2. 1. Au niveau de granules minéraux	
4. 2. 2. 2. Au niveau du système lysosomal	
<b>IV : EFFETS CELLULAIRES ET BIOCHIMIQUES DES METAUX</b>	<b>84</b>
<b>1. Effets des métaux sur la population hématocytaire</b>	<b>84</b>
1. 1. Effets sur le nombre de cellules	84
1. 2. Effets sur les capacités phagocytaires	85
<b>2. Effets des métaux sur le système lysosomal</b>	<b>86</b>

<b>DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES</b>
---

<b>I : MATERIEL BIOLOGIQUE</b>	<b>89</b>
<b>1. La moule zébrée, <i>Dreissena polymorpha</i></b>	<b>89</b>
1. 1. Systématique et répartition géographique	89
1. 2. Morphologie, anatomie générale	89
1. 3. Physiologie générale	90
1. 3. 1. Reproduction	
1. 3. 2. Nutrition	
1. 4. Ecologie	92
1. 5. Réponse à la contamination métallique	92
<b>II : METHODES</b>	<b>93</b>
<b>1. Techniques de microscopie optique</b>	<b>93</b>
1. 1. Prélèvement de l'hémolymphe	93
1. 2. Frottis d'hémolymphe	94
1. 2. 1. Préparation des frottis d'hémolymphe	
1. 2. 2. Coloration des frottis d'hémolymphe	

1. 2. 3. Mise en évidence des phosphatases acides	
1. 2. 4. Mise en évidence des estérases non spécifiques	
1. 2. 5. Mise en évidence des $\beta$ -glucuronidases	
1. 2. 6. Comptage différentiel des hémocytes	
<b>1. 3. Histologie</b>	<b>96</b>
1. 3. 1. Préparation des tissus	
<b>1. 4. Histochimie</b>	<b>96</b>
1. 4. 1. Mise en évidence de l'acide urique et des urates	
1. 4. 2. Mise en évidence de la ferritine	
1. 4. 3. Détection du plomb	
1. 4. 4. Détection du zinc	
<b>2. Techniques de microscopie électronique</b>	<b>97</b>
2. 1. Préparation des échantillons pour la microscopie électronique à transmission	97
2. 1. 1. Fixation et inclusion des tissus	
2. 1. 2. Fixation et inclusion des hémocytes	
2. 1. 3. Coupes, coloration et contrastes	
2. 2. Préparation des échantillons pour la microanalyse de RX	99
2. 2. 1. Pour le M.E.T.	
2. 2. 2. Pour le M.E.B.	
2. 3. Cytochimie	100
2. 3. 1. Mise en évidence des phosphatases acides	
2. 3. 2. Mise en évidence des activités péroxydasiques	
2. 3. 3. Capture de traceurs par les organes du système excréteur	
<b>3. Techniques de microanalyse de RX</b>	<b>102</b>
3. 1. Introduction et techniques utilisées	102
3. 2. Traitements des échantillons	104
<b>4. Isolation des granules rénaux</b>	<b>104</b>
<b>5. Contamination métallique expérimentale</b>	<b>105</b>
5. 1. Dispositif expérimental	105
5. 1. 1. Choix des métaux utilisés dans les expériences de contamination	
5. 1. 2. Système de contamination métallique	
5. 1. 3. Culture du phytoplancton	
5. 1. 4. Dosage du plomb et du zinc dans l'eau et dans les Dreissènes	

5. 1. 4. 1. Dans l'eau	
5. 1. 4. 2. Dans les organismes	
5. 2. Effets des métaux sur les hémocytes	109
5. 2. 1. Effets sur le nombre total d'hémocytes	
5. 2. 2. Effets des métaux sur les capacités phagocytaires des hémocytes	
5. 2. 2. 1. Effets des métaux <i>in vivo</i>	
5. 2. 2. 2. Effets des métaux <i>in vitro</i>	
5. 3. Effets biochimiques des métaux, approche expérimentale préliminaire	111
5. 3. 1. Evaluation cytochimique	
5. 3. 1. 1. Les phosphatases acides	
5. 3. 1. 2. Les $\beta$ glucuronidases	
5. 3. 2. Dosage quantitatif des phosphatases acides	
5. 3. 2. 1. Préparation des échantillons d'hémolymphe	
5. 3. 2. 2. Mesure de l'activité des phosphatases acides	
5. 3. 2. 3. Mesure de l'activité des transaminases	
5. 3. 3. Dosage des protéines	
5. 3. 4. Essais d'inhibition des phosphatases acides par les métaux	
6. Analyse statistique	113

<p><b>TROISIEME PARTIE : LES HEMOCYTES ET LE SYSTEME EXCRETEUR DE <i>Dreissena polymorpha</i></b></p>
---

<b>I : LES HEMOCYTES</b>	115
<b>1. Morphologie cellulaire</b>	115
1. 1. Observation des couches monocellulaires d'hémocytes	115
1. 1. 1. Les hyalinocytes	
1. 1. 2. Les hémocytes granuleux	
1. 2. Observation des hémocytes en microscopie optique sur coupes histologiques et semi fines	116
1. 2. 1. Les hyalinocytes	
1. 2. 2. Les hémocytes granuleux	
<b>2. Morphologie ultrastructurale</b>	117

2. 1. Les hyalinocytes	117
2. 2. Les hémocytes granuleux	120
<b>3. Activités enzymatiques dans les hémocytes</b>	<b>121</b>
3. 1. Cytochimie enzymatique des hémocytes sur couches monocellulaires	121
3. 1. 1. Activité des phosphatases acides	
3. 1. 2. Activité des $\beta$ glucuronidases	
3. 1. 3. Activité des estérases non spécifiques	
3. 2. Localisation ultrastructurale des phosphatases acides	122
<b>4. Comptage différentiel des hémocytes</b>	<b>123</b>
<b>5. Discussion</b>	<b>123</b>
<b>II : LES ORGANES DU SYSTEME EXCRETEUR</b>	<b>127</b>
<b>1. Les glandes péricardiales</b>	<b>127</b>
1. 1. Localisation	127
1. 2. Ultrastructure	127
<b>2. Les reins</b>	<b>129</b>
2. 1. Localisation et morphologie	129
2. 2. Ultrastructure	131
2. 3. Structure et nature des granules rénaux	132
2. 3. 1. Structure et ultrastructure des granules	
2. 3. 2. Composition des concrétions	
2. 3. 3. Analyse des granules isolés	
<b>3. Discussion</b>	<b>135</b>

<p><b>QUATRIEME PARTIE: CONTAMINATION EXPERIMENTALE DE <i>D. polymorpha</i> PAR LE PLOMB ET LE ZINC, LOCALISATION TISSULAIRE ET CELLULAIRE DES METAUX</b></p>
---

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>145</b>
------------------------	------------

<b>II. CONCENTRATION DES METAUX DANS LES DREISSENES</b>	<b>145</b>
<b>III. LOCALISATION HISTOLOGIQUE DES METAUX</b>	<b>146</b>
1. Localisation du plomb	146
2. Localisation du zinc	147
<b>IV. LOCALISATION CELLULAIRE DES METAUX</b>	<b>147</b>
1. Localisation du plomb	147
1. 1. Dans les hémocytes	147
1. 2. Dans les podocytes des glandes péricardiales	150
1. 3. Dans les cellules rénales	151
2. Localisation du zinc	151
<b>V. DISCUSSION</b>	<b>156</b>

<p><b>CINQUIEME PARTIE: EFFETS DES METAUX CHEZ <i>Dreissena polymorpha</i>, APPROCHE EXPERIMENTALE PRELIMINAIRE</b></p>
---

<b>I : EFFETS CELLULAIRES ET BIOCHIMIQUES DES METAUX</b>	<b>160</b>
1. Effets des métaux sur les hémocytes	160
1. 1. Effets des métaux sur le nombre total de cellules circulantes	160
1. 2. Effets de la contamination métallique sur les capacités phagocytaires des hémocytes	162
1. 2. 1. Effets des métaux <i>in vivo</i>	
1. 2. 2. Effets des métaux <i>in vitro</i>	
2. Impact des métaux sur les principales enzymes lysosomales	164
2. 1. Evaluation cytochimique	164
2. 1. 1. Evaluation des phosphatases acides	
2. 1. 2. Evaluation des $\beta$ glucuronidases	
2. 2. Mesure quantitative de l'activité des phosphatases acides	166

**II : DISCUSSION**

**169**

**CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES**

**REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**181**

**PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES**

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1. Aspect des hémocytes de *C. gigas* sur frottis d'hémolymphe (Auffret, 1985).
- Figure 2. Représentation semi-schématique de l'ultrastructure des hémocytes de *C. gigas* (Ruddell, 1971c).
- Figure 3. Modèle général de renouvellement des hémocytes chez les bivalves (Mix, 1976).
- Figure 4. Modèle de filiation des hémocytes chez les bivalves selon Cheng (1981).
- Figure 5. Représentation schématique du système excréteur et du système vasculaire associé de *M. edulis*. (Pirie et George, 1979)
- Figure 6. Péricarde et organes associés de *D. polymorpha*. (Morton, 1969b).
- Figure 7. Voies générales d'excrétion, chez les bivalves (Morse, 1987).
- Figure 8. Rôle des ligands dans le transport et l'accumulation des métaux dans la cellule. (d'après Williams, 1981 in Simkiss, 1982).
- Figure 9. Absorption des métaux divalents chez les bivalves. (Cossa, 1989).
- Figure 10. Modèle illustrant la dynamique du zinc chez *M. edulis*. (George et Pirie, 1980).
- Figure 11. Voies métaboliques pour les métaux du groupe B dans les cellules animales. (George et Viarengo, 1985).
- Figure 12. Contrôle lysosomal des concentrations métalliques tissulaires et distribution subcellulaire. (George et Viarengo, 1985).
- Figure 13. Représentation schématique des sites de liaison du métal dans les lysosomes tertiaires chez *M. edulis*. (George, 1983b).
- Figure 14. Voies du métabolisme des métaux chez les bivalves. (George, 1980).
- Figure 15. *Dreissena polymorpha*.
- Figure 16. Schéma de *D. polymorpha* indiquant le sinus sanguin où l'hémolymphe est ponctionnée.
- Figure 17. Dispositif expérimental de contamination métallique.
- Figure 18 A et B. Aspect des hémocytes de *D. polymorpha* sur frottis d'hémolymphe.
- Figure 19. Représentation schématique du rein gauche de *D. polymorpha* en vue dorsale avec communication interrénale.
- Figure 20. Distribution de la taille des granules rénaux isolés chez des Dreissènes provenant de la Meuse et de la retenue du Mirgenbach

- Figure 21. A) Spectre typique de microanalyse de RX de granules rénaux isolés B) Spectre de microanalyse de RX d'un granule rénale fortement chargé en plomb
- Figure 22. Image-X de différents éléments d'un granule rénal isolé A) plomb B) phosphore C) calcium D) soufre
- Figure 23. Spectre typique de microanalyse de RX dans les hémocytes de *D. polymorpha* (A) de contrôle B) exposée au plomb
- Figure 24. Image-X de l'épithélium du tube rénal distal interne chez *D. polymorpha* exposée au plomb. Répartition A) du plomb B) du soufre C) du calcium D) du phosphore
- Figure 25. Image-X de l'épithélium du tube rénal distal interne chez *D. polymorpha* exposée au zinc. Répartition A) du zinc B) du phosphore C) du soufre D) du calcium E) du fer
- Figure 26. Nombre d'hémocytes chez *D. polymorpha* exposée au plomb et au zinc.
- Figure 27. Effets des métaux *in vivo* sur les capacités phagocytaires de *D. polymorpha*.
- Figure 28. Effets des métaux *in vitro* sur les capacités phagocytaires de *D. polymorpha*.
- Figure 29. Répartition des différentes classes d'abondance des phosphatases acides dans les hémocytes de *D. polymorpha* exposée au plomb et au zinc.
- Figure 30. Taux d'hémocytes montrant une activité pour les  $\beta$  glucuronidases chez *D. polymorpha* exposée au plomb et au zinc.
- Figure 31. Activité spécifique des phosphatases acides dans les hémocytes de *D. polymorpha* exposée au plomb et au zinc.
- Figure 32. Activité spécifique des phosphatases acides dans le sérum de *D. polymorpha* exposée au plomb et au zinc.
- Figure 33. Essai d'inhibition des phosphatases acides par le plomb et le zinc.
- Figure 34. Schéma de synthèse remplaçant les hémocytes, la glande péricardiale et le rein dans le devenir du plomb dans l'organisme de *D. polymorpha*



## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau I: Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Crassostrea virginica***

**Tableau II: Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Crassostrea gigas***

**Tableau III: Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Ostrea edulis***

**Tableau IV: Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Mya arenaria***

**Tableau V: Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Mercenaria mercenaria***

**Tableau VI: Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Mytilus edulis***

**Tableau VII: Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Anodonta grandis***

**Tableau VIII: Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Dreissena polymorpha***

**Tableau IX: Concentrations métalliques dans les parties molles de *Dreissena polymorpha* exposée au plomb et au zinc**

## LISTE DES PLANCHES

- PLANCHE I : Hémocytes de *D. polymorpha* sur couches monocellulaires
- PLANCHE II : Hémocytes de *D. polymorpha* sur couches monocellulaires
- PLANCHE III : Hémocytes de *D. polymorpha* sur couches monocellulaires
- PLANCHE IV : Hémocytes de *D. polymorpha* sur couches monocellulaires
- PLANCHE V : Hémocytes de *D. polymorpha* sur coupes histologiques et semi-fines
- PLANCHE VI : Ultrastructure des hyalinocytes de *D. polymorpha*
- PLANCHE VII : Ultrastructure des hyalinocytes de *D. polymorpha*
- PLANCHE VIII : Ultrastructure des granulocytes de *D. polymorpha*
- PLANCHE IX : Ultrastructure des granulocytes de *D. polymorpha*
- PLANCHE X : Ultrastructure des granulocytes de *D. polymorpha*
- PLANCHE XI : Ultrastructure des granulocytes de *D. polymorpha*
- PLANCHE XII : Ultrastructure des hémocytes de *D. polymorpha*. Contacts entre les hémocytes et les organes du système excréteur
- PLANCHE XIII : Révélation des phosphatases acides dans les hémocytes sur frottis
- PLANCHE XIV : Révélation des  $\beta$  glucuronidases dans les hémocytes sur frottis
- PLANCHE XV : Révélation des estérases non spécifiques dans les hémocytes sur frottis
- PLANCHE XVI : Révélation des estérases non spécifiques dans les hémocytes sur frottis
- PLANCHE XVII : Révélation de l'activité phosphatasique acide dans les hémocytes par la réaction au  $\beta$  glycérophosphate. Ultrastructure.
- PLANCHE XVIII : Révélation de l'activité phosphatasique acide dans les hémocytes par la réaction au  $\beta$  glycérophosphate. Ultrastructure.
- PLANCHE XIX : Révélation de l'activité phosphatasique acide dans les hémocytes par la réaction au  $\beta$  glycérophosphate. Ultrastructure.
- PLANCHE XX : Ultrastructure des oreillettes et de la glande péricardiale de *D. polymorpha*.
- PLANCHE XXI : Ultrastructure de la glande péricardiale de *D. polymorpha*.
- PLANCHE XXII : Ultrastructure de la glande péricardiale de *D. polymorpha*.
- PLANCHE XXIII : Ultrastructure de la glande péricardiale de *D. polymorpha*.
- PLANCHE XXIV : Ultrastructure de la glande péricardiale de *D. polymorpha*.
- PLANCHE XXV : La glande péricardiale de *D. polymorpha*.
- PLANCHE XXVI : Ultrastructure de la glande péricardiale de *D. polymorpha*.
- PLANCHE XXVII : Ultrastructure des reins de *D. polymorpha*. Rein proximal.

PLANCHE XXVIII : Ultrastructure des reins de *D. polymorpha*. Rein proximal.

PLANCHE XXIX : Ultrastructure des reins de *D. polymorpha*. Rein distal externe.

PLANCHE XXX : Ultrastructure des reins de *D. polymorpha*. Rein distal interne.

PLANCHE XXXI : Ultrastructure des reins de *D. polymorpha*. Rein distal interne.

PLANCHE XXXII : Rein distal interne de *D. polymorpha*.

PLANCHE XXXIII : Rein distal interne de *D. polymorpha*.

PLANCHE XXXIV : Ultrastructure des reins de *D. polymorpha*. Détail des concrétions dans le rein distal interne.

PLANCHE XXXV : Ultrastructure des reins de *D. polymorpha*. Détail des concrétions dans le rein distal interne.

PLANCHE XXXVI : Rein distal interne de *D. polymorpha*. Mise en évidence des composés puriques.

PLANCHE XXXVII : Mise en évidence du plomb dans les hémocytes au niveau de la branchie. Révélation au chromate de potassium.

PLANCHE XXXVIII : Mise en évidence du plomb dans les hémocytes au niveau du rein proximal et distal externe. Révélation au chromate de potassium.

PLANCHE XXXIX : Mise en évidence du plomb dans les tubules rénaux proximal et distal interne. Révélation au chromate de potassium.

PLANCHE XL : Mise en évidence du zinc au niveau des branchies. Révélation à la dithizone et au DMSO.

PLANCHE XLI : Granulocytes et mise en évidence du plomb par microanalyse de RX

PLANCHE XLII : Granulocytes chargés en métal

PLANCHE XLIII : Mise en évidence du plomb au niveau des podocytes

PLANCHE XLIV : Mise en évidence du plomb dans les granules rénaux

PLANCHE XLV : Granules rénaux chez des individus exposés au plomb

## **ABBREVIATIONS UTILISEES SUR LES PLANCHES PHOTOGRAPHIQUES**

**B : Branchie**  
**C : Concrétion**  
**Cpn : Citerne périnucléaire**  
**Co : Fibre de collagène**  
**Ect : Ectoplasme**  
**En : Endoplasme**  
**Eu : Espace urinaire**  
**F : Fente de filtration**  
**G : Appareil de Golgi**  
**Gl : Glycogène**  
**Gp : Glande péricardiale**  
**Gr : Granule**  
**Gra : Granulocyte**  
**H : Hémocyte**  
**He : Hémolymphe**  
**Hy : Hyalinocyte**  
**I : Invagination**  
**L : Lumière du tubule**  
**Lb : lame basale**  
**M : Mitochondrie**  
**M.E.B. : Microscope électronique à balayage**  
**M.E.T. : Microscope électronique à transmission**  
**Mi : Microvillosités**  
**N : Noyau**  
**Nu : Nucléole**  
**O : Oreillette**  
**P : Podocyte**  
**Pc : Prolongement cytoplasmique**  
**Pe : Pédicelle**  
**Rd : Rein distal**  
**R : Rectum**  
**REG : Réticulum endoplasmique rugueux**  
**REL : Réticulum endoplasmique lisse**  
**Rp : Rein proximal**  
**Va : Vacuole**  
**Ve : Vésicule d'endocytose**  
**VI : Vésicule lipidique**  
**WGA : Wheat germ agglutinin**

## AVANT-PROPOS

Le travail exposé dans ce document s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche sur la moule zébrée *Dreissena polymorpha* réalisé au Centre de Recherches Ecologiques de l'Université de Metz. Cet ensemble d'études s'est attaché à:

- étudier certains aspects de l'anatomie (Giamberini, 1987), de la biologie (Tourari, 1988) et de la physiologie (Ebersveiller, 1988; Mouabad, 1991) de cet organisme sentinelle à partir d'observations réalisées *in situ* et *in vitro*

- définir la Dreissène comme indicateur biologique de pollution chimique telle que la contamination par les métaux (Léglize et Crochard, 1987; Maarouf, 1988; Benyahia, 1991; Mersh, 1993), les radionucléides (Spor, 1989) et les organochlorés (Jeanjean, 1989)

- localiser et identifier les sites d'accumulation des métaux (zinc, plomb) et définir une première approche des voies de pénétration, de transport et de détoxification des contaminants métalliques (Giamberini, 1987; Maarouf, 1988; Benyahia, 1991)

Dans ce contexte, il était alors indispensable d'approfondir nos connaissances des cellules circulantes et du système excréteur, ces deux compartiments internes jouant un rôle fondamental dans le transport, la détoxification et l'excrétion.

Pour cela, j'ai dû successivement me former aux techniques de microscopie optique, de microscopie électronique à transmission et de microscopie électronique à balayage, d'histochimie et de microanalyse de rayons X, ainsi qu'aux techniques propres à l'écotoxicologie en laboratoire.

## INTRODUCTION GENERALE

Les mollusques sont, depuis plusieurs décennies, largement utilisés comme bioindicateurs de la contamination des écosystèmes aquatiques que ce soit en milieu marin ou continental. Parmi ceux-ci, les bivalves filtreurs constituent d'excellents bioaccumulateurs car ils sont capables d'accumuler et de concentrer de nombreux xénobiotiques présents dans leur environnement et en particulier les métaux.

Ainsi concentrés dans les organismes, les micropolluants métalliques présentent l'avantage d'être plus facilement détectés que dans l'eau où ils demeurent à l'état de trace. Il représentent également la fraction de métal réellement disponible pour les êtres vivants, même si, comme le souligne Simkiss (1982), une seule espèce est incapable d'assimiler toutes les formes d'un métal présent dans le milieu. Enfin, la charge métallique des individus, accumulée sur une longue période de temps, reflète plus fidèlement l'historique de la contamination d'un écosystème (Simkiss, 1982; Mauri, 1985).

Selon Phillips (1977), les organismes accumulateurs qui peuvent être utilisés avec profit comme bioindicateurs de pollution par les métaux lourds doivent être peu ou pas capables de réguler les concentrations internes de ces éléments, afin de les fixer dans les tissus. Une corrélation simple doit relier les concentrations métalliques de l'organisme à celles de l'eau. Ils doivent être abondants, représentatifs du site de prélèvement et facilement repérables dans les zones de contrôle. Enfin, ils doivent pouvoir présenter une résistance à des concentrations élevées et être utilisables pour des expériences au laboratoire.

Les premières études de biomonitoring ont été réalisées en milieu marin dans le cadre du "mussel watch" avec *Mytilus edulis* qui reste une des espèces les plus étudiées (Goldberg *et al.*, 1978; Bayne, 1989; Cossa, 1989).

Dans les systèmes dulçaquicoles, plusieurs espèces de bivalves sont utilisées avec succès dans le même type de programme comme *Corbicula sp* (Doherty, 1990) et *D. polymorpha*, maintenant largement en Europe (Karbe *et al.*, 1975; Leglize et Crochard, 1987; Kraag *et al.*, 1991; Mersh *et al.*, 1992).

La plus grande partie de la littérature internationale concernant les concentrations métalliques dans les organismes aquatiques se résume à des listes de données qui n'apportent pas ou peu d'explication sur la signification biologique.

L'ensemble des résultats acquis à ce jour montre également une grande variation des teneurs en métaux influencées par différents facteurs, soit biotiques liés à la croissance (âge, taille, poids) ou à la reproduction (sexe et gamétogénèse), soit abiotiques tels que la température, la salinité, la production primaire ou encore les interactions métalliques, rendant en définitive l'interprétation de l'accumulation des micropolluants par les invertébrés et les bioindicateurs en particulier très difficile.

La recherche d'explications biologiques aux teneurs métalliques analysées dans les organismes et la naissance de techniques plus performantes ont conduit au développement d'études sur les processus impliqués dans le métabolisme des métaux. Les mécanismes de prise, de contrôle intracellulaire et de détoxification des métaux ont été revus et fait l'objet d'ouvrages de synthèse chez les mollusques (George, 1980; Simkiss et Mason, 1983; George et Viarengo, 1985; Rainbow *et al*, 1990).

Dans la classe des bivalves, à de rares exceptions près, seules les espèces marines dont la contamination métallique constituerait un danger potentiel pour la santé de l'homme, ont fait l'objet de telles recherches. Pourtant, *Dreissena polymorpha* soulève un intérêt croissant tant dans les études de biomonitoring que dans les recherches de moyens de lutte contre cet organisme à grande capacité d'invasion, et ce non seulement en Europe mais également en Amérique du Nord.

Dans le présent travail nous nous sommes orientés, compte tenu des connaissances actuelles de ce mollusque, plus particulièrement vers l'étude des voies de transport, de détoxification et de stockage de deux métaux, l'un essentiel: le zinc et l'autre non essentiel: le plomb. Ces deux métaux sont actuellement souvent présents en concentrations élevées dans certains cours d'eau lorrains tel que la Moselle et dans certains de ses affluents du secteur aval.

La première partie de ce mémoire est consacrée à l'analyse bibliographique des compartiments impliqués dans le transport, le stockage, l'excrétion des métaux chez les bivalves mais aussi les gastéropodes. La classification et la caractérisation des hémocytes ont fait l'objet d'une étude bibliographique détaillée plus particulièrement pour les mollusques bivalves.

Les méthodologies adoptées pour l'expérimentation ainsi que les techniques utilisées sont présentées dans la deuxième partie.

Dans la troisième partie, nous traiterons de la caractérisation morphologique et ultrastructurale des cellules circulantes et des organes excréteurs de *D. polymorpha* ainsi que de la cytochimie enzymatique de ces structures.

La quatrième partie est consacrée à la localisation tissulaire et cellulaire des métaux à l'aide de techniques histologiques et microanalytiques dans les organes considérés.

Nous aborderons dans une cinquième partie, une étude préliminaire des effets des métaux sur les hémocytes et sur les principales enzymes lysosomales afin d'identifier d'éventuelles réponses pouvant être utilisées comme indice de stress.

Nous récapitulerons, en fin de ce mémoire sous forme d'un exposé synthétique l'ensemble de nos résultats en établissant un schéma possible du devenir dynamique des métaux chez la Dreissène.



**PREMIERE PARTIE : ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE**

# I : LES HEMOCYTES CHEZ LES MOLLUSQUES

L'étude des hémocytes, ou cellules de l'hémolymphe, de *Dreissena polymorpha* entreprise dans ce travail nous a paru intéressante pour plusieurs raisons:

- L'acquisition de données morphologiques ultra structurales et cytologiques sur les différents types d'hémocytes. En effet, exceptée une étude très ancienne réalisée par Cuénot en 1891, aucune description, à notre connaissance, ne concerne les hémocytes de *Dreissena*. Une classification est nécessaire avant d'aborder le rôle fonctionnel de chaque type cellulaire.

- Leur participation dans les mécanismes de défense interne, et plus particulièrement les processus de phagocytose et d'excrétion des corps étrangers.

- Leur intervention dans les mécanismes d'homéostasie des métaux, plus particulièrement au niveau du stockage, du transport et de l'élimination des métaux lourds.

Les nombreuses descriptions et classifications des différentes lignées d'hémocytes ont été réalisées principalement chez des espèces de bivalves marins ayant un intérêt économique certain (voir tableaux I à VIII). Les bivalves d'eau douce, sans valeur commerciale ont suscité nettement moins de curiosité.

Cependant, certaines descriptions des types hémocytaires des bivalves d'eau douce du genre *Anodonta* et *Unio* datant du siècle dernier (Cuénot, 1891; De Bruyne, 1895; Knoll, 1893) ou plus récentes (Dundee, 1953) sont rapportées par Cheng en 1981 dans un travail de synthèse concernant les cellules sanguines de bivalves.

En 1891, Cuénot décrivait trois types principaux de cellules sanguines chez *Dreissena polymorpha*:

- Les amoebocytes finement granuleux.
- Les amoebocytes peu granuleux.
- Les amoebocytes avec peu de cytoplasme autour du noyau.

Ce schéma de classification, quelque peu élaboré et modifié, va constituer un modèle de base pour toutes les classifications ultérieures concernant les hémocytes de bivalves (Narain, 1973; Cheng, 1981).

## 1. TYPES HEMOCYTAIRES CHEZ LES BIVALVES.

Les tableaux I à VIII, concernant les descriptions des diverses catégories d'hémocytes des espèces de bivalves les plus étudiées font ressortir les divergences entre les classifications établies pour une même espèce (Feng *et al.*, 1971; Cheng,

TABLEAU I. Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Crassostrea virginica*.

<i>Crassostrea virginica</i>		
Auteurs	Types cellulaires	Caractéristiques morphologiques
<b>FENG <i>et al.</i> (1971)</b> Classification basée sur la morphologie ultrastructurale.	<b>Leucocytes agranulaires</b>	
	Type I	Grand noyau oval, chromatine répartie en mottes ou en liseré autour de l'enveloppe nucléaire Cytoplasme peu abondant Vésicules de RE dilatées. Glycogène dispersé. Mitochondries regroupées
	Type II	Noyau identique au type I Cytoplasme abondant. Glycogène en amas. Mitochondries. REL en vésicules isolées, REG en longues citernes
	Type III	Noyau sphérique, chromatine dense. Nombreuses vésicules et tubules du REL REG en continuité du noyau ou localisé dans le cytoplasme.
	<b>Leucocytes granulaires</b>	Noyau rond ou oval avec ou sans nucléole Cytoplasme contenant des granules roses, bleu foncé ou réfractiles. En M. E. T : granules A à cortex finement granuleux, particules fines au centre, granules B à cortex dense, coeur clair, granules C à matériel granuleux sous la membrane
<b>FOLEY et CHENG (1972)</b> Classification basée sur les différences d'affinité tinctoriales des cytoplasmes, des noyaux et des granules.	<b>Hyalinocytes</b>	Taille des cellules fixées: 8.3 x 7.1 µm Cytoplasme peu ou pas granuleux. Filopodes ou lobopodes
	<b>Fibrocytes*</b>	Fibrocyte primaire: noyau lobé. Fibrocyte secondaire: noyau rond ou oval Taille des cellules fixées: 23.1 x 18.4 µm
	<b>Granulocytes</b>	Cytoplasme à granules basophiles, acidophiles ou réfractiles ou bien contenant une combinaison des trois types. Longs pseudopodes Taille des cellules fixées: 19.3 x 12.1 µm
<b>CHENG (1975)</b>	<b>Hyalinocytes</b>	Mêmes caractéristiques que précédemment.
	<b>Granulocytes</b>	Le cytoplasme contient du REL et du REG, des ribosomes libres ou liés, des mitochondries, des lysosomes et des gouttelettes lipidiques

\* Les fibrocytes sont en fait des granulocytes qui ont perdu leurs granules (Cheng, 1975)

TABLEAU I (suite). Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Crassostrea virginica* (suite 1)

<i>Crassostrea virginica</i>		
Auteurs	types cellulaires	caractéristiques morphologiques
RENWRANTZ <i>et al.</i> (1979) Classification basée sur les différences de taille de cellules non étalées et non fixées	<b>Hyalinocytes</b>	Cytoplasme peu ou pas granuleux. Diamètre 5 à 8 µm
	<b>Granulocytes</b>	Grands: diamètre 13 à 20 µm. Moyens: diamètre 9 à 13 µm. Petits: diamètre 3 à 9 µm
CHENG <i>et al.</i> (1980), Cheng et Downs (1988) Séparation des cellules par centrifugation à gradient de densité et identification des récepteurs membranaires	Subpopulation 1	Diamètre 3-5 µm. Correspondent aux petits granulocytes décrit par Renwrantz, (1979)
	Subpopulation 2	Diamètre 6-8 µm. Correspondent aux hyalinocytes
	Subpopulation 3	Diamètre 10-14 µm. Correspondent aux granulocytes moyens
	Subpopulation 4	Diamètre 10-14 µm
	Subpopulation 5	Agrégats ou grandes cellules  Les subpopulations 1, 2, 3, et 4 possèdent des récepteurs de surface pour la Concanavaline A et les lectines extraites de la glande à albumine de <i>Cepaea hortensis</i> et de <i>Helix pomatia</i> . La subpopulation 2 possède en plus un récepteur pour une phytohématagglutinine de germe de blé (WGA).
HAWKINS et HOWSE (1982)  Classification selon la morphologie ultrastructurale	<b>Hémocytes agranulaires</b>	Noyau rond et central. Cytoplasme peu dense, organites rares. Diamètre 4 µm
	Type I	
	Type II	Noyau central ou excentré. Cytoplasme souvent clair. Particules de glycogène. Petites vésicules claires. Rares mitochondries. REG. Quelques pseudopodes. Diamètre 6.5 µm
	Type III	Forme ovale 8.5 x 6 µm. Grand noyau excentré. Nombreux pseudopodes Nombreuses vésicules et citernes du REG Quelques inclusions paracrystallines dans l'espace périnucléaire ou dans les citernes du REG
	<b>Hémocytes granulaires</b>	Forme ronde ou ovale, 11 µm. Noyau central ou excentré Nombreux grands granules à matériel électron-dense en périphérie Petits granules denses. Granules contenant du glycogène. Golgi et REG peu abondants.

TABLEAU I (suite). Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Crassostrea virginica*

<i>Crassostrea virginica</i>		
Auteurs	types cellulaires	caractéristiques morphologiques
McCORMICK-RAY et HOWARD (1991) Classification basée sur les différences d'affinités tinctoria cellules	<b>Agranulocytes</b>	
	Type lymphoïde	Forme ronde. Petite taille, diamètre 10-12 µm Noyau central. Noyau et cytoplasme basophiles Rapport nucléocytoplasmique élevé
	Type non lymphoïde	Grande taille, diamètre de 20 à 30 µm Rapport nucléocytoplasmique faible
	Type RF ( <i>Round / Flat</i> )	Périphérie du cytoplasme légèrement ridée. Mobilité la plus faible
	Type IF ( <i>Irregular / Flat</i> )	Périphérie du cytoplasme irrégulière
	Type RO ( <i>Round / Oblong</i> )	Forme ronde ou oblongue
	<b>Granulocytes</b>	Rapport nucléocytoplasmique faible
	Type BASO ( <i>Basophile</i> )	Grande taille, diamètre 20 à 30 µm. Granules basophiles. Mobilité la plus élevée.
	Type SG ( <i>Small granulocyte</i> )	Même taille, granules plus petits et moins nombreux.
Type EOS ( <i>Eosinophile</i> )	Cellule ronde ou oblongue, diamètre 10 à 12 µm. Granules éosinophiles	

TABLEAU II. Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Crassostrea gigas* (huître japonaise).

<i>Crassostrea gigas</i>		
Auteurs	Types cellulaires	Caractéristiques morphologiques
<b>RUDELL (1971 a, b, c)</b> Classification selon la morphologie ultrastructurale	<b>Amebocytes agranulaires</b>	Noyau allongé, nucléole rare. Golgi, REL, petites mitochondries. Glycogène en particules ou en amas. Dépôts osmiophiles ressemblant à des gouttelettes lipidiques
	<b>Amebocytes granulaires</b>	Forme arrondie, diamètre 5 à 8 µm. Diamètre du noyau: 3 à 5 µm. Nucléole petit ou absent
	<b>Type acidophile</b>	Cytoplasme contient des petits granules sphériques, osmiophiles, à contenu amorphe. Diamètre 0.4 à 0.56 µm
	<b>Type basophile</b>	Cytoplasme contient des granules sphériques de 0.7 à 1.2 µm, matériel granuleux à la périphérie des granules, centre transparent
<b>AUFFRET ( 1985, 1988)</b> Classification selon la morphologie ultrastructurale	<b>POPULATION I. Hyalinocytes</b>	Diamètre 10 à 15 µm. Grand noyau, central, rond ou ovale de 5 à 7 µm Cytoplasme homogène. Mitochondries formant un corps juxtanucléaire REG peu abondant, Golgi peu développé. Vésicules claires. Vacuoles d'endocytose et lipidiques.
	<b>POPULATION II.</b>	Noyau 4 à 5 µm, excentré, chromatine en grosses mottes. Cytoplasme dense et hétérogène. Golgi dont les dictyosomes sont formés de nombreux saccules. Petites vésicules claires. Vacuoles d'endocytose et lipidiques. Glycogène.
	<b>Hémocytes agranuleux basophiles</b>	Cytoplasme homogène. Ectoplasme peu développé. REG bien développé.
	<b>Hémocytes granuleux basophiles</b>	Granulations de type A de 0.4 à 1.2 µm à cortex polymorphe qui entoure une ou deux lumières
<b>BACHERE et al. (1988)</b> Classification selon la morphologie ultrastructurale et la taille des cellules séparées par centrifugation à gradient de densité	<b>POPULATION III. Hémocytes granuleux acidophiles</b>	Granulations de type B de 0.6 µm à membrane double et matrice dense aux électrons. Ectoplasme développé. Filopodes
	<b>Hyalinocytes Fractions 1 et 2</b>	Population hétérogène, diamètre de 4 à 17 µm Rapport nucléocytoplasmique élevé. REL localisé autour du noyau, entourant des mitochondries.
	<b>Fractions 3 et 4. Fractions 5, 6 et 7</b>	Quelques grandes vésicules claires cytoplasmiques Rapport nucléocytoplasmique faible. Nombreuses vésicules polymorphes et claires Quelques vésicules électron denses, probablement de nature lipidique. R. E. G. très développé, phagosome, glycogène, mitochondries. Golgi non observé.
	<b>Granulocytes</b>	Noyau excentré, chromatine condensée. Nucléole absent. Mitochondries. Vésicules membranaires
	<b>Type I</b>	Présence dans le cytoplasme de granules électron clairs. Particules de glycogène. R. E.
	<b>Type II</b>	Présence dans le cytoplasme de granules osmiophiles à matrice finement granuleuse

TABLEAU III. Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Ostrea edulis* (huître plate).

<i>Ostrea edulis</i>		
Auteurs	Types cellulaires	Caractéristiques morphologiques
PODER (1980)  Classification selon la morphologie ultrastructurale	<b>Cellules souches</b>	Forme arrondie, diamètre 10µm. Large noyau lobé. Nucléole. Chromatine irrégulière. Cytoplasme réduit, peu de granules.
	<b>Hyalinocytes</b>	Forme arrondie, diamètre 6 à 8 µm. Large noyau central. Chromatine en amas. Cytoplasme réduit hyalin, basophile. Mitochondries, REG.
	<b>Hémocytes granuleux</b>	Forme variable, 15 à 20 µm. Petit noyau excentré, chromatine compacte. Nombreux granules acidophiles, basophiles ou neutrophiles. Mitochondries, REL peu développé.
AUFFRET (1985, 1989)  Classification selon la morphologie ultrastructurale	<b>POPULATION I</b>	Noyau central, chromatine condensée en petites mottes
	<b>Hyalinocytes</b>	Diamètre 10µm environ. Rapport nucléocytoplasmique élevé. Nombreuses mitochondries, REL, REG dilaté. Golgi peu développé. Quelques granules à matrice amorphe. Vacuoles d'endocytose, vésicules lipidiques. Glycogène. Corps résiduels.
	<b>Population II</b>	Rapport nucléocytoplasmique faible Noyau excentré. Chromatine en grosses mottes. Cytoplasme hétérogène. Nombreuses mitochondries et petites vésicules claires
	<b>Hémocytes agranuleux</b>	Golgi absent, petites vésicules denses, vacuoles d'endocytose.
	<b>Hémocytes granuleux</b>	Golgi très développé . Nombreuses granulations à centre clair. Vacuoles lipidiques. Glycogène. corps résiduels.

TABLEAU IV. Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Mya arenaria*.

<i>Mya arenaria</i>		
Auteurs	Types cellulaires	Caractéristiques morphologiques
<b>HUFFMAN et TRIPP (1982)</b> Classification basée sur les différences d'affinité tinctoriale des cellules	<b>Agranulocyte (23.5 %)</b>	Diamètre 5.43 $\mu\text{m}$ . Noyau 3.35 $\mu\text{m}$
	<b>Granulocytes (76.5 %)</b>	Diamètre 7.47 $\mu\text{m}$ . Noyau 3.39 $\mu\text{m}$ Granules éosinophiles, basophiles ou réfractiles. Présence de phosphatases acides et alcalines, d'estérases. Glycogène et lipofuschine dans le cytoplasme
<b>SEILER et MORSE (1988).</b> Classification selon la morphologie ultrastructurale	<b>Agranulocytes</b>	Forme arrondie , 7 $\mu\text{m}$ . environ . Grand noyau, chromatine condensée en mottes. Cytoplasme sans dépôts granuleux, vésicules claires. Amas de glycogène. Mitochondries, REG et Golgi abondants.
	<b>Granulocytes</b>	Forme arrondie , 7 $\mu\text{m}$ . environ. Noyau lobé, chromatine en mottes. Nombreuses granulations électron-denses de 0.08 à 0.5 $\mu\text{m}$ . Mitochondries et Golgi apparemment absents. REL peu développé, peu ou pas de glycogène



TABLEAU V. Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Mercenaria mercenaria*

<i>Mercenaria mercenaria</i>		
Auteurs	Types cellulaires	Caractéristiques morphologiques
<p>FOLEY et CHENG (1974) Classification selon les affinités tinctoriales et le comportement <i>in vitro</i> des cellules</p>	Cellules non granuleuses	
	<b>Hyalinocytes</b>	Grand noyau ovale et excentré. Cytoplasme contenant des inclusions vermiformes (mitochondries), vacuoles. Peu ou pas de filopodes.
	<b>Fibrocytes*</b>	Forme allongée. Noyau excentré. Inclusions vermiformes (peut-être mitochondries), corps réfractiles dans le cytoplasme
	Cellules granuleuses	
	<b>Granulocytes</b>	Noyau compact et excentré. Granules acidophiles et basophiles. Vacuoles. Nette séparation entre endoplasme et ectoplasme. Filopodes.
<p>CHENG (1975)  Classification basée sur la présence de granules et de filopodes.</p>	<b>Hyalinocytes</b>	Cytoplasme contenant quelques vésicules opaques ou claires. Gouttelettes lipidiques. Glycogène. Appareil de Golgi et centrosome absents. REL
	<b>Granulocytes</b>	Granules denses. Mitochondries. Vésicules claires. Lysosomes. Granules de glycogène. Golgi. REL, REG.
<p>MOORE et EBLE (1977) Classification basée sur la taille des cellules et de leurs noyaux, le nombre de granules et le rapport entre l'endo et l'ectoplasme.</p>	<b>Agranulocytes (2 %)</b>	Diamètre de 5 $\mu\text{m}$ . $\pm$ 0.68. Noyau central. Chromatine en liseré périnucléaire ou dispersée. Cytoplasme dépourvu de granules
	<b>Petits granulocytes (61%)</b>	Longueur de 28 $\mu\text{m}$ . Noyau oval et excentré. Quatre types de granules: arrondis, en pointillés, ronds et réfractiles, filamenteux.
	<b>Grands granulocytes (37 %)</b>	Longueur de 45 $\mu\text{m}$ . Mêmes caractéristiques, mais les granules n'occupent qu'un tiers de la cellule. Filopodes. Mobilité limitée.

\* Les fibrocytes ont été identifiés comme des "granulocytes dépassés" (Cheng, 1975)

TABLEAU VI. Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Mytilus edulis* (moule marine)

<i>Mytilus edulis</i>		
Auteurs	Types cellulaires	Caractéristiques morphologiques
<p>MOORE et LOWE (1977)</p> <p>Classification selon la morphologie ultrastructurale et les affinités tinctoriales des cellules</p>	<b>Lymphocytes basophiles</b>	Sphérique, 4 à 6 µm. Grand noyau. Cytoplasme basophile, hyalin et peu abondant. Pseudopodes, quelques granules et vacuoles. Peu de mitochondries, REL parallèle au noyau.
	<b>Grands hémocytes basophiles ou macrophages</b>	Noyau irrégulier. Cytoplasme abondant. Nombreuses inclusions membranaires à électron densité variable, correspondant à des phagosomes ou à des phagolysosomes
	<b>Granulocytes éosinophiles</b>	Forme souvent sphérique, 7 à 12 µm. Noyau central, hétérochromatine en mottes. Nucléole central Cytoplasme eosinophile contenant des granules ronds à électron densité variable. RE peu abondant. Glycogène.
<p>RASMUSSEN <i>et al.</i> (1985)</p> <p>Classification selon la morphologie ultrastructurale</p>	<b>Leucocytes agranulaires</b>	Forme circulaire ou ovale, 5 x 5.9 µm. Noyau réniforme ou lobé. Cytoplasme basophile. Ribosomes, REL, Mitochondries, Golgi.
	<b>Leucocytes granulaires</b>	Cytoplasme contenant des granules acidophiles, basophiles ou un mélange des deux types - Cellules de petite taille, 6.4 x 7.4 µm. Noyau lobé. REL, ribosomes libres, mitochondries, Golgi. Nombre variable de petits granules ronds situés autour du noyau à matrice finement granuleuse, variablement électron dense. La matrice centrale est entourée d'un halo clair. - Cellules de grandes tailles, 9.2 x 10.1 µm. Noyau non lobé. Cytoplasme complètement occupé par des granules à contenu finement granuleux et électron densité variable entouré ou non d'un halo clair et par quelques mitochondries et du REL.
<p>PIPE, (1990)</p> <p>Identification des récepteurs de surface membranaire. Corrélation avec la morphologie ultrastructurale.</p>	<b>Granulocytes</b>	
	Type I	Granulocytes dont les petits granules (0.2-0.3 µm) lient les lectines extraites de <i>H. pomatia</i>
	Type II	Granulocytes dont les grands granules (0.5-1.5 µm) lient les lectines extraites de germe de blé (WGA)
	<b>Hyalinocytes</b>	

TABLEAU VII. Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Anondonta grandis*

<i>Anondonta grandis</i>		
Auteurs	Types cellulaires	Caractéristiques morphologiques
DUNDEE (1953) <i>in</i> Cheng (1981)	Amoebocytes éosinophiles granuleux (85 %) Amoebocytes basophiles granuleux (7 %) Macronucléocytes (8 %)	Taille 8 à 20 µm. Noyau oval excentré. Granules éosinophiles  Taille 7 à 20 µm. Granules basophiles, parfois éosinophiles  Grand noyau. Cytoplasme agranuleux acidophile.

- 32 -

TABLEAU VIII. Désignation et caractéristiques des hémocytes de *Dreissena polymorpha* (moule zébrée)

<i>Dreissena polymorpha</i>		
Auteurs	Types cellulaires	Caractéristiques morphologiques
CUENOT (1891) <i>in</i> Cheng (1981)	Amoebocytes peu granuleux Amoebocytes à fins granules Amoebocytes basophiles  Erythrocytes	Taille 8 x 12 µm. Granules biréfringents, bleutés ou sans couleur.  Mêmes caractéristiques  Taille 8 x 12 µm. Cytoplasme réduit. Pas de granules  Forme variable. Rougeâtres. 20 x 30 µm

1975) et le manque d'un modèle général et cohérent pour l'ensemble des mollusques bivalves.

Dans les années 70, certains auteurs ont basé leur classification sur des critères aussi différents que : la morphologie cellulaire ou l'aspect du cytoplasme (Foley et Cheng, 1972), la taille des cellules (Renwantz *et al.*, 1979) ou les différences d'affinités tinctoriales du noyau, du cytoplasme et de ses granulations (Foley et Cheng, 1974; Moore et Lowe, 1977).

En se référant aux descriptions déjà établies et à ses propres observations concernant de nombreuses espèces de bivalves, Cheng (1981) propose un modèle également basé sur des critères morphologiques et ultrastructuraux. Il sépare ainsi deux grandes lignées d'hémocytes:

- Les **hyalinocytes**, constitués d'un cytoplasme peu abondant, contenant quelques granules et entourant un noyau de grande taille.

- Les **granulocytes**, contenant de nombreux granules caractéristiques. Ils possèdent une activité phosphatasique acide relativement élevée. Ils produisent des pseudopodes et des filopodes et sont très actifs dans les phénomènes de phagocytose.

Cependant, par centrifugation à gradient de densité couplée à l'utilisation de marqueurs de surface membranaires, cinq populations d'hémocytes (quatre populations de granulocytes, une de hyalinocytes) sont séparées chez *Crassostrea virginica*. Chaque classe de cellules montre également une activité enzymatique plus ou moins importante, indiquant ainsi des différences fonctionnelles dans la population de granulocytes (Cheng *et al.*, 1980; Cheng et Downs, 1988).

Plus récemment, Pipe (1990) utilise les capacités de liaison spécifiques des lectines et la microscopie électronique à transmission (M. E. T.) pour différencier les types hémocytaires. Ses résultats ne lui permettent pas d'établir de corrélation spécifique entre les différentes morphologies ultrastructurales des hémocytes et les lectines se liant à leur surface. Il divise néanmoins les granulocytes de *M. edulis* en deux catégories en fonction des différents constituants membranaires des petits et des grands granules.

Par cette approche, plusieurs auteurs ont distingué des sous-populations d'hémocytes en utilisant des anticorps monoclonaux comme marqueurs de surfaces membranaires chez les gastéropodes d'eau douce *Lymnea stagnalis* (Dikkeboom *et al.*, 1985; 1988) et *Biomphalaria glabrata* (Yoshino et Granath Jr, 1983).

En gardant le modèle proposé par Cheng, confirmé depuis par d'autres auteurs, Auffret (1988), précise cette classification en étudiant les hémocytes chez cinq espèces de bivalves marins. Il utilise la microscopie électronique couplée à des techniques cytochimiques et sépare toujours les hémocytes en deux grandes catégories. Les variations morphologiques observées dans chaque type cellulaire sont attribuées à des états cytogénétiques et physiologiques différents. Il distingue donc :

- Les hémocytes non granuleux, regroupant les hyalinocytes et les hémocytes agranuleux. Ces derniers appartiennent à la même lignée cellulaire que les granulocytes mais ne possèdent pas de granules (Auffret, 1985; 1989).

- Les hémocytes granuleux ou granulocytes.

Ce modèle répond avec succès au classement des hémocytes de nombreuses espèces de mollusques bivalves mais n'échappe pas à la règle des exceptions. En effet, un type supplémentaire, le granulocyte acidophile, est différencié chez *Crassostrea gigas* (Ruddell, 1971b; Auffret, 1989).

## 1. 1 LES HEMOCYTES NON GRANULEUX

### 1. 1. 1. Les hyalinocytes (Figures 1 a, b et Figure 2 a)

Autrefois utilisé, le terme lymphocyte a été abandonné au profit de hyalinocyte. En effet, ce terme correspond à un type particulier de cellules sanguines assurant, chez les vertébrés, certaines fonctions précises telle la production d'anticorps qui n'est pas retrouvée chez les invertébrés (Anderson, 1981).

Les descriptions morphologiques des hyalinocytes sont homogènes chez toutes les espèces étudiées. Leur cytoplasme est peu abondant, contient peu ou pas de granules (Renwartz *et al.*, 1979). Le noyau rond ou ovale est en position centrale, sa chromatine est condensée en mottes (Feng *et al.*, 1971; Poder, 1980; Auffret, 1989). Le rapport nucléocytoplasmique, proche de 0.7 reste toujours élevé (Bachère *et al.*, 1988; McCormick-Ray *et Howard*, 1991).

La microscopie électronique a permis d'observer quelques granules ou vésicules claires et des vacuoles d'endocytose (Auffret, 1985, 1988) ainsi que des gouttelettes lipidiques (Ruddell, 1971a).

Ils sont capables de produire des filopodes et des lobopodes chez *C. virginica* (Foley *et Cheng*, 1972).

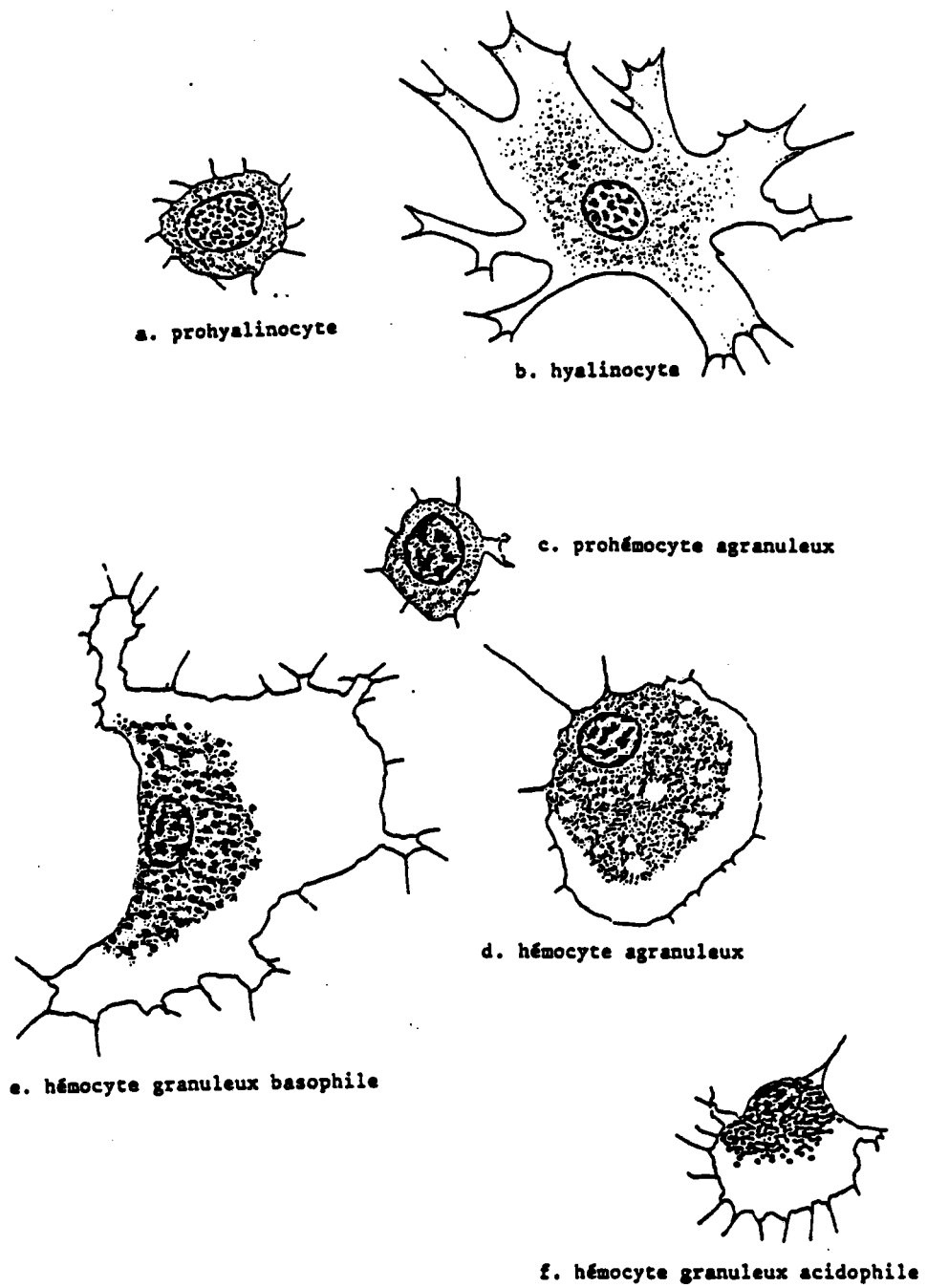


Figure 1 : Aspect des hémocytes de *C. gigas* sur frottis d'hémolymphe (Auffret, 1985).

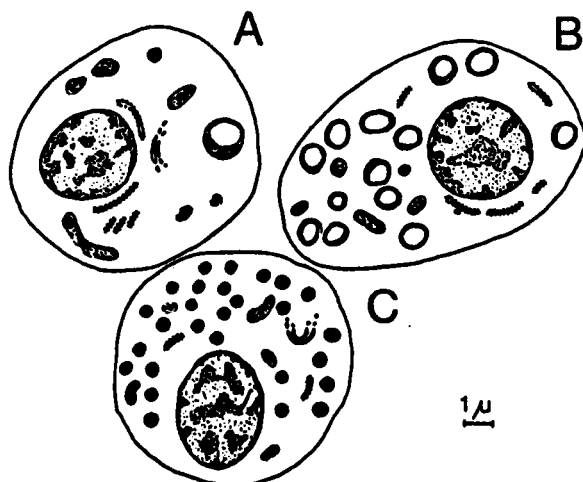


Figure 2 : Représentation semi-schématique de l'ultrastructure des hémocytes de *C. gigas*. A, hémocyte non granuleux. B, hémocyte granuleux basophile. C, hémocyte granuleux acidophile. (Ruddell, 1971c).

Leur comportement *in vitro* est différent des autres types cellulaires (McCormick-Ray et Howard, 1991). En effet, leur mobilité plus faible que celle des granulocytes, expliquerait selon les auteurs, des capacités de phagocytose et une participation aux mécanismes de défense interne réduites.

Même s'ils ne possèdent pas les capacités phagocytaires les plus élevées, les hyalinocytes de *C. virginica* et de *M. mercenaria* restent capables d'assurer cette fonction (Foley et Cheng, 1974; Cheng, 1975).

Chez *M. edulis*, les lymphocytes décrits par Moore et Lowe (1977) sont capables de phagocyter des particules de carbone injectées expérimentalement. Ces particules se retrouvent ensuite dans des phagolysosomes associées à des hydrolases lysosomales.

Au contraire, Ruddell (1971b) montre qu'il est le seul type cellulaire capable de phagocyter des particules de carmin, de carbone et des bactéries injectées à *C. gigas*.

#### 1. 1. 2. Les hémocytes agranuleux (Figures 1 c, d)

Décrit chez *Ostrea edulis* et chez *C. gigas*, ce type est également appelé hémocyte vésiculeux (Auffret, 1988, 1989). Plusieurs caractéristiques morphologiques semblables, notamment au niveau du noyau, l'apparente à la lignée granulocytaire. Son cytoplasme est entièrement occupé par du réticulum lisse et vésiculeux. Il contient également des vacuoles d'endocytose mais aucun corps résiduel ni d'autres signes d'activité phagocytaire ne sont observés. Ce type d'hémocyte serait considéré, chez ces deux espèces, comme un granulocyte à un stade précoce de maturation (Auffret, 1989).

Par contre, en se basant sur des critères d'affinité tinctoriale et de mobilité, McCormick-Ray et Howard (1991) décrivent, chez *C. virginica*, trois types différents d'hémocytes non lymphoïdes agranuleux, qu'ils considèrent comme des types morphologiquement distincts et non comme différents stades fonctionnels d'une même population. Les hémocytes agranuleux sont plus grands que les cellules lymphoïdes mais leurs cytoplasmes sont dépourvus de granules. Leurs contours peuvent être irréguliers (type IF), ou rond et légèrement plissé (type RF). Le troisième type (RO) possède une morphologie identique à celle des granulocytes mais son cytoplasme est dépourvu de granulations. Cette dernière catégorie correspond, selon l'auteur, aux hémocytes vésiculeux décrits chez *C. gigas* par Auffret (1989). Les types IF et RF observés en grand nombre chez *C. virginica* n'ont pas de correspondance dans les classifications précédentes. Les types cellulaires agranuleux et plus particulièrement le type RF ont une mobilité réduite. Ce dernier type cellulaire, moins

bien représenté, devient dominant au mois de mai. Ces différences d'abondance suggèrent non pas un rôle différent de chaque catégorie mais plutôt une diversité morphologique ou une fonction saisonnière particulière.

## 1. 2. LES HEMOCYTES GRANULEUX (FIGURES 1 E, F ET FIGURES 2 B, C)

### 1. 2. 1. Morphologie

Plus facilement identifiables, ces cellules sont caractérisées par la présence de nombreuses granulations cytoplasmiques. Celles-ci peuvent être révélées en microscopie optique par leurs différentes affinités tinctoriales pour les colorants hématologiques habituels.

L'affinité des granules peut être unique dans les granulocytes neutrophiles de *O. edulis* (Auffret, 1989) ou bien dans les granulocytes basophiles et les granulocytes acidophiles de *C. gigas* et, dans ce cas, caractériser deux types cellulaires distincts (Ruddell, 1971a). Mais le plus souvent la même classe de granulocytes possède des granules basophiles, acidophiles ou un mélange des deux types chez *C. virginica* (Foley et Cheng, 1972), chez *M. mercenaria* (Foley et Cheng, 1974) ou chez *M. edulis* (Rasmussen *et al.*, 1985).

Selon Cheng (1975), ces granulocytes appartiennent au même type cellulaire. En effet, les différentes affinités tinctoriales, dues aux fluctuations du pH interne des granules, reflètent plutôt une variation du stade métabolique. Cependant, McCormick-Ray et Howard (1991) distinguent, chez *C. virginica*, deux lignées d'hémocytes granuleux en fonction de leurs affinités tinctoriales: les granulocytes basophiles (l'un à petits et l'autre à grands granules) et les granulocytes éosinophiles.

Les observations ultrastructurales permettent d'affiner les descriptions des granules cytoplasmiques des hémocytes granuleux. Le plus souvent, une concordance peut être faite entre les observations de microscopie optique (M. O.) et celles de microscopie électronique à transmission (M. E. T.). Cependant, le manque de précision dans les descriptions de l'ultrastructure de ces organites et l'emploi de termes non appropriés pour les qualifier rendent parfois laborieux le parallèle entre les deux techniques.

Dans un travail de synthèse sur la morphologie des hémocytes chez cinq bivalves marins, Auffret (1988) met en évidence quatre types de granulations cytoplasmiques observées également par d'autres auteurs chez diverses espèces de bivalves:



1. Des granules à matrice, dense aux électrons, condensée à la périphérie et laissant une zone centrale claire dans les granulocytes de *O. edulis* ou dans les granulocytes basophiles de *C. gigas* (Ruddell, 1971b).

2. Des granules ronds ou allongés dont la périphérie apparaît claire et la matrice condensée au centre. De taille variable (0.3 à 0.6  $\mu\text{m}$ ), ils sont présents chez la palourde japonaise *Ruditapes philippinarum* (Auffret, 1985) et chez *M. edulis* (Rasmussen *et al.*, 1985).

3. Des granules ronds, limités par une double membrane, à matrice homogène, dense aux électrons, correspondant aux granulations acidophiles de *C. gigas* (Ruddell, 1971b; Bachère *et al.*, 1988).

4. Des granules polymorphes, de taille variable (0.5 à 2  $\mu\text{m}$ ) et à contenu amorphe réparti régulièrement, rencontrés parfois dans les granulocytes de *R. philippinarum* et de *Mya arenaria* (Seiler et Morse, 1988).

### 1. 2. 2. Nature des granulations cytoplasmiques

Les granulations cytoplasmiques ont fait l'objet de nombreux travaux descriptifs mais le nombre réduit d'études cytochimiques n'a pas permis à ce jour d'élucider complètement la composition de leur contenu ni leur rôle dans l'ensemble de la classe des bivalves.

Nous aborderons dans un paragraphe suivant le rôle des hémocytes dans les mécanismes de défense interne. Nous savons déjà que les granulocytes sont les cellules les plus actives dans les mécanismes de phagocytose des corps étrangers, dont l'étape finale est la dégradation intracellulaire (Cheng, 1981). Les granules cytoplasmiques impliqués dans ces processus, ont donc été le plus souvent étudiés dans ce contexte par plusieurs techniques.

A l'aide de techniques cytochimiques couplées à la microscopie optique, plusieurs auteurs ont mis en évidence différentes hydrolases lysosomales au niveau de diverses inclusions cytoplasmiques. Ainsi des estérases non spécifiques, des  $\beta$  glucuronidases et des phosphatases acides et alcalines ont été révélées dans les hémocytes de *M. mercenaria* (Moore et Gelder, 1985), de *C. virginica* (Feng et Feng, 1971) et de *M. arenaria* (Huffman et Tripp, 1982). Ces deux derniers auteurs notent d'importantes variabilités d'activité enzymatique entre les cellules de la même lignée. Ils expliquent cette hétérogénéité par les différences d'âge et de stade métabolique de la cellule, les formes jeunes étant plus actives.

De fortes activités phosphatasiques acides sont mesurées dans les granules isolés des hémocytes de *M. campechiensis*, *C. virginica* et de *Anadara ovalis* (Rodrick et Ulrich, 1984).

Des méthodes cytochimiques adaptées à l'étude ultrastructurale ont permis de préciser la localisation des enzymes lysosomales. En effet, la présence de phosphatases acides a été montrée dans les granulations des hémocytes de bivalves comme *M. mercenaria* (Yoshino et Cheng, 1976), *M. coruscus* ou *C. gigas* (Feng et al., 1977) et de certains gastéropodes d'eau douce comme *Viviparus ater* (Franchini et Ottaviani, 1990), *Lymnea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* et *Bulinus truncatus* (Sminia et Barendsen, 1980).

L'activité enzymatique n'est pas forcément uniforme sur l'ensemble du granule et peut être localisée au niveau de la zone centrale de l'organite chez *O. edulis* et chez *C. gigas*. Il est à noter que chez cette espèce, la réaction est positive seulement dans les granulocytes basophiles. En effet les granulations acidophiles sont totalement dépourvues d'activité enzymatique (Auffret, 1989).

Leur principale caractéristique étant leur richesse en hydrolases acides, les granules sont donc assimilés à de vrais lysosomes (Yoshino et Cheng, 1976) ou plus généralement à des organites de stockage d'enzymes lysosomales (Auffret, 1989).

### 1. 2. 3. Fonctions des granules cytoplasmiques

Après avoir injecté des bactéries à *O. edulis*, le même auteur observe les micro organismes à divers stades de dégradation dans des vacuoles membranaires ou phagosomes primaires. Il retrouve ensuite l'ensemble de ces structures à l'intérieur des granulations cytoplasmiques qui sont chez cette espèce, directement responsables de la digestion intracellulaire (Auffret, 1986). Des résultats identiques sont obtenus chez *M. mercenaria* (Mohandas, 1986).

Cheng (1975), assimile chez *C. virginica* les granules à des phagosomes secondaires, recevant à la fois du matériel partiellement digéré provenant des phagosomes primaires et des hydrolases provenant des lysosomes primaires. La dégradation cellulaire s'achève à l'intérieur de ces organites.

En tentant d'élucider la fonction des hémocytes granuleux dans les tissus normaux et traumatisés de *C. gigas*, Ruddell (1971c) a mis en évidence, du cuivre lié aux granules acidophiles et du zinc lié aux granules basophiles. En réponse inflammatoire, au niveau de zones traumatisées, il observe la libération extracellulaire du cuivre contenus dans les granules acidophiles et la fixation immédiate de ce métal par les granules basophiles. Le rôle précis du cuivre n'est pas complètement élucidé dans cette étude, mais il semblerait stabiliser les granules dans les granulocytes basophiles, qui conserveraient ainsi leur intégrité fonctionnelle et leur capacité de diapédèse et de phagocytose.

Les granules cytoplasmiques des hémocytes des bivalves, faisant véritablement parti du système lysosomal, interviennent dans les mécanismes de séquestration des métaux, essentiels ou non, qui ont été absorbés par les cellules.

Ainsi, George *et al* (1978) mettent en évidence chez *O. edulis*, du cuivre associé à du soufre dans des vésicules membranaires dans certains amoebocytes, assimilés aux granulocytes acidophiles décrits par Ruddell (1971a). Il révèle également la présence de zinc associé à du phosphore dans des vésicules d'autres amoebocytes, assimilés aux granulocytes basophiles (Ruddell, 1971a). Cependant, plus tard, les granulocytes acidophiles n'ont pas été décrit chez cette espèce (Poder, 1980; Auffret, 1989).

Amiard *et al.* (1986) ont mis en évidence plusieurs métaux (Zn, Cu, Al, Fe, P, S) dans des inclusions ovoïdes, homogènes et denses chez *C. gigas*.

L'origine et le mécanisme de formation des granules cytoplasmiques des hémocytes sont encore mal expliqués chez les bivalves. Cependant, plusieurs hypothèses sont proposées: Ils pourraient se former par fusion des vésicules du réticulum endoplasmique, par dilatation du réticulum endoplasmique ou bien encore par fusion des vésicules golgiennes (Auffret, 1985).

## 2. ORIGINE ET FORMATION DES HEMOCYTES

### 2. 1. ORIGINE

La littérature relate très peu de données sur l'origine des hémocytes chez les bivalves. Cuénot (1891), cité par Cheng (1981), suggère la formation des hémocytes dans une "glande lymphatique" située à la base des branchies.

Selon Narain (1973), Tanaka (1969) considère le canal digestif comme le centre de l'hématopoïèse chez les Mollusques.

Morton (1969a), quant à lui, suggère que la fragmentation de l'épithélium des diverticules digestifs pourrait constituer une source importante d'amoebocytes. Il met en relation la formation d'au moins une partie de ces cellules avec le rythme circadien d'activité et de repos des muscles adducteurs.

Chez *M. arenaria*, Smolowitz *et al.* (1989) suggèrent le développement des hémocytes à partir de cellules souches du tissu conjonctif.

### 2. 2. HEMOCYTOGENESE

L'ontogénèse des hémocytes chez les mollusques bivalves, comme leur classification, reste un sujet de contestation. Plusieurs auteurs ont proposé des modèles de renouvellement et de développement des hémocytes, basés sur des travaux de synthèse (Mix, 1976; Cheng, 1981) ou concernant une seule espèce (Ruddell, 1971c; Moore et Lowe, 1977; Poder, 1980).

Mix (1976) base son modèle sur la dynamique d'une seule lignée cellulaire (voir figure 3). Il sépare l'ontogénèse hémocytaire en quatre compartiments, dans lesquels les cellules passent de l'état de cellule souche à celui de cellule fonctionnelle. Les hyalinocytes sont, dans ce cas, des cellules peu différenciées faisant partie du compartiment de prolifération.

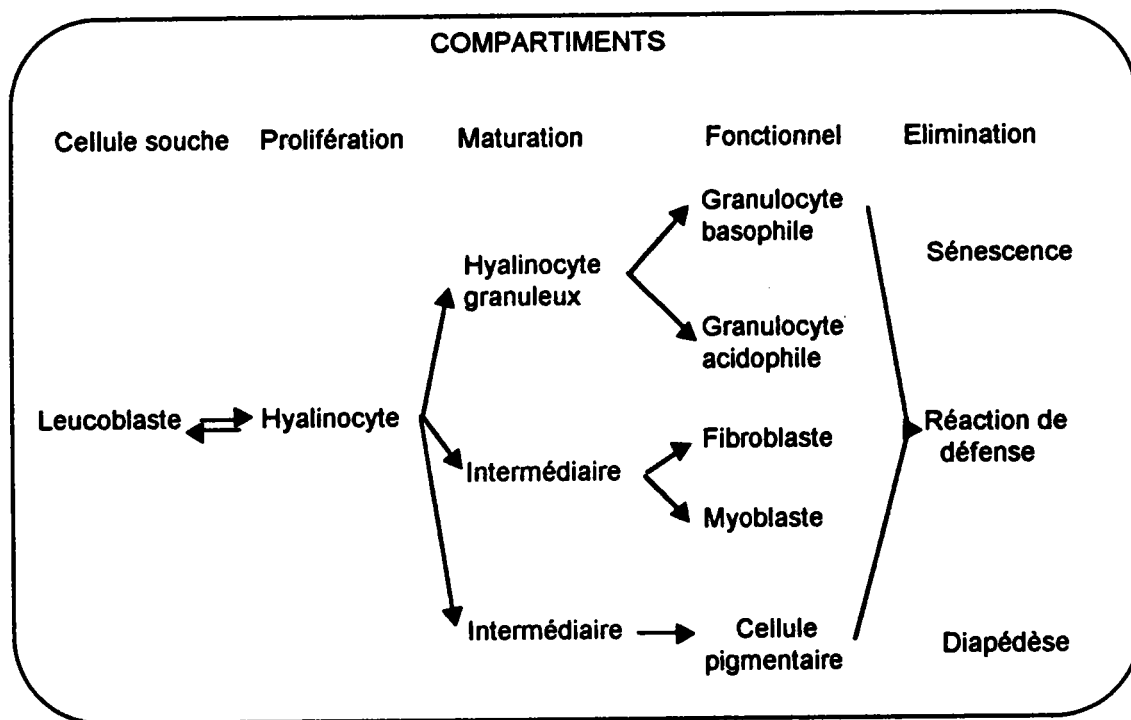


Figure 3. Modèle général de renouvellement des hémocytes chez les bivalves (Mix, 1976).

Les autres modèles établissent deux lignées distinctes, les hémocytes granuleux et non granuleux. Une cellule souche commune peut être observée par Poder (1980), chez *O. edulis*.

Chez *C. gigas*, Ruddell (1971c) sépare les granulocytes basophiles et acidophiles.

Cheng (1981) propose un modèle de synthèse du développement des hémocytes chez les bivalves, constitué de deux lignées cellulaires. Chaque lignée

possède un stade immature (voir figure 4). Les hémocytes granuleux passent d'un stade jeune (granuloblaste) à des stades fonctionnels (granulocyte I, basophile puis granulocyte II, acidophile) et finissent au stade de granulocyte "dépassé" ou de macrocyte multinuclée.

Les résultats de Rasmussen *et al.* (1985) chez *M. edulis* et ceux de Auffret (1985) chez deux espèces d'huîtres corroborent ce modèle.

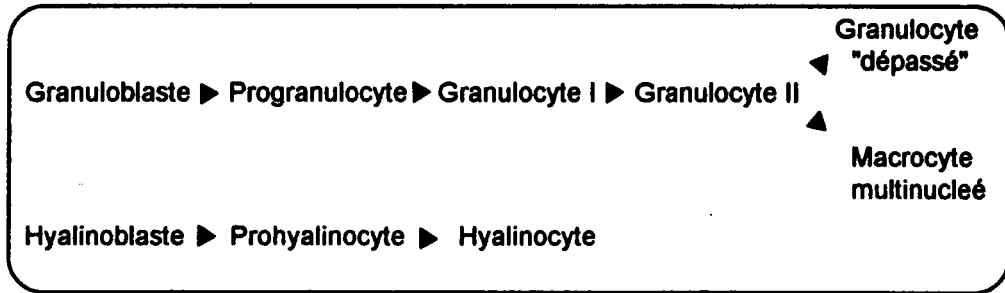


Figure 4. Modèle de filiation des hémocytes chez les bivalves selon Cheng (1981).

Par contre, Henry (1987) distingue deux types de granulocytes dans la glande digestive de *Ruditapes decussatus* et rejette donc ce dernier schéma. Ses observations coïncident avec un modèle proposé par Moore et Lowe (1977) chez *M. edulis*, qui sépare deux lignées de granulocytes en fonction de leurs affinités tinctoriales, acidophile et basophile.

### 3. FONCTION DES HEMOCYTES

Les fonctions hémocytaires sont multiples chez les bivalves et ont été revues dans des travaux de synthèse par Cheng (1981), Bayne (1983) et Fisher (1986).

Les hémocytes participent aux mécanismes de cicatrisation des tissus traumatisés et de la coquille, au transport et à la digestion des nutriments. Ils interviennent également dans les processus de défense interne de l'organisme et d'excrétion des corps étrangers.

#### 3. 1. CICATRISATION DES TISSUS ET DE LA COQUILLE

La première réponse observée est la migration massive des hémocytes au niveau des tissus blessés (Sparks et Morado, 1988). Les cellules en agrégats forment des bouchons qui empêchent l'écoulement de l'hémolymphe et la contamination par des

agents extérieurs (Ruddell, 1971c; Fisher, 1986; Feng, 1988). Les hémocytes forment une barrière autour de la zone traumatisée jusqu'au renouvellement des cellules épithéliales et peuvent ensuite se différencier en fibroblastes. L'élimination des débris cellulaires est assurée par les granulocytes (Feng, 1988).

Les hémocytes auraient un rôle limité dans la reconstruction de la coquille des bivalves. Ils transporteraient une partie du calcium nécessaire dans la zone endommagée ou protégeraient les épithéliums blessés pendant la réparation de la coquille (Cheng, 1981; Fisher, 1986).

### 3. 2. TRANSPORT ET DIGESTION DES ALIMENTS

Chez les mollusques bivalves, la digestion est extracellulaire et intracellulaire. La première phase se passe dans l'estomac avec l'intervention de diverses enzymes. La deuxième phase se déroule dans les cellules de la glande digestive et dans les hémocytes (Morton, 1983; Henry, 1987).

Le système circulatoire des bivalves étant ouvert, les hémocytes sont capables d'infiltrer tous les tissus. Chez *M. coruscus* et *C. gigas*, Feng *et al.* (1977) observent leur transit à travers l'épithélium digestif dans les deux sens, le contrôle de la direction des mouvements ne serait pas complètement élucidé, mais dépendrait du chimiotactisme des particules ingérées. Henry (1987) précise leur double intervention au niveau de la glande digestive de *R. decussatus*, déterminée selon la nature du matériel exogène ingéré:

- Les hémocytes s'insinuent à la base des cellules digestives et récupèrent par phagocytose les produits finaux de la digestion. Ils retournent ensuite vers les autres tissus, véhiculant ainsi les nutriments à l'ensemble de l'organisme.
- Les hémocytes migrent jusque dans la lumière intestinale afin de phagocyter du matériel étranger, éventuellement toxique.

### 3. 3. DEFENSE INTERNE DE L'ORGANISME

Les invertébrés, à l'instar des vertébrés, sont capables de reconnaître et de lutter contre des corps étrangers qui ont envahi leur organisme. La connaissance du système de défense interne chez les mollusques bivalves et gastéropodes est abordée principalement dans des études d'immunoparasitologie. Chez les mollusques, la défense interne est assurée par les cellules de l'hémolymphe fonctionnant en coopération avec des facteurs humoraux plasmatiques, tels des lectines dont les caractéristiques sont identiques à celles des agglutinines et des opsonines chez la plupart des invertébrés (Chu, 1988), des enzymes lytiques et des

bactéricides (Chorney et Cheng, 1980; Bayne *et al.*, 1980; Sminia et Van der Knaap, 1986, 1987a, 1987b; Ottaviani, 1986; Feng, 1988; Adema *et al.*, 1991).

Les fonctions immunitaires sont principalement cellulaires. En effet les hémocytes répondent aux substances étrangères, particulaires ou solubles par des mécanismes de phagocytose ou d'encapsulation dans le cas de très grosses particules, sans l'intervention systématique de facteurs humoraux (Foley et Cheng, 1972; Cheng, 1975; 1983; Vasta *et al.*, 1982; Sminia et Van der Knaap, 1986; Tripp, 1992a). Les nombreux travaux montrent, contrairement à l'idée reçue, la complexité et la diversité des mécanismes de défense des mollusques.

L'importance de la participation des hémocytes, assurant les processus de phagocytose, et des facteurs humoraux de l'hémolymphe varient d'une espèce à l'autre (Tripp, 1992b).

### 3. 3. 1. La phagocytose

Parmi les mécanismes intervenant dans les fonctions de défense, la phagocytose de corps étrangers par les hémocytes des mollusques est la plus documentée, en particulier depuis les travaux de Strauber datant de 1950, rapportés par de nombreux auteurs (Cheng, 1983a; Seiler et Morse, 1988; Sparks et Morado, 1988).

Même si la phagocytose a été largement étudiée chez de nombreuses espèces d'invertébrés, certains mécanismes restent actuellement un sujet de controverse. En effet, si le déroulement des différentes étapes morphologiques est bien connu (Renwranz *et al.*, 1979; Cheng, 1981), la participation de lectines, le contrôle moléculaire de la discrimination entre le soi et le non-soi ne sont pas complètement élucidés (Olafsen, 1988).

Les processus d'endocytose et de dégradation qui sont des réponses à l'inflammation chez les invertébrés aussi bien que chez les vertébrés impliquent d'abord les phases de chimiotactisme, de reconnaissance du "non-soi" et d'adhérence de la particule étrangère par la membrane plasmique des hémocytes (Cheng, 1986; Adema *et al.*, 1991).

Ensuite, le devenir du matériel phagocyté peut être différent selon sa nature. En effet, quand il est digérable, il est dégradé dans les hémocytes, sinon il est éliminé vers le milieu extérieur par migration des phagocytes chargés à travers les épithéliums du manteau, de la glande digestive ou des reins (Cheng, 1981; Fisher, 1988; Alvarez *et al.*, 1992).

### 3. 3. 1. 1. Moyen d'études

Les nombreux protocoles expérimentaux mis en place pour l'étude des capacités phagocytaires des hémocytes sont diversifiés aussi bien au niveau du compartiment étudié (*in vivo* ou *in vitro*) que des supports biotiques ou abiotiques utilisés.

Les mollusques peuvent être exposés et répondre à des agents biotiques de diverses natures, comme des bactéries, des érythrocytes de vertébrés (Yoshino et Cheng, 1976; Cheng *et al.*, 1977; Mohandas et Cheng, 1985; Wittke et Renwranz, 1984; Fisher et Tamplin, 1988; Tripp, 1992a), des larves de parasites (Cheng et Dougherty, 1989; Connors et Yoshino, 1990; Mourton *et al.*, 1992; Chargot *et al.*, 1992) et des levures (Le Gall *et al.*, 1991; Bachère *et al.*, 1991).

Toujours pour évaluer les capacités phagocytaires des hémocytes, certains auteurs utilisent comme supports différentes particules abiotiques, tels des billes de latex, *in vivo*, chez *C. virginica* (Alvarez *et al.*, 1992) ou *in vitro* (Fisher et Tamplin, 1988; Alvarez *et al.*, 1989), chez *O. edulis* et *C. gigas* (Fisher, 1988) ou chez *M. mercenaria* (Tripp, 1992a). Les hémocytes sont également capables de phagocyter et d'éliminer des particules de carbone ou d'encre injectées à *M. edulis* (Moore et Lowe, 1977) à *M. californianus* (Bayne *et al.*, 1980), ou au gastéropode, *Littorina scabra* (Cheng *et al.*, 1969).

Ces événements cellulaires et moléculaires possèdent un certain degré de spécificité selon certains auteurs (Cheng, 1986; Yoshino, 1986; Fisher et DiNuzzo, 1991). D'autres travaux ont montré une spécificité plus faible de la réponse immunitaire chez les invertébrés qui ne possèdent pas, comme les vertébrés, d'immunoglobulines, de lymphocytes T et du système anticorps et antigène spécifique. En effet les lectines présentent, chez les premiers, un large spectre de spécificité (Sminia et Van der Knaap, 1986).

Tripp (1992a), reconnaît chez *M. mercenaria* la phagocytose, comme un moyen de défense efficace et puissant, mais apparemment non spécifique. L'hypothèse de non-spécificité est également avancée par Chu (1988) en ce qui concerne les facteurs humoraux des bivalves marins.

### 3. 3. 1. 2. Chimiotactisme, reconnaissance et adhérence

Les hémocytes des mollusques sont capables de déceler et de migrer vers des micro-organismes qui ont envahi leur organisme. L'attraction dépend d'un gradient de



concentration de molécules de nature peptidique et glucidique sécrétées par les cellules étrangères (Cheng, 1986; Renwrantz, 1986; Adema *et al.*, 1991).

Les lectines sont des protéines ou des glycoprotéines, dont la nature exacte n'est pas connue, à de rares exceptions, chez les invertébrés (Sminia et Van der Knaap, 1986; Olafsen, 1988; Adema *et al.*, 1991). Elles forment un groupe de protéines hétérogènes, réunies par leurs capacités à se lier aux déterminants carbonés (Yang et Yoshino, 1990b). Elles sont entièrement intégrées à la membrane plasmique des hémocytes chez *C. virginica* (Vasta *et al.*, 1982) et chez *M. edulis* (Renwrantz, 1983) et se retrouvent aussi dans le sérum chez les mêmes espèces et chez *Corbicula fluminae* (Yang et Yoshino, 1990a, b). Chez cette espèce, les deux auteurs ont isolé une agglutinine et /ou opsonine de nature protéique, formée de deux sous unités de 20 kd, reliées entre elles par des ponts disulfures.

La fonction exacte des lectines n'est pas connue, mais leur présence à la fois au niveau du sérum et de la membrane plasmique suggère un rôle essentiel dans les mécanismes de discrimination du soi et du non-soi (Olafsen, 1988; Chu, 1988).

Les lectines immobilisent par agglutination les corps étrangers, empêchant ainsi leur prolifération, dans le cas de contamination par des micro-organismes. L'inactivation produit leur lyse par des enzymes extracellulaires suivie de leur phagocytose (Cheng, 1986; Chu, 1988; Olafsen, 1988; Adema *et al.*, 1991). Les lectines et les agglutines plasmatiques servent d'opsonines en installant des ponts entre les récepteurs de même configuration à la surface des hémocytes et des particules exogènes (Chu, 1988; Cheng, 1986), provoquant et facilitant ainsi la phagocytose.

Le rôle des lectines dans les processus de phagocytose reste toutefois controversé. Certaines études mettent en évidence les capacités opsonisantes des lectines et leur participation active à l'endocytose.

Elles facilitent ainsi la phagocytose d'érythrocytes (Mullainadhan et Renwrantz, 1986) ou de levures (Renwrantz et Stahmer, 1983) par les hémocytes de *M. edulis* et de *C. gigas* (Olafsen *et al.*, 1992). Les lectines plasmatiques ont les mêmes propriétés chez plusieurs espèces de bivalves et de céphalopodes (Fisher et Di Nuzzo, 1991) ainsi que chez le crustacé *Penaeus japonicus* (Kondo *et al.*, 1992).

Plusieurs travaux chez des bivalves, ont montré que les capacités d'agglutination des lectines sont dépendantes des cations calcium et magnésium présents dans le sérum (Renwrantz et Stahmer, 1983; Tuan et Yoshino, 1987).

A l'opposé, certains travaux montrent des taux de phagocytose identiques en présence ou absence de plasma chez *Corbicula japonica*, chez le gastéropode

*Heminerita japonica* (Kumazawa et Morimoto, 1992b, a) ou chez le bivalve *M. californianus* (Bayne et al., 1979).

Tripp (1992a, b) remet en cause l'intervention des lectines dans les mécanismes de défense cellulaires. En effet, il isole une agglutinine dans le plasma de *M. mercenaria*, inutile à la phagocytose de différents types de particules biotiques ou abiotiques.

D'autres facteurs, comme l'hydrophobicité et les charges de surface des phagocytes, ainsi que les propriétés physiques de la substance étrangère déterminent également le contact entre les deux structures (Van Oss et Gillman, 1972 et Lackie, 1983 in Olafsen, 1988).

### 3. 3. 1. 3. Endocytose

Cheng (1975), rapporte une étude de Bang (1961) concernant les mécanismes d'endocytose de bactéries par les hémocytes de *C. virginica*. Il montre l'importance de filopodes émis par les phagocytes. En effet, les corps étrangers adhèrent et glissent le long des filopodes jusqu'à l'ectoplasme où ils sont inclus dans un phagosome. Dans cette étude, il rapporte ses observations sur *M. mercenaria* et *C. virginica*, où les étapes de phagocytose sont différentes. Au contact de la particule exogène, la membrane plasmique du granulocyte forme une invagination et l'inclut dans une vésicule d'endocytose ou phagosome primaire. Ce second mécanisme d'endocytose est le plus fréquent chez *M. mercenaria* mise en compétition avec des bactéries (Mohandas, 1986)

Renwrantz et al. (1979) observe *in vitro*, la formation de pseudopodes "en tunnel" à la surface des granulocytes aussi bien que des hyalinocytes chez *C. virginica*. Les particules pénètrent à l'intérieur de la cellule en glissant dans le tunnel.

### 3. 3. 1. 4. Dégradation intracellulaire

Au paragraphe 1. 2. 2., nous avons montré l'importance des granulocytes et de leurs granulations cytoplasmiques, contenant des enzymes lysosomales dans les processus de dégradation intracellulaire de substances digérables chez les bivalves. Kroschinski et Renwrantz (1988) ont montré la chute du pH interne des vésicules digestives des hémocytes de *M. edulis* ayant phagocyté des levures à 4.5 +/- 0.5 correspondant au pH d'activité maximale pour les enzymes lysosomales.

Mohandas (1986) suggère que la dégradation complète de bactéries se déroule dans les phagosomes des granulocytes de *M. mercenaria*, et que des corps résiduels

ainsi que du glycogène restent inclus dans ces vésicules jusqu'à leur exclusion directement dans le sérum.

Auffret (1986) observe la dégradation de bactéries à l'intérieur même des granulations cytoplasmiques des hémocytes granuleux de *O. edulis*. Il retrouve du glycogène dans les granules et dans le cytoplasme, libre sous forme de rosette.

Toutes les hydrolases lysosomales ne sont pas engagées dans les mécanismes de dégradation intracellulaire. En effet sous l'influence d'un stimulus extérieur, les bivalves sont capables d'augmenter la synthèse d'enzymes lysosomales dans les granulocytes et de les libérer dans le sérum. Elles participeront ainsi à la défense humorale de l'organisme.

### 3. 3. 2. Facteurs humoraux

Les facteurs humoraux sont synthétisés par les hémocytes chez les mollusques et ensuite libérés dans le sérum où ils peuvent agir à distance (Adema et al., 1991; Chu, 1988). Il peut s'agir d'enzymes d'origine lysosomale, de lectines et de substances antimicrobiennes.

#### 3. 3. 2. 1. Enzymes lysosomales

De nombreuses enzymes lysosomales ont été mises en évidence biochimiquement dans l'hémolymphe des bivalves, ainsi que dans ses deux fractions séparées par centrifugation, le culot cellulaire et le sérum (Cheng et Rodrick, 1975; Cheng, 1980). Chez *C. virginica*, l'activité des phosphatases acides et alcalines, des  $\beta$ -glucuronidases et des lipases est plus élevée dans le culot cellulaire, alors que celle du lysozyme est plus importante dans le sérum. Chez *M. mercenaria* seules les phosphatases ont une activité plus élevée dans les hémocytes (Cheng et Rodrick, 1974b).

Une large variété d'agents biotiques et abiotiques est capable de provoquer l'hypersynthèse d'hydrolases lysosomales puis leur libération dans l'hémolymphe, jouant ainsi un rôle protecteur contre les agents infectieux et les particules exogènes abiotiques (Cheng, 1983a, b; Chu, 1988). De nombreuses études mettant en compétition des mollusques et des micro-organismes ont démontré ce phénomène.

L'injection de bactéries ou de larves de parasites a entraîné expérimentalement, chez *B. glabrata*, l'hypersynthèse et la décharge dans le sérum de lysozyme (Cheng et al., 1977), d'aminopeptidases (Mohandas et Cheng, 1985a), de phosphatases acides (Cheng et Butler, 1979) ou des trois types d'enzymes (Cheng et Dougherty, 1989).

Trois sites de reconnaissance cellulaire contrôlent l'induction de ces mécanismes. Un premier site récepteur au niveau de la membrane plasmique reçoit le signal exogène lors du contact entre les hémocytes et les particules étrangères, un second présent sur la membrane nucléaire est responsable de l'hypersynthèse d'enzymes lysosomales. Une troisième catégorie de sites récepteurs intégrés à la membrane des lysosomes active la libération d'enzymes ou dégranulation dans le compartiment extracellulaire (Cheng, 1983a, b)

Mohandas et Cheng (1985), Mohandas *et al.* (1985) ont appréhendé les événements morphologiques de la dégranulation des granulocytes de *M. mercenaria*. Ce processus se produit naturellement, mais est largement amplifié pendant la phagocytose. Ces études ont permis d'observer la migration des lysosomes de l'endoplasme vers la membrane plasmique. Les organites forment des protusions à la surface des granulocytes ou le long des filopodes avant d'être rejetés à l'extérieur de la cellule. Dans le sérum, ils sont entourés de leur membrane et de la membrane plasmique du granulocyte dont l'intégrité est respectée pendant l'exocytose des lysosomes.

### 3. 3. 2. 2. Facteurs cytotoxiques

Des essais de phagocytose *in vitro* ont mis en évidence la capacité des hémocytes de *M. edulis* (Wittke et Renwranz, 1984; Leippe et Renwranz, 1988) et de *C. fluminae* (Yoshino et Tuan, 1985) à sécréter des agents cytotoxiques contre des érythrocytes. La production de ces molécules thermosensibles, de nature protéique n'est pas permanente et peut être induite sans la stimulation d'un contact entre les hémocytes et les corps étrangers (Yoshino et Tuan, 1985).

### 3. 3. 2. 3. Lectines

Au paragraphe 3.3.1.2. nous avons relaté la présence de lectines, soit intégrées à la membrane plasmique des hémocytes, soit libres dans le plasma chez les invertébrés.

Chez les mollusques bivalves et gastéropodes, les hémocytes participent en partie à la production de lectines du sérum (Vasta *et al.*, 1982).

Ottaviani (1988b) a montré, à l'aide de techniques immunocytochimiques, qu'un type d'hémocyte est responsable de la synthèse d'agglutinines chez *P. comeus*.

*In vitro*, les hémocytes de *M. edulis* sont capables de sécréter des agglutinines (Leippe et Renwranz, 1988).

### 3. 4. TRANSPORT ET EXCRETION

Peu de travaux concernent la participation des hémocytes aux mécanismes de transport et d'excrétion de corps exogènes. Leur rôle dans l'élimination des xénobiotiques, et plus particulièrement des métaux lourds qui intéressent notre étude, n'est pas complètement élucidé. Nous aborderons l'intervention des hémocytes dans les processus de détoxification des métaux dans le chapitre III.

En injectant expérimentalement de l'encre à *L.scabra*, Cheng *et al.*, (1969) suivent son devenir dans l'organisme. Les particules d'encre sont rapidement phagocytées par les hémocytes qui migrent vers l'extérieur à travers certains épithéliums. Chez ce gastéropode, plusieurs organes sont concernés par l'excrétion des hémocytes chargés. Outre les branchies et le tractus digestif, les reins constituent le principal site de concentration des phagocytes. Ces derniers peuvent s'infiltrer entre les néphrocytes et passer, par diapédèse, directement à l'extérieur (Cheng *et al.*, 1969; Morse, 1987). Ils peuvent également vider uniquement leur contenu dans la lumière rénale. Cette voie semble être plus importante, pour l'excrétion des agents phagocytés non digérables. Cet auteur suggère que la voie d'élimination par diapédèse n'est pas un mécanisme spécifique puisque des hémocytes sont continuellement évacués vers l'extérieur de cette façon.

Alvarez *et al.* (1992) suivent des billes fluorescentes introduites dans le tractus digestif de *C. virginica*. Les billes sont phagocytées par les hémocytes au niveau du tube digestif et peuvent être éliminées à travers les épithéliums du manteau et des palpes labiaux.

## II : LE SYSTEME EXCRETEUR

Chez les bivalves, le système excréteur, situé dorsalement, est constitué du coeur (un ventricule et deux oreillettes latérales), des glandes péricardiales intégrées à la cavité péricardique qui communique avec les reins (voir figures 5 et 6) (Martin, 1983; Suzuki, 1985). L'ensemble constitue une zone de filtration, d'accumulation et d'élimination des déchets du métabolisme et éventuellement des polluants (Morse, 1987; Andrews, 1988).

Le processus d'excrétion commence au niveau des prolongements (pédicelles) des cellules péricardiques (podocytes) et de leurs membranes basales où l'hémolymphe est filtrée. L'urine primaire qui en résulte arrive, par le canal

rénopéricardique, aux reins où elle est modifiée par réabsorption et sécrétion avant de s'écouler dans la cavité branchiale (Meyhöfer *et al.*, 1985; Suzuki, 1985; Morse, 1987) (voir figure 7).

Plusieurs travaux ont montré l'importance des organes du système excréteur, pour le stockage et l'accumulation, puis pour l'élimination des métaux lourds ( Schulz-Baldes, 1978; Carmichael *et al.*, 1979; Simkiss et Mason, 1983; Robinson *et al.*, 1985; Benyahia, 1991). Les auteurs se sont le plus souvent penchés sur le rôle des reins dans ces mécanismes et n'ont que rarement abordé la fonction des glandes péricardiales.

Avant d'étudier l'intervention du système excréteur dans les mécanismes de détoxification des métaux, il convient d'appréhender la morphologie des différents organes qui le constituent. En effet, quelques travaux ont décrit, par des techniques d'histologie classique, l'anatomie des reins et de la glande péricardiale de *Dreissena polymorpha*, mais aucune description ultrastructurale, à notre connaissance, ne concerne ces organes chez cette espèce.

## 1. LES GLANDES PERICARDIALES

L'étude de Keber (1851), rapportée par plusieurs auteurs, fut la première observation des glandes péricardiales, qui sont parfois encore appelées "organe de Keber". Grobben (1888), cité par Andrews (1988), identifie la paroi auriculaire comme la source du liquide péricardique, mais ne pouvant séparer les activités de filtration et de sécrétion, il nomme cette zone spécialisée glande péricardiale.

Chez les bivalves, les glandes péricardiales sont formées par des cellules appelées podocytes, par analogie aux cellules épithéliales entourant les capillaires des glomérules rénaux chez les vertébrés et assurant les mêmes fonctions, sécrétion et filtration (Andrews, 1988).

### 1. 1. LOCALISATION DES GLANDES PERICARDIALES CHEZ LES BIVALVES

White (1942) les décrit chez quatre-vingts espèces de bivalves et constate une grande variabilité de leur localisation dans la cavité péricardique, empêchant toute généralisation systématique. Elles se situent, soit à la surface des oreillettes chez les espèces primitives, soit à la surface de la paroi péricardique, à l'intérieur ou à

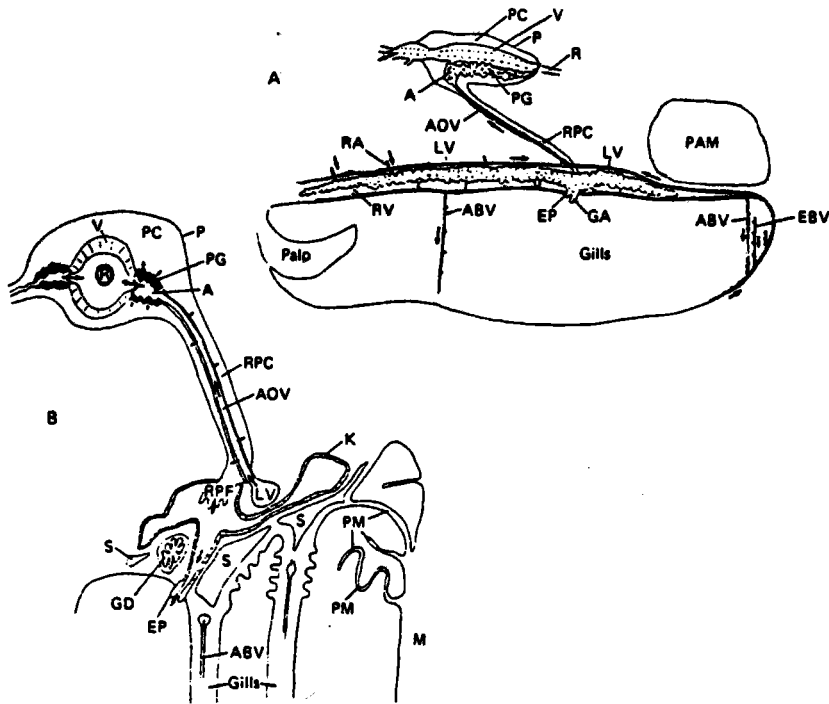


Figure 5. Représentation schématique du système excréteur et du système vasculaire associé de *M. edulis*. (A) Vue latérale. (B) Section transversale. Abréviations : A, oreillette ; ABV, veine branchiale afférente ; AOV, Veine oblique afférente ; EBV, veine branchiale efférente ; EP, pore excréteur ; GA, orifice génital ; GD, conduit génital ; K, rein ; LV, veine longitudinale ; M, manteau ; P, péricarde ; PAM, muscle adducteur postérieur ; PC, cavité péricardique ; PG, glande péricardiale ; PM, membrane plissée ; R, rectum ; RA, orifice rénal ; RPC, canal rénopéricardique ; RPF, orifice rénopéricardique ; S, sinus ; V, ventricule. (Pirie et George, 1979)

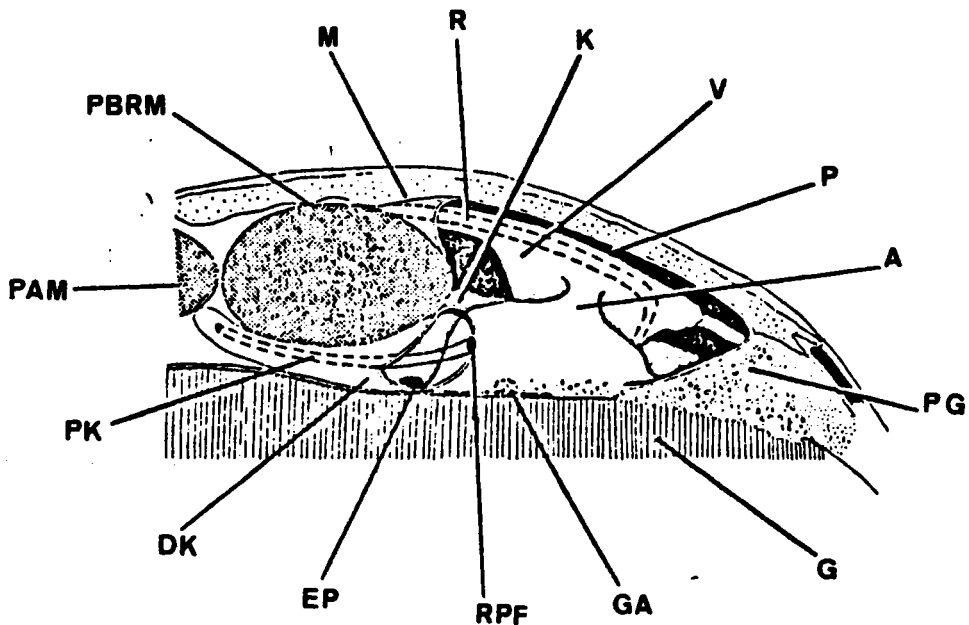


Figure 6. Péricarde et organes associés de *D. polymorpha*. Vue latérale droite. Abréviations: A, oreillette ; DK, rein distal ; EP, pore excréteur ; G, gill ; GA, orifice génital ; K, rein ; M, manteau ; P, péricarde ; PAM, muscle adducteur postérieur ; PBRM, muscle rétracteur du byssus ; PG, glande péricardiale ; PK rein proximal ; R, rectum ; RPF, orifice rénopéricardique ; V, ventricule. (Morton, 1969b).

l'extérieur de la cavité. Elles peuvent également occuper, simultanément, les deux positions. Les trois distributions se retrouvent chez les bivalves hétérondotes.

Meyhöfer *et al.* (1985) étudient le système excréteur de plusieurs espèces de bivalves, et observent des similitudes morphologiques et physiologiques pour les bivalves appartenant à la même sous-classe. Les glandes péricardiales sont associées à la surface des oreillettes chez les protobranches et les ptéridomorphes ou bien sont formées à partir d'évaginations de l'épithélium dorsal de la cavité péricardique dans un sinus sanguin, bordé à l'extérieur par le manteau et par la cavité péricardique à l'intérieur.

Le processus par lequel les glandes péricardiales se sont développées sur la paroi péricardique à partir des formes auriculaires primitives n'est pas connu, mais semble indépendant des variations morphologiques des oreillettes (Suzuki, 1985).

La localisation auriculaire se rencontre principalement chez les bivalves marins, les glandes péricardiales sont mieux développées en position péricardique chez les bivalves estuariens et sont exclusivement péricardiques chez les bivalves d'eau douce. Le passage des fonctions de filtration des oreillettes à la paroi péricardique semble être une adaptation des espèces à la vie en eau douce (Andrews, 1988).

Cependant, les glandes péricardiales de *Dreissena polymorpha* sont décrites, très succinctement par White (1942) au niveau des oreillettes et de l'épithélium péricardique en position antéro-latérale par rapport au coeur. Morton (1969b) observe, quant à lui, du tissu péricardique seulement en "position péricardiale". Mais l'auteur n'exclut toutefois pas la deuxième possibilité puisque l'histologie des oreillettes n'a pas été réalisée dans ce travail.

## 1. 2. MORPHOLOGIE

Chez *Dreissena polymorpha*, les glandes péricardiales occupent une position antérieure au coeur et émettent des extensions postérieures le long des axes branchiaux (voir figure 6). La structure est formée, au repos, par des "tubules vides" où des cellules épithéliales dispersées reposent sur une lame basale (Morton, 1969b).

Chez *M. edulis*, elles constituent un diverticule de l'oreillette, à lumière centrale et paroi fortement invaginée (Pirie et George, 1979). Elles sont composées de cellules épithéliales ou podocytes, riches en granules cytoplasmiques dont la taille varie de 0.3 à 3  $\mu\text{m}$  de diamètre (Moore *et al.*, 1980).

Elles sont constituées de nombreux tubules, entourés de tissu conjonctif dans la partie antérieure latérale de la cavité péricardique chez *Anodonta* et *Mercenaria* (Khan *et al.*, 1988). Les diverticules, à épithélium simple, s'ouvrent dans la cavité



péricardique par de petits pores à l'avant du canal rénopéricardique chez *Anodonta calipygos* (Suzuki, 1986).

L'étude ultrastructurale montre chez cette espèce, des podocytes de forme irrégulière à noyau basal et sphérique entouré par les structures golgiennes. La périphérie des cellules est occupée par de nombreuses petites vésicules et la membrane plasmique montre des figures d'endocytose. Des vacuoles et des granules de grande taille (2 à 3  $\mu\text{m}$ ) et à électron densité variable occupent une large partie de la cellule.

Le cytoplasme des podocytes contient des vésicules claires aux électrons de taille variable (30 à 200  $\mu\text{m}$ ) et des granules denses aux électrons 0.1 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre chez *Anodonta* et *Mercenaria* (Khan *et al.*, 1988). Les granules contiennent de fines particules de ferritine denses aux électrons. La ferritine pourrait constituer une forme de stockage du fer dans les glandes péricardiales et être une source de ferritine lors de la vitellogénèse chez les bivalves, comme elle l'est chez les gastéropodes (Misksys et Saleuddin, 1987; Khan *et al.*, 1988).

Moore *et al.* (1980) ont mis en évidence des phosphatases acides et des lipofuchsines dans les granules cytoplasmiques des podocytes de *M. edulis*. Selon Khan *et al.* (1988) les granulations pourraient être des lysosomes contenant de la ferritine.

Les travaux de Kato (1960), rapportés par plusieurs auteurs (Suzuki, 1986; Andrews, 1988) ont mis en évidence divers métabolites tels l'acide urique, l'acide hippurique, l'urée et la créatine au niveau des granulations cytoplasmiques.

Les cellules possèdent de nombreuses microvillosités chez les espèces hétérondotes étudiées par Meyhöfer *et al.* (1985), alors que les surfaces cellulaires sont relativement lisses chez les ptéridomorphes et les protobranches.

Le nombre de jonctions cellulaires est variable selon les espèces; elles sont nombreuses chez *Mytilus*, où les podocytes sont reliés entre eux par des jonctions de type "spot desmosomes" et "gap". Les podocytes sont largement espacés et les jonctions cellulaires rares chez *Anodonta* et *Mercenaria* (Khan *et al.*, 1988). Aucun desmosome n'est observé entre les podocytes de *Anodonta* (Suzuki, 1986).

Les membranes basales des podocytes sont séparées de l'hémolymphe et du tissu conjonctif par une fine lame basale (Morse, 1987; Khan *et al.*, 1988). Dans la partie basale, les cellules péricardiales émettent des prolongements cytoplasmiques ou pédicelles dont les extrémités sont interdigitées et forment un réseau délimitant ainsi des fentes de filtration d'une largeur variable d'environ 20 nm (Morse, 1987), de 25 nm chez le bivalve marin *Atrina pectinata* (Suzuki, 1988) et de 30 nm chez *A. calipygos* (Suzuki, 1986). Les fentes de filtration observées chez les bivalves

possèdent la même organisation que celles des podocytes de la capsule de Bowman des reins de vertébrés (Khan *et al.*, 1988; Suzuki, 1988) ou des cellules à pores des gastéropodes (Boer et Sminia, 1976; Andrews, 1979) .

### 1. 3. ULTRAFILTRATION ET SECRETION

Le réseau de pédicelles et la lame basale constituent le site d'ultrafiltration de l'hémolymphe (Morse, 1987). Chez les bivalves hétérodontes, le filtrat du sinus sanguin passe à travers la barrière de filtration dans la lumière des glandes péricardiales puis s'écoule le long des tubules vers la cavité péricardique (Morse, 1987) (figure 7).

Comme chez les vertébrés, les mécanismes d'ultrafiltration de l'hémolymphe chez les mollusques bivalves sont dépendants de la charge et de la taille des molécules (Morse, 1987).

En effet, des sites anioniques sont révélés par des colorants cationiques au niveau des lamelles basales chez les bivalves (Meyhöfer *et al.*, 1985) comme au niveau de la membrane basale des glomérules rénaux chez le rat (Kanwar et Farquhar, 1979). Les charges négatives peuvent influencer le passage des particules à travers les barrières de filtration.

Le devenir des composés transportés par l'hémolymphe et filtrés au niveau des glandes péricardiales est différent selon leur taille. En effet, des études rapportées par Martin (1983) montrent que le sulfonate indigo injecté dans l'hémolymphe est rapidement transporté et accumulé par les reins, tandis que les particules colloïdales de carmin sont éliminées de l'hémolymphe très lentement et retenues uniquement par les podocytes des bivalves. Il en est de même pour certains métaux, tel l'argent qui est accumulé, au niveau du système excréteur de *Chlamys varia* exclusivement dans les cellules péricardiales et non dans les néphrocytes. Le métal est dans ce cas lié à des transporteurs qui sont phagocytés par les podocytes mais qui ne peuvent franchir la barrière rénale (Martoja *et al.*, 1989).

Par des injections de traceurs particuliers et hémoprotéiques, associées à la microscopie électronique à transmission, certains auteurs ont précisé, plus récemment, la taille des composés retenus par les cellules péricardiales.

Les particules dont le poids moléculaire est compris entre 40000 et 400000 daltons sont accumulées dans les podocytes chez plusieurs espèces de bivalves (Meyhöfer et Morse, 1986), la ferritine (480000 daltons, taille : 12 nm), molécule trop volumineuse, est retenue au niveau de la lame basale qui constitue, d'après ces auteurs, le principal site de filtration. Marcaillou et Martoja (1990) abaissent cette

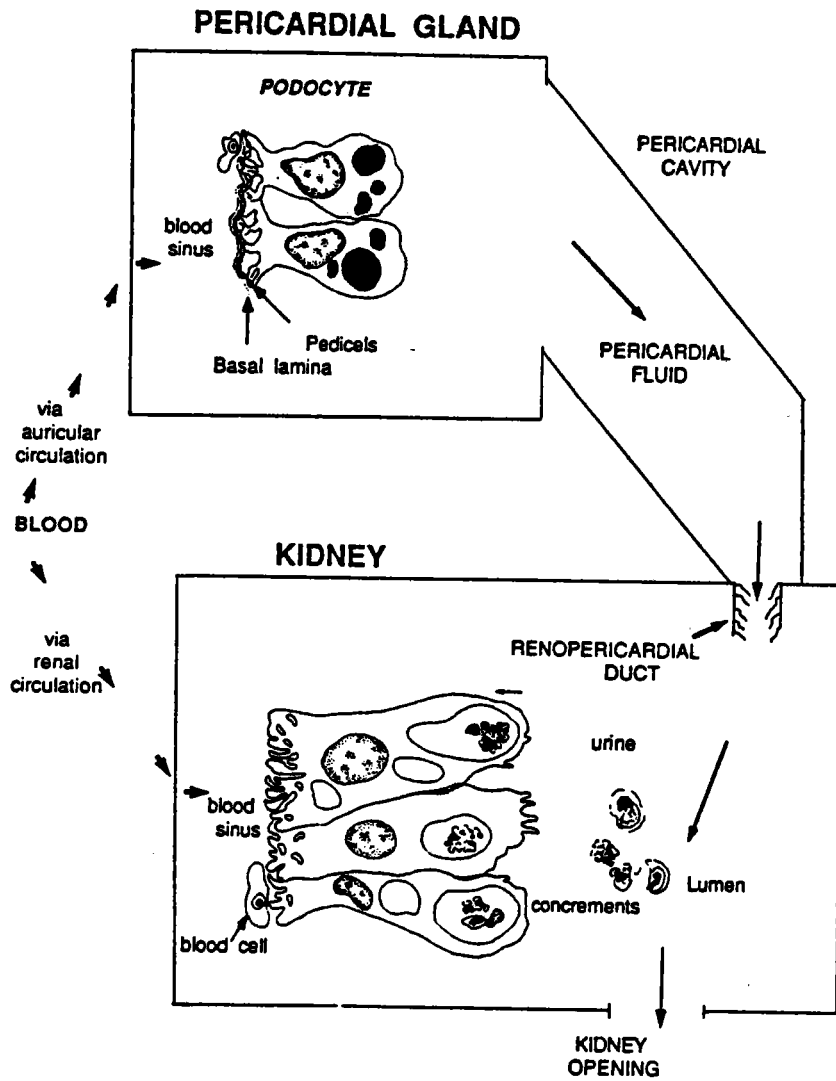


Figure 7. Voies générales d'excrétion, chez les bivalves, des produits du compartiment sanguin par l'intermédiaire du système excréteur (Morse, 1987).

échelle de taille puisqu'ils observent l'endocytose de la micropéroxydase (1880 daltons, diamètre moléculaire : 6 nm) par les podocytes de *M. edulis*. Par contre, Andrews (1988) rapporte les travaux de Jennings concernant la pinocytose de ferritine par les podocytes de *Scrobicularia plana*, ce qui élargit, en définitive, l'échelle de taille entre 1880 et 480000 daltons.

En plus de leur fonction d'ultrafiltration, les podocytes seraient capables de réabsorber certains ions et des molécules organiques comme du glucose à partir de l'urine primaire (Marcaillou et Martoja, 1990). La présence de microvillosités à l'apex des cellules péricardiales, indiquant un site d'absorption, serait un argument en faveur de cette autre fonction (Morse, 1987).

Les glandes péricardiales seraient donc impliquées dans la prise par endocytose des constituants de l'hémolymphe, dans leur dégradation ou leur accumulation dans le système lysosomal et enfin dans leur excrétion par l'intermédiaire du fluide péricardique vers la lumière rénale puis vers le milieu externe (Moore *et al.*, 1980; Pirie et George, 1979). Les molécules les plus volumineuses piégées, préférentiellement dans les podocytes au niveau du système excréteur, seraient stockées et excrétées plus rapidement que les constituants de plus petite taille, accumulés dans les reins et retenus plus longtemps à cet endroit chez *M. edulis* (Marcaillou et Martoja, 1990).

Plusieurs travaux ayant montré la participation des glandes péricardiales dans le stockage et l'élimination des métaux, cette fonction sera détaillée plus longuement dans un chapitre suivant.

## 2. LES REINS CHEZ LES BIVALVES

Chez les bivalves, les reins, encore appelés "organes de Bojanus" possèdent une forme typique en U. Ils mettent en relation la cavité péricardique et la cavité suprabranchiale. Ils se différencient en une branche proximale à partir du canal rénopéricardique puis en une branche distale qui communique avec l'extérieur par l'uropore dans la chambre suprabranchiale (Martin, 1983; Morse, 1987; Andrews, 1988). Selon les espèces, de multiples variations anatomiques existent concernant le niveau de fusion des reins, la différenciation du tubule proximal et distal et l'importance des replis épithéliaux.

Les bivalves d'eau douce, osmorégulateurs, à l'inverse des espèces marines, produisent une urine hypoosmotique par rapport à l'hémolymphe (Burton, 1983).

L'osmolarité de l'hémolymphe, généralement très faible chez ces espèces atteint une des valeurs les plus basses (36 mosm) chez *Dreissena* (Horohov *et al.*, 1992). Les reins jouent un rôle important dans le maintien de l'hypertonie de l'hémolymphe en produisant une urine hypoosmotique (Suzuki, 1986). La zone proximale est donc impliquée dans la réabsorption des composés organiques et des ions essentiels à partir de l'urine primaire (pro-urine) venant de la cavité péricardique. La région distale est responsable de l'excrétion des déchets du métabolisme et de l'élimination des polluants tels les métaux lourds (Khan *et al.*, 1986; Andrews, 1988).

## 2. 1. LOCALISATION, MORPHOLOGIE ET PHYSIOLOGIE

Chez *Dreissena polymorpha*, l'organisation des reins est identique à celle décrite chez d'autres bivalves. A la base du péricarde postérieur, les reins s'étendent entre le muscle rétracteur du byssus et le muscle adducteur postérieur (figure 6). La partie antérieure de la branche proximale communique avec la cavité péricardique par le canal rénopéricardique cilié, sa partie postérieure débouche dans une branche distale, divisée incomplètement en chambre latérale et médiane. Dans la portion antérieure du tubule distal, un canal cilié conduit au pore excréteur qui s'ouvre dans la chambre suprabranchiale. Les parties distales de chaque rein sont adjacentes et communiquent entre elles (Morton, 1969b; Herwig *et al.*, 1989).

Les observations chez d'autres bivalves hétérodontes d'eau douce tel, *Anodonta* (Khan *et al.*, 1986) et *A. calipygos* (Suzuki, 1986) ou marine tel, *M. mercenaria* (Khan *et al.*, 1986; Morse, 1987) et *Mytilus* (Khan *et al.*, 1986), constituant les principales études ultrastructurales, montrent un épithélium proximal caractérisé par des cellules prismatiques, dont l'apex est formé par des microvillosités ordonnées en bordure en brosse et quelques cils. Des canalicules sont visibles à la base des microvillosités. Le cytoplasme apical est rempli de petites vésicules et de vacuoles plus grandes. De nombreux granules membranaires, à contenu électrodense (lysosomes secondaires ou corps résiduels) ainsi que les structures golgiennes sont localisés au dessus d'un noyau sphérique et central. La partie basale des cellules, fortement invaginée, est en contact avec l'hémolymphe et les hémocytes du sinus sanguin de l'autre côté de la lame basale. Des mitochondries en grand nombre sont présentes dans le cytoplasme apical et basal, entre les invaginations.

De par ses caractéristiques ultrastructurales, l'épithélium proximal constitue le site principal de réabsorption (Tiffany, 1974; Suzuki, 1986; Morse, 1987). Par des études analytiques, Suzuki (1986) a confirmé cette fonction. En effet, les

concentrations des ions  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  et  $\text{Cl}^-$  mesurées dans l'urine sont plus faibles que celles de l'hémolymphe, indiquant ainsi leur absorption par les néphrocytes des tubules proximaux. Il a aussi montré que des protéines qui avaient franchi la barrière de filtration des podocytes, étaient également réabsorbées au niveau du rein proximal de *A. calipygos*.

La portion distale, excrétrice, des reins est constituée d'un épithélium simple caractérisé par des cellules à grandes vacuoles contenant des concrétions de nature et de taille différentes chez *M. mercenaria* (Morse, 1987) et chez *S. plana* (Andrews, 1988). La membrane apicale montre des microvillosités nettement moins hautes et moins nombreuses que celles des cellules proximales. Le noyau et les organites sont repoussés dans la partie basale de la cellule par la vacuole apicale qui contient ou non du matériel granulaire.

## 2. 2. NATURE ET FONCTION DES CONCRETIONS RENALES

Comme nous l'avons signalé auparavant pour d'autres sujets, la littérature est très riche en ce qui concerne la nature et la fonction des concrétions ou granules rénaux chez les bivalves marins, mais il existe à notre connaissance, très peu de données sur ce thème chez les espèces d'eau douce.

De plus, Andrews (1988) admet, à juste titre d'ailleurs, qu'il règne une relative confusion dans la bibliographie sur la distinction entre les corps résiduels, issus de la dégradation ou de la séquestration lysosomale, et les concrétions d'excrétion caractérisées par leur richesse en phosphate de calcium (Doyle *et al.*, 1978).

Chez les bivalves, les granules des reins peuvent être extra ou intracellulaires et varier énormément dans leur taille, leur concentration en calcium et plus généralement dans leur degré de minéralisation.

Hignette (1979) montre la présence de sphérocristaux intravacuolaires, à structure concentrique, fortement minéralisés, constitués principalement de phosphate et d'oxalate de calcium chez *Tridacna maxima* et de phosphate et de calcium chez *Argopecten irradians* (Carmichael *et al.*, 1979).

Des nephrolythes faiblement minéralisés mais formés de matériel granulaire dense et de débris cellulaires sont présents dans les reins de *Adamussium colbecki* (Nigro *et al.*, 1992).

Le contenu de certains granules intracellulaires, toujours limités par une membrane, serait originaire du système lysosomal (Brown, 1982; George, 1983a, b).

En effet, ce dernier auteur met en évidence, entre autre, la présence de lipofuchsine caractéristique des lysosomes tertiaires ou corps résiduels.

Par différentes techniques, Sullivan *et al.* (1988) isolent et analysent les deux types de granules dans les reins de *M. mercenaria*. Les concrétions intracellulaires, inférieures à 10 µm et riches en matériel organique sont issues du processus de maturation lysosomal. Elles sont libérées ensuite, dans le milieu extracellulaire où elles fusionnent et accumulent des éléments inorganiques pour constituer les concrétions extracellulaires d'une taille supérieure à 15 µm.

Des sphérocristaux, de 200 µm, extracellulaires, formés essentiellement par du phosphate et de l'oxalate de calcium, entourés et élaborés par une assise de cellules épithéliales sont observés dans les reins de *Pinna nobilis* (Hignette, 1979).

Les formes extracellulaires seraient issues des petits granules intracellulaires sécrétés et agrégés dans la lumière rénale (Brown, 1982; Sullivan *et al.*, 1988) ou recouverts de nouvelles couches concentriques de matériel (Doyle *et al.*, 1978; Carmichael *et al.*, 1979).

La caractéristique commune aux diverses concrétions rénales chez toutes les espèces étudiées est, en plus de leurs constituants organiques ou minéraux, leur forte teneur en éléments métalliques essentiels ou non tels Mn, Mg, Fe, Zn, Cu, Al, Co, Cd, Pb. Elles jouent un rôle important dans le contrôle de l'accumulation et de l'excrétion des métaux au niveau des reins des mollusques bivalves (Carmichael *et al.*, 1980; Carmichael et Fowler, 1981; Seiler et Morse, 1988; Sullivan *et al.*, 1988).

Cependant, chez trois unionidés d'eau douce, Pynnönen *et al.* (1987) identifient des concrétions de pyrophosphate de calcium en quantité variable au niveau de divers organes tels les branchies, le manteau, la glande digestive. A l'exception des cellules conjonctives bordant les épithéliums des tubules qui contiennent parfois quelques granules inférieurs à 0.5 µm, les tissus rénaux en sont pratiquement dépourvus. Les granules minéraux des divers organes ne sont pas impliqués dans l'accumulation de métal quand ces espèces sont exposées au cadmium. Les seules concrétions, chargées en métaux, mises en évidence dans les reins d'*Anodonta* ou d'autres moules d'eau douce seraient, selon les mêmes auteurs, de type "lysosomes tertiaires".

La formation des concrétions peut être induite lors de stress environnementaux telles des pollutions métalliques, des variations anormales de température ou de salinité ou des conditions d'anoxie (Doyle *et al.*, 1978). D'autres facteurs, comme les

cycles saisonniers ou le sexe des individus peuvent également influencer leur formation (Mauri et Orlando, 1982).

Chez certaines populations de *Abra alba* et de *D. polymorpha*, Secchi et Martoja (1986) révèlent la présence de concrétions très faiblement minéralisées d'acide urique dans les vacuoles des cellules rénales. Les néphrocytes décrits sont caractérisés par une grande vacuole et des microvillosités apicales et par des invaginations basales. A l'encontre de toutes les autres descriptions de morphologie rénale, les auteurs assimilent ces cellules à celles du tube proximal du néphron des vertébrés, responsables des processus de réabsorption.

Les concrétions, quand elles sont présentes, se montrent sous l'aspect d'une sphère à couches concentriques éventuellement entourée de matériel pulvérulent ou bien d'un agglomérat de petits grains et occupent toutes les cellules.

Cette étude valide des travaux anciens montrant la présence de concrétions puriques chez des bivalves. Les auteurs concluent à l'existence de deux types d'inclusions dans les reins, les unes strictement minérales et les autres constituées d'éléments puriques associés à quelques éléments minéraux. Certaines populations de dreissènes sont donc uricotéliques sans que cette caractéristique soit liée à un besoin d'économie d'eau.

Cette forme d'excrétion rénale est généralement abandonnée chez les bivalves au profit de la diffusion des composés azotés au niveau des branchies et des surfaces palléales. On observe plutôt, au niveau des reins, un déplacement des fonctions habituelles d'excrétion des composés puriques vers l'absorption et l'excrétion de métaux lourds circulant dans l'hémolymphe (rôle dévolu également aux glandes péricardiales) et vers des fonctions de réabsorption développées surtout chez les espèces d'eau douce (Andrews, 1988).

Le système rénal constitue chez de nombreux bivalves le site principal d'accumulation et d'excrétion de divers métaux dont le cadmium chez *M. mercenaria* (Robinson et Ryan, 1986; Morse *et al.*, 1985), chez *A. irradians* (Carmichael et Fowler, 1981) et chez deux moules d'eau douce, *A. cygnea* et *A. anatina* (Hemelraad et Herwig, 1988), le zinc chez *A. colbecki* (Mauri *et al.*, 1990) et chez *M. edulis* (Lobel, 1987a; Lobel et Marshall, 1988) ou le plomb chez cette dernière espèce (Schulz-Baldes, 1974; 1977).

L'intervention des reins dans les mécanismes d'accumulation et de détoxification des métaux sera abordée plus précisément dans le chapitre suivant.



### **III: LES MECANISMES DE LA BIOACCUMULATION ET DE LA DETOXICATION METALLIQUE CHEZ LES MOLLUSQUES**

Parce que de nombreux bivalves sont capables d'accumuler des concentrations élevées de xénobiotiques, tels les métaux, sans présenter d'apparents effets toxiques, ils sont communément utilisés comme bioindicateurs de pollution.

Ces caractéristiques ont conduit à de larges études concernant l'homéostasie des métaux lourds et leur détoxification chez ces organismes.

Les mécanismes de prise du métal au niveau des organes en contact avec le milieu extérieur, de transport par les cellules ou les protéines de l'hémolymphe, de stockage et d'excrétion au niveau des organes du système excréteur ont été revus, par différentes approches expérimentales, principalement chez des mollusques marins.

Si toutefois plusieurs schémas généraux du métabolisme des métaux lourds ont pu être établis chez certains bivalves, de nombreux mécanismes restent encore inexplicés.

Une partie de nos travaux de recherche concernent la participation des hémocytes et du système excréteur dans les mécanismes de stockage et de détoxification de deux métaux (plomb et zinc). Cependant, afin d'aborder correctement ces mécanismes, nous avons choisi de suivre les métaux depuis leur entrée dans l'organisme et de présenter une synthèse sur les processus d'absorption, de stockage, de transport et d'excrétion des métaux chez les bivalves principalement marins pour lesquels la bibliographie est disponible.

#### **1.INTRODUCTION**

##### **1. 1. ELEMENTS ESSENTIELS, ELEMENTS NON ESSENTIELS**

Pour le maintien de leur intégrité, les systèmes vivants ont élaboré des relations très étroites entre les cellules et les métaux au niveau de leur absorption, de leur transport, de leur stockage et de leur recyclage à l'intérieur de la cellule. Ces éléments entrent dans plusieurs catégories:

- C, N, O, P et S sont impliqués dans la formation des molécules organiques.

- Na, K, Ca, Mg, Cl et Si établissent la composition ionique des fluides intra et extracellulaires et le maintien des équilibres ioniques. Ils participent au transfert des messages, de certaines substances.

- Co, Cu, I, Fe, Mn, Mo, Ni, Se, Zn et V représentent les éléments traces essentiels assurant de nombreuses fonctions. Ils sont impliqués dans les réactions redox, le transport d'oxygène ou les activités catalytiques des métalloenzymes. Ils peuvent être également liés au site actif de l'enzyme et faire partie intégrante de la molécule.

Exemples de métaux impliqués dans certaines activités enzymatiques chez quelques mollusques (modifié d'après Simkiss, 1979; 1982; Simkiss et Mason, 1983)

Enzyme	Métal impliqué
amylase	Ca
cytochrome oxydase	Cu
pyruvate kinase	Mg, Mn
catalase	Fe
phosphatase alcaline	Zn
lactate	Zn
deshydrogénase	

Certaines protéines comme la ferritine, participent au stockage du fer ou comme les métallothionéines impliquées dans celui du zinc et du cuivre (Roesijadi, 1992).

Aux faibles concentrations, ces ions métalliques sont essentiels, quand leurs concentrations augmentent ils peuvent devenir inhibiteurs puis éventuellement toxiques.

- As, Ag, Cd, Hg, Pb représentent les éléments traces polluants qui ne possèdent aucun rôle biochimique fonctionnel. Ils sont rencontrés en concentrations élevées seulement à la suite d'activités anthropogéniques. Ils peuvent exercer leurs effets en parasitant les voies métaboliques des métaux essentiels (Simkiss, 1979; 1982; George, 1982; Simkiss et Mason, 1983).

Les éléments traces se trouvent, par définition, en très faibles concentrations dans l'eau. Essentiels ou non, ils sont potentiellement toxiques à un certain seuil de biodisponibilité. En effet, les invertébrés aquatiques sont capables de les concentrer dans leurs tissus à des niveaux largement supérieurs à ceux de l'environnement. La toxicité des métaux peut alors s'exprimer quand certains facteurs ont perturbé la prise

du métal ou ont modifié les capacités des organismes à les contrôler et à les éliminer (Rainbow *et al.*, 1990).

## 1. 2. NOTION DE DETOXICATION ET DE BIOACCUMULATION

Il est important, surtout chez les espèces bioindicatrices, d'expliquer la signification des concentrations métalliques rencontrées dans leurs tissus. Pour cela il est nécessaire de mieux comprendre les stratégies de prise et de contrôle de métal par les organismes (Rainbow *et al.*, 1990).

Malgré de nombreuses données et les quelques modèles proposés pour expliquer l'homéostasie des métaux, lourds en particulier, chez les mollusques, les concepts de détoxification et de bioaccumulation se confondent encore.

### ♦ Détoxification

Un exemple donné par Simkiss (1982) met bien en évidence la difficulté d'interprétation des accumulations métalliques:

Quand un métal entre dans le système sanguin d'un organisme, il est lié par une protéine circulante. Le complexe formé est phagocyté et pris en charge par le système lysosomal des cellules. A ce stade, le métal est séquestré et immobilisé dans des organites spécifiques. Comment interpréter et justifier cette accumulation métallique? Comme un processus de détoxification et ou simplement comme le turnover des protéines cytoplasmiques chargées du stockage du métal?

L'exemple des métallothionéines, illustre également cette difficulté. Par leur fortes capacités à lier les métaux, elles sont habituellement impliquées dans les mécanismes de détoxification du cadmium et du mercure ou dans la régulation cellulaire de métaux essentiels comme le zinc et le cuivre. Cependant, leurs rôles restent un sujet de controverse.

Récemment, Cosson *et al.* (1991) proposent de bannir, en ce qui concerne les métallothionéines, le terme de "protéines de détoxification". Elles ne seraient impliquées, avec certitude, que dans l'homéostasie du zinc et peut être du cuivre ; la fonction de détoxification serait éventuelle et fortuite.

Pour conclure à l'existence d'un système de détoxification, un organisme doit répondre à certains critères qui sont rarement vérifiés dans leur totalité:

- Il doit montrer une tolérance croissante aux effets du toxique.
- L'activité détoxificatrice doit être induite par la présence du toxique.
- L'activité de détoxification doit être compartimentalisée dans certains tissus ou cellules, protégeant ainsi l'organisme des effets du toxique.
- Le toxique doit être excrété sous une forme rendue non toxique par cette activité (Simkiss, 1982).

◆ **Bioaccumulation**

Même si tous les êtres vivants bioaccumulent certaines molécules pour survivre, le terme de bioaccumulateur a pris, plus récemment, un autre sens dans le contexte du biomonitoring des pollutions métalliques dans les écosystèmes aquatiques.

Chez de nombreuses espèces et pour divers métaux, une proportionnalité directe existe entre les concentrations métalliques de l'eau et celles des tissus, même si ces dernières résultent de plusieurs activités différentes au niveau des voies de prise du métal (directe ou trophique), des sites d'accumulation (système digestif ou rénal) ou de la vitesse du turnover de ces dépôts (Simkiss, 1982).

La notion de bioaccumulation repose sur deux composantes : la prise et la rétention ou non, c'est à dire l'excrétion.

Simkiss (1982) et Cossa (1989) rapportent les travaux de Williams (1981) et proposent une approche générale des processus de prise et de bioconcentration des cations divalents (voir figure 8). La membrane plasmique est hydrophobe, les cations métalliques sont hydrophiles et sont capables, sous forme libre ou liée (L3), avec l'aide d'un ligand (L1) synthétisé par la cellule, de pénétrer dans le cytoplasme. Dans ce compartiment, un second ligand (L2) piège le métal empêchant ainsi sa diffusion à l'extérieur. Les ligands constituent un système de "piégeage" dont l'efficacité dépend de la force de liaison des divers ligands.

Le stade ultime de liaison peut être spécifique dans le cas des métalloenzymes ou plus général dans les cas d'un système de détoxification comme les métallothionéines (Cossa, 1989) ou les lysosomes tertiaires (George, 1983a, b).

## **2. LA PRISE DU METAL**

La prise de métal est plus élevée pour les organismes dans les écosystèmes aquatiques où les animaux sont exposés aux métaux présents soit dans le milieu, soit dans leur alimentation, sous forme dissoute et particulaire.

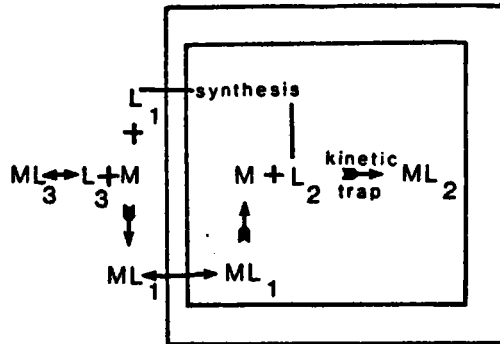


Figure 8. Rôle des ligands dans le transport et l'accumulation des métaux dans la cellule. La cellule synthétise le ligand (L<sub>1</sub>) qui transporte le métal (M) à travers la membrane plasmique. Dans le cytoplasme un deuxième ligand (L<sub>2</sub>) piège le métal empêchant ainsi une diffusion à l'extérieur. Dans l'environnement, les métaux peuvent être liés naturellement à des ligands (L<sub>3</sub>). Ainsi, une succession de ligands est probablement nécessaire au transport du métal dans la cellule. (d'après Williams, 1981 in Simkiss, 1982).

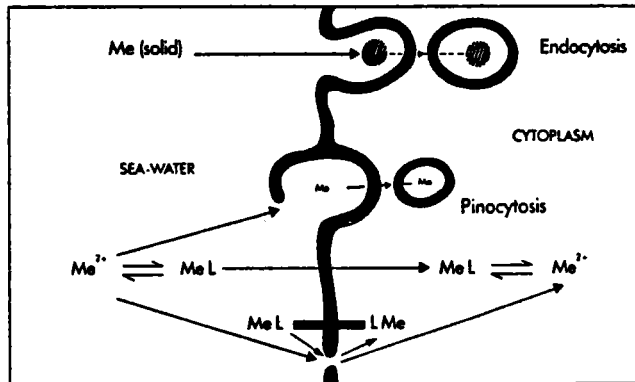


Figure 9. Absorption des métaux divalents chez les bivalves. L, ligand ; Me, métal. (Cossa, 1989).

Elle est également plus soumise et influencée par les variations de l'environnement. En effet, les changements de salinité, de pH, et de température ainsi que la présence de matières en suspension ou d'agents chélatants peuvent modifier la spéciation du métal et la physiologie des individus (George, 1982).

Le mécanisme de prise du métal chez les mollusques n'est pas complètement élucidé et plusieurs voies de pénétration peuvent coexister (Simkiss et Mason, 1983; George et Viarengo, 1985; Rainbow *et al.*, 1990).

Les métaux peuvent traverser les membranes plasmiques par:

- Diffusion passive pour les formes ioniques ou complexées.
- Transport facilité par des ligands.
- Pinocytose pour les complexes organo-métalliques.
- Endocytose pour les formes particulières (voir figure 8 et 9) (Simkiss et Mason, 1984; Cossa, 1989).

## 2. 1. PRISE A PARTIR DE LA PHASE DISSOUTE

Chez les mollusques bivalves, la prise de métal dissous se produit généralement au niveau des branchies et du manteau, largement en contact avec le milieu extérieur, ainsi qu'au niveau du tractus digestif.

George (1980) avance une diffusion passive pour le passage du zinc et du cadmium dans les branchies de *Mytilus*.

Chez la même espèce, le cadmium passe dans les épithéliums de la branchie et du manteau également par diffusion passive mais aussi lié à du mucus qui semble posséder une forte affinité pour le métal (Nola et Duke, 1983). Le mucus pourrait constituer une source de ligands améliorant la prise de métal ( Simkiss et Mason, 1983).

Le cadmium parasite les canaux à calcium pour traverser les structures membranaires des branchies isolées de *C. virginica* (Roesijadi et Unger, 1993). Ce moyen de pénétration est accompagné d'une diffusion passive du métal au niveau des épithéliums branchiaux de *Anodonta anatina* (Holwerda *et al.*, 1989).

Les travaux de Simon (1986), rapportés par Cézard et Haguenoer (1992), portent sur le transport du plomb à travers la membrane plasmique des hématies. Celui-ci s'effectue presque en totalité d'une manière passive. En effet, le potentiel négatif interne de la membrane accélère l'entrée du métal et réduit sa sortie.

L'utilisation d'inhibiteurs caractéristiques des anions laisse penser que le plomb traverse les barrières membranaires non en tant que cation mais en tant que complexe anionique. En effet, la vitesse de son entrée est directement proportionnelle aux concentrations externes d'ions  $Pb^{2+}$  et  $HCO_3^-$ .

Toutes les voies de transport sont possibles pour un même métal, leurs relatives importances dépendent alors seulement de la spéciation du métal. La coexistence de ces processus et la variabilité de la spéciation chimique rendent le concept de biodisponibilité très complexe (Cossa, 1989).

## 2. 2. PRISE A PARTIR DE LA PHASE PARTICULAIRE

La distribution des métaux est très complexe dans l'environnement, et il n'est pas aisé d'évaluer chez les bivalves en tout cas, l'influence relative de la prise à partir des phases solubles et particulaires. L'apport relatif des deux voies d'absorption dépend également de la stratégie alimentaire des mollusques (Simkiss et Mason, 1983). En effet, pour des bivalves filtreurs, dont fait partie *D. polymorpha*, la phase particulaire en suspension représente une source de contamination potentielle très importante (Ettajani *et al.*, 1992).

Chez *C. gigas*, plusieurs expériences en laboratoire ont mis en évidence une dominance des apports par la voie directe (eau) comparés à ceux de la voie trophique (particules alimentaires et sédimentaires) dans la contamination par le cuivre (Amiard *et al.*, 1986; Ettajani *et al.*, 1992), par l'argent (Martoja *et al.*, 1988b; Ettajani *et al.*, 1992) et par le plomb chez cette espèce (Amiard *et al.*, 1986) et chez *D. polymorpha* (Benyahia, 1991).

Toutefois l'ensemble de ces résultats montre que la voie de contamination trophique n'est pas négligeable et pourrait intervenir dans les expositions à long terme (Ettajani *et al.*, 1992).

La prise d'argent à partir de la phase particulaire reste insignifiante chez *C. virginica* (Abbe et Sanders, 1990).

L'apport de plomb par les deux voies est identique chez *M. edulis* (Schulz-Baldes, 1974), mais comme le souligne Amiard *et al.* (1986) les conditions expérimentales ne sont plus réalistes puisque les concentrations métalliques utilisées dans la contamination par voie trophique sont cent fois supérieures à celles de l'eau *in situ*.

Les épithéliums des branchies, du manteau et de la glande digestive sont responsables de l'absorption de particules de métal par des mécanismes d'endocytose (George, 1980; George et Pirie, 1980).

*M. galloprovincialis* est capable d'accumuler des particules de plomb supérieures à 0.8  $\mu\text{m}$  à partir de l'eau de mer avec un facteur d'enrichissement de 2300 (Pertoldi *et al.*, 1979).

Le plomb a été mis en évidence dans des vésicules d'endocytose dans les cellules branchiales de *M. edulis* sans que le processus de pinocytose ne soit observé (Schulz-Baldes, 1978).

Les événements de la pinocytose de particules d'hydroxyde de fer sont observés dans les cellules de branchies isolées de *M. edulis* (George *et al.*, 1976).

*Abra alba*, bivalve sédimentivore, est capable de retenir par endocytose des métaux sous forme particulaire ou liés aux particules de sédiments au niveau des branchies et des diverticules digestifs. Le stockage des éléments absorbés ainsi est assuré par le système lysosomal. Le devenir intracellulaire des métaux dissous ( $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  et  $\text{Al}^{+}$ ), assimilés par diffusion à travers les membranes sera d'ailleurs identique chez cette espèce (Martoja *et al.*, 1988a).

Les différentes formes métalliques pourront être complexées à l'intérieur des lysosomes par les protéines ou par les ions phosphates de ces derniers (Martoja *et al.*, 1988b).

### 2. 3. DEVENIR DES METAUX DANS LES ORGANES D'ABSORPTION

La séquestration des métaux dans les différents organes est due à des mécanismes de liaison impliquant, selon la nature du métal, divers ligands. Ainsi, des composés de type métallothionéines (Martoja et Martin, 1985; Amiard *et al.*, 1986) ou d'autres composés de nature protéique (Martoja *et al.*, 1988a; Berthet *et al.*, 1990) peuvent complexer des métaux des groupes IB et IIB, alors que d'autres métaux, tel le plomb, peuvent se lier avec des anions et précipiter sous une forme minérale (Amiard *et al.*, 1986).

Au niveau des organes de prise, tels les branchies ou le tractus digestif, les métaux assimilés par les différentes voies sont rapidement compartimentalisés au niveau du système lysosomal (George, 1982; Ballan-Dufrançais *et al.*, 1985; Jeantet *et al.*, 1985; Martoja *et al.*, 1988b).

En effet, l'accumulation de métaux dans les lysosomes est un phénomène général observé chez tous les êtres vivants (Sternlieb et Goldfisher, 1976).



Accumulées dans l'espace intralysosomal, les molécules non dégradables se maintiennent sous leur état initial, les éléments métalliques libérés par désorption deviennent disponibles pour l'organisme alors que d'autres se combinent avec des groupements minéraux ou organiques. Le devenir de ces derniers groupements dépend du type cellulaire concerné (Martoja *et al.*, 1988b).

A partir de la glande digestive une fraction métallique accumulée peut être directement excrétée par l'intermédiaire des fèces (George *et al.*, 1976; George, 1980; George et Pirie, 1980; Amiard *et al.*, 1986).

Dans les branchies, certains métaux quittent le cytosol par exocytose et s'accumulent à l'extérieur des cellules. Ainsi le plomb, associé à des carbonates et à du calcium, forme des dépôts extracellulaires dans les lames basales bordant l'épithélium branchial chez *M. edulis* (Marschall et Talbot, 1979).

Les métaux qui ne sont pas accumulés ou directement éliminés au niveau des lamelles branchiales et de la glande digestive peuvent être pris en charge par l'hémolymphe, soit stockés dans les hémocytes ou associés à des protéines du sérum. Par l'intermédiaire des hémocytes et/ou du sérum ils sont transportés vers les autres tissus et particulièrement vers les organes du système excréteur où ils seront accumulés puis éliminés vers le milieu extérieur dans le courant urinaire (George *et al.*, 1976; Schulz-Baldes, 1977; George, 1980; George et Pirie, 1980; George et Viarengo, 1985).

Plusieurs auteurs proposent une hypothèse concernant le passage du métal entre les compartiments branchiaux et hémolympatique. Ainsi, au niveau des cellules branchiales, les vésicules d'endocytose chargées d'éléments métalliques, sont transportées vers la partie basale et déversent leur contenu dans l'espace extracellulaire. Là, les complexes métalliques sont phagocytés par les hémocytes et transportés aux différents tissus (George *et al.* 1976; Coombs et George, 1978).

### **3. STOCKAGE ET TRANSPORT DES METAUX PAR LES CONSTITUANTS DE L'HEMOLYMPHE**

Depuis longtemps, de multiples études ont montré que les bivalves sont capables d'absorber et de concentrer dans leurs hémocytes de nombreux métaux présents dans le milieu naturel ou apportés lors de contaminations expérimentales.

### 3. 1. CAPACITE D'ACCUMULATION DES METAUX PAR LES HEMOCYTES

Normalement présents dans l'eau à l'état de traces, de nombreux métaux et métalloïdes (Cd, Ag, Mo, Zn, Br, Cu, Fe, Ca, S, Si, Al) sont détectés dans les amœbocytes de la glande digestive de *Pecten maximus* (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1982).

Chez un autre pectinidé des régions Antarctiques, *A. colbecki*, la microanalyse révèle dans les hémocytes, au niveau de particules électron denses la présence d'Ag, Se, Fe et de Cu (Nigro *et al.*, 1992).

Chez les ostréidés, le cuivre et le zinc sont décelés ensembles ou indépendamment dans les granules de certains hémocytes (George *et al.*, 1978; Pirie *et al.*, 1984) où ils peuvent représenter respectivement 93 % et 85 % de la charge totale de l'organisme (Thomson *et al.*, 1985).

Les hémocytes à zinc et à cuivre de *C. gigas* constituent le site principal d'accumulation du cadmium (Martoja et Martin, 1985), du plomb (Amiard *et al.*, 1986) et de l'argent administré expérimentalement par voie directe et trophique (Martoja *et al.*, 1988a).

Chez *Mytilus edulis*, des teneurs élevées de plomb (Schulz-Baldes, 1977), de zinc (George et Pirie, 1980) et de cadmium (Marschall et Talbot, 1979) sont mis en évidence dans les hémocytes granuleux par microanalyse de rayons-X.

Les hémocytes jouent un rôle important dans la capture et le stockage du chrome (Chassard-Bouchaud et Galle, 1988) et de l'uranium dont ils assurent également en partie l'excrétion (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1983).

Le plomb et le zinc sont mis en évidence, par histochimie, dans les hémocytes de *D. polymorpha* contaminée expérimentalement (Giamberini, 1987; Maarouf, 1988; Benyahia, 1991).

Toutefois, la participation des hémocytes dans la bioaccumulation ou le transport du cadmium n'est pas signalée chez *D. polymorpha* (Herwig *et al.*, 1989) ni chez deux autres moules d'eau douce *A. cygnea* et *A. anatina* (Hemelraad et Herwig, 1988).

L'intervention des hémocytes dans les mécanismes d'accumulation et de détoxification des métaux lourds reste un sujet de controverse et n'est pas complètement élucidée chez les mollusques bivalves.

Afin d'expliquer la présence de concentrations métalliques élevées dans les hémocytes des bivalves, Simkiss et Mason (1983) avancent trois hypothèses:

- Le métal présent dans l'hémolymphe, sous forme particulaire ou associé à des protéines est phagocyté par les hémocytes. Dans le milieu intracellulaire, le métal est

traité comme n'importe quel matériel non digérable et est accumulé dans le cytoplasme.

- La seconde hypothèse suggère que les hémocytes constituent un système de détoxification spécifique en capturant les ions métalliques de l'hémolymphe, maintenant ainsi, les concentrations sanguines en dessous d'un seuil toxique.

Cette théorie est retenue ultérieurement par plusieurs auteurs. Chez *P. maximus* les hémocytes stockent les métaux d'origine sérique et complètent ainsi le rôle des organes du système excréteur (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1985).

Chez *C. gigas*, le cadmium (Martoja et Martin, 1985) et l'argent (Martoja *et al.*, 1988a) sont compartimentalisés préférentiellement dans les hémocytes qui assurent ainsi la détoxification des ces métaux.

L'implication des hémocytes dans cette fonction est appuyée, dans ces études, par la faible participation des reins à l'élimination des métaux.

- La dernière théorie propose que le métal absorbé au niveau des branchies est transféré aux hémocytes puis transporté par la circulation sanguine aux reins et à d'autres organes où il sera stocké ou excrété. Cette troisième hypothèse indique que les hémocytes seraient impliqués dans le transport spécifique des métaux.

### 3. 2. CAPACITE DE TRANSPORT DES METAUX PAR LES HEMOCYTES

Les travaux de Cuénot (1914) et de Strauber (1950), rapportés par Seiler et Morse (1988), ont montré la capacité des hémocytes à phagocyter et à éliminer du matériel particulaire. Seiler et Morse (1988) y font référence pour admettre que le pool d'hémocytes présents dans les sinus sanguins autour des organes d'absorption constitue le système de transport des polluants le plus probable.

George (1980) et Schulz-Baldes (1977) ont observé une période de latence de l'accumulation du zinc, du cadmium et du plomb au niveau des reins de *M. edulis*, alors qu'ils sont rapidement assimilés dans les divers organes de prise et dans les hémocytes. Le décalage indique donc que des mécanismes de relais sont élaborés entre les différents compartiments.

Chez *Mytilus*, le plomb (Schulz-Baldes, 1977; Coombs, 1977), le zinc (George, 1980; George et Pirie, 1980), le fer (George *et al.*, 1976; Coombs, 1977), le cadmium (George, 1980), ainsi que l'uranium (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1983) sont transportés depuis les épithéliums d'absorption jusqu'au épithéliums d'excrétion par l'intermédiaire des hémocytes.

Très peu d'études mettent en évidence clairement la fonction de transport des hémocytes.

Cependant, en contaminant des moules par du zinc radioactif, George et Pirie (1980) parviennent à suivre le trajet du métal dans l'organisme (voir figure 10). La moitié du zinc présent dans l'hémolymphe est inclus dans les granulations cytoplasmiques des hémocytes qui assurent le transfert du métal depuis les branchies ou le manteau jusqu'aux reins qui constituent le site principal d'accumulation métallique.

Des complexes identiques d'Ag-Se, révélés dans les lames basales des néphrocytes et dans les granules de type lysosomal des hémocytes de *A. colbecki*, laissent penser que ces dernières cellules sont responsables du transfert du métal dans l'organisme (Nigro *et al.*, 1992).

### 3. 3. LOCALISATION ET FORME DE STOCKAGE METALLIQUE

Le zinc et le cuivre sont détectés par microanalyse dans les granulations cytoplasmiques des hémocytes chez certains ostréidés (George *et al.*, 1978; Pirie *et al.*, 1984; Thomson *et al.*, 1985). A ces endroits, le cuivre est associé à du soufre (George *et al.*, 1978; Amiard *et al.*, 1986) et le zinc est associé à du phosphore (George *et al.*, 1978).

Chez *Mytilus edulis*, le zinc est également localisé dans les granules où presque la totalité (98%) est complexée à une protéine à poids moléculaire élevé, le reste étant combiné à des sels (George et Pirie, 1980).

Le cadmium, mis en évidence dans les hémocytes à zinc et à cuivre chez *C. gigas* est associé à une protéine sulfhydrilée (Martoja et Martin, 1985)

Le plomb est, comme les autres métaux, localisé dans les granules membranaires des hémocytes chez *Mytilus* (George, 1980) et chez *C. gigas* (Amiard *et al.*, 1986) où il est le plus souvent précipité sous forme de sels.

Dans les hémocytes comme dans les épithéliums de prise, les métaux sont compartimentalisés dans des vésicules membranaires qui appartiennent au système lysosomal. Ces mécanismes de détoxification cellulaire par séquestration des métaux à l'écart du reste du cytoplasme expliquent que les organismes soient capables de concentrer des métaux essentiels en excès ou d'accumuler des métaux non essentiels sans que leur métabolisme cellulaire ne soit immédiatement affecté.

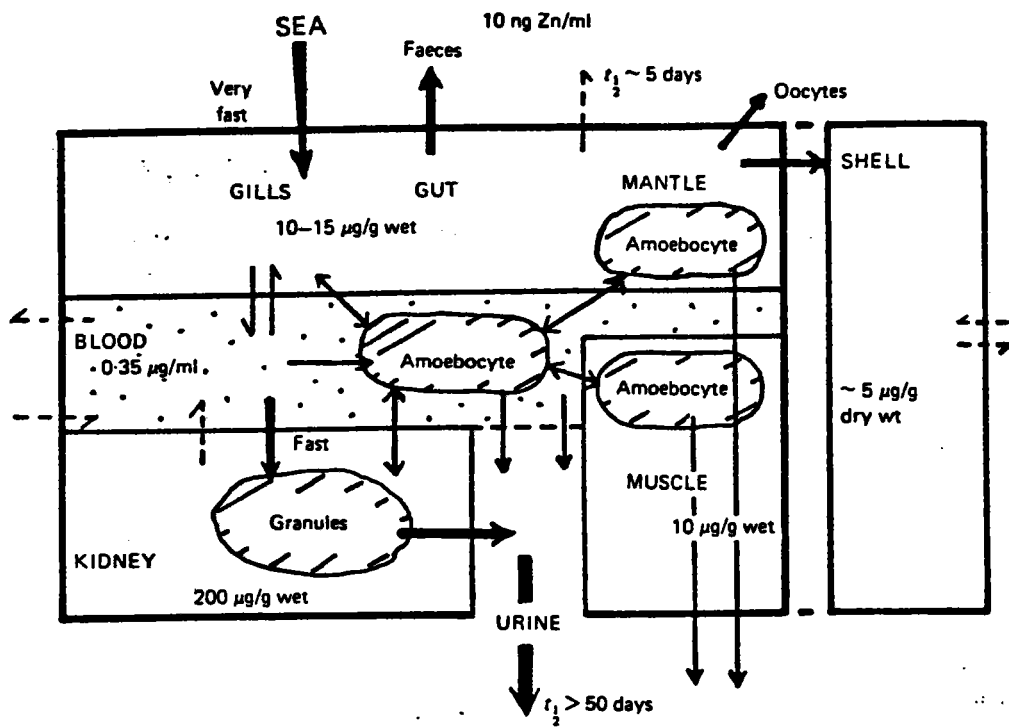


Figure 10. Modèle illustrant la dynamique du zinc chez *M. edulis*. Les flèches pleines représentent les voies connues, les flèches en pointillés représentent les voies possibles. La taille attribuée à chaque tissu est proportionnelle à sa charge en zinc, à l'exception du fluide sanguin qui contient seulement 0.5 % du zinc total. (George et Pirie, 1980).

Le transfert des polluants aux organes excréteurs par l'intermédiaire des hémocytes pourrait suivre deux voies selon Seiler et Morse (1988). Dans un cas, les hémocytes pourraient libérer leurs granules chargés dans les sinus rénaux. Les vésicules entières ou seulement leur contenu seraient endocytés à la base des cellules rénales et transportés à l'apex pour être excrétés. Dans la deuxième voie, les hémocytes chargés traversent les épithéliums pour excréter, à l'extérieur, uniquement leur contenu et pourraient ensuite soit regagner l'hémolymphe, soit être éliminés entièrement et alors être perdus pour l'organisme.

Ces différentes voies restent actuellement théoriques même si certaines observations appuyant chacune d'elles existent (voir figure 10).

### 3. 4. TRANSPORT DES METAUX PAR LE SERUM

Dans l'organisme, un métal peut être transporté par différentes voies. En effet, les hémocytes ne phagocytent pas l'ensemble du métal présent dans l'hémolymphe. Une fraction de métal, lié le plus souvent à des protéines, circule librement dans l'hémolymphe et arrive aux reins directement ou par l'intermédiaire du canal rénopéricardique après le passage à travers les barrières d'ultrafiltration des glandes péricardiales.

Ainsi, le plomb arrivant aux reins dans l'urine primaire peut être réabsorbé par pinocytose au niveau des microvillosités apicales et immobilisé sous une forme inerte dans des vésicules membranaires (Schulz-Baldes, 1977).

Les observations de George et Pirie (1980) montrent que la moitié du zinc, lié à des protéines, non pris en charge par les hémocytes chez *Mytilus* est rapidement et facilement phagocyté par les cellules rénales et inclus dans des granules minéraux.

Chez *M. mercenaria*, le cadmium peut suivre un cheminement identique dans l'organisme. En effet, après le passage à travers les podocytes il est soit éliminé directement avec l'urine soit réabsorbé à l'apex des néphrocytes. Il peut également pénétrer dans les reins par leur partie basale où il a été apporté par des protéines sériques ou par des hémocytes (Robinson *et al.*, 1985).

Les mécanismes de pinocytose du métal au niveau des microvillosités apicales doit vraisemblablement coïncider avec le processus normal de réabsorption rénale.

Marcaillou et Martoja (1990) ont montré, à l'aide de différents marqueurs particuliers et hémoprotéiques, que seules des molécules, telle la peroxydase (PM 44000), n'excédant pas 6 nm pouvaient être réabsorbées par les cellules rénales.

#### **4. SITES ET MECANISMES D'ACCUMULATION, DE DETOXICATION ET D'EXCRETION DES METAUX DANS LES ORGANES EXCRETEURS**

##### **4. 1. CONCENTRATION METALLIQUE DANS LES GLANDES PERICARDIQUES**

Très peu de travaux, parmi les nombreux qui ont traité de la distribution et des mécanismes de détoxification des métaux chez les mollusques bivalves, ont abordé la participation des glandes péricardiales au processus d'accumulation et d'excrétion des métaux.

Naturellement chez certaines espèces de gastéropodes, les granulations cytoplasmiques des podocytes contiennent de fortes teneurs de cuivre et de fer impliqués, respectivement dans la composition de l'hémocyanine ou de l'hémoglobine et de la ferritine vitellogène (Sminia et al., 1972 *in* Miksys et Saleuddin, 1987; Miksys et Saleuddin, 1987). Cependant chez des bivalves, dépourvus de pigments respiratoires, le fer, contenu dans la ferritine, est détecté dans les granules cytoplasmiques (Khan *et al*, 1988).

Les caractéristiques morphologiques ultrastructurales et la présence d'enzymes lysosomales dans les granulations cytoplasmiques des podocytes, mis en évidence dans plusieurs études, laisse penser à une fonction excrétrice (Moore *et al.*, 1980; Khan *et al*, 1988).

En effet, les glandes péricardiques peuvent être impliquées dans la prise, la dégradation et l'élimination de certains constituants de l'hémolymphe. Le matériel prélevé par endocytose, d'une manière non spécifique, peut être dégradé ou accumulé dans le système lysosomal puis excrété (Moore *et al.*, 1980).

Moore *et al.* (1980) et Marcaillou et Martoja (1990) ont montré la capacité des podocytes à prélever dans l'hémolymphe des protéines de l'importance des peroxydases.

Ainsi, le cadmium a été révélé dans les podocytes de *M. mercenaria* (Meyhofer et al., 1983) et de *D. polymorpha* contaminés expérimentalement (Herwig et al., 1989).

Les cellules péricardiques accumulent très fortement l'argent chez *C. varia* exposée au métal. En effet, rapportée au poids de l'organe, la teneur en métal est probablement l'une des plus élevées de l'organisme (Martoja et al., 1989). Dans le compartiment intracellulaire, l'argent est localisé dans les lysosomes où il précipite sous forme de sulfure.

Cependant, chez *D. polymorpha*, l'argent n'est pas détecté dans les podocytes mais se concentre, uniquement, dans les hémocytes du tissu péricardique (Martoja et Truchet, 1991)

Le cuivre et le plomb se concentrent dans les volumineux lysosomes, contenant naturellement du phosphate de fer, des cellules péricardiales de *C. gigas* (Amiard et al., 1986). Toutefois, la charge métallique de cet organe est moins élevée que celle des reins.

Les glandes péricardiques pourraient donc constituer un des organes de transit et d'excrétion des métaux lourds. En effet, les divers métaux accumulés sous forme de concrétions dans les podocytes seraient libérés dans la cavité péricardique et gagneraient la lumière rénale. Ils peuvent être directement éliminés dans le flot urinaire ou être réabsorbés au niveau de la portion proximale des reins (Robinson et al., 1985)

#### 4. 2. DISTRIBUTION SUBCELLULAIRE DES METAUX DANS LES REINS DES BIVALVES

De nombreuses études ont montré que le rein de différentes espèces de bivalves accumule un grand nombre de métaux et constitue l'organe principal de concentration de certains métaux essentiels comme le zinc (George et Pirie, 1980; Lobel, 1987; Mauri et al, 1990) et d'autres sans fonction métabolique connue tel le cadmium (Carmichael et al., 1980; Robinson et Ryan, 1986; Hemelraad et Herwig, 1988) ou encore le plomb (Schulz-Baldes, 1977; Coombs et George, 1978).

Dans le milieu intracellulaire, les métaux lourds, selon leur nature, peuvent être stockés et détoxiqués soit par liaison à des protéines spécifiques, soit par sequestration sous différentes formes dans des vésicules membranaires.

Ces différentes formes de détoxification peuvent également coexister pour le même métal dans un type cellulaire.



#### 4. 2. 1. Stockage des métaux par liaison à des protéines spécifiques

La distribution intracellulaire des métaux peut varier selon le métal et le tissu concerné. Dans le cytoplasme Zn, Cd, Cu et Hg sont rapidement liés à des métalloprotéines et immobilisés sous une forme inactive. D'autres métaux, comme le plomb ne sont jamais liés par des thionéines cytoplasmiques. En effet le plomb qui entre dans le compartiment cellulaire, sous diverses formes, est directement pris en charge et immobilisé par le système lysosomal (voir figure 11 et 12) (George et Viarengo, 1985).

Plusieurs auteurs ont isolé des composés de nature protéique, responsables de la liaison des métaux dans le cytosol des néphrocytes chez plusieurs bivalves.

Une fraction du zinc, accumulé dans les reins de *M. edulis*, est associée à deux ligands de nature protéique à faible poids moléculaire (5000 et 700-1300). Le ligand de plus faible poids moléculaire est en partie responsable de la variabilité des teneurs en zinc mesurées dans les reins (Lobel et Marschall, 1988).

Dans le cytosol des cellules rénales de *M. mercenaria*, Cd, Zn, et Mn sont liés, à des macromolécules de différents poids moléculaires (60000, 12000 et 7500 d) (Carmichael *et al.*, 1980) et Cd et Cu liés à des protéines de 14500 à 16500 daltons (Robinson *et al.*, 1985).

Le zinc et le cadmium sont associés à des protéines spécifiques de 45000 daltons dans les reins de *P. magellanicus* (Fowler et Gould, 1988).

La localisation subcellulaire des complexes métallo-protéiques est généralement attribuée à la phase soluble du cytoplasme. Cependant, George (1983a) met en évidence des métallothionéines dans les lysosomes primaires et secondaires des néphrocytes de *M. edulis*.

En effet, les métalloprotéines sont continuellement recyclées par le système lysosomal. Dans ce compartiment le métal, libéré de son association, est piégé dans la matrice du lysosome pendant un certain temps avant son excrétion dans le milieu extracellulaire (voir figure 11) (George et Viarengo, 1985; Bouquegneau *et al.*, 1984).

#### 4. 2. 2. Stockage des métaux dans des vésicules membranaires

Alors que les processus de liaison à des protéines constituent une des voies de stockage des métaux commune aux vertébrés et aux invertébrés et que la compartimentalisation dans les lysosomes reste largement répandue dans le règne

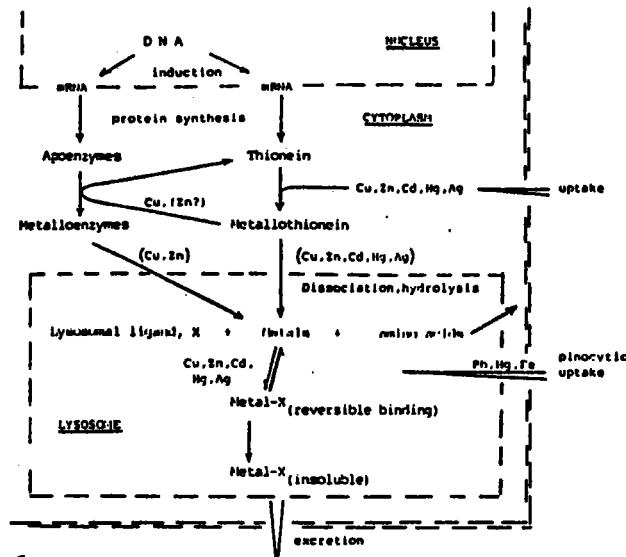


Figure 11. Voies métaboliques pour les métaux du groupe B dans les cellules animales. (George et Viarengo, 1985).

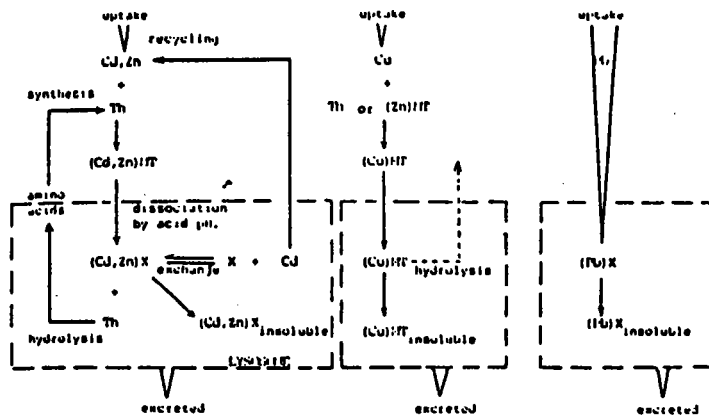


Figure 12. Contrôle lysosomal des concentrations métalliques tissulaires et distribution subcellulaire. Le recyclage à partir du lysosome vers le cytosol est rapide pour le Cd et le Zn, lent pour le Cu et probablement pour le Hg et inexistant pour le Pb. (George et Viarengo, 1985).

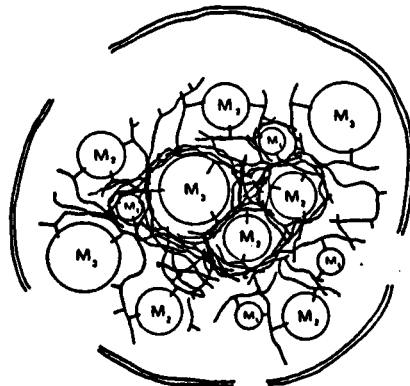


Figure 13. Représentation schématique des sites de liaison du métal dans les lysosomes tertiaires chez *M. edulis*. Les sites de liaison du métal sont distribués au hasard. Les différents métaux (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>,...) peuvent être liés si la géométrie est correcte (position et distance des ligands). Les métaux de la zone externe "flexible" peuvent être échangés, dans les autres régions les réactions de peroxydation lipidique augmentent les liaisons intramoléculaires et bloquent les métaux à l'intérieur des structures. (George, 1983b).

animal, l'immobilisation des métaux au niveau de sphérocristaux est réservée aux invertébrés (Bouquegneau *et al.*, 1984).

#### 4. 2. 2. 1. Au niveau de granules minéraux

Certaines espèces de bivalves possèdent, au niveau des reins, des granules minéraux intracellulaires dont la composition chimique varie selon les espèces, les individus et les cellules. Ils sont composés principalement de calcium et de phosphates mais aussi d'autres éléments dits majeurs tels Mn, Mg, Zn et Fe accompagnés, naturellement, d'un grand nombre d'éléments mineurs comme Ba, Cu, Cd, Sr, Ni, Pb, Cr, Hg, Co, Al (Doyle *et al.*, 1978; Carmichael *et al.*, 1979; Hignette, 1979; Sullivan *et al.*, 1988).

Leur mécanisme de formation n'est pas connu, mais il semblerait qu'ils soient constitués d'une matrice organique centrale recouverte de strates minérales (George, 1982).

Expérimentalement, les concrétions minérales de *M. mercenaria* sont responsables de l'accumulation de 34.4 % de Mn, de 5.6 % de zinc et seulement de 1.3% de Cd (Carmichael *et al.*, 1980). Cependant, chez la même espèce (Morse *et al.*, 1985) et chez *A. irradians* (Carmichael et Fowler, 1981), elles jouent le rôle principal dans la concentration et l'excrétion du cadmium.

*M. edulis*, exposée expérimentalement à l'uranium, immobilise le métal sous une forme insoluble dans les sphérocristaux intra ou extracellulaires. En effet, à ce niveau l'uranium est associé à des phosphates et en moindre proportion à Ca, Fe, S, Zn et Cu (Chassard-Bouchaud, 1983).

Le plomb est incorporé dans les strates minérales et le cuivre dans les strates organiques des sphérocristaux de *Mytilus* (Amiard *et al.*, 1986).

Chez la même espèce contaminée par le zinc George et Pirie (1980) détectent le métal dans des granules plus ou moins minéralisés. Il semblerait que dans les reins de cette espèce, des granules minéraux coexistent avec des granules d'origine lysosomale.

Les concrétions intracellulaires, d'origine lysosomale, des reins de *M. mercenaria* donnent naissance aux concrétions extracellulaires de grande taille mais nettement moins riches en éléments organiques. Les granules extracellulaires continuent à croître dans la lumière rénale en y accumulant préférentiellement des éléments inorganiques. Chez certaines espèces, elles représentent d'ailleurs, le système de séquestration des métaux lourds le plus important (Sullivan *et al.*, 1988).

Les études de contamination ont montré que les granules sont excrétés chez les individus témoins et exposés. Toutefois, les mécanismes excréteurs sont accélérés lors de l'exposition au métal (Cd, Carmichael et Fowler, 1981; Mn, Zn, Miller *et al.*, 1985). Naturellement, ils peuvent également être éliminés lors de la ponte des gamètes (George, 1982).

Chez les bivalves, les granules minéraux forment un système de détoxification très efficace aussi bien pour les excès de métaux essentiels que pour les métaux lourds.

#### 4. 2. 2. 2. Au niveau du système lysosomal

Le système lysosomal est impliqué dans la dégradation des aliments et dans le renouvellement des organites et des protéines cellulaires. Il est formé par un ensemble de vésicules membranaires dont les stades de développement sont parfois difficilement différenciables: les vésicules de pinocytose, les lysosomes primaires à contenu plus ou moins dense aux électrons, les lysosomes secondaires et les lysosomes tertiaires ou corps résiduels, stade ultime, très osmiophiles, contenant des débris cellulaires.

Au niveau des reins comme au niveau des organes de prise le métal peut s'accumuler dans les lysosomes. Cependant, les capacités des jeunes vésicules à séquestrer les métaux sont plus faibles que celles des lysosomes secondaires et tertiaires, plus âgés (George, 1982).

Les métaux présents dans le cytoplasme sous différentes formes, inclus dans des vésicules de pinocytose ou liés à des métalloenzymes et à des métalloprotéines, sont pris en charge et séquestrés dans les lysosomes secondaires puis tertiaires. Des composés organiques mais aussi des métaux comme le zinc et le cuivre sont recyclés et peuvent retourner dans le cytosol. Par contre, d'autres tel le plomb restent immobilisés dans le système lysosomal (figure 12).

Ainsi le plomb (Schulz-Baldes, 1977; Coombs et George, 1978), le zinc (George et Pirie, 1980; George, 1983b) et le cadmium (George, 1983a, b) ont été détectés par microanalyse dans diverses vésicules du système lysosomal et principalement dans les lysosomes tertiaires.

Stade terminal du développement lysosomal, ils contiennent du matériel cellulaire non digérable et sont composés de pigments lipoprotéiques fortement insolubles ou lipofuchsines associés à une fraction métallique (10 % environ) constituée essentiellement de fer, de zinc et de calcium (George, 1983a).

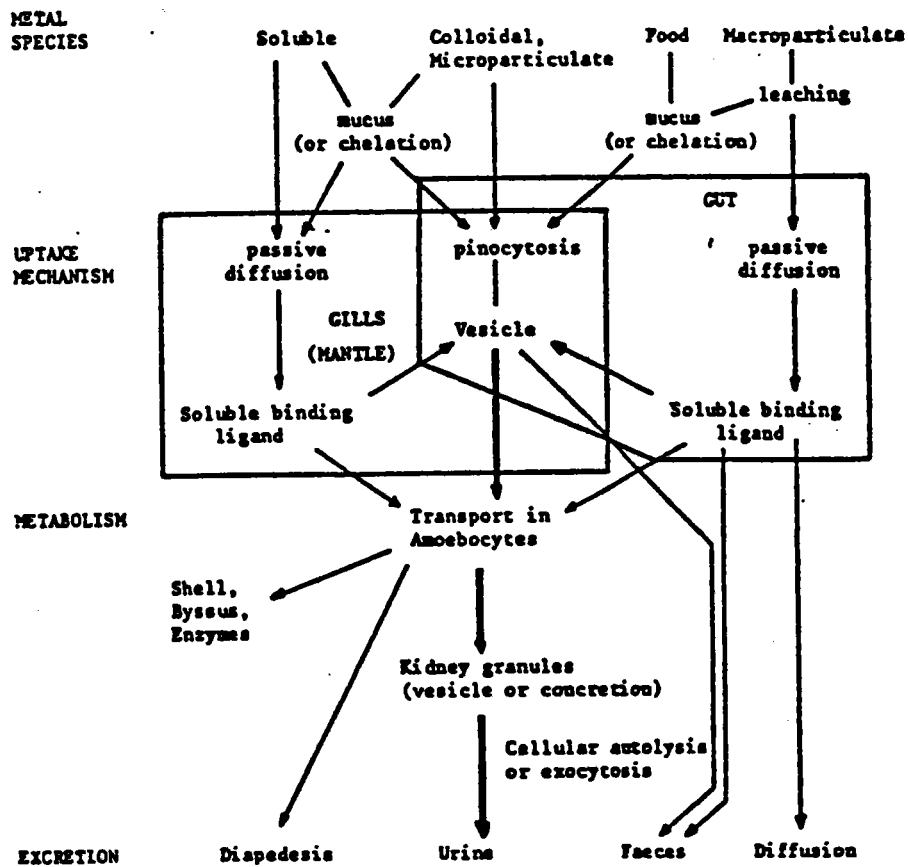


Figure 14. Voies du métabolisme des métaux chez les bivalves. (George, 1960).

Les granules ont été isolés et contaminés *in vitro* par le cadmium et le zinc (George, 1983b). Les résultats expérimentaux ont permis de montrer que les granules de lipofuchsine jouent un double rôle dans le contrôle intracellulaire des concentrations métalliques.

Ainsi, ils peuvent exercer un contrôle thermodynamique en équilibrant le métal cytoplasmique. Le mécanisme de liaison n'est pas spécifique, ils sont donc capables de lier une grande variété de métaux, tels  $\text{Ca}^{++}$  ou  $\text{Mg}^{++}$  libres dans le cytoplasme ou d'autres métaux associés à des complexes protéiques. Les éléments métalliques, moins fortement liés à la périphérie du granule, peuvent regagner le cytoplasme (figure 13).

Les granules peuvent également exercer un contrôle cinétique et agir comme un piège pour les métaux excédentaires. En effet, dans la zone centrale du lysosome, les réactions de peroxydation lipidique augmentent les liaisons intermoléculaires et immobilisent les métaux sous une forme insoluble (figure 13).

De fortes concentrations de métaux sont ainsi accumulées et détoxiquées par ces structures. En effet, dans les reins de *Mytilus*, des concentrations de 50 mg de Pb / g ont été mesurées (Schulz-Baldes, 1974). Les granules chargés en métaux représentent un cinquième du volume cellulaire (George et Pirie, 1980).

Les invertébrés, à l'opposé des vertébrés sont capables d'excréter les corps résiduels par des mécanismes d'exocytose (George, 1982; Viarengo, 1985).

Ils peuvent être excrétés dans la lumière rénale de diverses manières. En effet, la totalité du néphrocyte chargé de granules métalliques ou seulement sa partie apicale contenant la majorité des granules sont éjectées dans la lumière et quittent l'organisme en même temps que l'urine par l'uropore (Schulz-Baldes, 1977; George et Pirie, 1980).

Les invertébrés aquatiques ont développé divers mécanismes efficaces pour l'homéostasie et la détoxification des métaux lourds: compartimentalisation dans des vésicules membranaires ou formation de précipités inorganiques intracellulaires. Les deux modes de détoxification peuvent opérer en même temps dans le compartiment cellulaire pour le même métal.

Chez les bivalves le complexe, formé par les reins et la glande péricardiale, constitue donc le centre de stockage et d'excrétion des métaux et des autres xénobiotiques. Il est clair que les hémocytes font partie intégrante de ce système.

Le modèle général proposé par George (1980) illustre et résume les différentes étapes d'absorption, de concentration et d'élimination des métaux lourds chez les mollusques bivalves (figure 14).

Cependant, ce modèle concerne préférentiellement les bivalves marins et serait susceptible de présenter quelques modifications pour les bivalves d'eau douce, soumis à des conditions environnementales différentes et ne possédant pas la même physiologie.

#### **IV : EFFETS CELLULAIRES ET BIOCHIMIQUES DES METAUX**

La dernière partie de la synthèse bibliographique concerne l'évaluation de l'effet des métaux sur les hémocytes à un niveau cellulaire et subcellulaire.

Comme il a été énoncé précédemment, les bivalves ont développé plusieurs mécanismes pour réguler l'accumulation des métaux lourds dans l'organisme. Néanmoins, la toxicité des métaux peut s'exprimer lorsque ces mécanismes sont saturés.

##### **1. EFFETS DES METAUX SUR LA POPULATION HEMOCYTAIRE**

###### **1. 1. EFFETS SUR LE NOMBRE DE CELLULES**

Les hémocytes, comme nous l'avons montré au chapitre précédent, participent au transport et à l'excrétion des métaux. On pourrait alors penser que les bivalves répondraient au stress d'une pollution métallique par une surproduction d'hémocytes, nécessaires à l'élimination de l'excès de métal.

Cette première éventualité fait intervenir les mécanismes de régulation interne des métaux chez les bivalves. Cependant quand les capacités de détoxification de l'organisme sont dépassées, les métaux peuvent produire des effets toxiques conduisant à la réduction du pool hémocytaire.

Très peu d'études ont tenté d'évaluer l'effet des métaux sur le nombre d'hémocytes chez les mollusques.

Expérimentalement, seuls les effets du cadmium et du cuivre ont été étudiés. Selon l'espèce, ils induisent des réponses diverses et parfois difficilement interprétables.

Ainsi le cuivre ne provoque pas d'augmentation du nombre total d'hémocytes chez *C. virginica* mais élève la proportion des granulocytes (Cheng, 1988a).

*M. edulis*, contaminée par le cuivre, montre un pourcentage de granulocytes trois à quatre fois supérieur à celui des individus témoins (Pickwell et Steinert, 1984). Dans cette étude, le taux de macrophages (selon la terminologie de Moore et Lowe, 1977) augmente puis diminue brusquement chez les moules exposées au métal mais également, ce qui est plus surprenant, chez les moules témoins. Certaines contraintes expérimentales comme le mode de prélèvement de l'hémolymphe ou les conditions de jeûne peuvent, en partie, expliquer ces fluctuations anormales.

Utilisé à des doses largement inférieures à la CL 50, le cuivre ne provoque aucun effet sur la quantité d'hémocytes chez *Sunette scripta*. Au contraire, utilisé à des concentrations proches de la CL 50, il diminue l'abondance des hémocytes chez *Villorita cyprinoides* var. *cochiensis* (Suresh et Mohandas, 1990b). Les auteurs proposent deux hypothèses pour expliquer ces fluctuations : Les effets toxiques du cuivre ont entraîné la mort des cellules et / ou ont induit la participation des hémocytes au transfert du métal aux sites de stockage et d'excrétion.

Le cadmium stimule l'hémopoïèse chez *C. virginica* mais diminue la proportion des granulocytes, pouvant ainsi, éventuellement perturber les capacités de défense interne de l'organisme (Cheng, 1988a).

Il provoque l'effet inverse sur le pool hémocytaire de *O. edulis*, en affectant principalement le type d'hémocytes contenant du zinc et du cuivre (George *et al.*, 1983).

Des études comparatives entre des organismes, provenant de sites pollués ou non, ont également mis en évidence des variations du nombre de cellules. En effet, les individus soumis au stress polluant montrent des taux plus élevés de granulocytes circulants, impliqués dans l'élimination du matériel xénobiotique (Ruddell et Rains, 1975; Seiler et Morse, 1988). De plus, Seiler et Morse (1988) observent des concentrations plus élevées de granulocytes, chargés de matériel particulaire, dans les sinus autour des reins de *M. arenaria* provenant de sites contaminés.

Ces observations argumentent en faveur de la participation des hémocytes aux mécanismes de transport et d'excrétion des métaux.

## 1. 2. EFFETS SUR LES CAPACITES PHAGOCYTAIRES

Les hémocytes sont impliqués dans les mécanismes de phagocytose de tout corps étranger, biotique ou abiotique, qui pénètre dans l'organisme. Ainsi des



complexes métalliques particulières peuvent être pris en charge de cette manière par les hémocytes. La toxicité de certains métaux pourrait donc altérer ces fonctions.

Selon les conditions expérimentales, un métal peut induire différents effets.

Ainsi, *in vivo* le cuivre (1 ppm) inhibe la phagocytose chez *C. virginica* (Cheng, 1988b); *in vitro*, la même concentration n'a aucun effet, tandis qu'une concentration élevée de métal (5 ppm) stimule ce mécanisme (Cheng et Sullivan, 1984).

Il en est de même pour le cadmium qui n'a aucun effet *in vitro* mais possède des effets stimulateur *in vivo* (Cheng et Sullivan, 1984; Cheng, 1988b).

Plusieurs métaux testés, *in vitro*, comme Pb, Zn, Mn, Cd à toutes les concentrations et Co, Cr, Fe, Hg, Sn à faibles doses n'altèrent pas les capacités phagocytaires des hémocytes, tandis que 0.5, 1 et 5 ppm de mercure inhibent la phagocytose (Cheng et Sullivan, 1984).

## 2. EFFETS DES METAUX SUR LE SYSTEME LYSOSOMAL

Les premières perturbations, induites par les xénobiotiques et observables dans le compartiment intracellulaire, sont associées à certains organites particuliers comme les mitochondries, le reticulum endoplasmique ou les lysosomes (Moore, 1985).

Dans divers organes, les lysosomes constituent le principal site de séquestration des métaux et sont altérés en premier au niveau de leur intégrité membranaire (Sternlieb et Goldfischer, 1976; Viarengo, 1985; Moore, 1985).

De nombreuses études ont montré que divers composés peuvent entraîner la déstabilisation des structures membranaires des lysosomes et libérer ainsi les hydrolases dans le cytoplasme (Sternlieb et Goldfischer, 1976).

Les réponses lysosomales sont utilisées comme indice de stress pour évaluer les effets biologiques des pollutions métalliques (Cheng, 1983a; Moore, 1985; Tabata *et al.*, 1991; Viarengo et Canesi, 1991; Regoli, 1992).

La glande digestive des bivalves possède un système lysosomal particulièrement développé et représente un modèle idéal pour évaluer les réponses des lysosomes à une contamination métallique (Regoli, 1992).

Le cuivre, le cadmium et le mercure déstabilisent les membranes lysosomales dans les cellules digestives chez plusieurs espèces de mollusques (Viarengo *et al.*, 1981, 1987; Moore *et al.*, 1982; Chandy et Patel, 1985; Marigomez *et al.*, 1989).

Chez les bivalves les granulocytes, riches en enzymes lysosomales, pourraient également servir de support aux études d'impact des contaminations métalliques (Cheng, 1983a).

Très peu d'études ont été réalisées dans ce sens chez les bivalves. Ainsi, le cuivre induit une hypersynthèse des lysozymes et leur libération dans l'hémolymphe de *Mytilus edulis* (Pickwell et Steinert, 1984).

Suresh et Mohandas (1990a) observent des phénomènes d'inhibition ou de stimulation des phosphatases acides dans l'hémolymphe de deux bivalves. Les résultats sont très variables en fonction des doses utilisées et du temps d'exposition rendant l'interprétation très hasardeuse. Les doses les plus faibles provoqueraient l'hypersynthèse de phosphatases suivie de leur libération dans le milieu extracellulaire. les concentrations les plus élevées auraient un effet inhibiteur sur la synthèse enzymatique.

Cheng et Rodrick (1974a) notent également l'inhibition du lysozyme de l'hémolymphe de *M. arenaria* par le zinc et le plomb.

## **DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES**

# I : MATERIEL BIOLOGIQUE

## 1. LA MOULE ZEBREE, *Dreissena polymorpha*

### 1. 1. SYSTEMATIQUE ET REPARTITION GEOGRAPHIQUE

La position systématique du mollusque bivalve d'eau douce que nous avons étudié dans ce travail est la suivante :

Embranchement : Mollusque  
Classe : Bivalve  
Sous classe : Hétérodonte  
Ordre : Eulamellibranche  
Super famille : Dreissenoidae  
Famille : Dreissenidae  
Genre : *Dreissena*  
Espèce : *polymorpha* (Pallas 1771)

Encore appelée moule zébrée, *D. polymorpha* est originaire des bassins de la mer Caspienne et de la mer Noire. Elle présente actuellement une répartition géographique relativement vaste. En effet, depuis plus d'un siècle, elle a envahi la plupart des lacs et des rivières d'Europe.

Introduite accidentellement sur le continent nord américain en 1985 (Hebert *et al.*, 1989), elle a rapidement colonisé plusieurs grands lacs canadiens (Griffiths *et al.*, 1990).

Sa large répartition et sa rapide colonisation de nouveaux milieux peuvent être en partie expliquées par la présence d'une larve véligère nageuse (*Dreissena* est une des deux espèces de bivalves d'eau douce à présenter cette caractéristique (Morton, 1993)) et par les capacités de dérive bysso-pélagique des juvéniles. Par ailleurs, un appareil byssogène très actif permet aux adultes de se fixer sur des substrats habituellement inoccupés par les autres espèces de bivalves (Morton, 1969b; Griffiths *et al.*, 1990).

### 1. 2. MORPHOLOGIE, ANATOMIE GENERALE

Sa morphologie et son anatomie générale ont été revues en détail par Morton (1969b, 1993). *Dreissena* est caractérisée par une coquille mytiliforme, hétéromyaire,

montrant de grandes variabilités morphologiques. De couleur généralement verdâtres ou brunâtres, les valves sont ornées de bandes claires et foncées en chevrons conférant à la coquille un aspect zébré, caractéristique de cette espèce (figure 15).

Dans la partie postérieure, deux siphons courts, un inhalant, large et orné d'une couronne de tentacules ainsi qu'un plus petit, lisse et exhalant assurent les courants d'eau à l'intérieur de la cavité palléale. Les deux bords du manteau sont réunis par une simple fusion dorsalement et ventralement à l'exception de l'emplacement des siphons et du pied.

La masse viscérale contient les gonades orangées et, dans la partie antérieure, la glande digestive blanchâtre et la bouche entourée des palpes labiaux. Dans la partie dorsale, la cavité péricardique qui communique avec les reins contient le coeur, traversé par le rectum, et les glandes péricardiales. Dans la partie ventrale, le pied assure la locomotion et la sécrétion du byssus. De part et d'autre de la masse viscérale, les lamelles branchiales sont constituées d'un accolement de filaments.

### 1. 3. PHYSIOLOGIE GENERALE

#### 1. 3. 1. Reproduction

Les Dreissènes adultes sont à sexes séparés mais présentent quelquefois des cas d'hermaphroditismes (Walz, 1978). La fécondation est externe et les oeufs donnent naissance à une larve véligère nageuse qui se fixera après quatre semaines environ de vie planctonique (Morton, 1969c; Mackie, 1991).

Les adultes sont matures lorsque ils ont atteint une taille de 8 à 10 mm. La période d'émission des gamètes s'étale de mai à septembre et est déclenchée par une température supérieure à 12 °C (Tourari, 1988; Borcharding, 1991; Mackie, 1991).

#### 1. 3. 2. Nutrition

Les Dreissènes sont suspensivores, l'eau apportée dans la cavité palléale par le siphon inhalant est filtrée au niveau des branchies et les particules retenues sont englobées par du mucus et dirigées vers les palpes labiaux et la bouche (Morton, 1969b). Elles sont capables de retenir des particules de 0.7 µm et montrent une efficacité maximale quand les particules atteignent 5 µm (Sprung et Rose, 1988). Les moules sélectionnent préférentiellement les particules de 15 à 40 µm et rejettent dans les pseudofécès les plus grandes (Ten Winkel et Davids, 1982). Les capacités de filtration et d'ingestion peuvent être influencées par certains paramètres

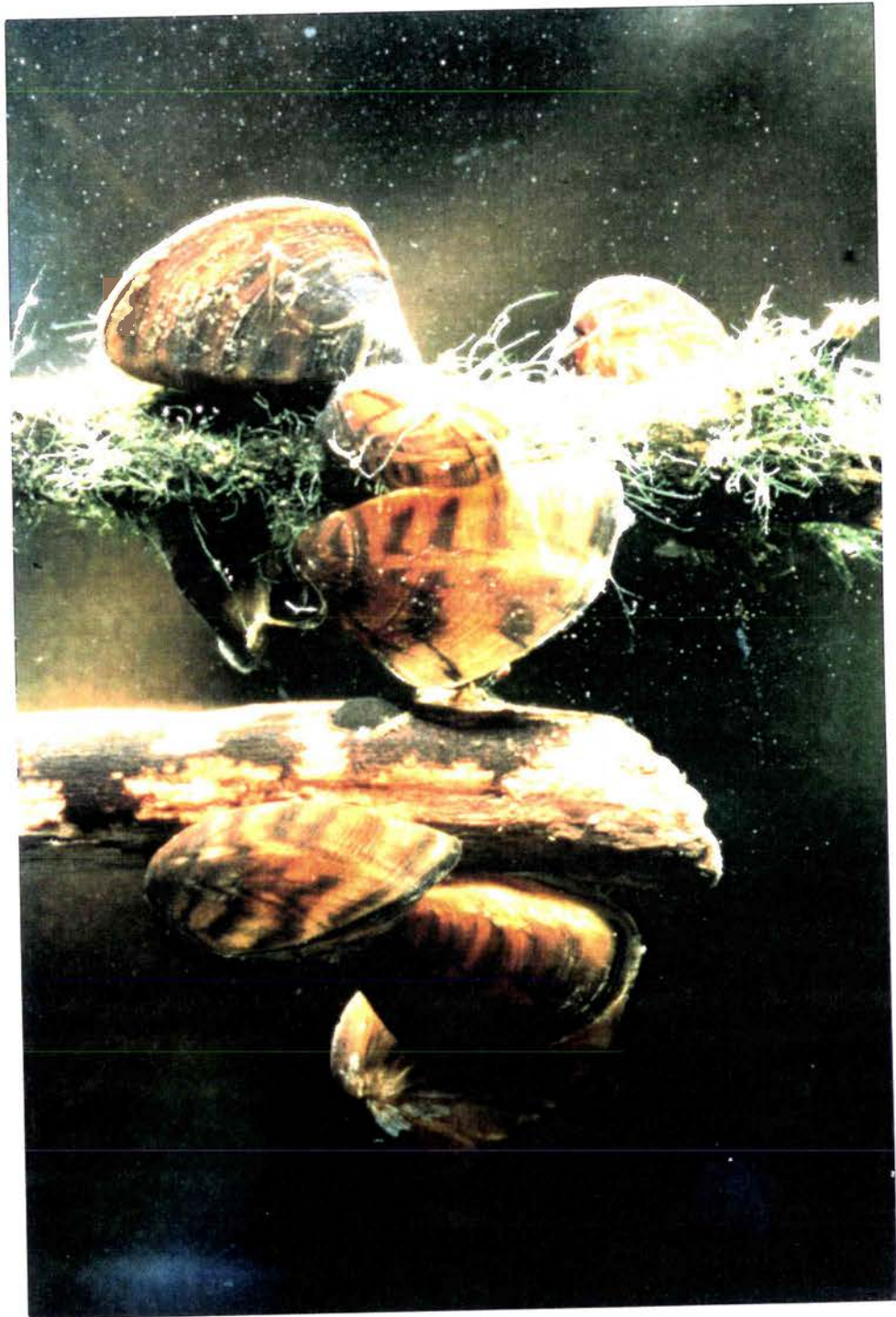


Figure 15. *Dreissena polymorpha*.

environnementaux comme la température, le pH ou bien encore la concentration planctonique (Walz, 1978; Morton, 1969c; Sprung et Rose, 1988).

#### 1. 4. ECOLOGIE

Les Dreissènes vivent habituellement fixées à toutes sortes de substrats durs (Morton, 1969b) en densité très élevée pouvant atteindre 200000 individus m<sup>-2</sup> dans certains lacs canadiens (Mackie, 1991). Elles sont également capables de coloniser les fonds meubles de certains lacs occupés par des unionidés qu'elles utilisent alors comme support (Mackie, 1991; Hunter et Bailey, 1992).

Par ailleurs, elles sont capables de se développer abondamment dans toutes les canalisations d'eau des installations industrielles ou agricoles et peuvent poser ainsi de graves problèmes de salissures biologiques (Jenner et Janssen-Mommen, 1993; Barton, 1993).

Quand elles sont fixées, elles supportent des vitesses de courant supérieures à 1.5 m. sec<sup>-1</sup>. Par contre, cette vitesse empêche les larves de se fixer (Jenner et Janssen-Mommen, 1993)

Certains auteurs observent une croissance des individus pour une température minimale de 3 °C dans le Rhin (Smit *et al.*, 1992). Morton (1969c), quant à lui, plaçait cette limite minimale à 12 °C.

*D. polymorpha* est rencontrée dans les eaux où le pH atteint 9 mais est absente des lacs où les valeurs moyennes de pH sont inférieures à 7.3 (Ramcharan *et al.*, 1992).

#### 1. 5. REPONSE A LA CONTAMINATION METALLIQUE

Comme nous l'avons déjà souligné, *D. polymorpha* est largement utilisée comme bioindicateur de pollution par les hydrocarbures et les métaux (Mersch *et al.*, 1992, 1993; Reincke, 1992).

En laboratoire, des contaminations expérimentales par les métaux ont montré que la bioaccumulation du plomb et du zinc est soumise à l'effet de facteurs biotiques tel que la saison ou la quantité de nourriture disponible et de facteurs abiotiques tel que la température, l'EDTA ou d'autres métaux (Maarouf, 1988; Benyahia, 1991).

La contamination métallique peut perturber certaines fonctions physiologiques comme l'activité de filtration ou de respiration et ainsi conditionner la quantité de métal ingéré par les organismes. Le comportement de filtration des Dreissènes est affecté par les métaux lourds. En effet, la contamination pendant une semaine par 1 mg. L<sup>-1</sup>

de Pb ou de Zn entraîne une diminution respectivement de 45 % et de 60 % du taux de filtration (Mouabad, 1991).

Certaines CL 50 ont été déterminées lors d'expérience de toxicité sub-aiguë :

Cu : 0,191 mg. L<sup>-1</sup> en automne, 0,133 mg. L<sup>-1</sup> au printemps, en 96 h (Mouabad, 1991)

Hg : 0,42 mg. L<sup>-1</sup> en automne, 0,45 mg. L<sup>-1</sup> au printemps, en 96 h (Mouabad, 1991)

Pb : supérieure à 10 mg. L<sup>-1</sup> à 96 h (Mouabad, 1991)

Cd : supérieure à 14 mg. L<sup>-1</sup> à 96 h (Mouabad, 1991),

D'autres CL 50 ont été mesurées au cours de contamination chronique dans le cas où aucun effet n'était visible à court terme:

Cd : 130 µg. L<sup>-1</sup> à 11 semaines (Kraak *et al.*, 1992).

Zn : 10,88 mg. L<sup>-1</sup> à 28 jours (Maarouf, 1988)

## II : METHODES

### 1. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE OPTIQUE

#### 1. 1. PRELEVEMENT DE L'HEMOLYMPHE

La taille réduite des Dreissènes rend l'opération de prélèvement de l'hémolymphe relativement difficile et délicate.

Une brèche est pratiquée dans la partie dorsale de la coquille et l'hémolymphe est ponctionnée à l'aide d'une seringue Hamilton de 50 µL au niveau du sinus sous le muscle adducteur postérieur (figure 16). On recueille pour chaque individu environ 150 µL d'hémolymphe.

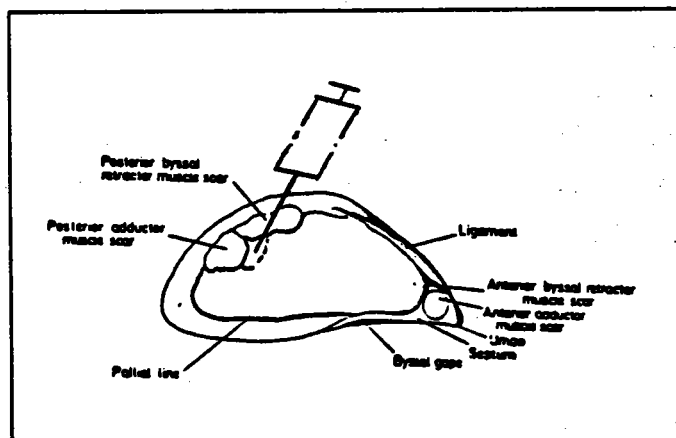


Figure 16 : Schéma de *D. polymorpha* indiquant le sinus sanguin où l'hémolymphe est ponctionnée (modifié d'après Morton, 1969b).



## 1. 2. FROTTIS D'HEMOLYMPHE

### 1. 2. 1. Préparation des frottis d'hémolymphe

Quelques gouttes d'hémolymphe sont déposées sur une lame de verre préalablement rincée par une solution de HCl à 1 % puis à l'eau distillée. Les cellules s'étalent spontanément pendant une quinzaine de minutes sur le support placé dans une chambre humide.

Immédiatement après le dépôt, les cellules ont tendance à former des agrégats, qu'elles quittent par mouvement amiboïde. Quinze minutes sont nécessaires pour que la plupart des cellules soient isolées sur le support et facilement observables. L'excédent d'hémolymphe est délicatement retiré et les cellules sont fixées pendant 5 minutes environ (Auffret, 1985) par quelques gouttes d'une solution de glutaraldéhyde à 1 % tamponnée par le liquide de Sørensen à 0.025 M, pH 7.4 ou par le cacodylate à 0.025 M, pH 7.4. Cette dernière solution tampon est utilisée dans le cas où les préparations subissent des traitements cytochimiques ultérieurs. Les lames sont ensuite rincées par la solution tampon et séchées à l'air.

### 1. 2. 2. Coloration des frottis d'hémolymphe

La coloration au May-Grünwald-Giemsa, largement utilisée a été retenue pour l'observation et la description des types hématocytaires. Les lames, placées dans une boîte de Lavéran, face à colorer vers le fond, sont recouvertes de colorant de May-Grünwald pendant 3 min. Un volume égal de tampon est alors ajouté et laissé en contact 3 min. Il est remplacé immédiatement par une solution de colorant de Giemsa diluée extemporanément au 1 / 20 pendant 10 min. Les préparations sont rincées à l'eau et séchées à l'air.

Les noyaux peuvent être rouge-violet ou roses, mais le plus souvent violets tirant sur le bleu. Les cytoplasmes basophiles sont colorés en bleu ciel ou bleu foncé, les cytoplasmes acidophiles en rouge clair ou rosé. Les granulations acidophiles sont colorées en orangé ou rouge, les granulations neutrophiles en rose-beige, les granulations basophiles en bleu ou violet foncé.

### 1. 2. 3. Mise en évidence des phosphatases acides

Pour mettre en évidence les phosphatases acides dans les hémocytes nous nous sommes servi du kit Sigma N° 386, employé en hématologie humaine, utilisant

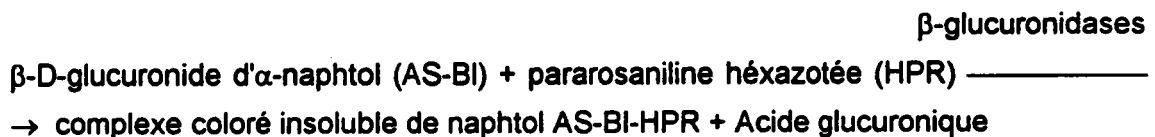
le phosphate de naphтол (AS-BI) comme substrat. Les préparations sont incubées dans une solution contenant du phosphate de naphтол (AS-BI), de l'acide phosphorique et du grenat rapide (GBC), composé diazoïque. En duplicat, des préparations sont traitées par du substrat contenant du tartrate. Le naphтол (AS-BI) libéré par l'hydrolyse enzymatique se couple immédiatement avec le grenat rapide formant ainsi des dépôts marrons aux sites d'activité. Les cellules contenant des phosphatases acides sensibles à l'acide tartrique sont dépourvues d'activité.

#### 1. 2. 4. Mise en évidence des estérases non spécifiques

Pour révéler les estérases non spécifiques dans les hémocytes nous nous sommes servi du kit Sigma N° 91, employé en hématologie humaine, utilisant l'acétate  $\alpha$ -naphtyl comme substrat. Les préparations sont incubées dans une solution contenant de l'acétate de naphтол et du bleu rapide. L'hydrolyse des liaisons esters libère des composés naphtols qui se couplent avec le sel diazoïque pour former des dépôts noirs aux sites d'activité. Dans les préparations témoins, les estérases sont inhibées par le fluorure de sodium.

#### 1. 2. 5. Mise en évidence des $\beta$ -glucuronidases

Nous avons utilisés un kit Sigma N° 181 pour mettre en évidence les  $\beta$ -glucuronidases dont le principe est basé sur la réaction :



#### 1. 2. 6. Comptage différentiel des hémocytes

Des comptages différentiels des différents types d'hémocytes ont été effectués ponctuellement.

500 cellules sont alors comptées sur les frottis d'hémolymphe provenant de 10 individus. Le nombre de granulocytes neutrophiles facilement identifiables est évalué.

Des essais de comptage différentiels séparant les populations d'hémocytes peu granuleux, des granulocytes et des hyalinocytes ont été réalisés sur 5 individus.

### 1. 3. HISTOLOGIE

#### 1. 3. 1. Préparation des tissus

Afin de préserver le plus possible l'intégrité anatomique des Dreissènes, une seule valve est retirée par section des muscles adducteur postérieur et rétracteur du byssus, puis l'animal *in toto* est plongé dans le liquide fixateur. Les tissus subissent une préfixation pendant quelques heures puis la deuxième valve est retirée délicatement dégageant ainsi un côté morphologiquement intact. Les fixateurs de Bouin Hollande ou de Carnoy sont utilisés habituellement pour les observations anatomiques. Le formaldéhyde à 10 % neutralisé et stabilisé par CaCO<sub>3</sub> ou l'alcool absolu sont utilisés pour les études histochimiques.

Après déshydratation et imprégnation, les tissus sont inclus dans la paraffine. Des coupes d'une épaisseur de 6 à 7 µm sont réalisées sur microtome.

Le trichrome de Masson, l'hématoxyline de Groat, le bleu de toluidine ou le rouge nucléaire sont utilisés pour la coloration des coupes.

### 1. 4. HISTOCHIMIE

#### 1. 4. 1. Mise en évidence de l'acide urique et des urates

Nous avons employé une technique préconisée par Gomori 1946 (*in* Gabe, 1968) basée sur l'argentaffinité des urates. En effet, les urates ont la propriété de réduire dans certaines conditions les solutions de sels d'argent, il se forme à leur niveau un précipité noir d'argent métallique. Les coupes de tissus fixés à l'alcool absolu sont traitées par le complexe d'argent-méthénamine puis par une solution aqueuse de chlorure d'or. Elles sont ensuite rincées par l'eau distillée et par une solution d'hyposulfite de sodium puis colorées par une solution de rouge nucléaire et montées, entre lames et lamelles, dans du Depex.

#### 1. 4. 2. Mise en évidence de la ferritine

Le fer contenu dans la ferritine est mis en évidence par la méthode de Hutchison 1953 (*in* Humason, 1979). Les tissus sont fixés par une solution formée d'un mélange de sulfate de sodium, d'acide acétique et de formol. Les coupes déparaffinées et hydratées sont traitées par une solution contenant du ferrocyanure de potassium et de l'acide chlorhydrique, à 56 °C pendant 10 min. Elles sont ensuite

rincées dans l'eau distillée, colorées par le rouge nucléaire, rincées par l'alcool 70 ° et montées comme précédemment. Le fer apparaît en bleu -vert brillant.

#### 1. 4. 3. Détection du plomb

Nous avons utilisé une méthode au chromate de potassium basée sur une réaction de conversion des sels de plomb en cristaux jaunâtres de chromate de plomb par action d'une solution de bichromate de potassium.

Les tissus sont fixés par le fixateur de Möller (bichromate de potassium + formaldéhyde) pendant 3 jours puis rincés 6 heures à l'eau courante et traités classiquement. Les coupes sont colorées par le bleu de toluidine.

#### 1. 4. 4. Détection du zinc

Trois techniques ont été utilisées pour la détection du zinc :

- Une méthode à la dithizone selon Mager *et al.* (1953) (*in* Ganter et Joller, 1970) basée sur la formation d'un complexe coloré entre la dithizone et le zinc. Les coupes sont traitées par une solution acétonique de dithizone, rincées par le chloroforme et l'eau distillée. Le zinc forme un complexe coloré en rouge.
- Une deuxième méthode à la dithizone selon Sumi *et al.* (1991). Les coupes déparaffinées sont traitées par une solution de dithizone dissoute dans du diméthylsulfoxyde à 0.1 % pendant 5 min., rincées à l'eau courante, séchées à l'air et immergées rapidement dans le xylène avant d'être montées. Le zinc, ainsi mis en évidence, forme un complexe coloré en rouge.
- Une deuxième méthode selon Avry au réactif de Rush et Yoe (1959) (*in* Ganter et Joller, 1970). Ce réactif, le zincon, forme avec le zinc un composé coloré en bleu. Les coupes, provenant d'individus fixés par l'alcool absolu ou le formol neutre à 10 %, sont traitées par une solution tamponnée de zincon à 0.2 % puis rincées à l'eau.

## 2. TECHNIQUES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

### 2. 1. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A TRANSMISSION

### 2. 1. 1. Fixation et inclusion des tissus

Le fixateur utilisé est une solution de glutaraldéhyde à 2 % (solution mère à 25 %, commercialisée par TAAB ou SIGMA) dans du tampon phosphate selon Sørensen à pH 7,4 et à 0,025 M en concentration finale.

Les organes sont disséqués et immergés immédiatement dans le fixateur fraîchement préparé, pendant 1 h ou 1 h 30 à 4° C. Ils sont ensuite rincés dans une solution tampon de Sørensen à 0,05 M pendant 3 h à 4° C et postfixés par le tétr oxyde d'osmium à 1 % pendant 1 h à 4° C. L'étape de postfixation est supprimée dans la préparation des échantillons à la microanalyse de RX.

Après un rinçage, les tissus sont déshydratés par une série de solutions de degré croissant en alcool (un bain dans de l'éthanol 30° pendant 5 min., 50° pendant 5 min., 70° pendant 10 min., 95° pendant 10 min. et 100° deux fois 15 min.) et par deux bains de 15 minutes chacun dans de l'oxyde de propylène.

Les tissus sont ensuite imprégnés progressivement par un mélange d'oxyde de propylène (O.P) et de résine (R), soit 1 h dans un mélange 70% O.P / 30% R, 1 h dans un mélange 50% O. P / 50% R, et enfin 1 h dans 30% O.P / 70% R. Un bain dans de la résine pure pendant 12 h, à température ambiante termine l'imprégnation des tissus.

Ils sont inclus, en bloc de plastique, dans de la résine fraîchement préparée et reposent 2 h avant l'étape de polymérisation en étuve : 1 h à 37°C et 48 à 72 h à 60° C. La résine est un mélange Epon-Araldite dont les proportions des différents constituants dépend de la dureté désirée.

### 2. 1. 2. Fixation et inclusion des hémocytes

L'hémolymphe prélevée est déposée au fur et à mesure dans un tube de type Eppendorf contenant une solution de fixateur de glutaraldéhyde à 2% additionnée de tampon Sørensen à 0,025 M à pH 7,2 permettant ainsi une préfixation des cellules. L'ensemble est ensuite centrifugé doucement à 200 g pendant 5 min.

L'osmolarité de la solution fixatrice est légèrement hypertonique par rapport à celle de l'hémolymphe de *Dreissena* (36 mosm) dont la valeur fait partie des plus basse rencontrée chez les bivalves d'eau douce (Horohov *et al.*, 1992).

Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans une nouvelle solution fixatrice de glutaraldéhyde à 1% pendant 30 min. Après une deuxième centrifugation, les hémocytes sont rincés dans une solution tamponnée de Sørensen à 0,05 M, pH 7,2 à 4° C pendant 3 h. La solution de rinçage est éliminée

après centrifugation, et les cellules sont postfixées par le tétroxyde d'osmium à 1% à 4° C pendant 30 min. La solution postfixatrice est éliminée et le culot cellulaire est remis en suspension dans une solution de rinçage pendant 10 min.

Afin d'éviter la dispersion des hémocytes dans le milieu d'inclusion et de faciliter leur manipulation qui reste délicate, les cellules isolées subissent une double inclusion, premièrement dans une solution de gélose, puis dans un mélange d'Epon-Araldite: après une dernière centrifugation, le liquide de rinçage est éliminé au maximum. Quelques gouttes de gélose liquide à 1,5 % sont déposées sur le culot, légèrement agité afin de faciliter sa pénétration entre les cellules. Après quelques instants, le culot de gélose solidifiée est retiré du tube et découpé en cubes d'environ 1 mm<sup>3</sup>.

Les cubes contenant les hémocytes sont ensuite traités comme les tissus jusqu'à la polymérisation.

### 2. 1. 3. Coupes, coloration et contrastes

Les coupes sont réalisées sur un ultramicrotome LKB, Ultratome V. Des couteaux de verre sont utilisés pour les coupes semi-fines (environ 1 µm d'épaisseur) qui sont recueillies et déposées sur une lame de verre, séchées et colorées par le bleu de toluidine pour l'observation au microscope photonique.

Les coupes fines (70 à 100 nm d'épaisseur) réalisées à l'aide d'un couteau de diamant, sont récupérées sur des grilles de 200 mesh en cuivre, ou en nickel pour la microanalyse de RX. Elles sont contrastées par l'acétate d'uranyl pendant 10 min. puis par le citrate de plomb pendant 5 min. selon Reynolds (1963).

L'examen des coupes est effectué sur un microscope électronique à transmission JEOL CX 100 à 80 Kv.

## 2. 2. PREPARATION DES ECHANTILLONS POUR LA MICROANALYSE DE RX

### 2. 2. 1. Pour le M.E.T.

Pour la microanalyse X, les tissus sont préparés classiquement comme pour le M.E.T. selon les techniques de fixation décrites précédemment avec cependant quelques modifications. L'étape de postfixation est, en effet généralement, éliminée même si certains échantillons postfixés ont été analysés. Les coupes fines d'une épaisseur d'environ 100 nm, ne subissent pas de contraste supplémentaire pour la microanalyse.

Par ailleurs, une technique cytochimique a été testée pour la préparation des tissus provenant d'individus contaminés par le zinc. La fixation est effectuée pendant 1 h à 4 °C par le tétr oxyde d'osmium à 1 % dans une solution de pyroantimonate de potassium qui permet une meilleure rétention de certains cations, tels  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Zn}^{++}$  dans les structures. Les tissus ne sont pas rincés mais directement déshydratés dans les alcools et inclus classiquement.

Les coupes fines qui flottent sur l'eau, sont récupérées sur des grilles de nickel de 200 mesh.

## 2. 2. 2. Pour le M.E.B.

Les organes du système excréteur prélevés et l'hémolymphe ponctionnée sont déposés immédiatement sur des plots de carbone. Les préparations sont placées dans une cloche à vide où elles subissent une dessiccation. Cette technique de fixation permet de minimiser les déplacements des différents éléments dans les structures biologiques et d'éviter les artefacts dus aux associations inévitables entre ces éléments et les éléments chimiques du liquide fixateur. En effet, Keller *et al.* (1992) ont montré que la technique de fixation des tissus animaux par dessiccation est aussi performante que la fixation par l'azote à -196 °C quant au respect de la composition chimique des structures biologiques.

## 2. 3. CYTOCHIMIE A L'ECHELLE ULTRASTRUCTURALE

### 2. 3. 1. Mise en évidence des phosphatases acides

Pour la recherche des phosphatases acides, nous avons opté pour la méthode de Barka et Anderson (1962) qui utilisent le  $\beta$ -glycérophosphate de sodium comme substrat.

Quelques modifications sont apportées pour la préparation des tissus décrite au paragraphe précédent :

- Dans le mélange fixateur, la solution tampon de phosphate est remplacée par une solution tampon de cacodylate de sodium / HCl, 0.025 M à pH 7.4.
- La fixation se déroule à 4° C, sur glace pilée.
- Le temps de rinçage des pièces de tissus est prolongé. Elles sont rincées 12 h environ dans une solution tampon de cacodylate de sodium / HCl, 0.05 M à pH 7.4 à 4° C.

De très petits fragments de tissus (50 µm d'épaisseur sont recommandés) sont lavés 20 min. dans le tampon utilisé pour l'incubation. Les tissus sont ensuite incubés 1 h à 37° C dans le mélange suivant :

Solution	Volume (ml)	Concentration finale (mM)
• Tampon Tris / maléate 0.2 M, pH 5.2	10	40
• β-glycérophosphate de sodium, 0.1 M	4	8
• Nitrate de plomb, 0.02 M	6	2.4
• Eau distillée	30	

La réaction d'incubation est arrêtée en plongeant les piluliers et les tubes dans la glace pilée.

Après l'incubation, les tissus sont rincés 40 à 60 min. dans plusieurs bains d'une solution de tampon Tris maléate dilué deux fois.

Les fragments de tissus sont ensuite postfixés et inclus classiquement pour le M.E.T.

Des préparations témoins sont effectuées par incubation des tissus dans un milieu sans substrat ou additionné d'un inhibiteur de phosphatases acides comme le fluorure de sodium (0.01 M).

Des modifications identiques sont apportées dans les solutions de fixation et de rinçage pour mise en évidence des phosphatases acides dans les hémocytes. Les hémocytes isolés sont incubés dans des tubes de type Eppendorf. Après l'arrêt de la réaction, les cellules sont rincées, postfixées et incluses dans la gélose. Puis les cubes de gélose contenant les hémocytes subissent les mêmes traitements que les tissus.

### 2. 3. 2. Mise en évidence des activités peroxydasiques

Jusqu'à l'étape d'incubation, les tissus sont préparés de la même manière que précédemment. Les peroxydases exogènes sont ensuite mises en évidence dans le milieu de Graham et Karnovsky (1966).

Les fragments de tissus incubent 45 min. à 37° C dans une solution de tampon Tris, 0.05 M, pH 7.6 contenant 0.05 % de diaminobenzidine (DAB) et 0.01 % de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Des préparations témoins sont réalisées par incubation des tissus dans un milieu sans DAB.

Après l'incubation, les tissus sont rincés et traités classiquement pour le M.E.T.

### 2. 3. 3. Capture de traceurs par les organes du système excréteur

La perméabilité du système excréteur a été étudiée au moyen de traceurs particuliers et hémoprotéiques administrés aux Dreissènes par incubation *in vitro* ou par injection. Nous ne rapporterons ici que les expériences concernant l'utilisation de la peroxydase de raifort.

Les Dreissènes, dont une valve est retirée, sont immergées dans une solution de peroxydase de raifort (Sigma type II, PM 44000) à 1 %. D'autres individus ont reçu une injection de 10 µl de cette solution au niveau du péricarde. L'injection est pratiquée par une petite brèche faite dans la partie dorsale de la coquille. Les moules sont ensuite replacées dans l'eau. Les organes du système excréteur sont prélevés après 10, 30 et 60 min. d'incubation ou d'injection et fixés par une solution de glutaraldéhyde à 2 % tamponnée par le cacodylate 0.025 M, pH 7.4. Les organes d'individus témoins n'ayant subi aucune intervention sont également prélevés et fixés.

Les tissus sont ensuite traités pour la révélation des peroxydases exogènes selon la méthode décrite au paragraphe 2. 3. 2.

## 3. TECHNIQUES DE MICROANALYSE DE RX

### 3. 1. INTRODUCTION ET TECHNIQUES UTILISEES

Un échantillon bombardé par un faisceau d'électrons émet des rayonnements X caractéristiques des éléments contenus dans cet échantillon. La microanalyse de RX qui consiste en l'analyse des spectres X émis permet de définir sa composition chimique.

Les rayons X émis sont caractérisés par leur longueur d'onde ( $\lambda$ ) et par leur énergie (E) reliés par la relation :  $E = hc / \lambda$ .

Deux types d'analyse sont donc possible :

1. Un premier type d'analyse par spectrométrie à dispersion de longueur d'onde (WDS) dont nous rapportons ici simplement le principe puisque nous ne l'avons pas utilisé dans notre travail de recherche. Elle correspond à la sonde de Castaing et

comprend un cristal monochromateur courbé, un détecteur à gaz ionisé par les X émis et une chaîne d'analyse monocanale pilotée par ordinateur.

2. Nous avons employé le deuxième type d'analyse par spectrométrie à sélection d'énergie (EDS) qui permet une acquisition de spectre très rapide. Cette méthode comprend :

- Un détecteur semi-conducteur Silicium-lithium qui transforme les photons émis par l'échantillon bombardé d'électrons en charges électriques proportionnelles à l'énergie des photons incidents. Le détecteur ou diode est protégé par une fenêtre très fine en béryllium (0.4  $\mu\text{m}$ ) ou norvar (0.3  $\mu\text{m}$ ).

- Une chaîne analogique formée d'un pré-amplificateur, d'un amplificateur, d'un convertisseur analogique numérique, d'un rejet d'empilement, d'un analyseur multicanal, d'un correcteur de temps mort et d'une mémoire de stockage.

Le spectre total émis par l'échantillon est analysé à l'aide du système informatique couplé au spectromètre par des méthodes qualitatives et semi-quantitatives.

Nous avons utilisé des techniques de microanalyse de RX en spectrométrie à sélection d'énergie couplée à un M.E.T. ou à un M.E.B. :

- Le M.E.T. de type Phillips CM 20 est associé à un spectromètre à sélection d'énergie EDAX, à une tension de 120 Kv avec un angle de "take off" de 40 ° et un diamètre de sonde de 10 ou 14 nm.

- Le M.E.B. de type Jeol CX 35 est associé à un spectromètre à sélection d'énergie Tracor de type Z max 30, à une tension de 25 Kv ou de 15 Kv, avec un angle de "take off" de 28°.

Le temps de comptage est généralement de 100 secondes pour les deux techniques, certains essais ont été réalisés en 200 secondes.

L'image X est un deuxième moyen d'évaluer la composition chimique des structures biologiques. Elle est formée par une succession de points qui indiquent la présence de l'élément permettant ainsi de visualiser sa distribution dans la zone analysée. Les images X ont été obtenues avec des temps de pose plus ou moins longs, pouvant atteindre 13 heures.

### 3. 2. TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

Pour la microanalyse de RX, les Dreissènes sont prélevées après 35 jours de contamination métallique. L'hémolymphe est ponctionnée, les reins et les glandes péricardiales sont prélevés selon les techniques décrites aux paragraphes 2. 1. et 2. 2. sur les individus exposés aux plus fortes concentrations de chaque métal.

Pour chaque concentration métallique, les organes et l'hémolymphe de 5 individus ont été prélevés. Six ou sept spectres ont été généralement réalisés sur chaque échantillon, représentant un nombre total d'environ 280 spectres pour l'analyse couplée au M.E.B. et un nombre similaire pour le M.E.T.

Les techniques de microanalyse de RX couplées au M.E.B. ont été utilisées dans le but, d'une part: de détecter le métal dans les divers organes (spectres) et d'autre part d'obtenir des images X qui permettent de contrôler la distribution de ces éléments sur les tissus et de visualiser s'il existe des associations entre eux

Les specimens biologiques, de part leur ondulation de surface ne permettent qu'une semi quantification de la concentration de chaque élément. Toutefois, cette semi quantification est suffisante pour vérifier la présence ou l'absence de tel ou tel métal et permet d'en contrôler l'évolution au cours d'une expérience.

Cela a d'ailleurs été fait dans le cas de l'analyse des granules rénaux isolés de *D. polymorpha*, nous avons mis en place des quantifications comparatives. Douze éléments, toujours identiques, sont quantifiés à partir du spectre obtenu sur chaque granule analysé. Les éléments C, H, O et N, identifiés mais non quantifiés d'une manière correcte par ces techniques, ont donc été écartés.

### 4. ISOLATION DES GRANULES RENAUX

Les granules rénaux ont été isolés chez des Dreissènes provenant de deux sites naturels différents : La Meuse au niveau de Commercy qui constitue notre station de référence et la retenue artificielle du Mirgenbach recevant les eaux échauffées de la centrale nucléaire de Cattenom, soumis à une plus importante contamination métallique. Dans ces deux sites, les moules présentaient des concentrations métalliques tissulaires différentes pour certains métaux au moment du prélèvement:

	Meuse*	Mirgenbach*
Zn	128	115
Pb	0,2	1,2
Cu	9	32
Ni	17	13
Cd	0,7	1,3
Cr	0,7	

\* Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{g} / \text{g}$  de poids sec

Dans chaque population de Dreissènes, les reins distaux de 50 individus sont prélevés, rassemblés et traités par un procédé de digestion enzymatique selon George (1983a) et Sullivan *et al.* (1988). Dix volumes d'une solution de protéase à 0,07 % (Sigma, Type XIV de *Streptomyces griseus*) dans du tampon Tris-HCl 100 mM, pH 7.5 sont ajoutés à chaque pool de reins. Le mélange est incubé pendant 24 heures à 37 °C sous agitation constante. Les granules sont sédimentés par centrifugation puis rincés à l'eau distillée plusieurs fois de suite.

Une goutte d'eau contenant des granules est déposée sur une lame de verre et séchée. Leur taille est évaluée sur un microscope optique à grossissement 1000. Seuls les granules excédents une graduation (1.2  $\mu\text{m}$ ) sont mesurés.

Pour la microanalyse de RX couplée au M.E.B. une goutte d'eau contenant des granules est déposée sur un support en carbone et séchée en étuve. Avant l'analyse, les échantillons sont recouverts d'une mince couche de carbone.

## 5. CONTAMINATION METALLIQUE EXPERIMENTALE

### 5. 1. DISPOSITIF EXPERIMENTAL

#### 5. 1. 1. Choix des métaux utilisés dans les expériences de contamination

Le plomb et le zinc, utilisés dans les expériences de contamination sont largement répandus, sous formes particulières et dissoutes, dans les écosystèmes aquatiques marins et continentaux. La présence de ces métaux dans les milieux aquatiques a une double origine, naturelle et anthropique.

Malgré le ralentissement conjoncturel des activités sidérurgiques qu'a subi la région lorraine pendant la dernière décade, les concentrations en plomb et en zinc dans l'eau peuvent rester élevées sur certains sites le long de la rivière Moselle ou de

ses affluents (Rapports de contrats parties I et II, Laboratoire d'Ecologie, Université de Metz, 1985; Mersch *et al.*, 1992).

Plusieurs études écotoxicologiques du plomb et du zinc chez *D. polymorpha* ont été réalisées au laboratoire ou *in situ* sur la Moselle (Léglize et Crochard, 1987; Maarouf, 1988; Pihan *et al.*, 1988; Benyahia, 1991; Mersch *et al.*, 1992).

### 5. 1. 2. Système de contamination métallique

Pour les expériences en laboratoire, nous avons choisi un système de contamination dynamique ouvert. Le dispositif est constitué de 5 bacs de 12 l, disposés en cascade sur 3 étages (figure 17). Le bac de contrôle se trouve à l'étage supérieur, les bacs expérimentaux recevant les plus faibles doses métalliques ( $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de plomb ( $\text{PbCl}_2$ ) et  $500 \mu\text{g. L}^{-1}$  de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ )) sont placés sur l'étage intermédiaire et enfin les bacs expérimentaux recevant les doses métalliques les plus élevées ( $800 \mu\text{g. L}^{-1}$  de plomb et  $1000 \mu\text{g. L}^{-1}$  de zinc) sur l'étage inférieur.

Les 3 bacs des deux étages supérieurs reçoivent directement de l'eau de conduite, déchlorée sur charbon actif, amenée par une pompe péristaltique à galets avec un débit de  $100 \text{ ml min}^{-1}$ . Dans les bacs de l'étage intermédiaire, les solutions métalliques sont apportées et ajustées à l'aide d'une pompe péristaltique à  $400 \mu\text{g. L}^{-1}$  de plomb et  $500 \mu\text{g. L}^{-1}$  de zinc.

Les bacs de l'étage inférieur reçoivent l'eau chargée en métal des bacs supérieurs ainsi qu'une solution métallique supplémentaire apportée par une pompe péristaltique ajustant les concentrations finales des bacs respectivement à  $800 \mu\text{g. L}^{-1}$  de plomb et  $1000 \mu\text{g. L}^{-1}$  de zinc.

Ce dispositif en cascade présente l'avantage d'économiser l'eau et de réduire la charge métallique rejetée.

L'eau des bacs est maintenue à une température de  $15.5 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  et à un pH de  $7.6 \pm 0.2$  et oxygénée en permanence par un diffuseur d'air. L'homogénéisation du milieu est assurée par un agitateur magnétique.

Les Dreissènes sont acclimatées aux conditions du laboratoire 3 jours, pendant lesquels elles se fixent au support. Dans chaque bac expérimental, les supports en carrelage sont surélevés par des cales permettant ainsi une meilleure circulation de l'eau.

Les moules sont nourries une fois par jour avec des algues vertes congelées. Le glaçon d'algues est suspendu par un système de potence au dessus de chaque bac expérimental. En fondant, le glaçon distribue doucement la nourriture aux Dreissènes.



Figure 17. Dispositif expérimental de contamination métallique.

### 5. 1. 3. Culture du phytoplancton

Pendant les expériences de contamination métallique, nous avons opté pour un apport de nourriture par séquence, plus facilement contrôlable et moins onéreux qu'un apport en flux continu. Nous avons donc nourri les Dreissènes une fois par jour avec une espèce d'algue verte *Chlamidomonas variabilis*. Cette algue unicellulaire flagellée ne possédant pas de paroi est facilement assimilable par les bivalves (Ten Winkel et Davids, 1982).

La culture des algues se fait en milieu liquide de Lefèvre-Czarda modifié par l'incorporation d'oligo-éléments d'après Mugel et Férard (1978). Les cultures sont réalisées dans des ballons de 1.5 l ou de 3 l pour obtenir une densité algale d'environ 5 millions de cellules / ml. Les repiquages sont fréquents pour éviter le vieillissement cellulaire.

La solution algale est ensuite distribuée dans des tubes de 40 ml et congelée. Un stock de "glaçons d'algues" est constitué avant l'expérience, facilitant ainsi la maintenance du dispositif expérimental.

### 5. 1. 4. Dosage du plomb et du zinc dans l'eau et dans les Dreissènes

#### 5. 1. 4. 1. Dans l'eau

Chaque expérience d'intoxication par le plomb et le zinc a fait l'objet d'un contrôle permanent des concentrations en métaux dans l'eau. Pour cela, les concentrations sont déterminées à partir d'un échantillon d'eau recueilli en continu durant 48 heures, dans un flacon en polyéthylène (2000 ml). Avant dosage, les échantillons sont acidifiés à 1% avec de l'acide nitrique normapur (69%). Les dosages sont réalisés en spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme pour le zinc (Perkin-Elmer 2380) et au four graphique pour le plomb (Perkin Elmer 305B). Les résultats étant exprimés en  $\mu\text{g. L}^{-1}$  de métal total, ne donne aucune information sur la spéciation du métal dans les milieux d'intoxication.

#### 5. 1. 4. 2. Dans les organismes

Pour chaque milieu d'intoxication, 16 Dreissènes sont prélevées et réparties en 2 sous-échantillons de 8 individus en respectant une répartition homogène des tailles des coquilles. Après dissection des organismes, seules les parties molles sont retenues, déshydratées puis broyées à la main dans un mortier. Environ 200 mg de broyat sont minéralisés dans des tubes de 20 ml en polyéthylène avec 3 ml d'acide

nitrique normapur dilué à 35%. L'attaque acide se fait sous pression pendant 24 heures à 70°C.

Le dosage des métaux est réalisé en absorption atomique en flamme pour le zinc et au four graphite pour le plomb. Le protocole complet de minéralisation et de dosage est détaillé par Mersh (1993).

## 5. 2. Effets des métaux sur les hémocytes

### 5. 2. 1. Effets sur le nombre total d'hémocytes

Les comptages sont effectués sur 6 Dreissènes provenant des bacs témoin et expérimentaux après 2, 7, 21, 28 et 35 jours de contamination.

Afin d'évaluer le nombre d'hémocytes circulants, 50 µl d'hémolymphe sont prélevés de la manière décrite précédemment et immédiatement dilués et fixés par 100 µl de formol à 5 %. Les comptages pouvant être ainsi différés sont réalisés à l'aide d'une cellule de Malassez.

### 5. 2. 2. Effets des métaux sur les capacités phagocytaires des hémocytes

#### 5. 2. 2. 1. Effets des métaux *in vivo*

Afin d'évaluer d'éventuels effets produit *in vivo* par la contamination métallique sur les capacités phagocytaires des hémocytes, nous avons modifié une méthode utilisée par Fisher (1988) et Cheng (1988b) chez des bivalves marins. La phagocytose de particules inertes de latex par les hémocytes d'individus contaminés expérimentalement par les métaux est étudié *in vitro* sur lames de verre.

L'hémolymphe est prélevée chez les individus de contrôle et contaminés (n =4), une goutte d'environ 50 µl est déposée sur une lame de verre. Après 10 min. d'étalement, environ 25 µl d'une solution contenant des billes de latex colorées (microsphères de latex de 2 µm de diamètre, concentration de  $10^7$  / ml, Polysciences) est ajoutée à l'hémolymphe. La préparation est replacée en chambre humide et incubée 20 à 25 minutes. Les lames sont ensuite rincées délicatement puis fixées et colorées classiquement.

Pour chaque individu, 200 cellules sont observées au microscope optique. Le nombre d'hémocytes qui ont phagocyté ou adhéré au moins une bille de latex sont comptés et le pourcentage qui est ainsi déterminé constitue un indice de phagocytose.



Les prélèvements sont effectués après 7, 22 et 35 jours de contamination.

#### 5. 2. 2. 2. Effets des métaux *in vitro*

Pour évaluer *in vitro* l'effet des métaux sur les capacités de phagocytose des hémocytes de *D. polymorpha* nous avons employé une méthode modifiée d'après Vogel (1981) et Cheng et Sullivan (1984).

Les hémocytes sont mis en contact *in vitro* avec une solution contenant des cations métalliques et des billes de latex. Les cellules ayant phagocyté des billes de latex sont séparées du reste de la solution par centrifugation à travers une colonne d'une solution visqueuse de polyéthylèneglycol. Les billes de latex non ingérées restent dans la partie supérieure de la colonne tandis que les hémocytes plus volumineux migrent au fond du tube.

Chaque traitement consiste à évaluer l'effet de deux cations métalliques à deux concentrations différentes sur les capacités phagocytaires des hémocytes et de le comparer à l'activité d'hémocytes non soumis aux solutions métalliques, chaque mesure est doublée. Nous avons étudié les effets de concentrations subléthales de plomb (1 et 6 mg. L<sup>-1</sup> de PbCl<sub>2</sub>), zinc (1 et 6 mg. L<sup>-1</sup> de ZnCl<sub>2</sub>), cuivre (50 et 100 µg. L<sup>-1</sup> de CuSO<sub>4</sub>) et mercure (100 et 200 µg. L<sup>-1</sup> de HgCl<sub>2</sub>). Les concentrations métalliques finales dans le milieu expérimental sont obtenues par des dilutions successives à partir de solutions mères à 2 g. L<sup>-1</sup>.

Pour chaque traitement, l'hémolymphe de 45 Dreissènes est ponctionnée et rassemblée, constituant un volume d'environ 10 ml. Un ml d'hémolymphe, contenant environ 4 millions d'hémocytes, est réparti dans 10 tubes et centrifugé à 200 g pendant 5 min. Les culots cellulaires sont rincés plusieurs fois dans une solution isotonique de tampon Hepes, 5 mM additionnée de NaCl, 20 mM.

Les culots d'hémocytes sont remis en suspension dans 1 ml de solution tamponnée contenant 2.10<sup>8</sup> billes de latex (Billes de latex Polysciences, 1 µm de diamètre), seules dans le cas des tubes témoins ou additionnée de cations métalliques. Les hémocytes sont incubés ainsi 2h à 25 °C sur une table à agitation rotative (100 rpm). Après l'incubation, les contenus de chaque tube sont transférés dans des tubes coniques contenant une solution aqueuse de polyéthylèneglycol 6000 (Sigma) à 20 % sur une hauteur de 7 cm. Les hémocytes sont séparés des billes libres par centrifugation pendant 15 min. à 200 g. Le culot hémocytaire ainsi recueilli est rincé puis lysé dans 1 ml de NaOH 1 N. Après 48 h, la proportion d'hémocytes associés à des billes de latex est déterminée par la mesure de la densité optique à 560 nm de chaque lysat cellulaire.

Chaque traitement est répété trois fois permettant d'obtenir 6 mesures témoins et 6 mesures pour chaque concentration métallique testée.

Par ailleurs des culots d'hémocytes soumis ou non aux différentes solutions métalliques et incubées en présence de billes sont fixés classiquement pour le M. E. T. et inclus dans une résine à base d'Epon ne nécessitant pas une déshydratation par le toluène qui ne conserve pas les billes de latex. Les coupes semi-fines sont effectuées et observées pour vérifier la phagocytose des microbilles par les hémocytes.

### 5. 3. Effets biochimiques des métaux, approche expérimentale préliminaire

#### 5. 3. 1. Evaluation cytochimique

L'activité des  $\beta$  glucuronidases et des phosphatases acides est évaluée sur des frottis d'hémolymphe, traités pour la révélation des enzymes selon les méthodes décrites aux paragraphes 1. 2. 3. et 1. 2. 5., provenant de 4 individus prélevés dans chaque bac expérimental après 7, 21 et 35 jours de contamination.

##### 5. 3. 1. 1. Les phosphatases acides

200 cellules sont comptées sur chaque préparation et réparties dans quatre classes définies arbitrairement en fonction du nombre de granules positifs selon une méthode de Moore et Gelder (1985) modifiée. La classe 1 comprend les hémocytes dont des granules positifs occupent 0 à 25 % de la surface cellulaire, dans la classe 4, les granules occupent 75 à 100 % de la surface.

##### 5. 3. 1. 2. Les $\beta$ glucuronidases

L'activité des  $\beta$  glucuronidases est faible dans la population hémocytaire de *D. polymorpha*. En effet, un seul type cellulaire correspondant aux hémocytes peu granuleux réagit positivement à la présence de cette enzyme. Nous avons donc choisi de retenir le nombre de cellules montrant une réaction positive pour les  $\beta$  glucuronidases sur 1000 hémocytes comptés.

#### 5. 3. 2. Dosage quantitatif des phosphatases acides

### 5. 3. 2. 1. Préparation des échantillons d'hémolymphe

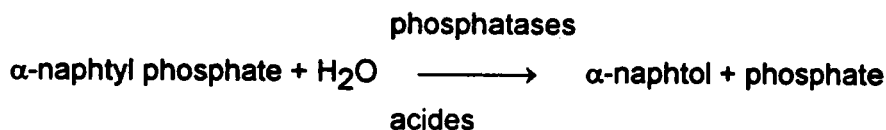
L'hémolymphe de 5 Dreissènes est prélevée suivant la méthode décrite précédemment et rassemblée dans un tube maintenu sur glace pilée. A chaque prélèvement 5 pools d'hémolymphe sont ainsi constitués pour chaque concentration métallique testée et pour le contrôle.

Les constituants de l'hémolymphe sont séparés par centrifugation à 200 g pendant 5 min. Le surnageant, correspondant au sérum, est recueilli puis immédiatement congelé à - 20 °C. Une fraction de 100 µl de sérum, congelée séparément, servira pour le dosage des protéines.

Le culot cellulaire est également immédiatement congelé à - 20°C jusqu'au moment du dosage. A ce moment, le culot d'hémocytes est directement repris dans 750 µl d'une solution de triton X 100 à 0.1 % et lysé pendant 30 min. Une fraction de 100 µl est alors prélevée pour le dosage des protéines. Le reste du lysat cellulaire est centrifugé 5 min. à 200 g à 4 °C. Le surnageant recueilli servira au dosage des activités enzymatiques.

### 5. 3. 2. 2. Mesure de l'activité des phosphatases acides

L'activité des phosphatases acides présentes dans l'échantillon est déterminée selon la méthode d'Hillman (1971) modifiée suivant les réactions :



(\* diazo 2, chloro 5 toluène)

L'activité enzymatique est alors mesurée automatiquement par spectrophotométrie (Cobas Bio) à 405 nm, en présence de 12,5 mmol. L<sup>-1</sup> de substrat, pH 5,1, à 30 °C .

Pour ces dosages nous avons utilisé un coffret de réactif bioMérieux, Enzyline, phosphatase acide optimisé 10. Un contrôle de qualité est effectué à l'aide d'une solution de zymotrol.

L'activité totale des phosphatases acides est exprimée en U / L. L'activité spécifique des phosphatases acides exprimée en mU / mg de protéines cellulaires (1 U correspond à la transformation de 1  $\mu$  mole de substrat par minute)

### 5. 3. 3. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées dans chaque pool de sérum et de lysat cellulaire selon la méthode de Bradford (1976) d'après un procédé Bio-Rad basé sur l'absorbance d'un complexe coloré de Bleu de Coomassie et de protéines, mesuré à 595 nm. Les concentrations de protéines sont obtenues à partir d'une courbe standard. La courbe établie à l'aide d'une solution mère de BSA (Sérum Albumine Bovine) à 2 mg / ml diluée au 1 / 100 ° dans du tampon Tris 50 mM à pH 8.5.

### 5. 3. 4. Essais d'inhibition des phosphatases acides par les métaux

Afin de vérifier un éventuel effet des métaux sur les phosphatases acides lors de la préparation des échantillons d'hémolymphe, des essais d'inhibition par le plomb et le zinc ont été réalisés *in vitro* sur cette enzyme dans le sérum uniquement.

L'hémolymphe de 8 Dreissènes est poolée et centrifugée, le sérum est recueilli dans un tube sur glace pilée.

Des échantillons de 125  $\mu$ L de sérum sont mis en contact avec des solutions métalliques de  $Pb^{++}$  (10, 50, 100, 500 et 2500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) et de  $Zn^{++}$  (100, 500, 1000 et 2500  $\mu$ g L<sup>-1</sup>) pendant 30 minutes. Chaque essai est répété trois fois.

## 6. ANALYSES STATISTIQUES

Les comparaisons de moyennes figurant dans la partie résultats ont toutes été réalisées à l'aide du test de Student (test t) appliqué à des échantillons de faibles effectifs. Au préalable, l'égalité des variances, condition indispensable à l'application du test t, a été systématiquement vérifiée (test F du quotient des variances).

D'autres tests, mais non-paramétriques, tel que le test de Mann-Whitney, ont également été utilisés mais les résultats ne différant pas de ceux obtenus à l'aide du test t, seuls ces derniers seront considérés lors de l'exposé des résultats.

**TROISIEME PARTIE : LES HEMOCYTES ET LE  
SYSTEME EXCRETEUR DE *Dreissena*  
*polymorpha***

# **I : LES HEMOCYTES**

## **1. MORPHOLOGIE CELLULAIRE**

### **1. 1. OBSERVATION DES COUCHES MONOCELLULAIRES D'HEMOCYTES**

Deux populations d'hémocytes circulants ont été distinguées après coloration panoptique des frottis:

- La population des hyalinocytes
- La population des hémocytes granuleux

#### **1. 1. 1. Les hyalinocytes**

Les hyalinocytes possèdent un cytoplasme d'aspect hétérogène mais toujours non granuleux. Le noyau, rond ou ovale, possède une chromatine abondante condensée en petites mottes et un ou deux gros nucléoles.

La coloration confère au cytoplasme une couleur bleue, à affinité basophile et au noyau une couleur violette.

Après étalement, la taille des cellules peut varier de 20 à 50  $\mu\text{m}$ . De forme circulaire, les cellules les plus petites, à grand noyau entouré par très peu de cytoplasme, émettent de fins prolongements cytoplasmiques sur l'ensemble de leur pourtour. Elles présentent des caractéristiques de cellules jeunes et peu différenciées et pourraient être considérées comme des prohyalinocytes (PL.I fig. 1 et 2).

L'ectoplasme des cellules plus grandes forme un voile régulier autour de la cellule ou émet des filopodes de longueur variable donnant un aspect irrégulier aux hyalinocytes (PL.I fig. 3 à 6). L'endoplasme, légèrement coloré, peut contenir des vacuoles variables en taille et en nombre (PL.I fig. 3 à 6) et un noyau dont la taille varie entre 7 et 10  $\mu\text{m}$ . Les plus grands hyalinocytes, probablement moins mobiles, n'émettent plus de filopodes (PL.I fig. 5).

#### **1. 1. 2. Les hémocytes granuleux**

Deux sous populations cellulaires peuvent être distinguées parmi la population des hémocytes granuleux.

Les cellules appartenant à la première sous population présentent les mêmes caractéristiques nucléaires que les hyalinocytes et possèdent par ailleurs un

cytoplasme plus granuleux, contenant quelques inclusions de forme rondes à affinité basophile (PL.II et III fig. 1 à 3). Certaines de ces cellules montrent des vacuoles d'endocytose (PL.III fig. 3).

L'autre sous population est représentée par des cellules dont l'endoplasme contient de très nombreuses granulations à affinité neutrophile après coloration panoptique. Les granules cytoplasmiques de forme polyédrique possèdent une taille très variable pouvant atteindre 2  $\mu\text{m}$  de diamètre (PL.IV fig.1, 2). Le noyau rond, d'un diamètre de 3 à 5  $\mu\text{m}$ , est généralement excentré. L'ectoplasme transparent s'étale comme un voile autour de l'endoplasme et émet des prolongements cytoplasmiques longs donnant ainsi à la cellule une forme irrégulière (PL.IV fig.1). Quand il ne forme plus de filopodes, le granulocyte prend une forme plus régulière en demi-lune (PL.IV fig. 2).

Nous pouvons proposer, dès à présent, que les hémocytes à granulations neutrophiles constituent chez *D. polymorpha* les hémocytes granuleux caractéristiques, encore appelés granulocytes.

Nous avons pu remarquer, sur les frottis, la présence d'agrégats de cellules formés immédiatement après le dépôt de l'hémolymphe sur le support et à partir desquels les hémocytes migrent en se déplaçant par mouvement amiboïde. Les agrégats ont tendance à disparaître après 40 minutes d'étalement, les cellules sont alors fortement étalées et montrent de nombreuses vacuoles.

## 1. 2. OBSERVATION DES HEMOCYTES EN MICROSCOPIE OPTIQUE SUR COUPES HISTOLOGIQUES ET SEMI-FINES

A l'instar des autres bivalves, *D. polymorpha* possède un système circulatoire semi-ouvert qui permet non seulement aux cellules d'envahir les sinus bordant les différents organes mais aussi d'infiltrer leurs épithéliums. Les cellules circulantes observées sur les frottis sont donc également présentes dans tous les tissus baignés par l'hémolymphe (PL.V fig. 1 à 3).

### 1. 2. 1. Les hyalinocytes

Généralement de forme arrondie, ils mesurent 7 à 10  $\mu\text{m}$  et possèdent un cytoplasme clair, finement granuleux; le noyau rond, d'environ 6  $\mu\text{m}$  de diamètre, contient un ou deux nucléoles et une euchromatine, répartie en mottes.

Des stades plus jeunes dont la taille varient entre 5 à 6  $\mu\text{m}$  sont également observés (PL.V fig. 1).

Dans ce type cellulaire, le rapport nucléocytoplasmique est élevé.

### 1. 2. 2. Les hémocytes granuleux

Dans cette population à faible rapport nucléocytoplasmique, les cellules mesurent environ 12  $\mu\text{m}$  et présentent un cytoplasme très granuleux et un noyau de 4 à 5  $\mu\text{m}$  de diamètre contenant une chromatine condensée en petites mottes (PL.V fig. 1 à 3).

Les figures 18 A et 18 B schématisent l'aspect des différents types hémocytaires chez *D. polymorpha*.

## 2. MORPHOLOGIE ULTRASTRUCTURALE

Les observations ultrastructurales ont permis de retrouver les deux populations d'hémocytes chez *D. polymorpha*: les hyalinocytes et les hémocytes granuleux.

### 2. 1. LES HYALINOCYTES

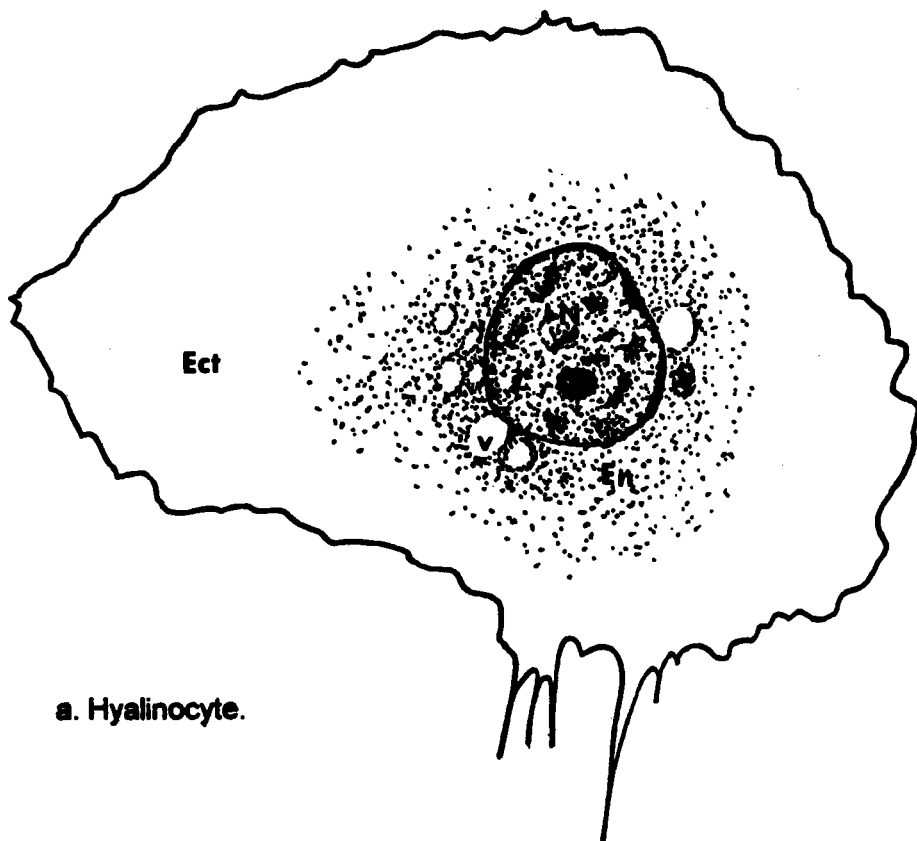
Ces cellules sont caractérisées par l'absence presque totale de granulations cytoplasmiques. A tendance sphérique, leur contour peut être irrégulier par la présence de prolongements cytoplasmiques. Les hyalinocytes ont un diamètre moyen de 7  $\mu\text{m}$ , un noyau central sphérique ou ovale mesurant environ 4  $\mu\text{m}$  et sont donc caractérisés par un rapport nucléocytoplasmique élevé (PL.VI fig.1, 2 et PL.VII fig. 1).

Le noyau contient une chromatine abondante, condensée en petites mottes et en liseré périnucléaire ainsi qu'un ou deux nucléoles (PL.VI fig.1, 2).

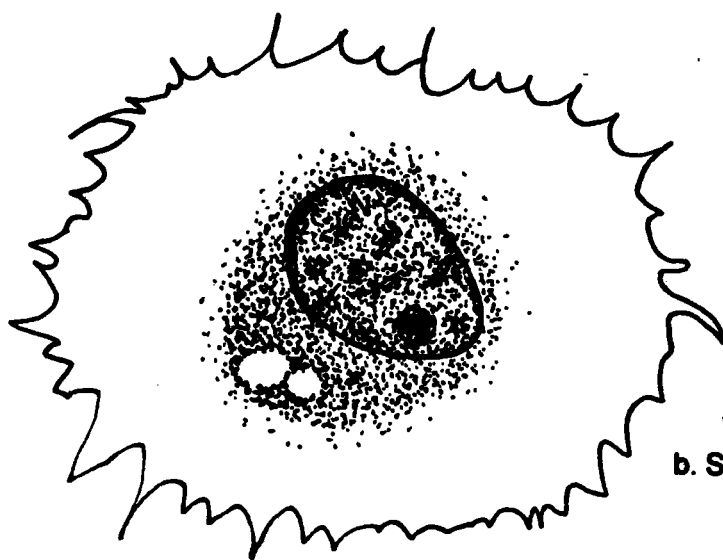
Le cytoplasme des hyalinocytes contient diverses organites :

- Des petites granulations rondes ou allongées de 0.1 à 0.3  $\mu\text{m}$  regroupées par dix ou quinze forment un ou deux amas dans le cytoplasme. Ces vésicules, limitées par une membrane, contiennent une matrice amorphe moyennement électrodense (PL.VII fig. 2).
- Quelques structures limitées par une membrane, rondes à contenu peu dense aux électrons, probablement de nature lipidique (PL.VII fig. 3).





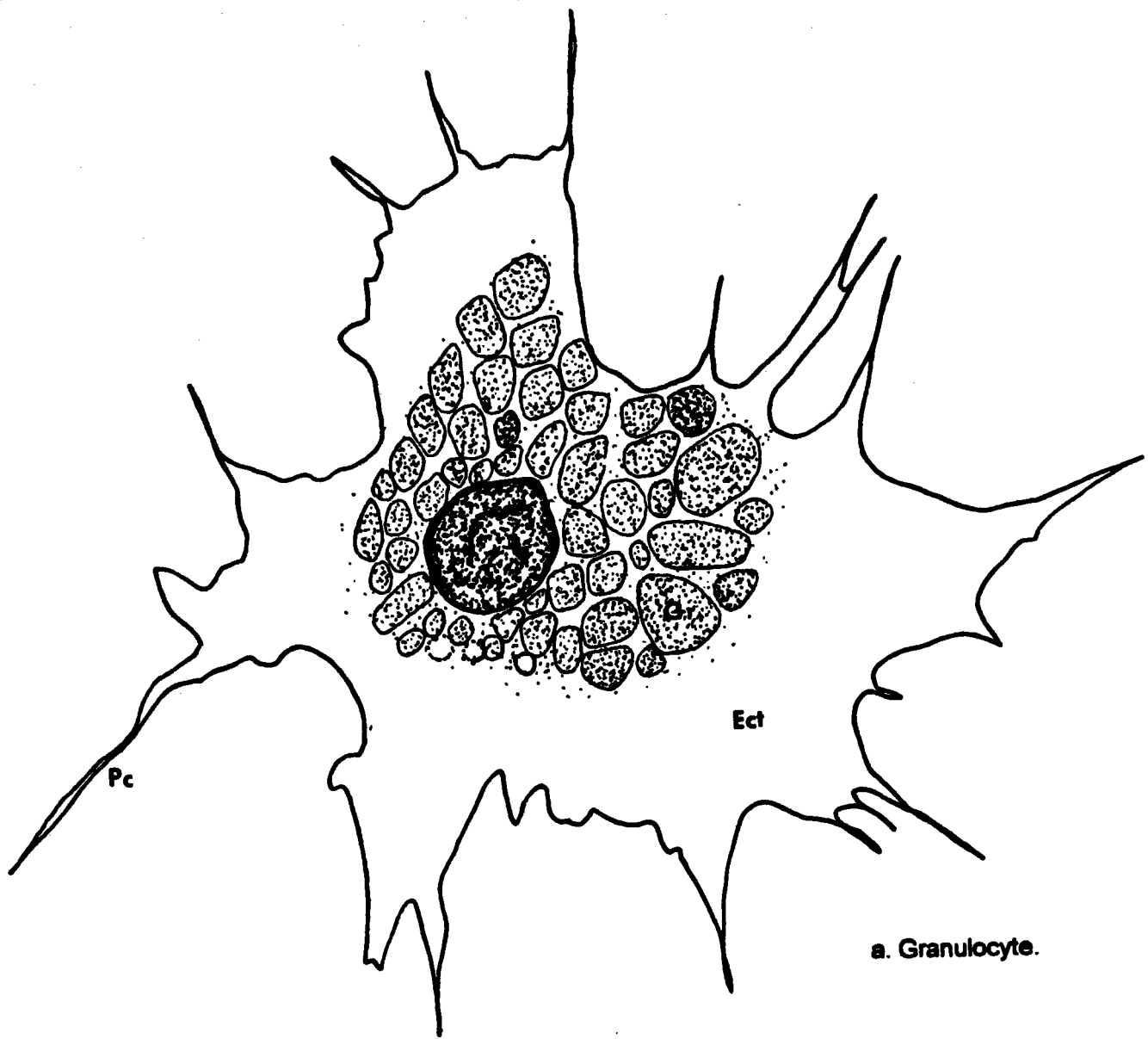
a. Hyalinocyte.



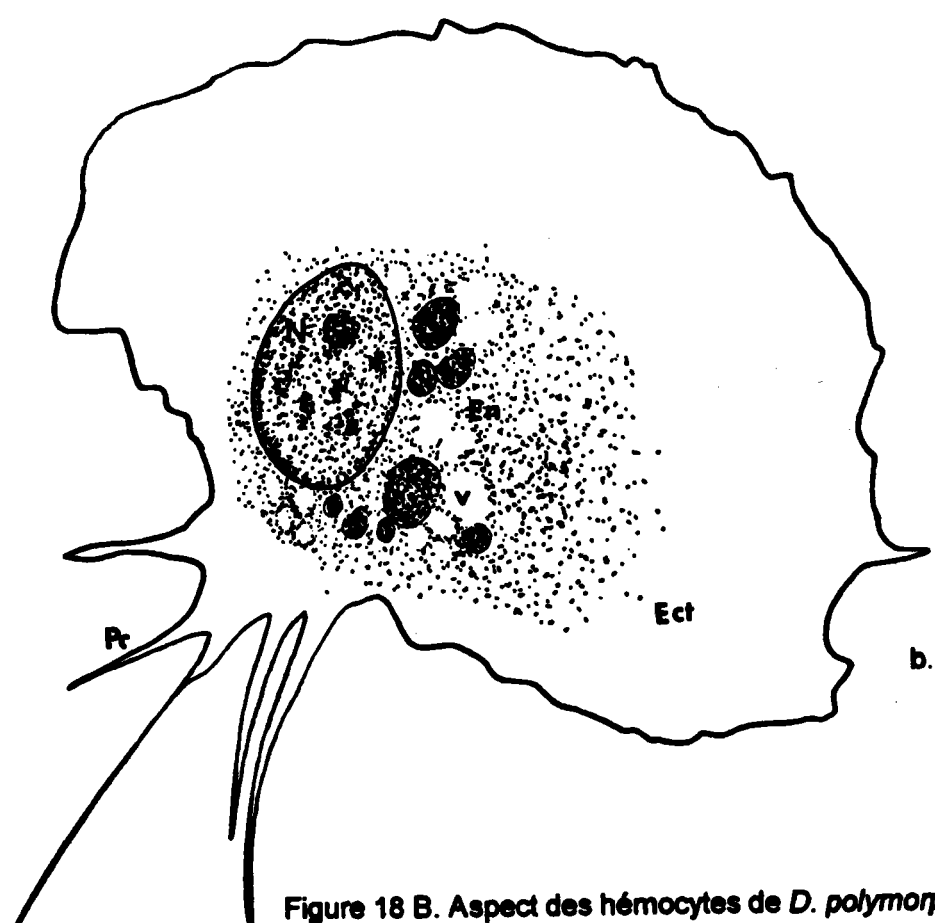
b. Stade de développement jeune, prohyalinocyte.

2  $\mu$ m

Figure 18 A. Aspect des hémocytes de *D. polymorpha* sur frottis



a. Granulocyte.



b. hémocyte peu granuleux.

2 μm

Figure 18 B. Aspect des hémocytes de *D. polymorpha* sur frottis

- Le réticulum endoplasmique rugueux peu développé situé principalement autour du noyau sous forme de petites citernes allongées (PL.VI fig. 2, PL.VII fig. 2).
- Le réticulum endoplasmique lisse est abondamment développé et dispersé dans le cytoplasme en petites vésicules polymorphes ou en fines citernes allongées (PL.VII fig. 2, 3).
- L'appareil de Golgi peu fréquent dans les coupes est constitué par des dictyosomes de 4 à 5 saccules.
- Les mitochondries sont isolées ou réunies en petits groupes près du noyau (PL.VI fig. 2, PL.VII fig. 1).

## 2. 2. LES HEMOCYTES GRANULEUX

Les cellules sont généralement de forme arrondie mais peuvent être irrégulière quand l'ectoplasme émet des prolongements cytoplasmiques. Elles atteignent 10  $\mu\text{m}$  de diamètre et possèdent un noyau rond et excentré de 3 à 4  $\mu\text{m}$  de diamètre dont la chromatine est condensée en grosses mottes et en liseré périnucléaire. Leur rapport nucléoplasmique est faible (PL.VIII fig. 1, 2).

Les granulocytes sont caractérisés par de nombreuses granulations cytoplasmiques (PL.VIII fig. 1, 2). Ces dernières ont une forme variable, et peuvent être rondes ou polyédriques et mesurer entre 0.3 et 1.2  $\mu\text{m}$  de diamètre (PL.IX fig.1, 2). Les granules sont entourés par une membrane simple et contiennent une matrice modérément électrodense homogène et amorphe où quelques petits corpuscules sphériques correspondant à des débris membranaires peuvent être parfois observés (PL.IX fig. 2). La matrice occupe le plus souvent tout le volume.

Le cytoplasme des hémocytes granuleux contient par ailleurs des petites vésicules membranaires claires, du réticulum endoplasmique lisse sous forme de saccules dispersés et un appareil de Golgi développés (PL.IX fig. 1, 2, 3). Les mitochondries rondes ou allongées sont distribuées entre les granules ou rejetées à la périphérie de l'endoplasme (PL.VIII fig. 1, 2).

D'autres structures membranaires, correspondant à des phagosomes ou à des corps résiduels de très grande taille (PL.X fig. 1, 2) sont également observables dans certains granulocytes qui, par ailleurs, ne possèdent plus que quelques granulations. Ces cellules, correspondant à des stades âgés de maturation, sont quelques fois circulantes dans l'hémolymphe (PL.X fig. 1) ou mobilisées au niveau des organes tels que les reins (PL.X fig. 2).

Parmi la population des hémocytes granuleux nous avons également observé des cellules possédant les mêmes caractéristiques que les granulocytes précédemment décrits mais dont les granules nettement moins nombreux sont de plus petite taille (0.5  $\mu\text{m}$  de diamètre environ) (PL.XI fig. 1). Aucun élément actuellement ne permet de dire si ces hémocytes constituent un type cellulaire distinct dans la population des hémocytes granuleux mais nous pensons plutôt qu'il correspond à un état fonctionnel différent ou à un stade de maturation plus précoce des granulocytes typiques.

L'étude ultrastructurale permet d'observer les contacts étroits qu'établissent les hémocytes avec les cellules plus particulièrement des organes excréteurs qui concernent notre travail. Les hyalinocytes et les granulocytes présents dans les zones basales du rein et des glandes péricardiales montrent des activités d'échange avec ces organes (PL.XII. fig.1, 2, 3, 4).

Par ailleurs, la microanalyse de RX couplée au M.E.T. révèle que la matrice des granules cytoplasmiques contient principalement P, S associés en proportions plus faibles à Si, Cu, Zn ou occasionnellement à Fe, Pb et Mg.

### **3. ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES HEMOCYTES**

Les réactions de mise en évidence des activités des phosphatases acides, des estérases et des  $\beta$  glucuronidases ont été réalisées sur des frottis d'hémolymphe. L'activité des phosphatases acides a été révélée dans les hémocytes à l'échelle ultrastructurale.

#### **3. 1. CYTOCHIMIE ENZYMATIQUE DES HEMOCYTES SUR COUCHES MONOCELLULAIRES**

##### **3. 1. 1. Activité des phosphatases acides**

La présence de granules de couleur brun rouge met en évidence l'activité de certaines phosphatases acides dans le cytoplasme des hémocytes.

Les phosphatases acides sont révélées dans les granules de certains hémocytes peu granuleux et vacuolisés décrits au paragraphe 1. 1. 1. 2. (PL.XIII fig.1).

L'activité des phosphatases acides montre une plus grande variabilité dans la population des granulocytes entre les cellules et entre les granules d'une même cellule (PL.XIII fig. 2, 3).

Les hyalinocytes apparaissent dépourvus de phosphatases acides, cependant quelques cellules possèdent des inclusions qui réagissent positivement dans le milieu de révélation mais aussi dans le milieu témoin.

### 3. 1. 2. Activité des $\beta$ glucuronidases

La présence des  $\beta$  glucuronidases est indiquée par une coloration rose violette mis en évidence seulement au niveau du type d'hémocytes peu granuleux et vacuolisés décrits au paragraphe 1. 1. 1. 2. (PL.XIV fig. 1 à 3). Dans le cytoplasme, ces enzymes sont localisées dans les inclusions rondes dispersées entre les vacuoles.

Les granulocytes ne présentent aucun signe d'activité de cette enzyme (PL.XIV fig. 3).

### 3. 1. 3. Activité des estérases non spécifiques

La présence d'estérases non spécifiques dans les cellules est indiquée par une coloration des structures en noir. Quelques inclusions cytoplasmiques réagissent positivement, avec une intensité variable, dans les hyalinocytes (PL.XV fig. 1) et dans les hémocytes peu granuleux décrits au paragraphe 1. 1. 1. 2. (PL.XV fig. 1, 2). Les granules cytoplasmiques des granulocytes montrent en majorité une forte activité estérasique (PL.XVI fig. 1, 2).

## 3. 2. LOCALISATION ULTRASTRUCTURALE DES PHOSPHATASES ACIDES

L'activité des phosphatases acides dans les divers organites est révélée à l'échelle ultrastructurale par la présence de dépôts de phosphates de plomb.

Dans les hyalinocytes l'activité est localisée dans la citerne périnucléaire, dans le réticulum endoplasmique rugueux, dans l'appareil de Golgi et dans le système vésiculaire (PL.XVII fig. 1 à 4).

Les petites granules cytoplasmiques des hyalinocytes n'ont pas montré d'activité.

Une réaction non spécifique a été observée dans des mitochondries de cellules incubées dans le milieu de révélation aussi bien que dans le milieu témoin ne contenant pas de substrat.

Par ailleurs, les granules cytoplasmiques des granulocytes montrent une forte activité des phosphatases acides (PL.XVIII fig. 1 à 3, PL.XIX fig. 1, 2) avec une

intensité très variable entre les granules d'une même cellule. En effet, alors que certains granules montrent une très forte activité enzymatique, d'autres en sont totalement dépourvus (PL.XVIII fig. 2, PL.XIX fig. 1, 2).

Dans le milieu intragranulaire l'activité des enzymes n'est pas toujours homogène. En effet, certaines zones bien délimitées, peuvent être exemptes de réactivité apparente (PL.XIX fig. 1, 2).

Dans les granulocytes la présence de phosphatases acides est révélée également au niveau du réticulum endoplasmique rugueux, de l'appareil de Golgi et de la citerne périnucléaire de certaines cellules (PL.XIX fig. 3, 4).

La localisation de phosphatases acides dans les granulocytes tend à attribuer aux granules une fonction de stockage de ces enzymes produites par l'appareil sécréteur de ces cellules.

Sur les préparations témoins, les réactions sont négatives sauf dans quelques granules de granulocytes où de fins dépôts noirs peuvent être observés. De fins dépôts sont également visibles sur les mottes de chromatine dans les noyaux de certaines cellules incubées dans les milieux de contrôle et de révélation.

#### **4. COMPTAGE DIFFERENTIEL DES HEMOCYTES**

Les comptages d'hémocytes réalisés à partir d'hémolymphe ponctionnée au niveau du sinus du muscle adducteur renseignent uniquement sur la population cellulaire circulante et ne concernent pas les hémocytes mobilisés au niveau des différents tissus.

Des comptages différentiels partiels distinguant d'une part, la population des granulocytes neutrophiles facilement identifiable et d'autre part toutes les autres cellules ont été réalisés sur des individus provenant de sites naturels.

Les résultats montrent des proportions de granulocytes neutrophiles de 35 %  $\pm$  7.11% et de 31 %  $\pm$  6.89% pendant deux mois consécutifs.

Un essai de comptage séparant les granulocytes neutrophiles, les hémocytes peu granuleux basophiles et les hyalinocytes a été effectué chez cinq individus et montre que la population des hémocytes granuleux atteint 59 %  $\pm$  6.5 %.

#### **5. DISCUSSION**

Les observations de microscopie optique et électronique à transmission nous ont permis de distinguer deux grandes populations d'hémocytes chez *D. polymorpha*.

- Une population de cellules agranuleuses : les hyalinocytes et
- Une population de cellules granuleuses composée par : les granulocytes et les hémocytes peu granuleux .

Les seuls travaux, à notre connaissance, publiés jusqu'à présent sur les hémocytes de *D. polymorpha* sont ceux de Cuénot (1891), rapportés succinctement par Cheng (1981). Cuénot décrit quatre types d'hémocytes communs à plusieurs espèces de bivalves marins tels que *M. edulis* et *O. edulis* ou d'eau douce comme *A. grandis* et *U. requienii* ou bien encore *D. polymorpha* .

Les hyalinocytes que nous avons décrit chez *D. polymorpha* correspondent aux amœbocytes basophiles, de 8 à 12 µm de diamètre, à cytoplasme réduit ne contenant pas de granules, observés par Cuénot (1891). Leur morphologie ultrastructurale est caractéristique de la population d'hémocytes non granuleux typiques décrits chez de nombreux bivalves ainsi que chez d'autres mollusques (Rasmussen *et al.*, 1985; Seiler et Morse, 1988; Ottaviani et Franchini, 1988; Auffret, 1988; Pipe, 1990).

Cuénot (1891) décrit également un type d'amœbocyte peu granuleux et un type finement granuleux dont les granules sont biréfringents, bleuâtres ou sans couleur. Ces deux derniers types cellulaires pourraient correspondre aux cellules de la population des hémocytes granuleux. Sans renseignements morphologiques supplémentaires sur les cellules peu granuleuses ou finement granuleuses décrites par Cuénot en microscopie optique, il nous paraît hasardeux, de préciser la correspondance entre ces cellules et nos observations.

Par ailleurs, Cuénot (1891) observe aussi un type cellulaire appelé érythrocyte, de grande taille (20 X 30 µm), de forme variable et de couleur rougeâtre que nous n'avons pas observé sur nos préparations.

Les granulocytes typiques de *D. polymorpha*, observés sur les couches monocellulaires, contiennent des granulations à affinité tinctoriale unique, neutrophile, comme celle des granulocytes de *O. edulis* (Auffret, 1989). Ce type cellulaire est retrouvé en M.E.T. L'endoplasme est occupé entièrement par des granules de 0.3 à 1.5 µm de diamètre à matrice moyennement dense aux électrons. Leur morphologie est similaire à celle observée par Rasmussen (1985) et par Pipe (1990) dans les grands granulocytes de *M. edulis*. Uniquement différencié par le M.E.T., certains granulocytes présentent un nombre réduit de granules cytoplasmiques de plus petite taille, mesurant environ 0.5 µm de diamètre. En outre, ces cellules ne présentent pas de structures comme des lamelles digestives ou des corps résiduels, caractéristiques

de cellules âgées. Par contre, le nombre réduit de granules pourrait s'expliquer par le fait que ces cellules correspondent à des granulocytes jeunes, en cours de maturation. Des granules cytoplasmiques de petite taille sont également décrits par Rasmussen (1985) et par Pipe (1990) dans les petits granulocytes de *M. edulis*, qui sont alors considérés comme des hémocytes jeunes.

Les investigations cytochimiques ont mis en évidence une forte activité hydrolytique au niveau des granules. En effet, des phosphatases acides et des estérases non spécifiques ont été révélées dans les granules des granulocytes. Ces résultats concordent avec ceux de plusieurs auteurs chez différentes espèces de bivalves (Moore et Lowe, 1977; Moore et Gelder, 1985; Gelder et Moore, 1986).

Les hémocytes de *D. polymorpha* montrent une relative hétérogénéité d'activité hydrolytique. Certaines cellules possèdent une forte activité enzymatique alors que d'autres en sont dépourvues reflétant certainement différents stades fonctionnels. Des résultats similaires ont été observés par Moore et Eble (1977) et par Moore et Gelder (1985) chez *M. mercenaria* ainsi que par Huffman et Tripp (1982) chez *M. arenaria*.

La localisation des phosphatases acides a été précisée en M. E. T. au niveau des granulations cytoplasmiques à matrice électrodense. Les variations de réactivité observées entre les granules d'une cellule reflète, à notre avis, une différence de maturation ou d'activité de la part de ces organites. Une localisation ultrastructurale identique est rapportée par Yoshino et Cheng (1976) dans les granulocytes de *M. mercenaria*, par Auffret (1985; 1989) chez *C. gigas* et *O. edulis* et par Franchini et Ottaviani (1990) chez le gastéropode *V. ater*.

La présence de ces enzymes lysosomales caractéristiques nous permet d'affirmer l'appartenance des granulations des granulocytes de *D. polymorpha* au système lysosomal.

Les granulations cytoplasmiques des hyalinocytes ne semblent pas contenir de phosphatases acides mais présentent une activité estérasique.

Enfin, nous distinguons, en microscopie optique, une troisième sous population d'hémocyte contenant peu de granules cytoplasmiques ronds à affinité basophile et de nombreuses vacuoles, vides ou remplies de produits de phagocytose. Ces granules présentent, également, des activités phosphatasiques acides, estérasiques. Par ailleurs, ces cellules sont les seules à montrer une activité pour les  $\beta$  glucuronidases.



Ces cellules, observées sur les frottis d'hémolymphe pourraient correspondre aux granulocytes observés en M.E.T., ne montrant que quelques granulations spécifiques et des vacuoles contenant des corps résiduels.

Le fait que les granulations cytoplasmiques des hémocytes peu granuleux possèdent une enzyme lysosomale supplémentaire pourrait expliquer un stade de maturation plus avancé pour ces cellules.

Particulièrement riches en enzymes lysosomales, ces cellules pourraient éventuellement correspondre aux macrophages décrit par Moore et Lowe (1977) chez *M. edulis*.

Nos résultats actuels ne nous permettent pas de préciser plus avant l'appartenance des hémocytes peu granuleux à la population des hémocytes granuleux. La différence d'affinité tinctoriale observée sur les frottis pour ces deux catégories d'hémocytes granuleux ne va cependant pas à l'encontre de notre classification. En effet, les différences d'affinité tinctoriales des granulations cytoplasmiques dans une population hémocytaire reflètent de préférence des variations du stade métabolique des cellules (Cheng, 1975).

Les caractéristiques morphologiques que nous avons décrit pour les trois catégories hémocytaires chez *D. polymorpha* sont à rapprocher de celles décrites chez *M. edulis*, pour qui, la filiation des différents types d'hémocytes reste encore aujourd'hui controversée. En effet, Moore et Lowe (1977) décrivent chez cette espèce un type de granulocyte éosinophile et deux types d'hémocytes basophiles: les lymphocytes et les macrophages. Les auteurs distinguent ces deux types cellulaires en fonction de leurs caractéristiques cytochimiques: alors que les macrophages présentent une forte activité pour plusieurs hydrolases lysosomales, les hyalinocytes en sont dépourvus. Les premiers seront considérés, ensuite, comme des granulocytes à un stade particulier de dégradation intracellulaire (Cheng, 1981; Rasmussen *et al.*, 1985). Ces auteurs ne distinguent plus que deux populations: les hémocytes agranuleux et granuleux et considèrent les variations morphologiques comme des stades fonctionnels différents. Cependant, plus récemment, Pipe (1990) sépare à nouveau les populations hémocytaires en fonction des différences de composition chimique des membranes des petits et grands granules et reprend la classification de Moore et Lowe (1977). Toutefois il envisage la présence de plusieurs stades fonctionnels à l'intérieur d'une seule lignée cellulaire.

Il est important de distinguer les diverses populations hémocytaires chez *D. polymorpha* afin de mieux comprendre leur rôle particulier dans le métabolisme des métaux lourds. Nous avons donc distingué, sur des critères d'affinité tinctoriale et de

morphologie ultrastructurale, deux populations d'hémocytes agranuleux et granuleux qui sont habituellement décrites dans la littérature.

Par ailleurs, nous avons révélé au niveau de la matrice intragranulaire, la présence des certains métaux comme Zn, Cu, Fe ou Pb chez des Dreissènes provenant de sites naturels. Ces résultats indiquent que *D. polymorpha* est capable, à partir de son environnement naturel, d'accumuler et de séquestrer divers métaux dans les granulations des hémocytes granuleux. Des observations comparables sont rapportées par Ballan Dufrançais *et al.* (1982) chez *P. maximus*, par Nigro *et al.* (1992) chez *A. colbecki* et également par George *et al.* (1978) chez *O. edulis*.

Cette compartimentation d'éléments métalliques au niveau du système lysosomal laisse envisager chez *Dreissena*, comme il est suggéré d'ailleurs chez d'autres bivalves, l'implication des hémocytes dans les mécanismes de détoxification des métaux lourds.

## II. LES ORGANES DU SYSTEME EXCRETEUR

### 1. LES GLANDES PERICARDIALES

#### 1. 1. LOCALISATION

Chez *D. polymorpha*, les glandes péricardiales occupent, dans la cavité péricardique, une position ventrale antérieure au coeur principalement au niveau de la jonction de l'oreillette et du tissu conjonctif suprabranchial. Elles sont formées par des saccules digités provenant d'évaginations de l'épithélium péricardial. Les tubules sont bordés par des cellules appelées podocytes contenant de grandes inclusions cytoplasmiques.

Nos observations ultrastructurales de l'épithélium des oreillettes (PL.XX fig. 1) n'ont jamais révélé la présence de podocytes à ce niveau. Ceci laisse envisager que les glandes péricardiques ont une localisation uniquement péricardiale chez *D. polymorpha*.

#### 1. 2. ULTRASTRUCTURE

Les tubules de la glande péricardique sont bordés par des podocytes abondamment ciliés sur leur face libre du côté de la lumière (PL.XX fig. 2, PL.XXI fig. 1, 2) montrant également à ce niveau des vésicules d'endocytose (PL.XXII fig. 1, 2).

Dans leur partie basale, les podocytes émettent des prolongements cytoplasmiques qui se ramifient et forment à leur extrémité des pédicelles rectangulaires reliés par des diaphragmes (PL.XXIII fig. 1 à 3). Des fentes de filtration sont ainsi constituées entre les pédicelles. Les fentes ont une largeur d'environ 20 à 25 nm et sont partiellement occupées par les diaphragmes accolés aux membranes de chaque pédicelle et disposées en quinconce dans la lumière de la fente. L'espacement entre les diaphragmes détermine ainsi la taille des molécules filtrées par les podocytes ou retenues dans le compartiment hémolympatique (PL.XXIII fig. 2, 3).

Les nombreux pédicelles des différents podocytes s'entrecroisent et constituent un réseau basal de filtration, séparé du sinus sanguin sous-jacent par une lame basale (PL.XX fig. 2, PL.XXIII fig. 1, 2). Du côté du sinus sanguin, la lame basale est parfois doublée par des filaments extracellulaires de collagène (PL.XXIII fig. 3).

Le cytoplasme des cellules de la glande péricardiale contient de nombreuses granulations montrant une grande hétérogénéité aussi bien dans leur forme que dans leur contenu (PL.XXI fig. 1, 2).

De grands granules, dont le diamètre varie de 1 à 3.5  $\mu\text{m}$  peuvent occuper une grande partie du cytoplasme. Leur matrice est amorphe et fortement électrodense (PL.XXI fig. 1, 2).

Un autre type de vésicules membranaires peut également être rencontré dans le cytoplasme des podocytes. De taille nettement plus petite avec un diamètre maximum d'environ 1.25  $\mu\text{m}$ , elles apparaissent claires et contiennent partiellement un matériel amorphe à aspect floconneux (PL.XXI fig. 1, 2, PL.XXII fig. 2).

Par ailleurs, la présence de phosphatases acides est révélée à l'échelle ultrastructurale au niveau de certains granules à matrice électrodense par la présence de dépôts de phosphates de plomb (PL.XIV fig. 1) indiquant ainsi que ces organites appartiennent au système lysosomal.

La microanalyse de RX, couplée au M. E. T. a permis de révéler dans la matrice granulaire la présence de divers éléments: P, Ca et Fe peuvent être considérés comme des éléments majeurs accompagnés d'autres éléments rencontrés en plus faible quantité ou occasionnellement tels S, Mg, Mn, Cu, Zn et Pb.

L'histochimie révèle la présence d'amas de ferritine au niveau des granulations des cellules péricardiales qui pourraient constituer un site de stockage de cette protéine (PL.XXV fig. 1).

L'utilisation de colorant vital tel le bleu trypan en solution dans l'eau, permet de localiser les organes participant à l'accumulation du colorant. Après 24 heures, le colorant est présent uniquement dans les granulocytes qui sont très nombreux au niveau de l'épithélium branchial; après deux jours, on note la présence du colorant également au niveau des podocytes et plus particulièrement dans les granulations cytoplasmiques (PL.XXV fig. 2). Cette accumulation indique chez *D. polymorpha*, comme chez les autres bivalves, la capacité des glandes péricardiales à accumuler et à stocker au niveau du système lysosomal des constituants présents dans l'hémolymphe.

Il est à noter également que le colorant qui s'accumule préférentiellement dans les podocytes n'est pas observé au niveau des cellules épithéliales des oreillettes, tendant à confirmer l'absence de podocytes associés aux oreillettes chez la moule zébrée (PL.XXV fig. 3).

L'examen des sections de glande péricardiale provenant des individus injectés ou incubés *in vitro* par une solution de peroxydase de raifort montre que, après une heure d'expérience, cette enzyme est localisée dans certaines inclusions cytoplasmiques des podocytes. Les préparations de contrôle sont dépourvues de réactivité. Ces résultats indiquent une endocytose de la peroxydase au niveau du système lysosomal des podocytes (PL.XXVI fig. 1).

Le rouge de ruthénium est localisé au niveau de la lame basale bordant les pédicelles (PL.XXVI fig. 2) indiquant ainsi la présence de sites anioniques à la base des podocytes.

## 2. LES REINS

### 2. 1. LOCALISATION ET MORPHOLOGIE

A la base du péricarde, chaque rein longe le bord latéro-ventral du muscle postérieur rétracteur du byssus, la courbure la plus postérieure se situant au niveau du muscle adducteur postérieur. Les reins sont constitués chacun de trois branches tubulaires leur donnant ainsi une forme de W dissymétrique (figure 19).

Au niveau du péricarde, où il débouche dans la partie postéro-inférieure, le néphrostome ou pavillon cilié, pourvu de cellules cylindriques à longue ciliature se

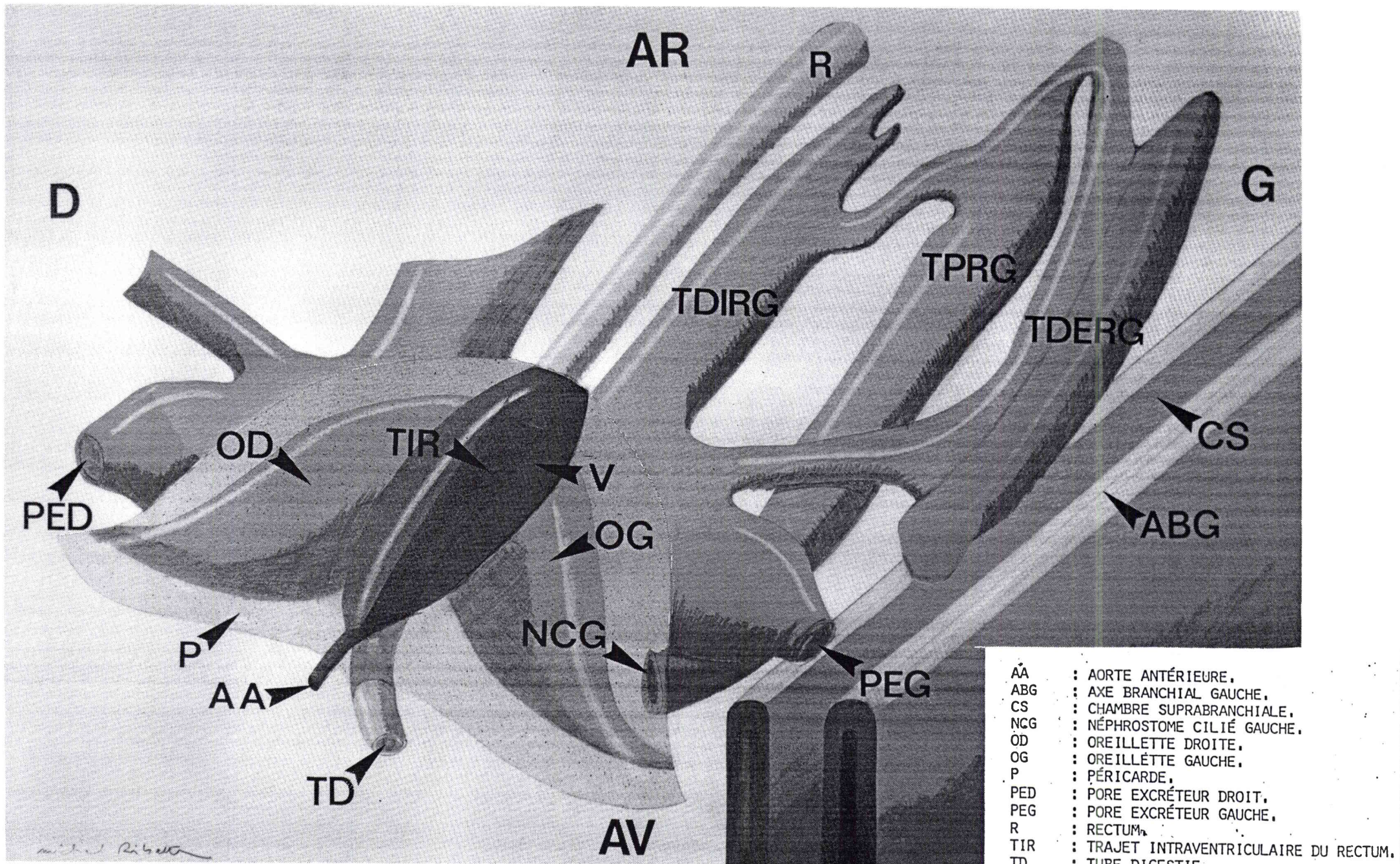


Figure 19. Représentation schématique du rein gauche de *D. polymorpha* en vue dorsale avec communication interrénale.

- AA : AORTE ANTÉRIEURE.
- ABG : AXE BRANCHIAL GAUCHE.
- CS : CHAMBRE SUPRABRANCHIALE.
- NCG : NÉPHROSTOME CILIÉ GAUCHE.
- OD : OREILLETTE DROITE.
- OG : OREILLETTE GAUCHE.
- P : PÉRICARDE.
- PED : PORE EXCRÉTEUR DROIT.
- PEG : PORE EXCRÉTEUR GAUCHE.
- R : RECTUM.
- TIR : TRAJET INTRAVENTRICULAIRE DU RECTUM.
- TD : TUBE DIGESTIF.
- TPRG : TUBULE PROXIMAL DU REIN GAUCHE.
- TDERG : TUBULE DISTAL EXTERNE DU REIN GAUCHE.
- TDIRG : TUBULE DISTAL INTERNE DU REIN GAUCHE.

poursuit par le tube rénal proximal. La forme du tubule proximal est régulière sur toute sa longueur et présente une section circulaire atteignant 400  $\mu\text{m}$ . L'épithélium simple constitué de cellules cylindriques ciliées a une hauteur d'environ 50  $\mu\text{m}$ .

La branche latérale externe, que nous avons appelé tube distal externe est située à la base des branchies. Ce tubule est aveugle et est formé par un épithélium pavimenteux d'une hauteur maximale de 15  $\mu\text{m}$  dont certaines cellules sont ciliées.

La branche latérale interne ou tubule distal interne longe le rectum et est constituée d'un épithélium cubique d'environ 25  $\mu\text{m}$  de hauteur. Les cellules de cette zone distale sont caractérisées par une grande vacuole apicale qui contient des concrétions de nature diverse. Au cours des différentes dissections, nous avons pu observer les variations de couleur du tubule distal. En effet, la coloration de cette zone peut varier du blanc opaque au brun orangé certainement selon les stades d'élimination des granules rénaux.

Le tube distal interne se poursuit par un canal cilié qui s'ouvre par un néphroprocte dans la chambre suprabranchiale.

Il existe une connexion antérieure entre les branches distales interne et externe de chaque rein ainsi qu'une commissure très antérieure entre les branches distales internes des deux reins.

Les tubules rénaux émettent des diverticules d'importance variable sur toute leur longueur.

## 2. 2. ULTRASTRUCTURE

L'épithélium proximal est caractérisé par des cellules prismatiques pourvues de microvillosités régulières, disposées en bordure en brosse (PL.XXVII fig. 1, 2). La bordure apicale présente à ce niveau des figures d'endocytose (PL.XXVIII fig. 2). Les cellules sont toujours reliées dans cette zone par des jonctions serrées et par des desmosomes (PL.XXVIII fig. 1). La partie basale de ces néphrocytes, où se situe le noyau, montre de nombreuses invaginations entre lesquelles se trouvent des mitochondries. Le cytoplasme contient du réticulum endoplasmique, des dictyosomes mais également quelques vacuoles à contenu hétérogène (PL.XXVIII fig. 4, 5), des lysosomes ainsi que des particules de glycogène dans certaines cellules (PL.XXVIII fig. 1, 3).

L'épithélium du tubule distal externe est formé par des cellules plutôt cubiques dont les microvillosités moins nombreuses, ne forment pas de bordure en brosse et dont la partie basale est fortement invaginée. Le cytoplasme de certaines cellules contient de nombreuses mitochondries et des vacuoles dont la taille varie de 0.5 à 3  $\mu\text{m}$ . Le contenu des vacuoles est électrodense et hétérogène, et peut être constitué de matériel amorphe ou de débris cellulaire indiquant l'appartenance de ces structures membranaires au système lysosomal en tant que lysosomes secondaires ou tertiaires (PL.XIX fig. 1).

L'épithélium du tube distal interne est caractérisé par des cellules de forme irrégulière à vacuole apicale. Certaines vacuoles sont vides et d'autres contiennent des granules de différentes taille, forme et nature. L'apex des cellules est légèrement cilié et dépourvu d'organites signifiant la possibilité de sécrétion apocrine. La partie basale où se situe le noyau présente de nombreuses invaginations peu profondes (PL.XXX fig. 1, 2, PL.XXXI fig. 1, 2).

## 2. 3. STRUCTURE ET NATURE DES GRANULES RENAUX

### 2. 3. 1. Structure et ultrastructure des granules

Différents types de concrétions rénales ont été observées indifféremment dans les reins des deux populations de Dreissènes étudiées.

La microscopie optique permet d'observer, sur nos préparations histologiques, deux types de granules rénaux dans les vacuoles des cellules du tubule distal interne.

En effet, les figures 1 et 2 de la planche .XXXII concernant des sections transversales de tube distal montrent qu'il peut s'agir de concrétions hétérogènes formées d'un agglomérat de petits grains de matériel très dense, à forte affinité pour le colorant.

Par ailleurs, d'autres sections de tubule rénaux (PL.XXXIII fig. 1) ainsi que des préparations *in toto* de rein distal non fixé (PL.XXXIII fig. 2, 3), provenant d'individus différents, montrent des granules à aspect étoilé. Naturellement de couleur jaunâtre, les concrétions intravacuolaires peuvent atteindre une taille de 10  $\mu\text{m}$ .

On retrouve en microscopie électronique à transmission les différents aspects des granules rénaux.

En effet, certaines vacuoles cellulaires ne présentent qu'un seul type de concrétions constituées d'un agglomérat de matériel amorphe très électrodense associé à de nombreux débris membranaires sphériques ou lamellaires d'aspect très

différent (PL.XXX fig. 2, PL.XXXI fig. 1, 2, PL.XXXV fig. 2). Ce type de matériel est également observé dans des vacuoles plus petites dispersées dans le cytoplasme appartenant au système lysosomal. Les diverses petites vacuoles fusionnent avec la vacuole apicale principale et y déversent leur contenu qui participe à la formation de ces agglomérats.

L'étude ultrastructurale permet de préciser que le type de granule à aspect étoilé n'est jamais seul dans le milieu intravacuolaire mais est toujours associé aux agglomérats précédemment décrits (PL.XXX fig. 1, PL.XXXIV fig. 1 à 3, PL.XXXV fig. 1). Ils sont formés par des structures cristallines géométriques et rectangulaires regroupées, conférant ainsi un aspect étoilé au granule. Les structures cristallines peuvent également être plus petites et dispersées entre les différents amas de matériel constituant la concrétion (PL.XXXIV fig. 3). Ces formations sont très claires aux électrons et leurs contours ne sont révélés que par la présence des autres constituants de la concrétion.

### 2. 3. 2. Composition des concrétions

Les réactions de mise en évidence de l'acide urique et de ses sels, utilisant une solution d'argentométhénamine, montrent que les concrétions à structure étoilée du tubule distal interne réagissent positivement (PL.XXXVI fig.1 à 3) indiquant la nature purique des granules. Des analyses complémentaires permettront cependant de préciser si le composé purique identifié correspond à l'acide urique ou à un de ses sels.

La microanalyse de RX couplée au M.E.T. montre d'importantes variations inter cellulaires et inter individuelles quant à la composition des granules. Ce phénomène empêche donc de mettre en évidence une différence de composition des granules rénaux chez les individus provenant des deux sites étudiés.

Les éléments C, H, O, N sont uniquement identifiés et ne peuvent être quantifiés par la technique de microanalyse de RX utilisée.

Dans les deux populations de Dreissènes, les concrétions rénales formées d'agglomérats hétérogènes d'origine lysosomale sont en majorité constituées de P, S et Ca associés en moindre quantité ou occasionnellement à du Pb, Fe, Si, Cu, Zn, Mg et Mn.

Les structures à aspect étoilées non dissociées du reste de la concrétion montrent la même composition principale d'où le soufre peut cependant être parfois absent.



### 2. 3. 3. Analyse des granules rénaux isolés

Malgré le nombre important d'individus utilisés dans cette étude (les reins de 50 moules ont été disséqués dans chaque population) la quantité de granules recueillie est faible rendant les manipulations délicates.

Les granules rénaux isolés par digestion enzymatique et dépassant la limite de détection du microscope optique ( $1.7 \mu\text{m}$  à grossissement 1000) ont été mesurés. Dans les deux populations de Dreissènes, plus de 95 % des granules mesurent moins de  $3.4 \mu\text{m}$  de diamètre (figure 20).

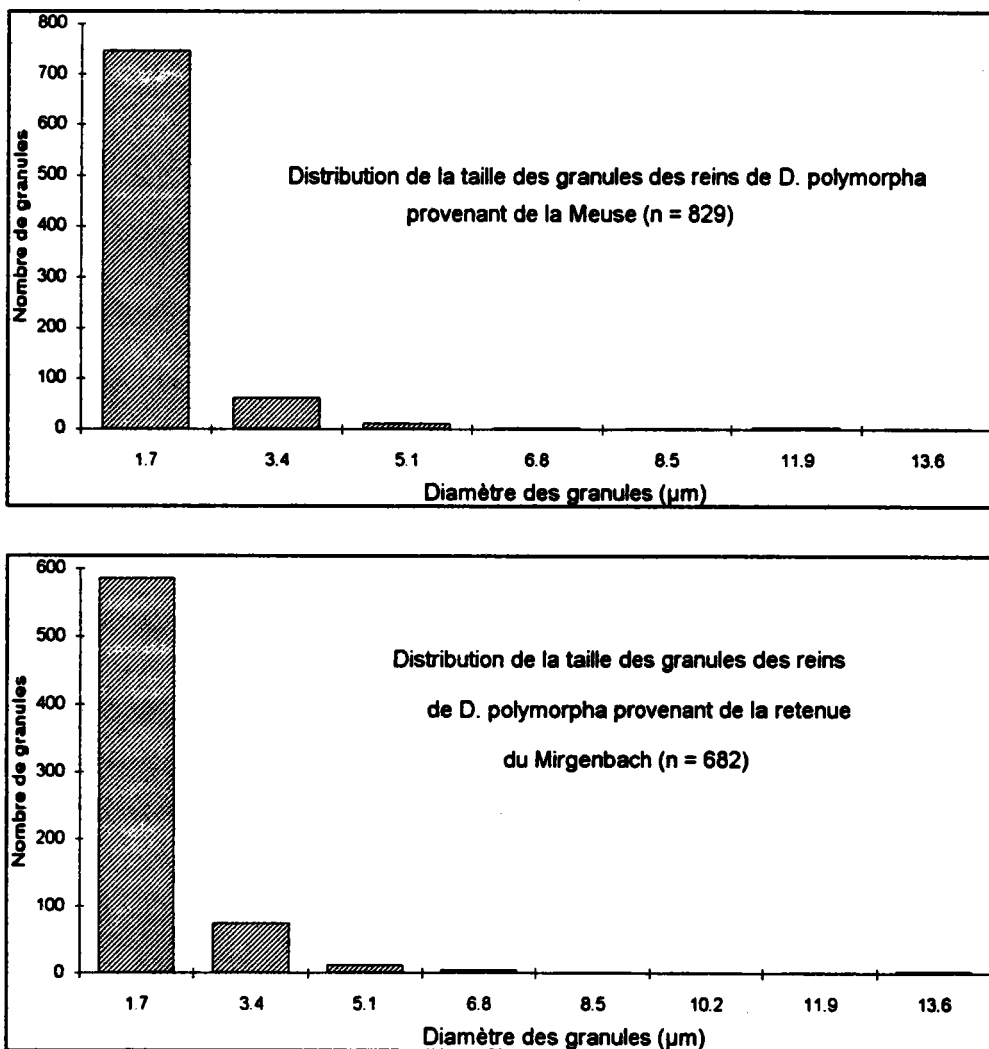


Figure 20: Distribution de la taille des granules rénaux de *D. polymorpha* provenant de la Meuse et de la retenue du Mirgenbach.

La microanalyse de RX couplée au M.E.B. montre que les granules rénaux des deux populations naturelles de Dreissènes présentent de grandes variations dans la proportion de leurs éléments. On retrouve, comme pour la microanalyse couplée au M.E.T la présence principalement de P, Ca associés très souvent à S, Pb, Al, Cu, Zn, et plus irrégulièrement à Si, Mn, Mg, Fe (figures 21 A) et exceptionnellement à Mo et Hg chez certains individus provenant du lac du Mirgenbach .

Par ailleurs, certains granules contiennent de très fortes proportions de métaux lourds représentés presque exclusivement par du plomb (figure 21B)

L'image X réalisée sur un granule pendant 5 heures montre la répartition des différents éléments dans la zone analysée. Pb, P, S et Ca sont répartis presque sur la totalité de la partie analysée. Ces éléments montrent une similitude de localisation indiquant ainsi leur étroite association dans la structure granulaire (figure 22).

### 3. DISCUSSION

Nos observations histologiques et ultrastructurales des oreillettes et des glandes péricardiales montrent que ces dernières occupent une position exclusivement péricardique chez *D. polymorpha*.

Ces résultats sont en contradiction avec les observations, très anciennes, de Grobben (1888) rapportées très succinctement par White (1942) qui envisageait une localisation simultanément auriculaire et péricardique. Par contre beaucoup plus récemment, Morton (1969b) favorise la position péricardique pour les glandes péricardiales de *D. polymorpha* sans toutefois exclure une situation auriculaire. En effet, cet auteur n'a pas effectué, ce qui semble étonnant, l'étude histologique des oreillettes et ne pouvait donc totalement rejeter cette éventualité.

Par ailleurs, Andrews (1988) favorise également la localisation péricardique pour les glandes péricardiales chez les espèces de bivalves d'eaux douces, mais reconnaît des glandes péricardiales auriculaires résiduelles chez *D. polymorpha* (Andrews et Jennings, 1993). En effet, le passage progressif de la position auriculaire, trouvée préférentiellement chez les espèces marines ou primitives, à la localisation péricardique constitue une adaptation des bivalves aux écosystèmes estuariens et dulçaquicoles.

Les podocytes, cellules typiquement associées aux mécanismes d'ultrafiltration et de formation de l'urine primaire chez les invertébrés comme chez les vertébrés (Boer et Sminia, 1976; Farquhar, 1982; Meyhöfer *et al.*, 1985; Andrews, 1988) sont présents dans les glandes péricardiales de *D. polymorpha*.

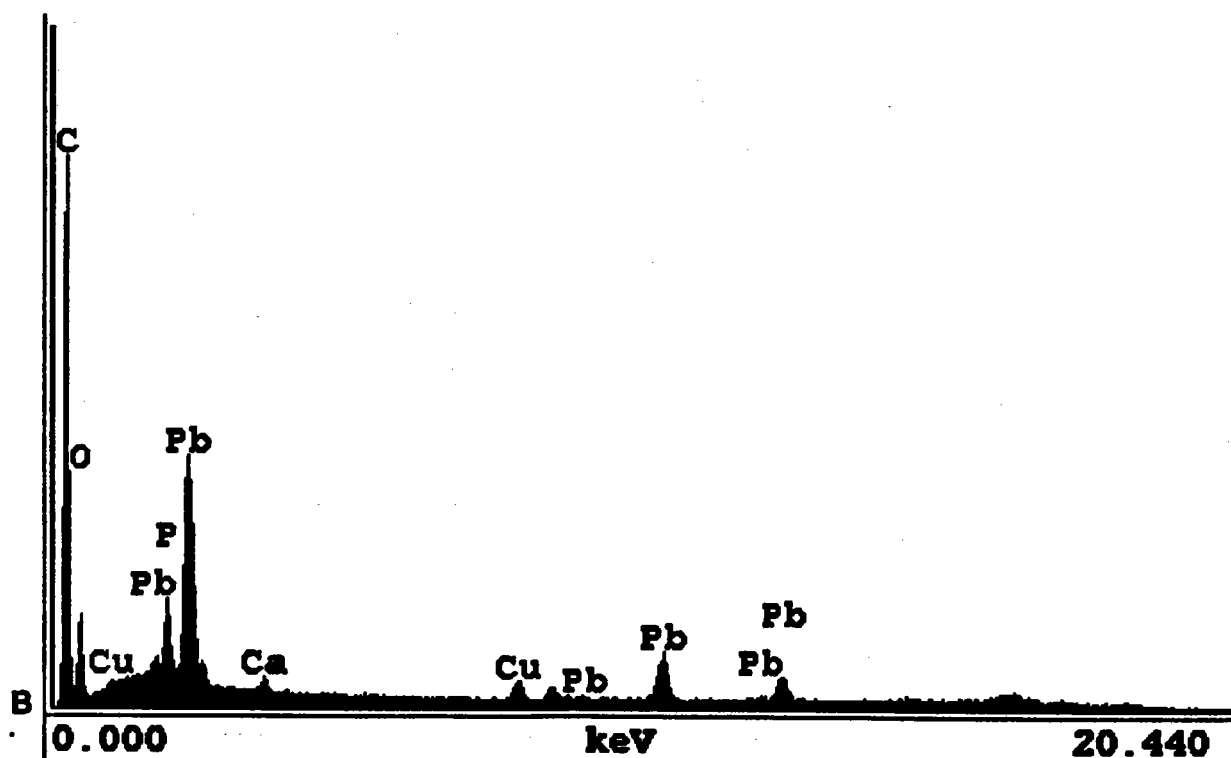
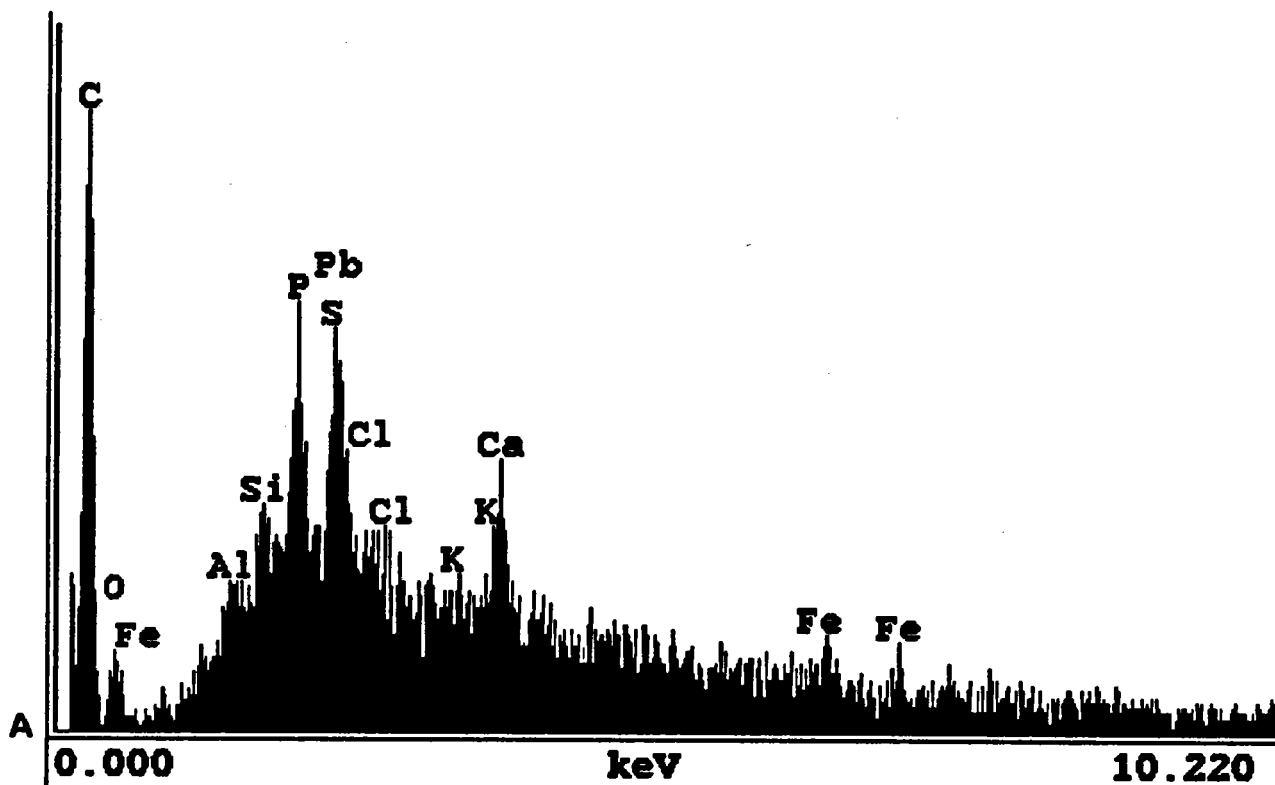


Figure 21. A) Spectre typique de microanalyse de RX de granules rénaux isolés  
 B) Spectre de microanalyse de RX fortement chargé en plomb

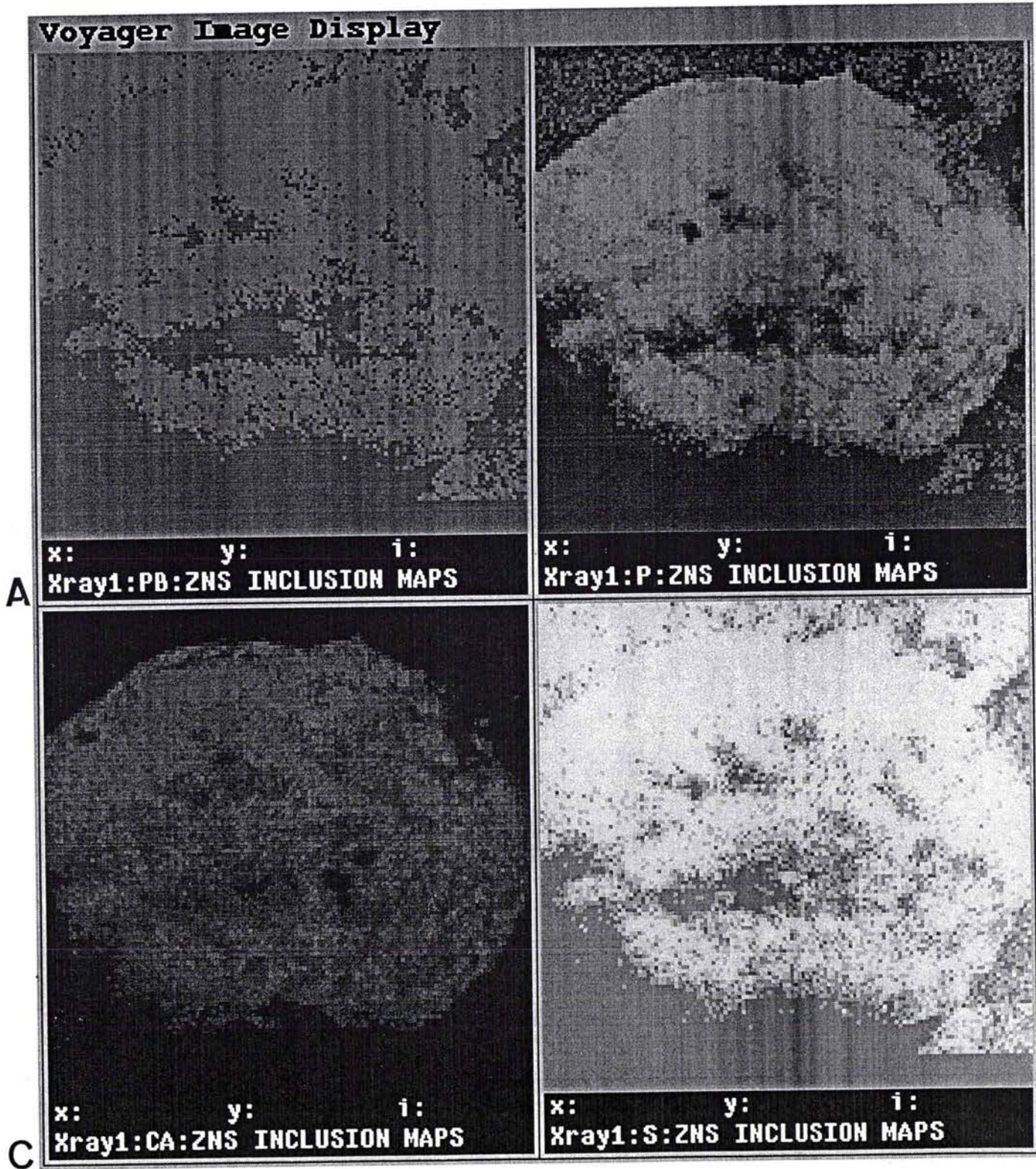


Figure 22. Image-X de différents éléments d'un granule rénale isolé A) plomb B) phosphore C) calcium D) Soufre

Nos observations ultrastructurales montrent que les glandes péricardiques de cette espèce possèdent les caractéristiques communes au système d'ultrafiltration chez les mollusques bivalves décrites par Meyhöfer *et al.* (1985). En effet, les podocytes bordant les tubules sont séparés par de larges espaces intercellulaires et montrent un système lysosomal révélé par la présence de phosphatases acides au niveau des granulations cytoplasmiques. Les cellules émettent de nombreux prolongements cytoplasmiques interdigités terminés par des pédicelles entre lesquels sont délimitées des fentes de filtration associées à des diaphragmes. Le réseau de filtration de l'hémolymphe formé par les pédicelles est bordé par une lame basale très fine contenant des sites de liaisons anioniques, localisés par le rouge de ruthénium qui est un marqueur cationique. Par leurs charges négatives, ces sites peuvent influencer le passage des molécules hémolympatiques comme l'ont montré Kandar et Farquhar (1979) et Farquhar (1982) chez les mammifères et Meyhöfer *et al.* (1985) chez les bivalves.

Les voies d'ultrafiltration proposées, d'une part, par Meyhöfer *et al.* (1985) pour des bivalves hétérodontes tels que *M. mercenaria*, *M. arenaria* ou *Clinocardium nuttalli* et, d'autre part, par Suzuki (1986) pour le bivalve d'eau douce *A. calipygos* pourraient également s'appliquer à *Dreissena* : A partir du compartiment hémolympatique, les éléments passent à travers la lame basale et les fentes de filtration dans l'espace urinaire entre les podocytes puis vers la lumière des tubules. A ce niveau, le filtrat peut être modifié par des phénomènes de sécrétion ou de réabsorption de la part des podocytes. En effet, l'étude ultrastructurale des podocytes de *Dreissena* montre la présence de microvillosités et de figures d'endocytose à la surface des cellules du côté de la lumière des tubules indiquant la possibilité de phénomènes d'absorption.

Dans la partie basale des podocytes, le réseau des pédicelles souligné par une lame basale parfois doublée de filaments de collagène extracellulaire constitue chez *D. polymorpha* comme chez les autres bivalves la barrière d'ultrafiltration.

La largeur des fentes de filtration est proche de 25 nm, valeur qui est à rapprocher de celles observées par Suzuki (1986) chez *A. calipygos* et par Morse (1987) chez plusieurs espèces de bivalves hétérodontes, protobranches et ptéridomorphes. La taille des particules retenues dans l'hémolymphe est pourtant plus faible. En effet, les fentes sont occupées en partie par des diaphragmes qui abaissent la taille des molécules filtrées à 10 nm chez les gastéropodes *V. viviparus* et *L. stagnalis* (Boer et Sminia, 1976). Les fentes de filtration représentent le principal filtre chez ces deux dernières espèces, alors que c'est la lame basale qui joue ce rôle chez

la même espèce, *V. viviparus* et chez plusieurs bivalves selon Andrews (1979) et Meyhöfer et Morse (1986).

La mise en évidence expérimentale de l'accumulation d'un marqueur au niveau de certains granules cytoplasmiques à matrice électrodense indiquent que les cellules péricardiques sont capables d'absorber, à partir de l'hémolymphe, des molécules de PM 44000 et d'un diamètre de 6 nm. Nos résultats concordent avec ceux de Moore *et al.* (1980) qui localisent ce marqueur également dans les granules cytoplasmiques des podocytes de *M. edulis*. Marcaillou et Martoja (1990) observent cette enzyme dans des vésicules d'endocytose dans les cellules péricardiques de *M. edulis* très rapidement après l'injection du marqueur. Meyhöfer et Morse (1986) observent l'endocytose du marqueur mais ne précisent pas sa localisation ultrastructurale.

Cependant, pour des raisons techniques, les préparations concernant les individus traités par des marqueurs hémoprotéiques et particulaires de poids moléculaires plus faibles ou plus élevés que la peroxydase n'ont pu être exploitées. Nous ne pouvons donc dire actuellement si les cellules péricardiques de *D. polymorpha* sont capables d'absorber depuis l'hémolymphe des molécules d'un diamètre supérieur ou inférieur à 6 nm. Ces précisions nécessiteront de nouvelles études. Cependant, Marcaillou et Martoja (1990) ont montré que la catalase (PM 240000, diamètre 10 nm) était difficilement accumulée par les podocytes de *M. edulis*. Ces derniers auteurs ainsi que Morse (1987) ont mis en évidence que les particules plus volumineuses comme la ferritine (PM 480000, diamètre 12 nm) étaient retenues au niveau des lames basales chez certains bivalves alors que Jennings (*in* Andrews, 1988) démontre l'endocytose et l'incorporation de la ferritine dans les lysosomes des podocytes de *Scrobicularia* sp.

Nous avons mis en évidence la présence de phosphatases acides dans des granules cytoplasmiques des podocytes indiquant donc que ces granules appartiennent au système lysosomal. Ces résultats concordent avec ceux de Moore *et al.* (1980) et de Zarogian et Yevich (1993) qui ont par ailleurs démontré la présence également d'autres enzymes lysosomales ( $\beta$  glucuronidase, N-acetyl- $\beta$ -hexosaminidase, lysozyme) et de pigments de type lipofuchsine dans les granules des podocytes de *M. edulis* et dans les inclusions cytoplasmiques des cellules brunes (podocytes) des glandes péricardiales de *M. mercenaria* et *C. virginica*. Les granules sont ainsi assimilés à des lysosomes secondaires (Moore *et al.*, 1980) participant aux mécanismes de détoxification mais aussi de catabolisme des produits réabsorbés (Zarogian *et al.*, 1989; Zarogian et Yevich, 1993).

Par ailleurs, par microanalyse de RX nous avons révélés la présence de P, Ca et Fe accompagnés en plus faible quantité ou occasionnellement par d'autres métaux tels Mg, Mn, Cu, Zn et Pb dans la matrice des granules.

Le fer détecté par microanalyse confirme la présence de ferritine révélée par histochimie au niveau des granules qui pourraient constituer ainsi des sites de stockage de cette protéine comme le suggèrent Khan *et al.* (1988) chez d'autres bivalves

Ces résultats laissent envisager pour les glandes péricardiales de *D. polymorpha*, non seulement une fonction d'ultrafiltration, mais encore, des fonctions d'accumulation et d'excrétion de certains éléments organiques ou inorganiques circulant dans l'hémolymphe.

Les reins de *D. polymorpha*, situés à la base du péricarde, ont une forme de W asymétrique par la présence de trois branches bien différenciées histologiquement en portion proximale, portion distale interne et distale externe. Les cellules proximales ont une forme prismatique et sont revêtues d'une ciliature du côté de la lumière. Les cellules distales internes moins hautes et moins ciliées sont caractérisées par une grande vacuole apicale.

Nos observations histologiques des reins de *D. polymorpha* sont en accord et précisent les travaux de Morton (1969b) concernant l'anatomie générale des reins et ceux de Herwig *et al.* (1989) concernant également l'anatomie et l'histologie de la portion proximale.

Par contre, Sécchi et Martoja (1986) étudient les concrétions rénales situées dans la portion distale des reins mais ne signalent pas la présence d'une branche rénale proximale. Leurs observations histologiques correspondent à l'épithélium distal caractérisé par des vacuoles apicales contenant des granules. Cependant, les auteurs s'appuient sur des études ultrastructurales concernant des pectinidés dont les reins ne montrent pas de spécialisation morphologique pour assimiler les cellules à vacuoles observées sur leur préparations à celles du "tube contourné proximal du néphron des vertébrés".

La spécialisation structurale des reins chez la Dreissène est une caractéristique retrouvée également chez les autres bivalves d'eau douce comme *A. calipygos* (Suzuki, 1986). A l'opposé, la moule marine *M. edulis* est dotée de reins comprenant un tubule central d'où partent de nombreuses branches aveugles sans spécialisation morphologique apparente. L'épithélium rénal de cette espèce selon Pirie et George

(1979) possède certaines similitudes avec celui du tubule proximal. La distance entre le néphrostome et l'orifice excréteur est très rapprochée, l'urine ne parcourt pas toute la longueur du tubule.

Au contraire des bivalves marins, les bivalves d'eau douce dont l'hémolymphe est hypertonique par rapport au milieu externe produisent une urine hypoosmotique en conservant leurs ions. Chez *Dreissena*, l'urine doit parcourir toute la longueur des tubules proximal et distal interne pour passer de la cavité péricardique au pore excréteur dans la chambre suprabranchiale. Ces mollusques possèdent des reins fonctionnellement plus efficaces pour les processus de réabsorption.

Dans ce travail nous décrivons pour la première fois l'ultrastructure des reins chez *Dreissena*. Dans le tube proximal, les cellules prismatiques dont le cytoplasme est occupé par de nombreuses mitochondries sont caractérisées par des microvillosités apicales très nombreuses formant une bordure en brosse et de hautes invaginations basales suggérant la présence d'un système de transport ionique développé. Ces caractéristiques ultrastructurales indiquent que cette portion représente, chez la Dreissène, le site principal de réabsorption de certaines molécules, d'ions ou bien d'eau composant l'urine primaire comme la montré Tiffany (1974) chez *M. campchiensis*.

La présence de particules de glycogène dans le cytoplasme des cellules proximales est également indiquée chez *M. mercenaria* (Morse, 1987) et chez *M. campchiensis* (Tiffany, 1974) qui attribue également au tube proximal une fonction de stockage du glycogène.

Les néphrocytes des branches distales externes montrent un apex à microvillosités moins nombreuses et une partie basale à invaginations moins hautes que celles des cellules proximales. Le chondriome et le système lysosomal vacuolaire sont bien développés. Ces caractéristiques morphologiques nous permettent d'assimiler le tubule distal externe à une zone de transition entre la portion proximale et la portion distale possédant des capacités de réabsorption et de sécrétion.

Les cellules du tube distal interne, peu ciliées, présentant une grande vacuole apicale sont caractéristiques de l'épithélium distal observé chez d'autres espèces de bivalves (Morse, 1987). Les différentes concrétions observées dans les vacuoles indiquent que cette zone possède des propriétés de sécrétion et d'élimination des déchets du métabolisme.



Ainsi, la confrontation des nos résultats avec des travaux déjà publiés concernant les concrétions rénales des bivalves d'eau douce est rendue difficile par la pauvreté de la littérature sur ce sujet. Les concrétions rénales ont été largement étudiées chez les bivalves marins par un grand nombre de techniques différentes, ce qui a conduit d'ailleurs à une confusion d'identification entre les concrétions d'origine lysosomale et les concrétions purement minérales formées de phosphate et de calcium. De plus, le parallèle entre des bivalves marins et des bivalves d'eau douce qui ne possèdent pas la même physiologie et qui sont soumis à des conditions environnementales différentes nous paraît délicat.

Nous avons mis en évidence dans les vacuoles des cellules du rein distal de *D. polymorpha* deux types de concrétions:

Le premier type est constitué d'un agglomérat de matériel amorphe électrodense et de débris cellulaires résultant certainement du processus continu de maturation lysosomale. La microanalyse couplée au M.E.T. et au M.E.B. montre que ces concrétions sont composées principalement de P, S et Ca accompagnés en proportion variable de Pb, Cu, Zn, Fe, Si, Mg et Mn.

Chez plusieurs espèces de bivalves marins, P et Ca existent sous forme de phosphate de calcium (Doyle *et al.*, 1978; Gold *et al.*, 1982; Sullivan *et al.*, 1988). L'excès de P est certainement, comme le suggèrent Sullivan *et al.* (1988), complexé dans des composés insolubles de phosphates de cations métalliques divalents. Nos résultats ne permettent pas d'identifier sous quelle forme se présente le phosphore. Cependant, Sullivan *et al.* (1988) ont montré, chez *M. mercenaria*, qu'il est présent essentiellement comme phosphate (PO<sub>4</sub>)<sup>3-</sup> accompagné de très faibles quantités de pyrophosphate (P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>)<sup>4-</sup> inhabituel chez les bivalves mais plutôt observé chez les gastéropodes (Pullen et Rainbow, 1991)

Le deuxième type de concrétions, dont l'histochimie a révélé la nature purique, possède une structure cristalline "étoilée" et quand il est présent il n'est jamais seul dans le milieu intravacuolaire mais coexiste avec les concrétions formées d'agglomérat de matériel de différente nature.

La présence de composés puriques, a déjà été signalée par Secchi et Martoja (1986). Ces auteurs ont également précisé chez cette espèce la présence de populations différant par leur degré d'uricotélie. Quand elles sont présentes, les concrétions, ne montrant aucune trame organique sont constituées d'acide urique et sont faiblement minéralisées.

Par contre, nos résultats montrent que dans les populations de *D. polymorpha* que nous avons étudiés, les composés puriques coexistent dans la même vacuole

cellulaire avec du matériel certainement d'origine lysosomale ainsi que des quantités variables de matériel inorganique.

Nous avons montré par microanalyse de RX que les concrétions des reins de *D. polymorpha* sont capables, en situations naturelles de piéger de nombreux métaux présents dans leur environnement, ce qui suggère, comme pour les bivalves marins, une fonction dans l'élimination des métaux lourds par l'excrétion des granules dans la lumière rénale (Hignette, 1979; Nigro *et al.*, 1992).

**QUATRIEME PARTIE:  
CONTAMINATION EXPERIMENTALE DE  
*D. polymorpha* PAR LE PLOMB ET LE ZINC,  
LOCALISATION TISSULAIRE ET CELLULAIRE  
DES METAUX**

## I. INTRODUCTION

Plusieurs bivalves marins mais aussi d'eau douce, de par leurs capacités à accumuler les métaux présents dans leur environnement à l'état de traces, sont actuellement largement utilisés comme organismes sentinelles des écosystèmes aquatiques (Mauri, 1985, Léglize et Crochard, 1987, Mersch *et al.*, 1992; Mersh, 1993). Généralement, dans les études de biomonitoring, le processus de bioaccumulation est abordé d'une manière globale par le dosage des métaux dans l'ensemble de l'organisme et très peu de travaux détaillent les mécanismes au niveau des différents organes.

La charge métallique totale d'un organisme résulte d'un équilibre entre les mécanismes de prise et d'élimination du métal, où interviennent différents systèmes d'accumulation, de stockage et de détoxification. Il nous semble donc nécessaire de combiner au dosage total des métaux l'étude de la distribution des métaux au niveau des différents compartiments de l'organisme.

Dans ce travail de recherche, les Dreissènes ont été exposées expérimentalement pendant 35 jours au plomb ou au zinc à des concentrations respectives de 400 et 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  ou 500 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Après cette contamination, seuls les individus soumis aux plus fortes concentrations ont été retenus pour les études histochimiques et microanalytiques. La localisation des métaux a été abordée à un niveau tissulaire par des techniques histochimiques et à un niveau cellulaire par des techniques de microanalyse de RX couplées au M. E. T. ou au M. E. B.

La distribution et les associations des différents éléments métalliques ont été effectuées au niveau des reins à l'aide d'images X.

## II. CONCENTRATION DES METAUX DANS LES DREISSENES

Afin de contrôler la bioaccumulation des métaux chez les Dreissènes pendant l'expérience de contamination, la charge totale des individus est mesurée par spectrométrie d'absorption atomique.

Les concentrations des métaux ont été mesurées dans les parties molles des Dreissènes témoins ou exposées pendant 35 jours à 400 (A) et 800 (B)  $\mu\text{g L}^{-1}$  de plomb ou à 500 (C) et 1000 (D)  $\mu\text{g L}^{-1}$  de zinc. Les dosages ont été effectués sur 2 lots de 8 individus, les résultats sont reportés dans le tableau IX.

	Concentration en Pb dans les parties molles	I. C	Concentration en Zn dans les parties molles	I.C
Témoin	1.02		187.8 +/- 22.91	
A	1041 +/- 436.9	1020	-	
B	2901 +/- 428.5	2901	-	
C	-		735.3 +/- 53.8	3.91
D	-		1277.4 +/- 43.27	6.8

Tableau IX. Concentrations métalliques ( $\mu\text{g/g}$  de poids sec) dans les parties molles de *D. polymorpha* exposée au plomb et au zinc. L'indice de contamination (I.C) est calculé selon la formule:  $I. C. = C_d / C_i$  ( $C_d$  est la concentration de métal dans les Dreissènes,  $C_i$  est la concentration initiale).

### III. LOCALISATION HISTOLOGIQUE DES METAUX

Après plus d'un mois de contamination par le plomb et le zinc, les Dreissènes ne présentent pas d'altérations tissulaires apparentes en microscopie optique.

#### 1. LOCALISATION DU PLOMB

Le plomb est mis en évidence dans les tissus par la réaction au chromate de potassium, basée sur la conversion des sels de plomb en chromate de plomb qui prennent une coloration jaune.

Le cytoplasme des hémocytes granuleux contient des granules jaunes de chromate de Pb. Le système circulatoire des bivalves étant ouvert, on observe des granulocytes chargés en métal au niveau de tous les organes. Ils infiltrent l'épithélium sous palléal et bordent les tubules de la glande digestive ou de la gonade ainsi que les épithéliums du tube digestif ou des reins. Les granulocytes sont particulièrement nombreux au niveau des branchies où ils contiennent plus ou moins de granules de plomb (PL. XXXVII, fig. 1). Certaines cellules sont tellement chargées en métal que plus aucune structure n'est reconnaissable (PL. XXXVII, fig. 2). Par ailleurs, quelques granulocytes ont infiltré l'épithélium branchial et sont en contact direct avec le milieu externe (PL. XXXVII, fig. 3). Nous ne pouvons dire si ces hémocytes, dans cette situation sont, soit prêts à quitter l'organisme par cette voie, soit prêts à capturer le métal présent dans le milieu.

Après 35 jours de contamination, c'est les reins qui montrent la plus forte charge en métal (PL. XXXVIII, PL. XXXIX). Le plomb est présent dans la lumière des tubules rénaux proximaux et distaux externes (PL. XXXVIII, fig. 1 à 4) sous forme de granules isolés ou regroupés en amas. Au niveau du tubule distal interne, le métal est localisé dans les grandes vacuoles apicales (PL. XXXIX, fig. 2 et 3).

Par ailleurs, aucune trace de plomb n'est observable dans les podocytes des glandes péricardiales.

## **2. LOCALISATION DU ZINC**

Le zinc est révélé par différentes techniques histochimiques utilisant comme réactif soit le zincon, soit la dithizone. Les observations histologiques montrent que le métal est mis en évidence uniquement par la réaction combinant la dithizone et le DMSO au niveau de l'épithélium branchial. Le zinc est alors localisé d'une manière diffuse dans les cellules à l'apex des filaments branchiaux (PL. XL, fig. 1).

## **IV. LOCALISATION CELLULAIRE DES METAUX**

Dans le cadre de ce travail, la localisation des métaux par microanalyse de RX a été abordée dans les hémocytes ainsi que dans les cellules épithéliales des organes du système excréteur, les glandes péricardiales et les reins.

### **1. LOCALISATION DE PLOMB**

#### **1. 1. DANS LES HEMOCYTES**

La microanalyse de RX couplée aux deux types de microscopes électroniques a été utilisée.

Dans le cas du M. E. B., les hémocytes ponctionnés chez les Dreissènes contaminées sont directement posés sur le support et ne subissent pas de fixation chimique mais sont conservés simplement par dessiccation. Cette technique à l'avantage d'être simple et de respecter très correctement la distribution des éléments dans les structures comme le fait la fixation par congélation (Keller *et al.*, 1992) qui

nécessite, par ailleurs, un matériel important dont nous ne disposons pas au laboratoire.

L'analyse combinée au M. E. B. permet d'obtenir un spectre d'éléments mais ne permet pas une identification des structures intracellulaires concernées.

Les résultats ont été obtenus à partir de l'analyse de 25 spectres sur les cellules provenant des individus de contrôle et de 15 spectres sur les hémocytes issus des individus contaminés.

Nous notons, dans les hémocytes des Dreissènes de contrôle, la présence principalement de P, Ca, S, associés en moindre proportion ou occasionnellement à Fe, Mg, Zn, Cu, Al, Si et Pb (figure 23 A).

Nous retrouvons ces éléments au niveau des hémocytes provenant de Dreissènes exposées au plomb, avec cependant, une proportion de plomb nettement accrue (figure 23 B).

La microanalyse couplée au M. E. T. permet de faire correspondre l'analyse des éléments à l'ultrastructure des organites cellulaires impliqués.

Une soixantaine d'analyses ont été réalisées dans les hémocytes de Dreissènes exposées au plomb. Plusieurs spectres sont obtenus dans la même cellule au niveau de différents granules.

Le plomb est localisé dans la matrice des granules cytoplasmiques des granulocytes (PL. XLI, fig. 1 et 2). Le métal est présent aussi bien au niveau de granules très denses aux électrons qu'au niveau de granules typiques à matrice moyennement dense aux électrons. On retrouve la même distribution d'éléments dans les deux types de techniques. En effet, il est associé à P et Ca accompagnés, comme chez les individus témoins, par S, Cu, Zn, Fe, Si et Mn.

Nous avons déjà noté la présence occasionnelle de plomb dans la matrice granulaire des granulocytes chez les individus de contrôle. Chez les individus contaminés, la détection du métal est plus fréquente et sa proportion plus élevée.

Par ailleurs, le plomb peut être totalement absent de la matrice de certains granules ou montrer des proportions identiques à celles des hémocytes des individus de contrôle. Cette variation de détection du métal est certainement à mettre en relation avec les différences d'états fonctionnels des granulations cytoplasmiques des granulocytes.

Le métal est localisé aussi bien dans les granulocytes circulants qui ont été ponctionnés dans le sinus du muscle adducteur que dans les cellules mobilisées au niveau des organes d'excrétion comme les reins. La présence du métal est plus fréquente dans les cellules infiltrées à la base des tubules rénaux. En effet, sur 17

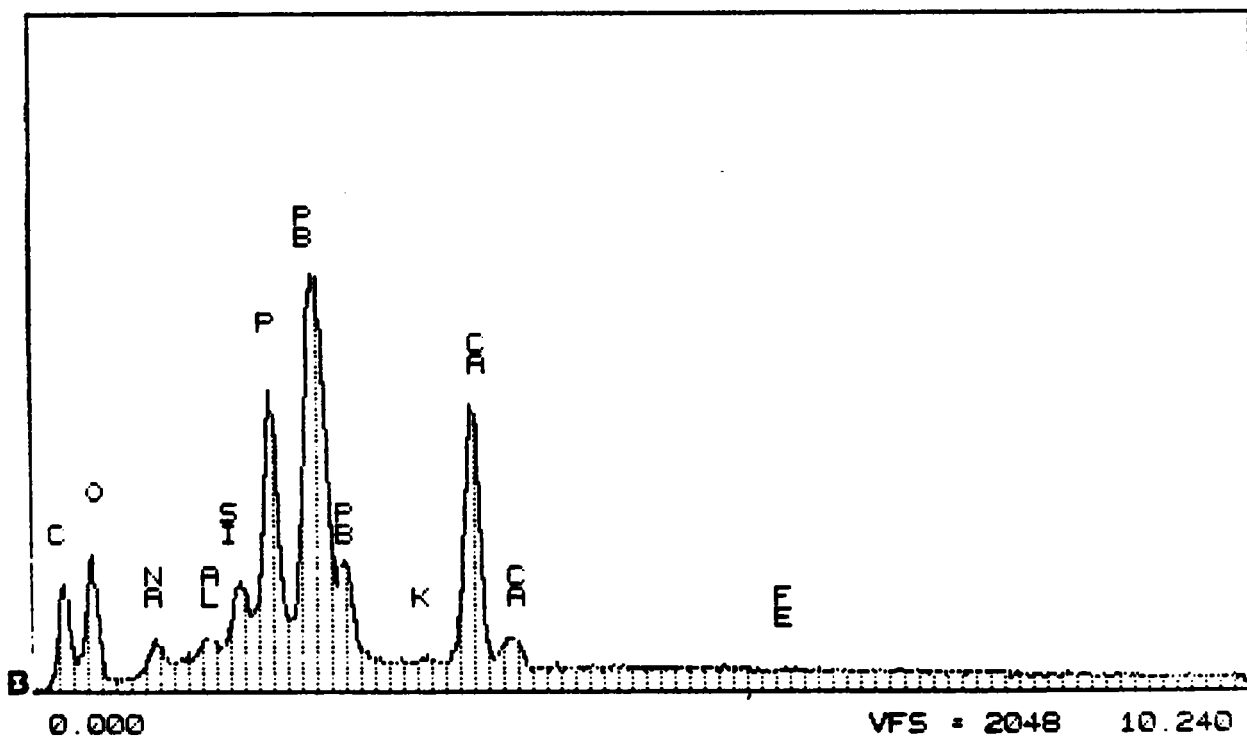
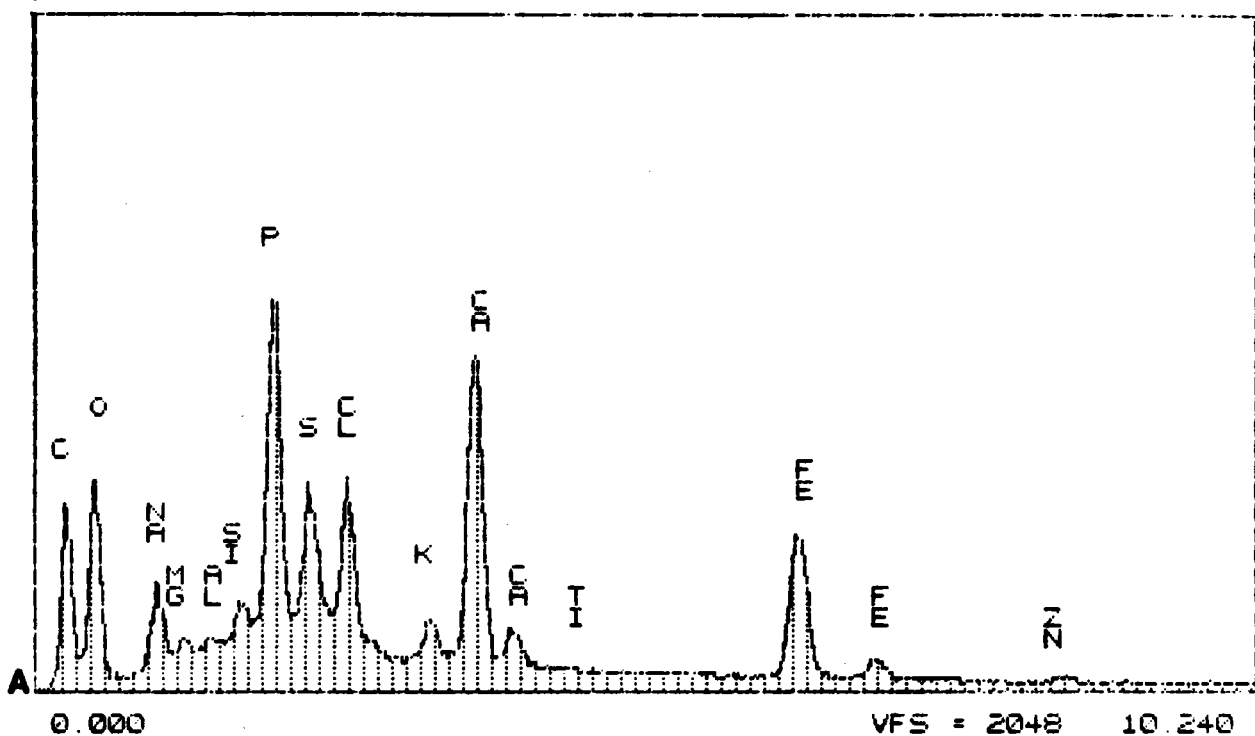


Figure 23. Spectre typique de microanalyse de RX dans les hémocytes de *D. polymorpha* (A) de contrôle B) exposé au plomb



spectres que nous avons réalisé dans ces hémocytes, 13 indiquaient sa présence. A ce niveau, on observe la présence de granulocyte typique mais aussi de granulocytes qui présentent un stade de maturation âgé. Leur cytoplasme contient en effet des corps résiduels, et de nombreuses granulations très denses aux électrons (PL. XLII, fig. 1).

Ces cellules sont également observables parmi les cellules circulantes. Leur ultrastructure n'est plus toujours respectée. En effet, fragilisés par leur surcharge métallique, ces hémocytes ont pu être endommagés pendant une des phases de préparation. La membrane cytoplasmique n'est plus visible, seuls le noyau et le cytoplasme sont observables. On peut noter toutefois que le cytoplasme contient des corps résiduels chargés de matériel granuleux très dense aux électrons. Certains granules possèdent un contenu complètement opaque aux électrons. L'analyse de ces structures montre de très fortes proportions de plomb (PL. XLII, fig. 2).

L'analyse de la matrice des granules cytoplasmiques de petite taille des hyalinocytes n'a pas mis de plomb en évidence.

## 1. 2. DANS LES PODOCYTES DES GLANDES PERICARDIALES

Une vingtaine de spectres ont été obtenus par microanalyse de RX couplée au M.E.B. à partir des glandes péricardiales d'individus de contrôle et exposés au plomb. Dans ce cas également, les tissus sont conservés uniquement par dessiccation.

L'hétérogénéité des différentes distributions d'éléments ne permet pas de mettre clairement en évidence le plomb au niveau des podocytes. En effet dans les glandes péricardiales des Dreissènes contaminées, certaines analyses montrent la présence du métal dont la fréquence et la proportion ne sont pas beaucoup différentes de celles observées dans ces organes témoins.

Quand le métal est présent, il est associé principalement à P et S et en moindre proportion à Ca, Fe, Mg, Si, Al, Cu et Zn.

La microanalyse de RX combinée au M. E. T. permet la localisation du métal à l'échelle ultrastructurale. Environ vingt spectres ont été réalisés au niveau des podocytes des glandes péricardiales de Dreissènes contaminées et témoins.

Les analyses ont permis de localiser le plomb principalement au niveau de la matrice des granules cytoplasmiques dans les podocytes (PL. XLIII, fig. 1 et 2).

Alors que le métal est détecté ponctuellement dans les granules cytoplasmiques des podocytes des individus de contrôle, il est mis en évidence dans presque toutes les analyses chez les individus contaminés. Dans ce cas, le plomb est associé principalement avec des éléments tels P, S et Ca accompagnés en moindre proportion ou occasionnellement par Cu, Zn, Fe et Mn. Cette distribution est donc identique à celle observée dans les analyses couplées au M. E. B. qui ne permettait pas la localisation des éléments.

### 1. 3. DANS LES CELLULES RENALES

Nous avons montré précédemment la présence de granules dans les vacuoles apicales des cellules du tubule distal interne. Elles sont composées en majorité par P, S et Ca associé en moindre proportion ou rarement à Pb, Fe, Si, Cu, Zn, Mn et Mg. Les 30 spectres réalisés au niveau des granules rénaux des Dreissènes exposées au plomb pendant 35 jours indiquent la même distribution des éléments avec cependant une charge nettement supérieure en plomb (PL. XLIV, Figure 1). Les granules intravacuolaires constitués de matériel de diverse nature sont très denses aux électrons. Le plomb forme de petits amas totalement opaques aux électrons répartis sur l'ensemble de la concrétion (PL. XLIV, fig. 2 et 3; PL XLV, fig. 2). Il peut également s'accumuler en strates autour de la concrétion (PL XLV, fig. 1).

Les vacuoles cytoplasmiques, de petites, tailles chargées en éléments métalliques fusionnent avec la vacuole apicale des cellules du tube distal interne et y déverse son contenu (PL. XLV, fig. 2).

Les analyses de RX combinées au M. E. B. sur des tubules rénaux qui n'ont subi aucune fixation chimique et conservés par dessiccation donnent la même distribution des éléments.

L'image X réalisée sur un de ces échantillons montrent la répartition de Pb, S, Ca et P dans le tubule rénal distal interne (Figure 24). On peut noter la parfaite superposition du plomb (A) et du soufre (B) associés à de nombreux endroits au calcium (C) et au phosphore (D).

### 2. LOCALISATION DU ZINC

Chez les Dreissènes de contrôle, le zinc est détecté comme nous l'avons remarqué précédemment, au niveau des granulations cytoplasmiques dans les

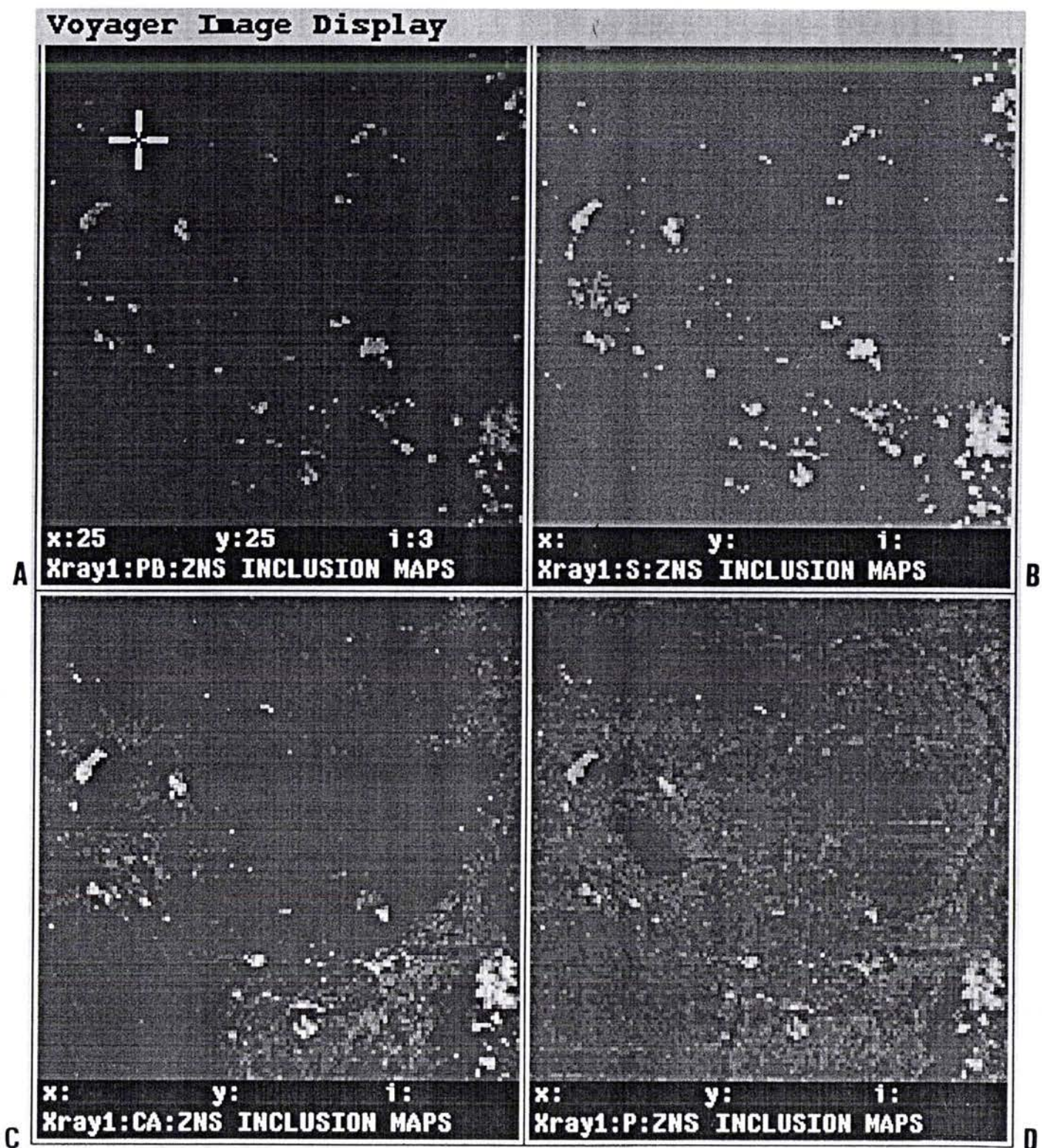


Figure 24. Image-X de l'épithélium du tube rénal distal interne chez *D. polymorpha* exposé au plomb. Répartition A) du plomb B) du soufre C) du calcium D) du phosphore

hémocytes et dans les podocytes des glandes péricardiales. Il est également mis en évidence, en association avec de nombreux autres éléments métalliques dans les granules intravacuolaires des cellules rénales.

Malgré une quarantaine d'analyses de RX en M. E. T. au niveau de l'épithélium rénal et une quinzaine au niveau des hémocytes et des podocytes chez les Dreissènes exposées à  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de zinc pendant 35 jours, nous n'avons pu mettre en évidence une augmentation nette de la proportion du métal dans ces cellules.

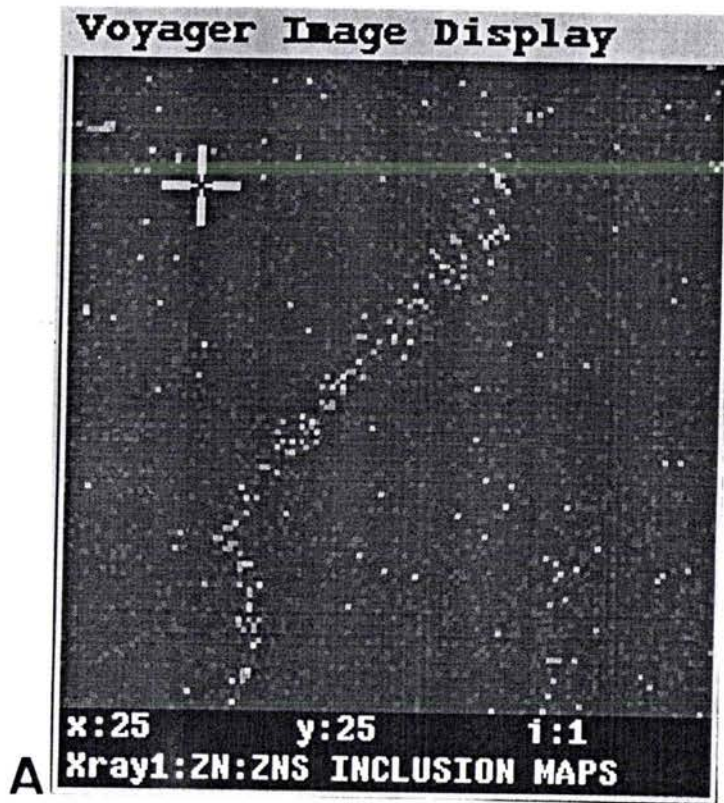
Chez les individus contaminés, la proportion de zinc correspond à celle détectée chez les individus témoins dans les différents types cellulaires, elle peut être également légèrement supérieure ou exceptionnellement élevée ne permettant donc aucune conclusion quant à une éventuelle surcharge de métal.

L'utilisation du pyroantimonate de potassium pendant la phase de fixation des tissus rénaux et péricardiques n'a pas amélioré la détection du zinc, par microanalyse RX, dans les diverses catégories de cellules. Cependant cette technique cytochimique a permis de mettre en évidence des proportions plus élevées de calcium dans les différentes structures.

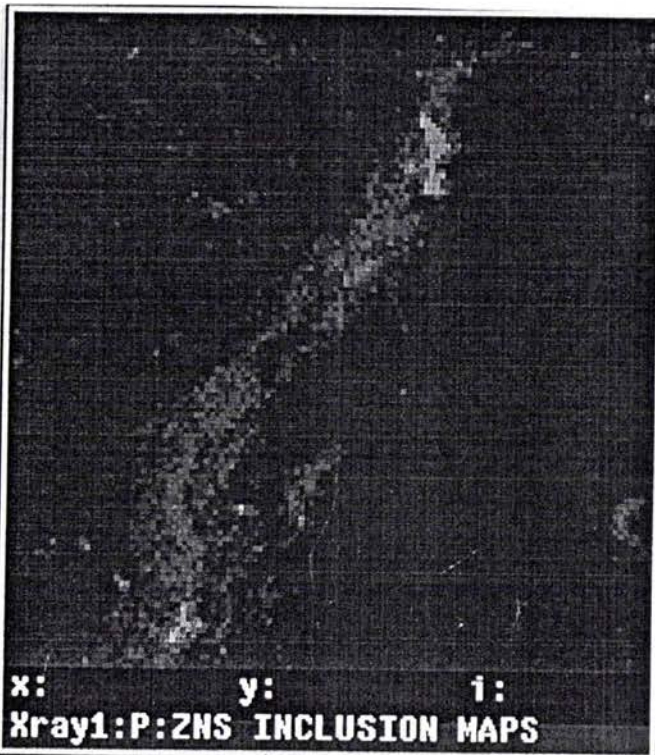
La microanalyse de RX couplée au M. E. B. n'a pas permis de révéler une surcharge de zinc au niveau des hémocytes ou des podocytes chez les Dreissènes exposées expérimentalement au métal.

Par contre, alors que le zinc est ponctuellement détecté, par cette dernière technique, au niveau du tubule rénal distal interne des Dreissènes de contrôle (il est détecté 5 fois sur 12 analyses), sa fréquence de détection est supérieure chez les individus contaminés (le métal est mis en évidence dans les 8 analyses). Les proportions de métal mesurées dans ce cas sont soit identiques aux témoins ou légèrement plus élevées.

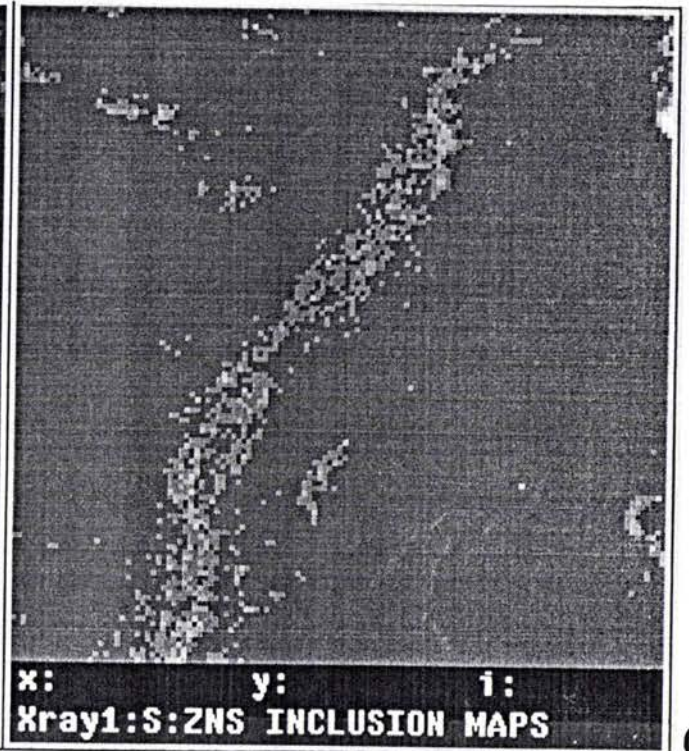
L'image X (figure 25) réalisée au niveau d'une structure rénale distal interne montre une bonne superposition des éléments P, S, Fe, Ca. La zone de répartition du zinc est plus étroite mais se superpose aux zones de distribution des autres éléments cités indiquant donc leur association.



**A**



**B**



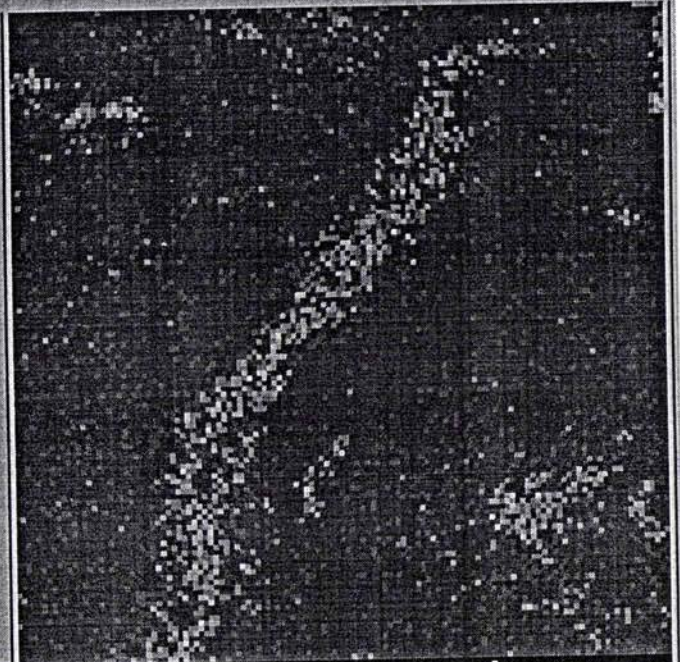
**C**

Figure 25: Image-X de l'épithélium du tube rénal distal interne chez *D. polymorpha* exposé au zinc. Répartition A) du zinc B) du phosphore C) du soufre D) du calcium E) du fer

**Voyager Image Display**



x:25      y:25      i:3  
Xray1:CA:ZNS INCLUSION MAPS



x:      y:      i:  
Xray1:FE:ZNS INCLUSION MAPS

**D**

**E**

## V. DISCUSSION

La localisation des métaux au niveau tissulaire et cellulaire permet de préciser les sites d'accumulation, et par conséquent d'appréhender les voies de transport et les voies de détoxification. L'utilisation des techniques histologiques et microanalytiques apparaît donc comme une étape indispensable à la compréhension des mécanismes d'accumulation. Ainsi les études menées au niveau du tissu et de la cellule représentent une suite logique à celles accomplies par dosage du métal total au niveau de l'organisme ou des organes (spectrométrie d'absorption atomique). En effet, en ce qui concerne la Dreissène, si plusieurs études traitant de l'accumulation de métaux au niveau de l'individu entier ont été réalisées, il n'existe à notre connaissance que très peu de recherches publiées s'attachant à préciser la localisation des métaux au sein de l'organisme.

La présence de plomb et de zinc dans les hémocytes de bivalves est un phénomène classiquement observé que ce soit par microanalyse ou histochimie. Ainsi, Coombs (1977), Schultz-Baldes (1977) et Georges (1980) ont démontré par microanalyse de RX, la présence de plomb dans les hémocytes de *M. edulis*, confrontée à des concentrations variables de plomb. Il en est de même dans les amoebocytes de *C. gigas* (Amiard *et al.* 1986).

Les amoebocytes représentent également un site important d'accumulation du zinc chez diverses espèces de bivalves marins tel que *P. maximus* (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1982), *O. edulis* (Georges, 1980), *C. gigas* (Martoja et Martin, 1985) et de *M. edulis* (George et Pirie, 1980).

Chez *D. polymorpha*, Maarouf (1988) a mis en évidence par histochimie le zinc dans les granulocytes, puis Benyahia (1991) a révélé le plomb dans les même cellules par microanalyse laser (LAMMS) et par histochimie.

Dans notre étude, nous avons pu démontrer la présence de plomb et de zinc dans les granules cytoplasmiques appartenant au système lysosomal des hémocytes granuleux, mais il n'a pas été détecté dans les hyalinocytes, ce qui vient conforter l'hypothèse d'une différence fonctionnelle dans le transport des métaux, entre ces deux types cellulaires.

Les métaux détectés dans les hémocytes sont pris en charges par ces cellules au niveau des organes de prise comme les branchies et la glande digestive.

La microanalyse a permis de démontrer la présence de plomb et de zinc dans les granules cytoplasmiques des podocytes de la glande péricaridale de *D. polymorpha*. Des observations similaires à propos du plomb sont rapportées par Amiard *et al.* (1986) dans les cellules à pores de *C. gigas*.

Si la littérature concernant ces deux métaux au niveau de la glande péricardiale est encore peu abondante, l'accumulation d'autres métaux, essentiels ou non, tel que le cadmium a été démontrée chez *M. Mercenaria* (Meyhofer *et al.*, 1983) et *D. polymorpha* (Herwig *et al.*, 1989) ainsi que l'argent chez *C. varia* (Martoja *et al.*, 1989) et le Cuivre chez *C. gigas* (Amiard *et al.*, 1986).

L'origine du plomb au niveau de la glande péricardiale est à mettre en relation avec les fonctions d'ultrafiltration de l'hémolymphe et de réabsorption de ses composés.

Dans les deux types de cellules étudiées, granulocytes et les podocytes, les organites cytoplasmiques impliqués dans le stockage, appartiennent toujours au système lysosomal.

Chez de nombreuses espèces, le rein est classiquement considéré comme étant le site principal d'accumulation du plomb et du zinc (Schultz-Baldes, 1977; Coombs et George, 1978; George, 1980; George et Pirie, 1980), mais également d'autres métaux (Carmichael *et al.*, 1980; Robinson et Ryan, 1986; Hemelraad et Herwig, 1988). Chez *D. polymorpha*, le plomb et le zinc ont été détectés dans des concrétions localisées au niveau des vacuoles apicales du tube distal interne. Par ailleurs le plomb a également été mis en évidence par histochimie dans la lumière du tubule proximal.

La localisation des métaux au niveau du rein est une conséquence de leur rejet dans la cavité péricardique après leur passage dans les glandes péricardiales.

Dans les granulocytes, les podocytes et les cellules rénales où ces métaux sont accumulés, ils coexistent toujours avec certains éléments (S, P, Ca) et occasionnellement avec de nombreux autres éléments (Fe, Al, Cu, Si, Mg).

Dans notre étude, il est important de considérer la présence occasionnelle de plomb et de zinc chez les individus témoins. Dans ces cas, les métaux détectés reflètent les conditions naturelles du milieu dans lequel les organismes ont été prélevés avant l'expérimentation en laboratoire, démontrant ainsi que l'élimination du métal et en particulier du plomb est processus lent. En effet, Benyahia (1991) a démontré que chez *D. polymorpha*, après une période de dépuración d'une durée au moins 1,5 fois plus longue que de phase de contamination ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$  durant 27 jours), la décontamination totale de l'organismes n'est jamais atteinte.

Toutefois, si l'on observe une surcharge évidente en plomb chez les organismes intoxiqués par rapport aux témoins, aucune différence n'est alors constatée en ce qui concerne le zinc, ce qui tend à démontrer clairement un contrôle cellulaire différent en



fonction du métal considéré, tel que cela à été avancé par George et Viarengo (1985) (Cf figure 11 et 12, 1<sup>ère</sup> partie).

La distribution du zinc et du plomb à l'échelle des tissus de la Dreissène et des cellules de ces tissus représente une donnée intéressante nous permettant de mieux comprendre l'organotropisme de ces métaux, les voies de détoxification et donc leurs dynamiques internes au sein de l'organisme. Cependant de nombreuses investigations complémentaires seraient utiles pour affiner notre compréhension de ces mécanismes et de leur chronologie.

Si le transport et le système excréteur ont été étudiés, il conviendra de les replacer dans un contexte plus général, comprenant notamment les organes de prise (branchie et glande digestive). Dans ce contexte, des expérimentations d'intoxication complémentaires (métaux dissous et particuliers) sont à entreprendre et la recherche de métaux chez des organismes prélevés selon des intervalles de temps très rapprochés permettront de suivre précisément l'évolution du métal considéré. L'utilisation de métaux marqués serait alors une possibilité particulièrement intéressante.

**CINQUIEME PARTIE : EFFETS DES METAUX CHEZ  
*Dreissena polymorpha*, APPROCHE  
EXPERIMENTALE PRELIMINAIRE**

# **I : EFFETS CELLULAIRES ET BIOCHIMIQUES DES METAUX**

## **1. EFFETS DES METAUX SUR LES HEMOCYTES**

### **1. 1. EFFETS DES METAUX SUR LE NOMBRE TOTAL DE CELLULES CIRCULANTES**

Les comptages du nombre total d'hémocytes chez les individus témoins et exposés aux différentes concentrations métalliques de plomb et de zinc sont reportés dans la figure 26.

Les tests statistiques de Mann-Whitney, non paramétriques, et de Student montrent que sur l'ensemble des résultats seulement 5 valeurs moyennes chez les individus contaminés sont significativement différentes des moyennes observées chez les individus témoins à divers temps de prélèvement.

Malgré le manque de significativité statistique hormis ces cinq cas, nous discuterons, quand cela sera possible, de la tendance dégagée par les différents résultats.

La première remarque générale que nous pouvons faire au sujet de nos résultats est la présence de valeurs relativement élevées pour les écart-types mettant, entre autres, en évidence une forte variabilité interindividuelle pour chaque lot de 6 individus.

Après 2 et 7 jours de contamination, les concentrations métalliques les plus faibles testées ( $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb et  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  de Zn) induisent une augmentation non significative du nombre moyen d'hémocytes, alors que les doses les plus élevées ( $800 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb et  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de Zn) semblent au contraire induire une baisse ( $P < 0.05$ ). Le phénomène effet / dose est plus marqué pour les deux métaux après 2 jours de contamination, il s'accroît seulement chez les individus exposés au zinc après 7 jours.

Après 21 jours d'exposition au plomb, la tendance observée précédemment s'accroît et les moyennes des taux d'hémocytes chez les Dreissènes contaminées sont significativement différentes de celle observée chez les témoins ( $P < 0.05$ ) avec un effet inverse selon la concentration: augmentation en présence de  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  et diminution en présence de  $800 \mu\text{g L}^{-1}$ .

A partir de 28 jours d'expérience le nombre moyen d'hémocytes chez les individus contaminés a tendance à augmenter. Cette tendance se confirme à la fin de l'expérience de contamination, avec une différence significative en présence de  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de Zn ( $P < 0.1$ ).

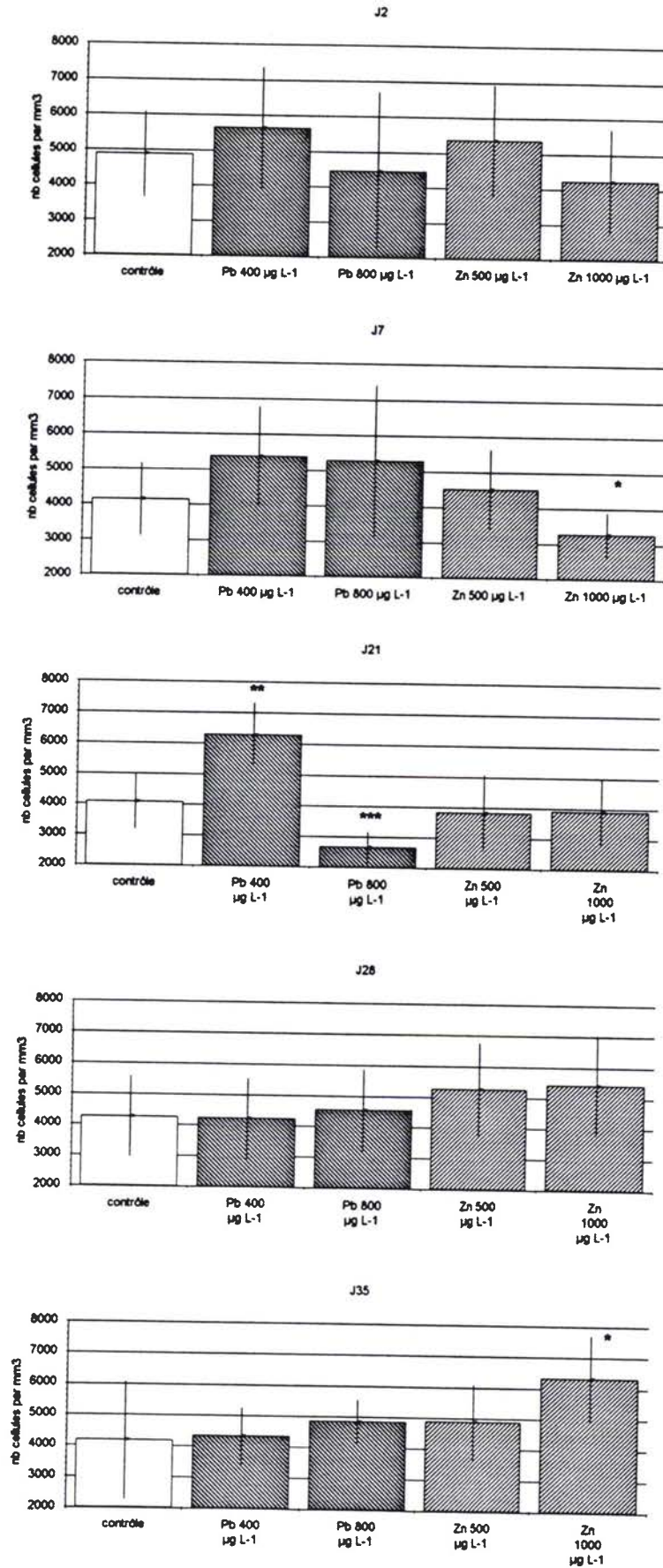


Figure 26. Nombre d'hémocytes chez *D. polymorpha* (n = 6) exposée au plomb et au zinc. Evolution en fonction de la concentration de métal et du temps. (Test de Student, test de Mann et Whitney, \* P < 0.05, \*\* P < 0.02, \*\*\* P < 0.01).

La figure 26 montre la stabilité du nombre moyen d'hémocytes chez les individus témoins tout au long de ces 35 jours d'expérience. Ce taux moyen peut varier de 4083 à 4885 cellules / mm<sup>3</sup>.

Le plomb, à la plus faible concentration testée semble induire, jusqu'à 21 jours d'expérience une tendance progressive à l'augmentation des hémocytes qui ne persiste pas après 28 et 35 jours. Une tendance identique est produite par la plus forte concentration en fin d'expérience, à 28 et 35 jours.

Le zinc, à la plus faible concentration testée tend à accroître le nombre d'hémocytes en début et en fin d'expérience, la tendance s'inverse au jour 21. La plus forte concentration de ce métal tend à baisser le nombre de cellules jusqu'à 7 jours de contamination, alors que la tendance s'inverse à 28 et 35 jours, où la différence devient significative.

## 1. 2. EFFETS DE LA CONTAMINATION METALLIQUE SUR LES CAPACITES PHAGOCYTAIRES DES HEMOCYTES

### 1. 2. 1. Effets des métaux *in vivo*

L'effet du plomb et du zinc sur les capacités de phagocytose de *D. polymorpha* a été évalué après une exposition des Dreissènes à des concentrations de 400 et 800 µg. L<sup>-1</sup> de Pb et de 500 et 1000 µg. L<sup>-1</sup> de Zn. Les prélèvements ont été effectués dans cette étude seulement après 7, 22 et 35 jours de contamination.

Les résultats concernant les indices de phagocytose sont reportés sur la figure 27.

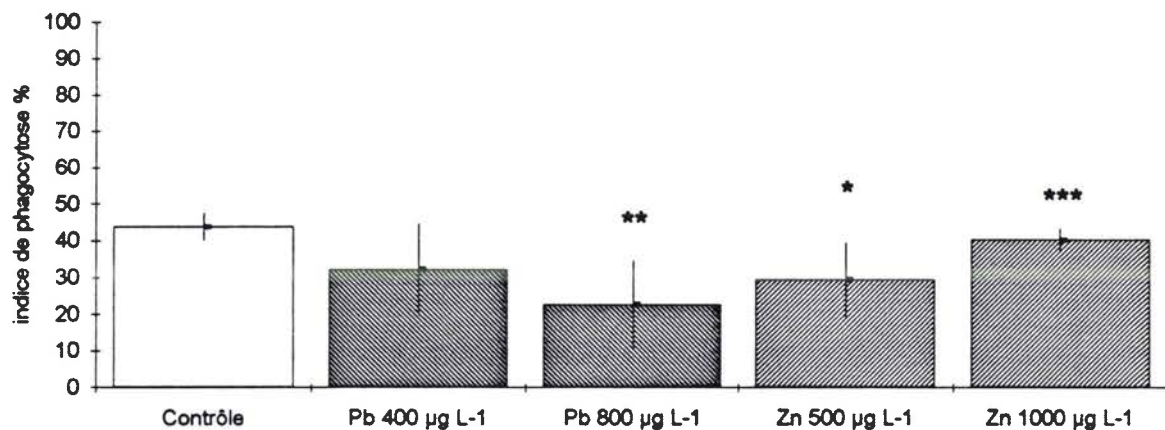
La même remarque que précédemment concernant une faible significativité statistique peut être avancée. Cependant certaines tendances peuvent être dégagées.

Après 7 jours d'expérience, la contamination par les métaux tend à entraîner une baisse des capacités de phagocytose par les hémocytes quelque soit le métal. L'effet est plus marqué pour les plus hautes concentrations métalliques et celui du zinc à 1000 µg. L<sup>-1</sup> est particulièrement marqué ( $P < 0.001$ ).

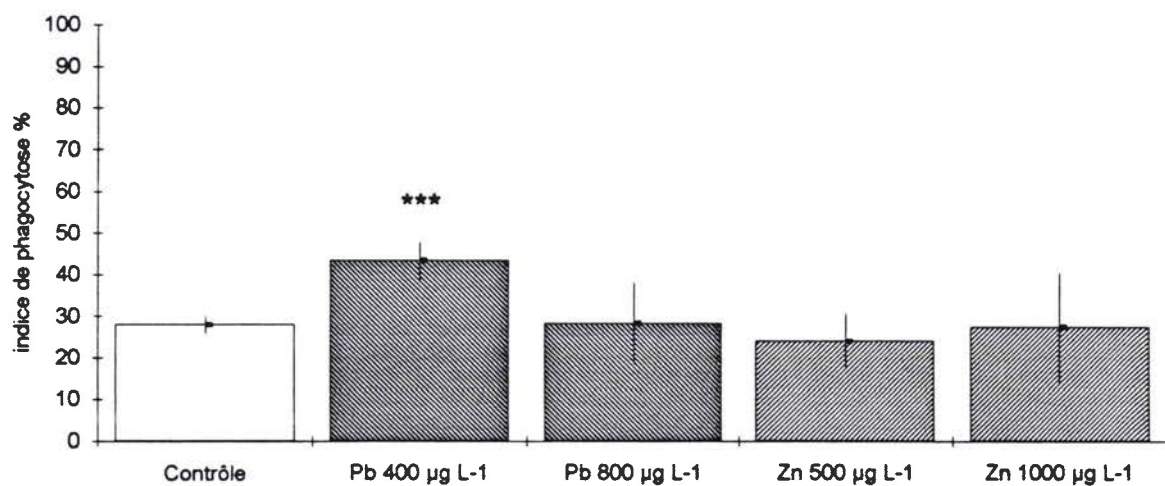
Après 22 jours, on observe un indice de phagocytose plus élevé chez les individus soumis à 400 µg. L<sup>-1</sup> de Pb ( $P < 0.001$ ).

Les valeurs moyennes du nombre de cellules capables de phagocytose chez les individus exposés aux autres concentrations métalliques sont proches ou légèrement inférieures à celles des témoins, sans être significativement différentes.

J7



J22



J35

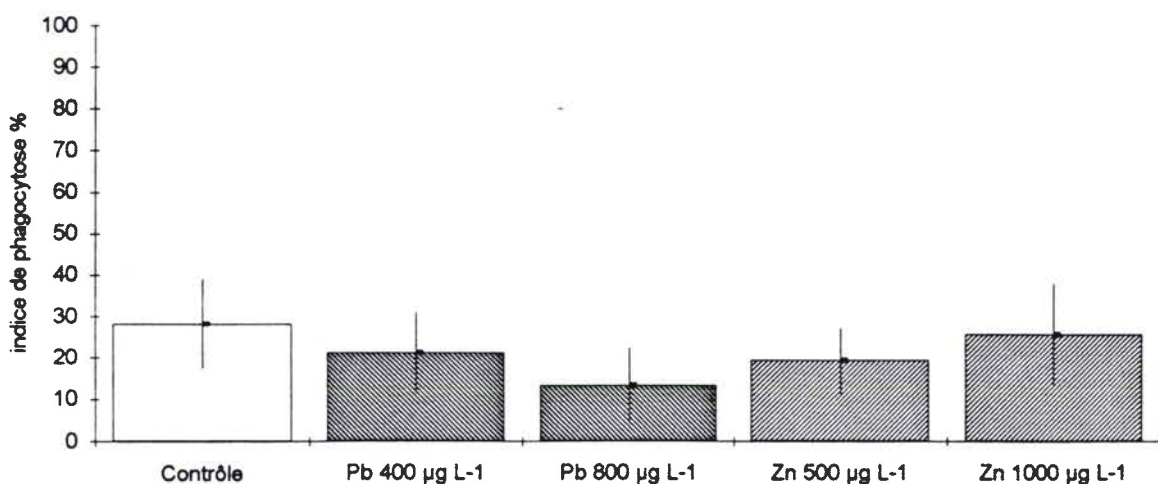


Figure 27. Effets des métaux *in vivo* sur les capacités phagocytaires de *D. polymorpha* (n = 4). Pourcentage des hémocytes ayant au moins adhéré une bille de latex. Evolution en fonction de la concentration de métal et du temps. (Test de Student, test de Mann et Whitney, \* P < 0.05, \*\* P < 0.02, \*\*\*\* P < 0.001).

En fin d'expérience, après 35 jours, les capacités de phagocytose des Dreissènes soumises aux contaminations métalliques restent inférieures à celles des contrôles, sans différences significative du fait d'une grande variabilité interindividuelle. En comparant ces résultats, à 35 jours, avec ceux de la numération cellulaire on observe une tendance un accroissement du nombre d'hémocytes avec des capacités de phagocytose réduites.

### 1. 2. 2. Effets des métaux *in vitro*

La capacité phagocytaire des hémocytes soumis *in vitro* pendant 2 heures à des concentrations subléthales de  $Pb^{++}$ ,  $Zn^{++}$  a été mesurée chez *D. polymorpha*, les résultats sont exposés sur la figure 28.

Des concentrations de 1 et 6  $mg. L^{-1}$  de Pb et de Zn ont tendance à réduire les capacités de phagocytose des hémocytes. Seuls les effets observés pour les concentrations les plus faibles en Zn sont significativement différents du contrôle.

Les deux tests de phagocytose réalisés mettent en évidence que le zinc à une concentration de 1000  $\mu g. L^{-1}$  induit des effets identiques sous des conditions expérimentales *in vivo* ou *in vitro*, à savoir une diminution des capacités phagocytaires des hémocytes.

## 2. IMPACT DES METAUX SUR LES PRINCIPALES ENZYMES LYSOSOMALES

### 2. 1. EVALUATION CYTOCHIMIQUE

L'effet du plomb, métal non essentiel, et du zinc, métal essentiel, sur le système lysosomal des hémocytes est évalué par des méthodes cytochimiques sur des frottis d'hémolymph. Les phosphatases acides et les  $\beta$  glucuronidases sont appréciées d'une manière semi quantitative dans les hémocytes de Dreissènes soumises à des concentrations métalliques de 400 et 800  $\mu g L^{-1}$  de Pb et de 500 et 1000  $\mu g L^{-1}$  de Zn après 7, 21 et 35 jours d'expérience.

#### 2. 1. 1. Evaluation des phosphatases acides

La quantité de granules cytoplasmiques présentant une activité phosphatasique acide est évaluée dans chaque cellule (200 sont comptées) et quatre classes (classe 1: 0-25 % de granules positifs, classe 2: 25-50 %, classe 3: 50-75 %, classe 4: 75-

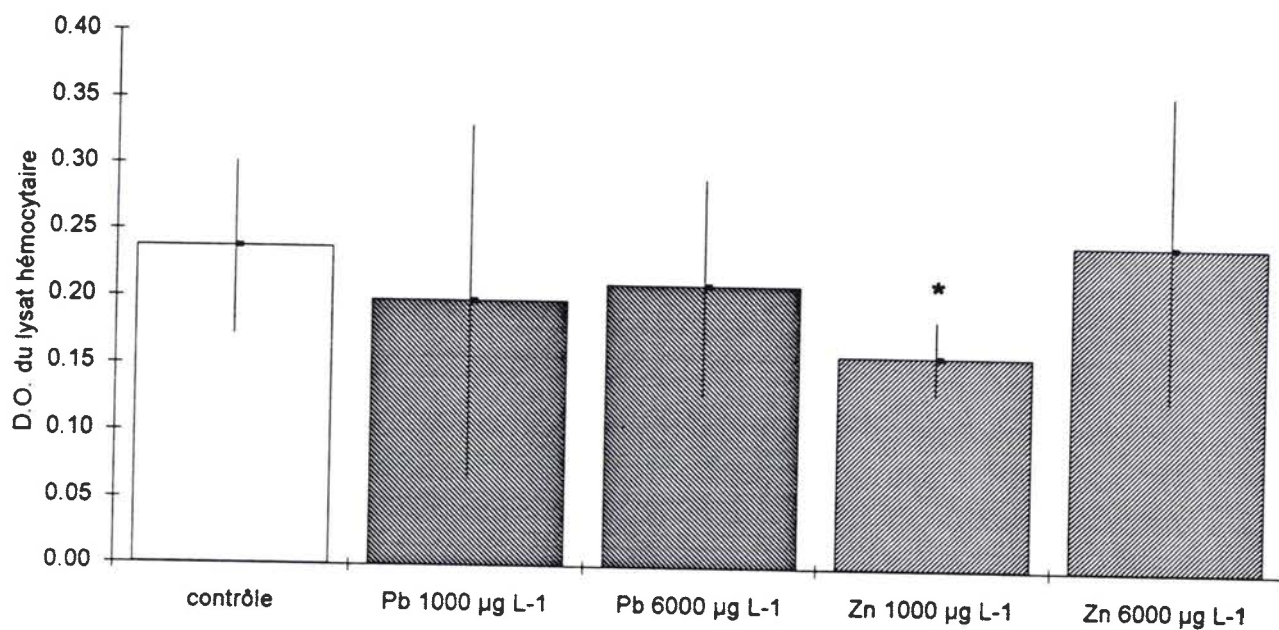


Figure 28. Effets des métaux *in vitro* sur les capacités phagocytaires de *D. polymorpha* (n = 4). Densité optique du lysat hémocytaire. (Test de Student, test de Mann et Whitney, \* P < 0.05).



100%) sont ainsi définies arbitrairement. Les résultats concernant le pourcentage de chaque classe chez les individus de contrôle et soumis aux contaminations métalliques sont indiqués sur la figure 29.

Pour les trois périodes (7, 21 et 35 jours) de prélèvement on observe une baisse, le plus souvent significative, du pourcentage de la classe 1 au profit des classes 3 et 4.

Ce phénomène est particulièrement accentué dans la population hémocytaire des individus exposés aux plus faibles concentrations de Pb et de Zn testées, après 7 jours d'expérience. Cette prédominance de la classe 4 ne se prolonge pas d'une façon aussi marquée après 21 ou 35 jours de contamination.

Le pourcentage de la classe 2 chez les individus soumis aux contaminations métalliques varie très peu par rapport à celui observé chez les individus témoins. C'est donc la classe 1 qui est particulièrement influencée à la baisse au profit des classes 3 et 4.

#### 2. 1. 2. Evaluation des $\beta$ glucuronidases

Le nombre de cellules présentant une activité pour les  $\beta$  glucuronidases relativement faible dans l'ensemble de la population hémocytaire, nous avons donc choisi de mesurer d'éventuelles variations en ne considérant que le nombre d'hémocytes positifs parmi 1000 cellules observées chez les Dreissènes de contrôle ou exposées aux métaux. Les résultats sont donnés dans la figure 30.

Alors qu'en présence de  $400 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb il n'y a pas d'action significative, l'exposition à  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb entraîne après 7 jours une augmentation significative ( $P < 0.02$ ) du nombre de cellules contenant cette enzyme. Ce processus persiste après 21 et 35 jours d'expérience.

L'exposition à la plus basse concentration de zinc de  $500 \mu\text{g L}^{-1}$  ne produit le même phénomène qu'à partir de 21 jours de contamination ( $P < 0.01$ ). La plus forte concentration de zinc induit une baisse à 21 jours ( $P < 0.001$ ), puis une faible augmentation du nombre de cellules positives, après 35 jours ( $P < 0.05$ ).

#### 2. 2. MESURE QUANTITATIVE DE L'ACTIVITE DES PHOSPHATASES ACIDES

Des mesures quantitatives de l'activité des phosphatases acides ont été réalisées sur les deux fractions de l'hémolymphe (culot cellulaire et sérum) chez des Dreissènes exposées à  $400$  et  $800 \mu\text{g L}^{-1}$  de Pb et à  $500$  et  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$  de Zn

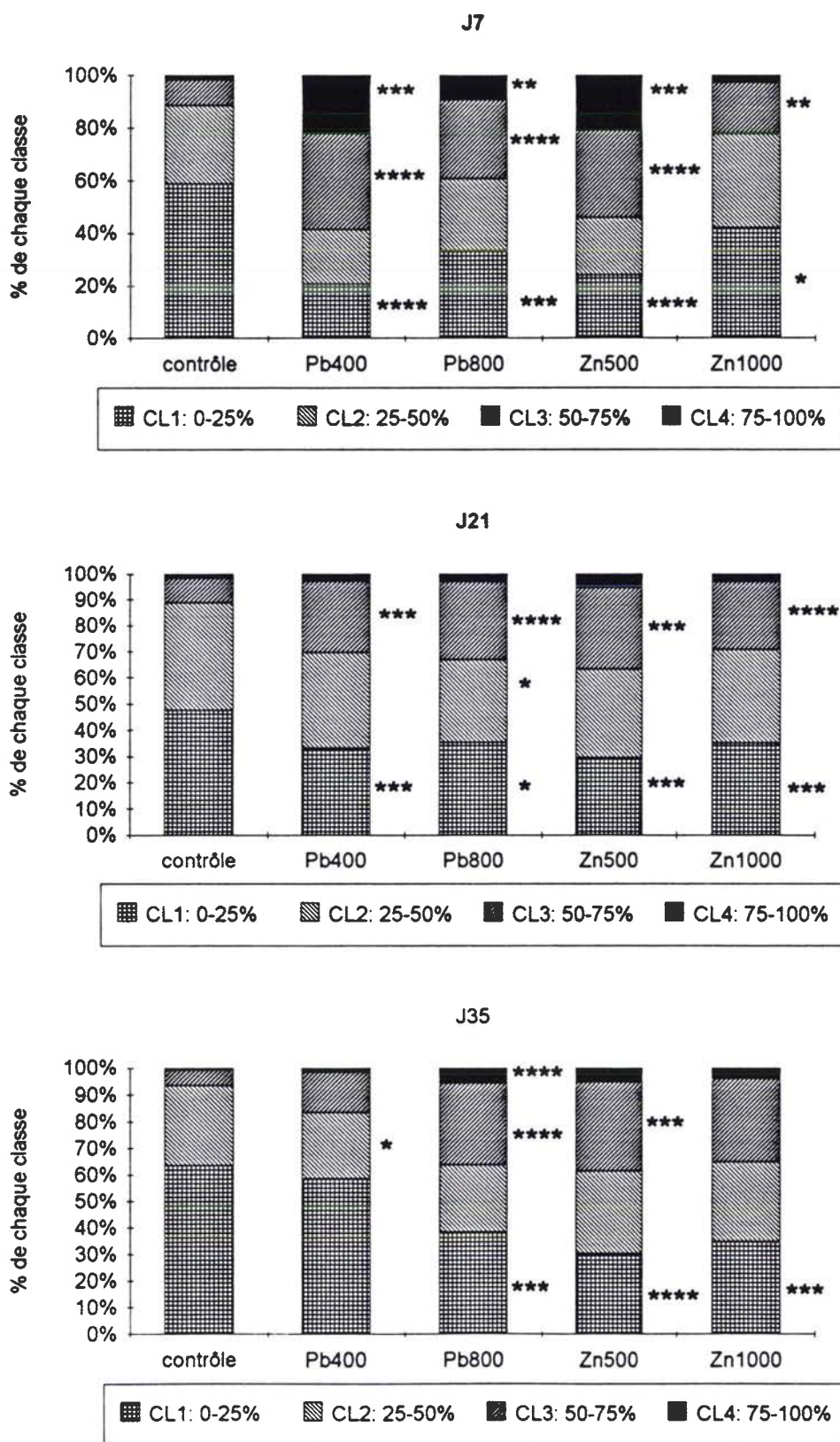


Figure 29. Répartition des différentes classes d'abondance des phosphatases acides dans les hémocytes de *D. polymorpha* (n = 4) exposée au plomb et au zinc. Evolution en fonction de la concentration de métal et du temps. (Test de Student, test de Mann et Whitney, \* P < 0.05, \*\* P < 0.02, \*\*\* P < 0.01, \*\*\*\* P < 0.001).

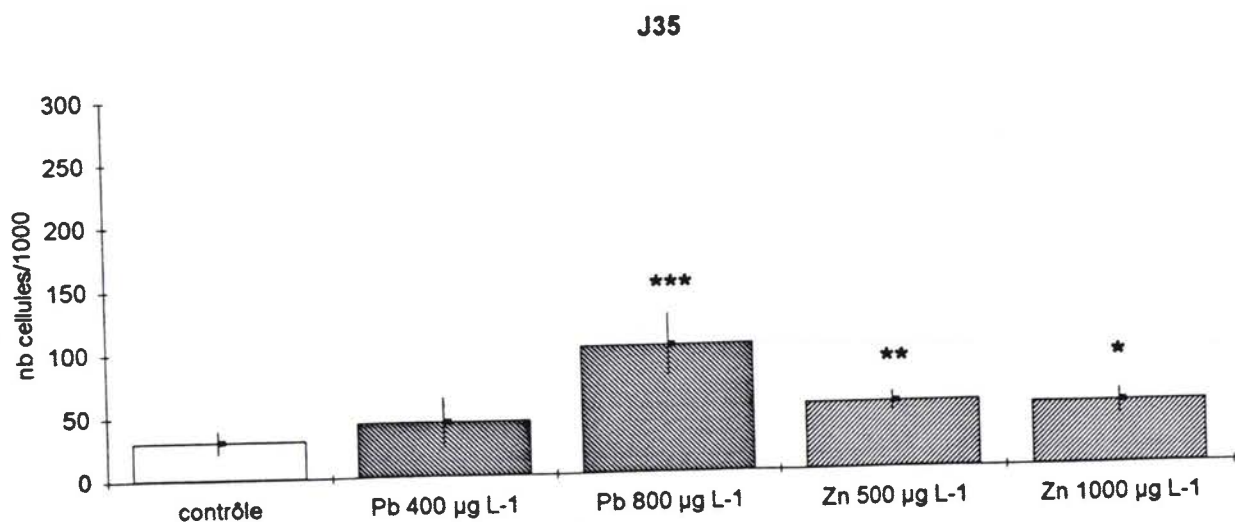
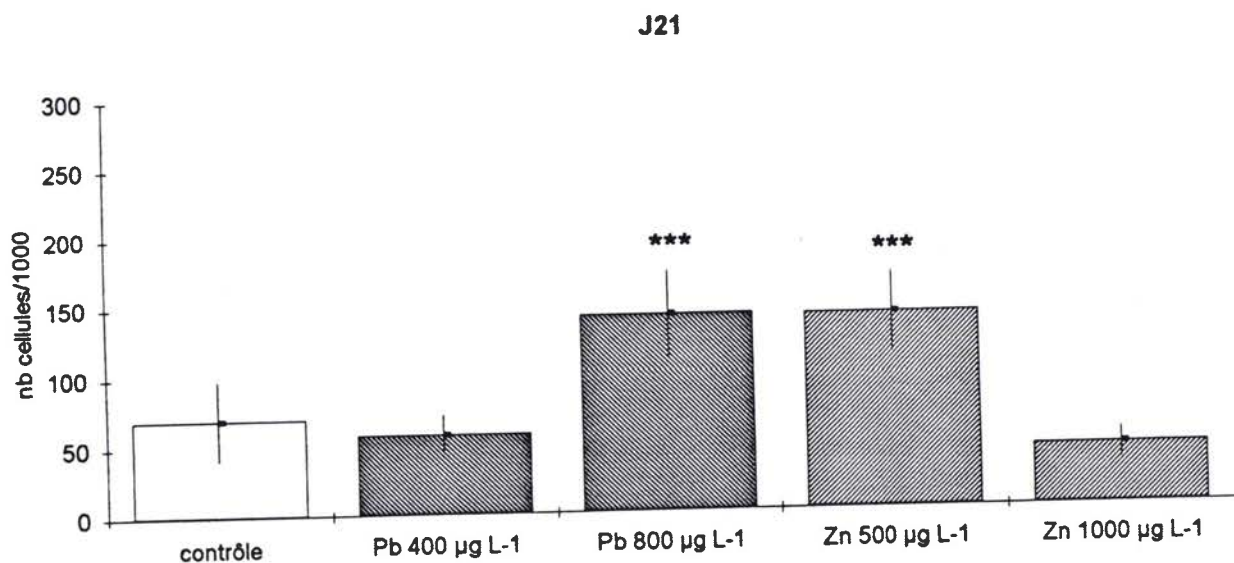
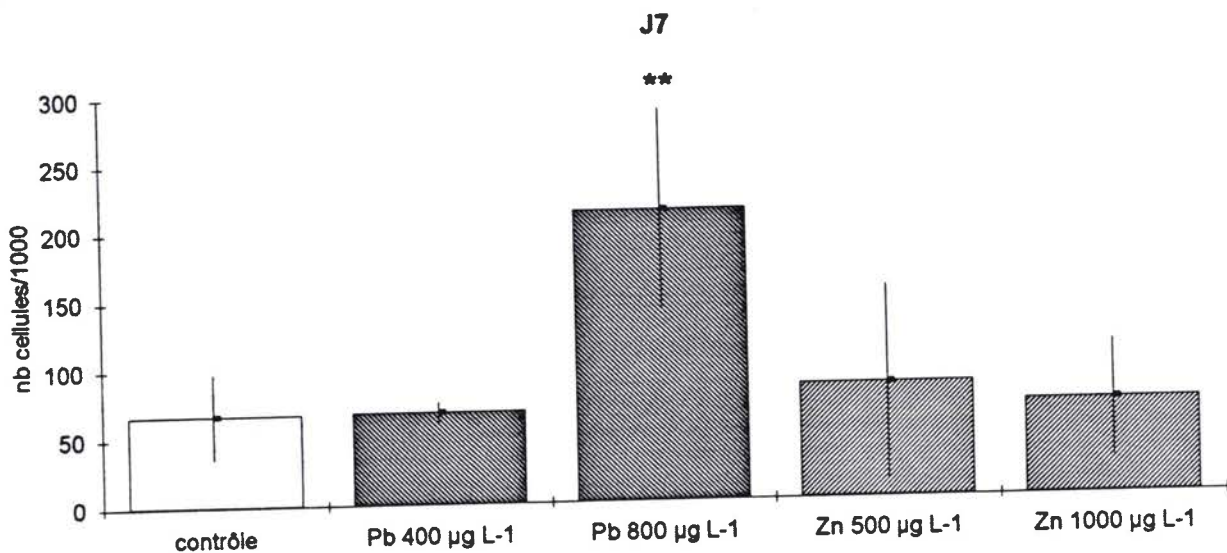


Figure 30. Taux d'hémocytes (1000 cellules comptées) montrant une activité pour les  $\beta$  glucuronidases chez *D. polymorpha* ( $n = 4$  ou  $n = 5$ ) exposée au plomb et au zinc. Evolution en fonction de la concentration de métal et du temps. (Test de Student, test de Mann et Whitney, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.02$ , \*\*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.001$ ).

pendant 35 jours, de façon à déceler une éventuelle sortie d'enzyme dans le compartiment extracellulaire. A chaque prélèvement, les dosages ont été réalisés sur 5 pools de culots et de sérums provenant chacun de l'hémolymphe de 5 Dreissènes. Les résultats sont donnés dans les figures 31 et 32.

Pour tous les temps de prélèvements, les dosages des phosphatases acides dans les culots cellulaires ou dans les sérums des individus exposés aux métaux ne montrent pas de différences significatives avec les dosages réalisés chez les individus de contrôle. De plus, aucune tendance ne peut être dégagée de ces résultats.

Nous avons vérifié par des essais d'inhibition *in vitro* que le plomb (10, 50, 100, 500 et 2500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) et le zinc (100, 500, 1000 et 2500  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) n'inhibaient pas les activités enzymatiques dans le sérum ( figure 33.)

## II. DISCUSSION

Le but de notre étude était d'identifier des réponses de stress chez *D. polymorpha* soumises à des contaminations par les métaux dans des conditions expérimentales du laboratoire.

En effet, chez les bivalves, les hémocytes qui sont présents au niveau de tous les tissus de l'organisme et qui participent activement aux mécanismes de défense interne constituent un indicateur de stress représentatif de l'individu. Ils ont d'ailleurs été utilisés dans ce sens par Fisher *et al.* (1990) et par Hansen (1992) pour évaluer l'impact de la contamination par les micropolluants organiques.

Les variations de la population hémocytaire et de ses capacités physiologiques ainsi que les réponses du système lysosomal des cellules nous semblent des indices de stress valables.

Les indices, une fois identifiés au laboratoire pourrait être utilisés *in situ* afin d'évaluer l'impact sur les organismes de la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds.

Dans une première approche, nous avons donc évalué l'effet des métaux sur le nombre total de ces cellules. Notre étude a été réalisée sur un temps suffisamment long (35 jours) pour évaluer un effet de toxicité chronique.

Les concentrations métalliques que nous avons testé dans cette étude, soit 400 et 800  $\mu\text{g L}^{-1}$  de plomb et 500 et 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  de zinc sont largement supérieures à celles rencontrées dans l'environnement mais sont nettement inférieures aux CL 50

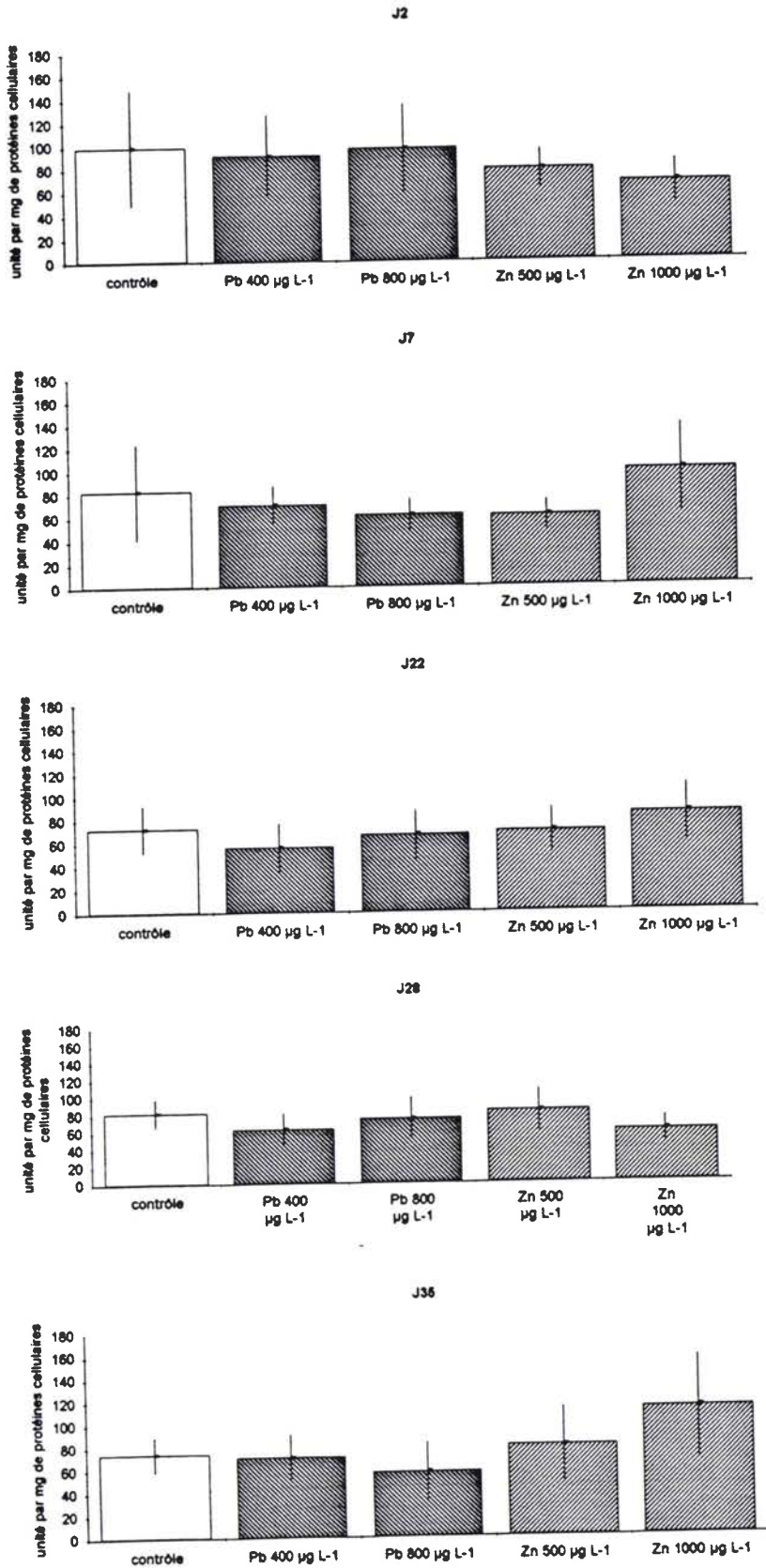


Figure 31. Activité spécifique des phosphatases acides dans les hémocytes (pools de culots cellulaires, n = 5) de *D. polymorpha* exposée au plomb et au zinc. Evolution en fonction de la concentration de métal et du temps.

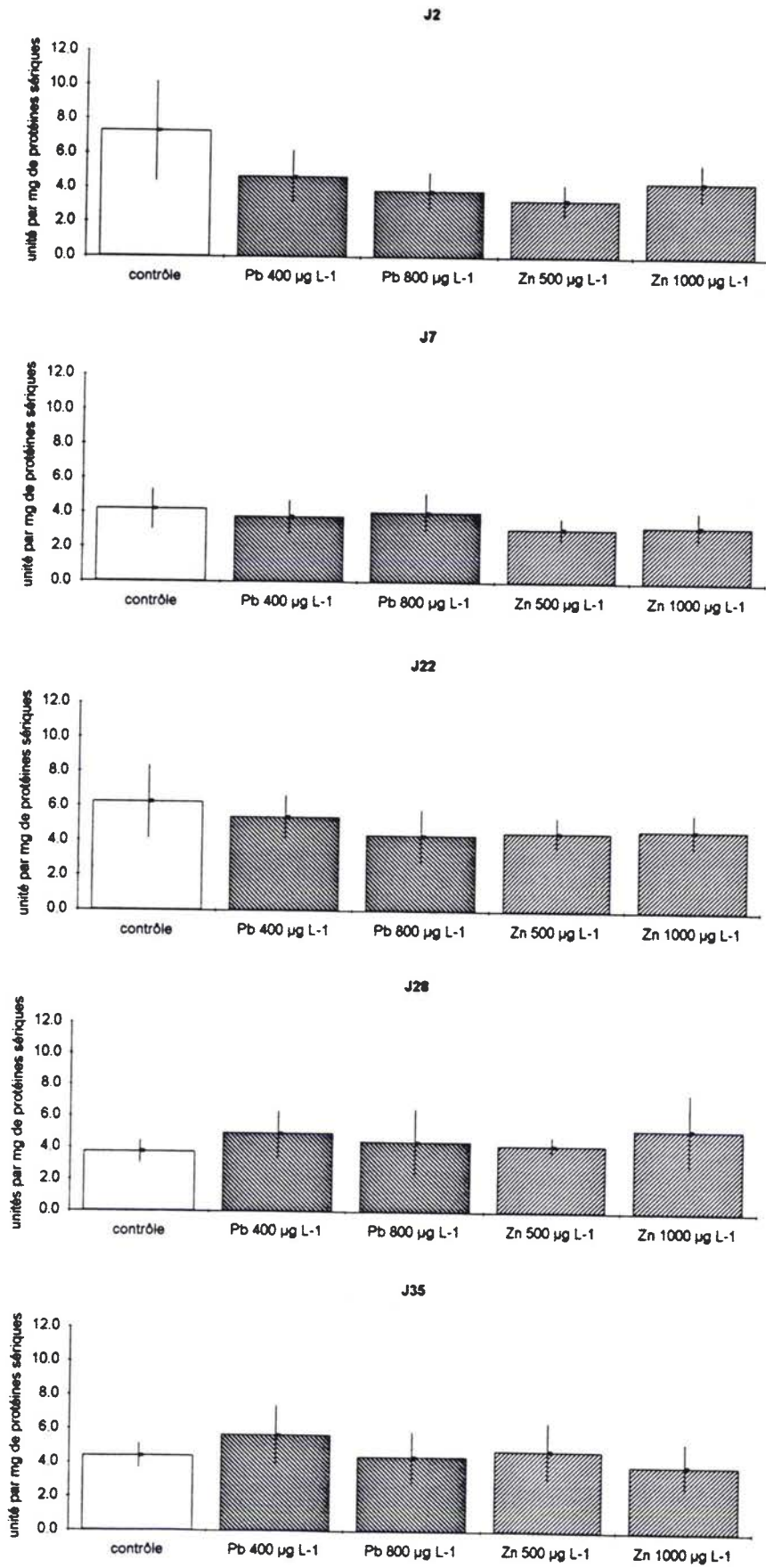


Figure 32. Activité spécifique des phosphatases acides dans le sérum (pools de sérum, n = 5) de *D. polymorpha* exposée au plomb et au zinc. Evolution en fonction de la concentration de métal et du temps.

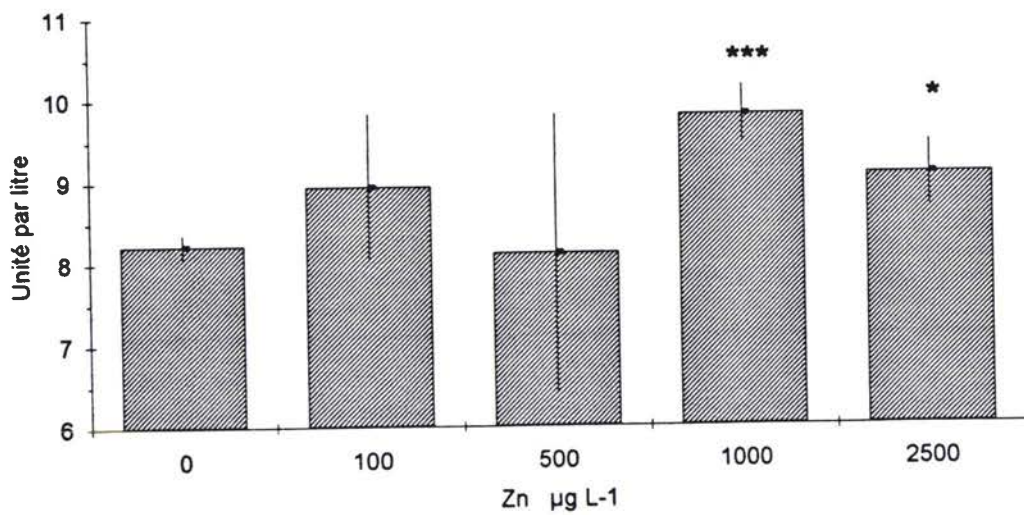
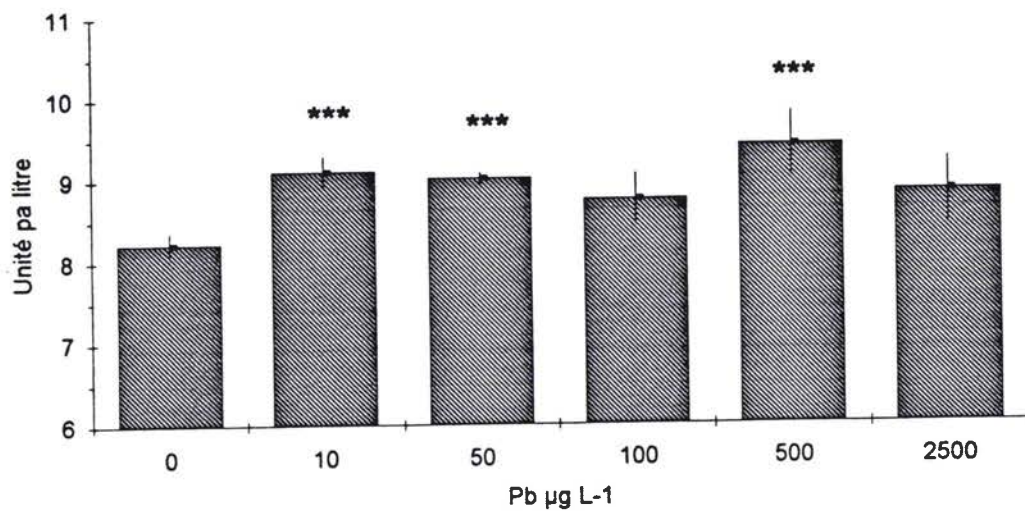


Figure 33. Essai d'inhibition des phosphatases acides par le plomb et le zinc. Activité brute des phosphatases acides dans le sérum (pools de sérum,  $n = 3$ ) de *D. polymorpha* en fonction de la concentration de métal. (Test de Student, test de Mann et Whitney, \*  $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.01$ ).

mesurées chez *Dreissena* (Zn: CL 50 = 10.8 mg L<sup>-1</sup> en 28 jours (Maarouf, 1988); Pb: CL 50 > 10 mg L<sup>-1</sup> en 96 h (Mouabad, 1991); 1 et 10 mg L<sup>-1</sup> de plomb provoque la mort de, respectivement, 10 et 25 % d'une population en 15 jours de contamination (Benyahia, 1991)).

Une augmentation du nombre d'hémocytes est un phénomène que l'on peut s'attendre à observer chez des mollusques bivalves soumis à un environnement contaminé. En effet, les bivalves chez qui les hémocytes participent aux mécanismes de détoxification des métaux pourraient accroître le nombre de cellules permettant ainsi une élimination plus importante de la surcharge métallique.

Cependant, la littérature concernant cet effet est assez contradictoire. Si certains auteurs trouvent une augmentation, d'autres observent une baisse et il faut, sans doute, incriminer d'une part les conditions expérimentales différentes d'un auteur à l'autre et surtout les variations de sensibilité des différentes espèces.

Ainsi, un nombre plus élevé d'hémocytes et plus particulièrement de granulocytes est observé chez certains bivalves soit soumis *in situ* à un environnement contaminé par les métaux ((*C. gigas* et *C. virginica*, ) Ruddell et Rains, 1975; (*M. arenaria*) Seiler et Morse, 1988) ou par une contamination par le cuivre ((*M. edulis*) Pickwell et Steinert, 1984; (*C. virginica*) Cheng, 1988a).

Par contre, le même métal provoque une baisse de l'effectif hémocytaire chez *V. cyprinoides* (Suresh et Mohandas, 1990b) pour des concentrations métalliques proches de la CL 50 de l'espèce.

Le cadmium, autre métal très souvent testé provoque selon l'espèce ou selon l'expérience des effets contraires: il fait diminuer le nombre total d'hémocytes chez *O. edulis* (George *et al.*, 1983) alors qu'il le fait augmenter chez *C. virginica* (Cheng, 1988a).

L'absence d'effet sur le nombre d'hémocytes est également observé chez d'autres bivalves comme *C. virginica* (Cheng, 1988a) ou chez *S. scripta* (Suresh et Mohandas, 1990b) exposés à des doses de cuivre très inférieures à la dose létale dans le cas de la dernière espèce ou comme *M. edulis* et *C. virginica* exposés à des micropolluants organostanneux (Pickwell et Steinert, 1988). Un phénomène identique se produit chez d'autres invertébrés tel le crustacé, *C. moenas* qui montre une certaine tolérance à une exposition au mercure (Truscott et White, 1990).

Nous n'avons pas observé de différences significatives entre le nombre d'hémocytes chez les individus contaminés ou non et certaines hypothèses peuvent expliquer ces résultats:

- La tolérance de l'espèce à des doses faibles, nettement inférieures aux concentrations létales.



- Par ailleurs les Dreissènes soumises à un environnement pollué réduisent leur activité de filtration, limitant ainsi les contacts avec le milieu extérieur. Mouabad (1991) a montré qu'1 mg L<sup>-1</sup> de plomb ou de zinc réduit le taux de filtration de *Dreissena*, respectivement, de 60 et 45 %.

- Les bivalves possédant un système circulatoire ouvert, il existe des fluctuations aussi bien du volume total de l'hémolymphe dans l'organisme que du nombre d'hémocytes Cheng (1988a).

- La présence d'une variabilité interindividuelle assez importante chez les mollusques bivalves en présence d'un polluant.

- Un nombre trop faible d'individus soumis aux expériences.

- La forme sous laquelle les métaux ont été administrés.

Dans une deuxième approche, nous avons évalué l'impact du plomb et du zinc sur les capacités phagocytaires des hémocytes. Nos résultats montrent que les deux métaux ont tendance à induire une diminution des capacités phagocytaires des hémocytes de *D. polymorpha*. Les effets produits *in vivo* par le plomb sont proportionnels à la dose sauf au 22<sup>ème</sup> jour de l'expérience. En effet, les hémocytes des individus soumis à la plus faible concentration de plomb montrent un taux de phagocytose significativement supérieur à celui des individus témoins, phénomène qui ne se prolonge pas ensuite et qui reste difficilement explicable.

*In vitro* le plomb et le zinc tendent également à réduire les capacités de phagocytose des hémocytes.

Là encore, les résultats de la littérature sont controversés et difficile à interpréter. En effet, chez *C. virginica*, la contamination par le cuivre (1 mg L<sup>-1</sup>) *in vivo* inhibe les capacités de phagocytose tandis que le cadmium produit un effet inverse (Cheng, 1988b). Par contre, ces effets ne sont plus observés lors d'expériences menées *in vitro*, même à des concentrations plus élevées de 5 mg L<sup>-1</sup>. Il en est de même pour le plomb et le zinc utilisés à des concentrations de 1 et 5 mg L<sup>-1</sup>.

Par ailleurs, les capacités phagocytaires des hémocytes peuvent être affectées, chez les bivalves par d'autres micropolluants comme certains fongicides (Alvarez *et al.*, 1991; Alvarez et Friedl, 1992) biocides (Fisher *et al.*, 1990) ou phénols (Fries et Tripp, 1980).

Chez les vertébrés, le plomb et le zinc peuvent induire plusieurs effets contraires sur le système immunitaire et entraîner une inhibition ou une stimulation des capacités phagocytaires des macrophages ou des leucocytes polynucléaires (Koller et Roan, 1977; Koller, 1980; Baginski, 1989)

Ces études font ressortir que les bivalves présentent non seulement une variabilité inter individuelle assez élevée mais aussi des réponses très hétérogènes

que ce soit pour une espèce face à différentes concentrations d'un métal ou que ce soit pour diverses espèces vis-à-vis du même métal. Par ailleurs, la comparaison entre les différentes études est rendue difficile, voire impossible par la diversité des protocoles expérimentaux employés.

Enfin dans une dernière approche nous avons évalué l'impact du plomb et du zinc sur le système lysosomal des hémocytes par des méthodes cytochimiques et par la mesure quantitative de l'activité des phosphatases acides.

Certains types d'hémocytes possèdent, en effet, un système lysosomal bien développé, où divers types de micropolluants peuvent s'accumuler. Ainsi isolés dans ce compartiment, ils peuvent ne pas induire d'effets toxiques tant que les capacités de stockage des lysosomes ne sont pas saturées. Le système lysosomal est sensible aux perturbations de l'environnement par différents types de xénobiotiques. La réponse des lysosomes, principalement au niveau de la glande digestive, constitue un indice de stress souvent utilisé aussi bien chez les bivalves et chez les gastéropodes que chez d'autres invertébrés comme le crustacé, *C. moenas* (Moore, 1977; Moore *et al.*, 1982; Amiard *et al.*, 1982; Viarengo, 1985; Marigomez *et al.*, 1989). Toutefois dans quelques cas, la réponse des lysosomes a été évaluée au niveau des hémocytes chez les mêmes espèces (Amiard *et al.*, 1982; Steinert et Pickwell, 1984; Pickwell et Steinert, 1984; Suresh et Mohandas, 1988a).

Nos résultats concernant les mesures quantitatives de phosphatases acides montrent que les doses utilisées n'ont pas provoqué de variations sensibles des activités enzymatiques. En effet, aucun taux d'activité enzymatique mesuré dans les culots cellulaires ou dans les sérums de l'hémolymphe des individus exposés aux métaux n'est significativement différent des taux mesurés dans les mêmes fractions de l'hémolymphe chez les individus de contrôle. Il est à noter, dans cette étude, les valeurs relativement peu élevées des écart-types pour les activités enzymatiques.

Par contre, l'étude cytochimique s'est révélée plus fructueuse. En effet, nos résultats montrent une augmentation du pourcentage des classes 3 et 4, caractérisées par une activité phosphatasique acide plus importante, chez les Dreissènes soumises aux contaminations métalliques.

De même, le plomb, à la plus forte concentration testée et après 7 jours de contamination induit une augmentation nette du nombre d'hémocytes présentant une activité pour les  $\beta$  glucuronidases. Cet effet s'amorce pour la plus faible dose en fin d'expérience.

Le zinc provoque les mêmes effets, à la plus faible dose à partir de 21 jour, et aux deux doses en fin d'expérience.

Les différences observées entre les deux techniques d'évaluation de l'activité des phosphatases acides pourraient s'expliquer d'une part par la légère différence des substrats de révélation utilisés qui ne permettent pas le dosage des mêmes isoformes de l'enzyme et d'autre part par le fait que l'utilisation de triton pendant la préparation des culots cellulaires n'a pas permis de faire éclater les lysosomes et qu'un broyage des cellules aurait été nécessaire.

Amiard *et al* (1982) ont montré que certains métaux comme le cadmium, le plomb, le cuivre et le zinc ne produisent aucun effet sur l'activité de plusieurs enzymes hématocytaires chez *C. moenas*. Par contre, les activités phosphatasiques et estérasiques sont réduites par ces métaux au niveau des cellules de la glande digestive.

Par ailleurs, Steinert et Pickwell (1984) et Pickwell et Steinert (1984) observent une augmentation d'une hydrolase lysosomale, le lysozyme, dans la fraction sérique de l'hémolymphe de *M. edulis* exposée au cuivre. L'enzyme est libérée par les hématocytes où l'intégrité membranaire des lysosomes n'est plus respectée.

De nombreux xénobiotiques organiques ou métalliques provoquent une augmentation du volume des lysosomes et la formation de lysosomes géants, phénomènes associés à la perte de la stabilité des membranes lysosomales entraînant une libération des enzymes dans le cytosol (Lowe *et al.*, 1981; Moore, 1985; Marigomez *et al.*, 1989).

Une augmentation du taux d'enzymes lysosomales est également observé par Moore (1977) dans les cellules endodermiques d'une espèce de coelentéré, *Campanularia flexuosa*, exposé au cuivre, au cadmium ou au mercure.

D'autres métaux comme le zinc et le plomb (Sternlieb et Goldfischer, 1975; Chvapil, 1972, cité par Marigomez *et al.*, 1989) sont capables de stabiliser les membranes des lysosomes. Ces deux métaux peuvent également montrer des effets stimulateurs sur les enzymes lysosomales (Webb, 1979 cité, par Viarengo, 1985; Koller, 1980).

D'autres études de dosages d'activité phosphatasiques acides dans l'hémolymphe de certains bivalves contaminés par les métaux ne mettent pas clairement en évidence les effets du métal. Suresh et Mohandas (1988a) étudient l'impact du cuivre sur l'activité des phosphatases acides de l'hémolymphe chez deux bivalves. Ils réalisent leur dosages sans séparer les fractions cellulaires et sériques de l'hémolymphe et leurs résultats montrent beaucoup de variabilités. Ils observent, ponctuellement, pour certains prélèvements, aux doses les plus faibles de métal testées, une augmentation du taux d'activité des enzymes puis une baisse pour les doses métalliques plus élevées, irrégulièrement tout au long de l'expérimentation. Ces

**résultats montrant de grandes fluctuations ne prêtent pas, à notre avis, à une interprétation biologique correcte.**

**Dans cette approche expérimentale préliminaire, nous avons pu montrer que:**

**- *D. polymorpha* résiste bien à des doses métalliques importantes, nettement supérieures à celles observées dans les écosystèmes aquatiques d'eau douce, en tout cas en ce qui concerne le plomb. Ces phénomènes sont bien évidemment à mettre en relation avec les capacités de cette espèce pour la bioindication.**

**- Les Dreissènes réagissent à la contamination par les métaux en augmentant l'activité de certaines hydrolases lysosomales. L'évaluation cytochimique de l'activité des phosphatases acides et des  $\beta$  glucuronidases permet d'observer une réponse même pour les plus faibles doses testées.**

**- La plus faible dose de plomb induit une augmentation significative du nombre d'hémocytes en cours d'expérience. La plus forte dose de zinc provoque des effets identiques en fin d'expérience.**

**- Les deux métaux ont tendance à provoquer une baisse des capacités de phagocytose de l'espèce.**

**D'autres études basées sur des intoxications sub-aiguës permettant de valider le modèle et d'identifier des tests intéressants seront nécessaires.**

**Il serait intéressant également d'améliorer les tests utilisés en réalisant des comptages différentiels dans la population hémocytaire.**

**L'activité des enzymes lysosomales pourra être évaluée au niveau d'autres organes, riches en lysosomes comme la glande digestive ou la glande péricardiale.**

**Enfin d'autres hydrolases lysosomales pourront être testées dans les différents organes.**

## **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**

Les travaux antérieurs avaient prouvé la capacité de bioaccumulation, la contribution des hémocytes, le rôle des organes excréteurs dans la détoxification des métaux sans support ultrastructural ni connaissance anatomique précise.

Une adaptation des techniques de microscopie a été nécessaire en amont de l'étude cytologique fine des hémocytes.

La morphologie et l'ultrastructure des différentes populations d'hémocytes, de la glande péricardiale et des reins ont été décrites.

Connaissant l'anatomie, le devenir des métaux a été abordé en ce qui concerne trois compartiments: hémolymphe, glande péricardiale et reins. Deux métaux ont été étudiés, Zn et Pb, leur comportement différent pouvant s'expliquer par leur statut : un élément essentiel, le zinc et l'autre non essentiel, le plomb. Dans les conditions expérimentales utilisées, le zinc ne présente pas de surcharge détectable. Le schéma de synthèse présenté à la figure 34 propose le devenir du plomb.

Le plomb, sous ses formes dissoutes traverse l'épithélium branchial et est libéré du côté hémolympatique. Parmi les hémocytes, seuls les granulocytes interviennent. Au cours de leur déplacement, ceux ci peuvent soit se retrouver dans le sinus de la glande péricardiale, soit dans le sinus rénal.

Au niveau de la glande péricardiale, il y a en même temps ultrafiltration, réabsorption et invasion par les granulocytes de l'épithélium péricardial. Le produit final est transporté par le liquide péricardial sous une forme dissoute ou particulaire vers le pavillon cilié, puis le rein proximal. Celui ci ne semble pas jouer un rôle dans le cycle du métal.

Le rein dans sa portion distale intervient d'une manière prépondérante. La cellule du tube rénal distal filtre également et absorbe le métal présent dans l'hémolymphe. Un enrichissement localisé en métal par libération du contenu des granulocytes du coté basal de l'épithélium est également possible.

La cellule rénale montre une activité lysosomale intense et expulse des granules rénaux riches en métal (Pb) associé à d'autres éléments principaux (P, S, Ca) et mineurs (Zn, Cu, Fe, Al, Mg).

Ces granules rénaux sont observables dans la lumière rénale et sont émis par le pore excréteur dans la chambre supra branchiale.

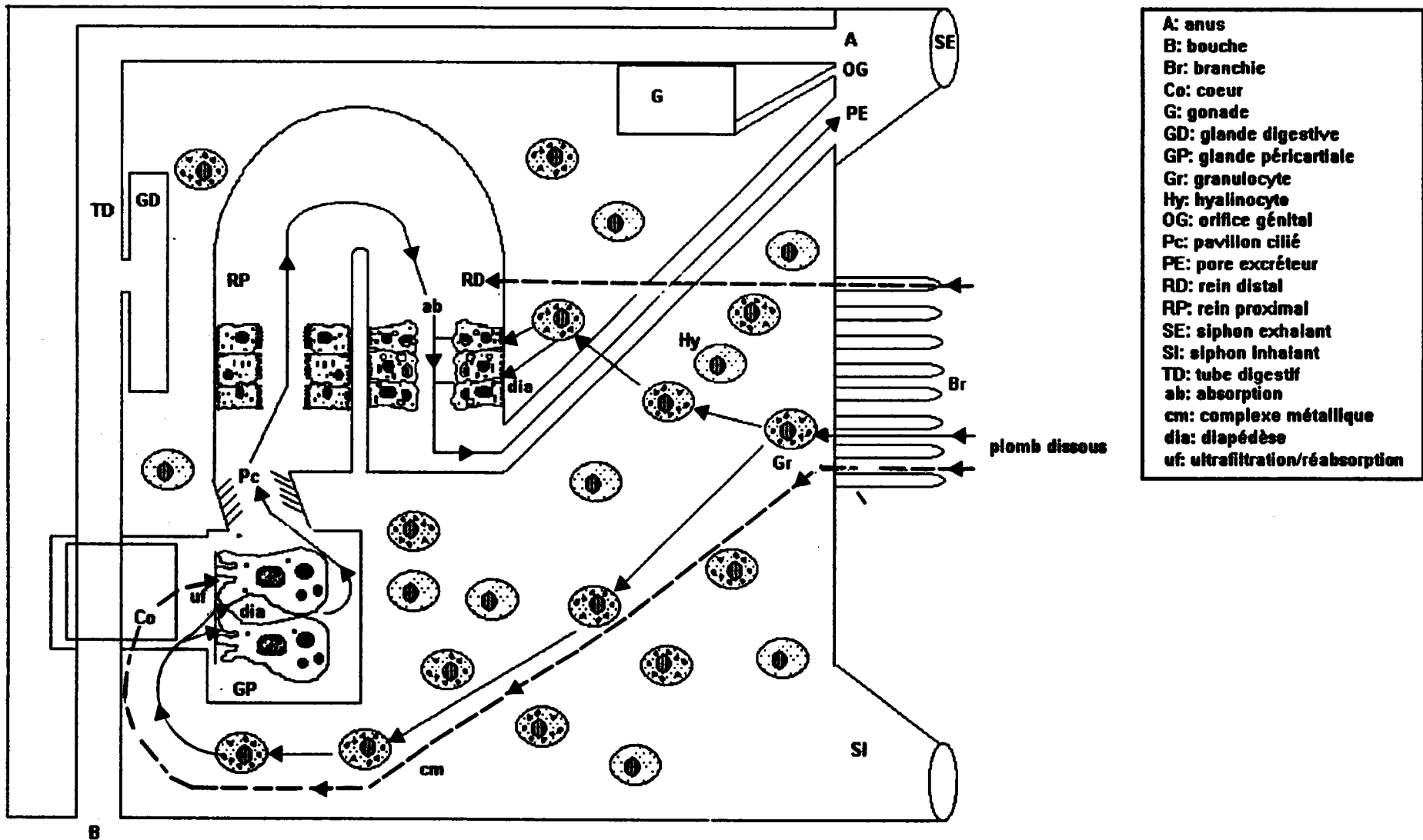


Figure 34: Schéma de synthèse remplaçant les hémocytes, la glande péricardiale et le rein dans le devenir du plomb dans l'organisme de *D. polymorpha*. (----- : cheminement du plomb dans l'hémolymphe; ———— : cheminement du plomb pris en charge par les cellules)

Ainsi, quelle que soit la cellule concernée dans le processus de transport ou de détoxification (granulocyte, podocyte, néphrocyte), le système lysosomal joue un rôle prépondérant. Une tentative d'évaluation de l'activité enzymatique était donc justifiée. Une activité phosphatasique acide a été mise en évidence dans les granules cytoplasmiques des granulocytes et des podocytes indépendamment de la présence de métal.

Une évaluation de la capacité de la Dreissène à répondre à la présence du métal a été entreprise dans une approche préliminaire par la recherche d'une modification de l'activité des hémocytes: nombre total, capacité de phagocytose, activité lysosomale. Selon nos résultats, il existe une tendance à l'augmentation du nombre d'hémocytes en présence de métal. L'activité phagocytaire n'est pas significativement modifiée. Il semble cependant qu'une réponse existe dans les granulocytes avec augmentation du nombre de granules à activité phosphatasique positive.

Afin d'appréhender les mécanismes d'accumulation, de détoxification et d'excrétion des métaux au niveau de l'ensemble de l'organisme il conviendra d'étudier plus précisément les organes de prise comme la branchie et la glande digestive, ainsi que le rein proximal, sur les plans de l'ultrastructure et de la micronalyse. Il serait également intéressant d'étudier le transport du métal dans l'hémolymphe et de rechercher la nature de complexants telles que les métalloprotéines.

Par ailleurs, des recherches ultérieures complémentaires basées sur des intoxications subaiguës permettront d'identifier correctement des réponses de stress chez la Dreissène. Il serait alors intéressant de différencier lors de la numération les hyalinocytes et les granulocytes. Des techniques biochimiques mieux adaptées pourraient permettre une évaluation quantitative de l'activité lysosomale intra et extra cellulaire. Une fois identifiées au laboratoire, les réponses pourraient être utilisées *in situ* comme indicateur de stress de contamination par les métaux.

Il conviendra également de mener des études sur le devenir du plomb sous forme particulaire. Des études allant dans ce sens sont actuellement en cours.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**



- ABBE, G. R. & SANDERS, J. G. 1990. Pathways of silver uptake and accumulation by the American oyster (*Crassostrea virginica*) in Chesapeake Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 31: 113-123.
- ADEMA, C. M., VAN DER KNAAP, W. P. W. & SMINIA, T. 1991. Molluscan hemocyte mediated cytotoxicity: the role of reactive oxygen intermediates. *Rev. Aquat. Sci.*, 4: 201-223.
- ALVAREZ, M. R. & FRIEDL, F. E. 1992. Effects of a fungicide on *in vitro* hemocyte viability, phagocytosis and attachment in the american oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*, 107: 135-140.
- ALVAREZ, M. R., FRIEDL, F. E. & HUDSON, C. M. 1991. Effect of a commercial fungicide on the viability and phagocytosis of hemocyte of the american oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.*, 57: 395-401.
- ALVAREZ, M. R., FRIEDL, F. E., HUDSON, C. M. & O'NEIL, R. L. 1992. Uptake and tissue distribution of abiotic particles from the alimentary tract of the american oyster: A simulation of intracellular parasitism. *J. Invertebr. Pathol.*, 59: 290-294.
- ALVAREZ, M. R., FRIEDL, F. E., JOHNSON, J. S. & HINSCH, G. W. 1989. Factors affecting *in vitro* phagocytosis by oyster hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 54: 233-241.
- AMIARD, J. C., AMIARD -TRIQUET, C. & DENUIT, C. 1982. Variations de l'activité de quelques enzymes de l'hémolymphe et de l'hépatopancréas de *Carcinus moenas in situ* et expérimentalement sous l'effet de polluants métalliques (Cd, Pb, Cu et Zn). *Publi CNEXO (actes colloq.)* 14: 385-398.
- AMIARD, J. C., AMIARD -TRIQUET, C., BALLAN-DUFRANCAIS, C., BERTHET, B., JEANTET, B., MARTOJA, R. & TRUCHET, M. 1986. Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg directly from water or via food. *Proc. 21. Eur. Mar. Biol. Symp.* Gdansk.
- ANDERSON, R. S. 1981. Comparative aspects of the structure and functions of invertebrates and vertebrate leucocytes. In: N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley (eds.), *Invertebrate blood cells*, vol. 2, pp. 629- Academic Press, London New York.
- ANDREWS, E. B. 1979. Fine structure in relation to function in the excretory system of two species of *Viviparus*. *J. moll. Stud.*, 45: 186-206.
- ANDREWS, E. B. 1988. Excretory system of molluscs. In: E. R. Trueman & M. R. Clarke, (eds.), *The Mollusca*, vol. 11, *Form and function*, pp. 381-448. Academic Press, New York.
- ANDREWS, E. B. & JENNINGS, K. H. 1993. The anatomical and ultrastructural basis of primary urine formation in bivalve molluscs. *J. Moll. Stud.*, 59: 223-257.
- AUFFRET, M., 1985. Morphologie comparative des types hémocytaires chez quelques bivalves d'intérêt commercial. 153 p. Th. doct.: Océanographie, Biologie: Brest.
- AUFFRET, M., 1986. Internal defense in bivalve molluscs: ultrastructural observations on the fate of experimentally injected bacteria in *Ostrea edulis* granular hemocytes. In: *Pathology in Marine Aquaculture*. C. P. Vivares, J. R. Bonami, E. Jaspers (eds.), European Aquaculture Society, Special Publication, Bredene, Belgium. N° 9: 351-356.
- AUFFRET, M., 1988. Bivalve hemocyte morphology. In: *Disease processes in marine bivalve molluscs*. *American Fisheries Society*, Special Publication, 18: 169-177.
- AUFFRET, M., 1989. Comparative study of the hemocytes of two oyster species: the European flat oyster, *Ostrea edulis*, Linnaeus, 1750 and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). *J. Shellfish. Res.*, 8 (2): 367-373.
- BACHERE, E., CHAGOT, E. & GRIZEL, H. , 1988. Separation of *Crassostrea gigas* hemocytes by density gradient centrifugation and centerflow centrifugal elutriation. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 549-559.
- BACHERE, E., HERVIO, D. & MIAHLE, E. 1991. Luminol-dependent chemiluminescence by hemocytes of two marine bivalves, *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas*. *Dis. aquat. Org.*, 11: 173-180.

- BAGINSKI, B. 1989. Alterations of the oxidative metabolism and other microcidal activities of human polymorphonuclear leukocytes. *Free Rad. Res. Comms.*, **10** (4-5): 227-235.
- BALLAN-DUFRANCAIS, C., JEANTET, A. Y. & HALPERN, S. 1982. Localisation intracellulaire par microanalyse X de métaux et de métalloïdes dans la glande digestive d'un mollusque bivalve (*Pecten maximus*). Implication des processus de digestion. *C. R. Acad. Sc. Paris, Série III*, **294**: 673-678.
- BALLAN-DUFRANCAIS, C., JEANTET, A. Y., FEGHALI, C. & HALPERN, S. 1985. Physiological features of heavy metal storage in bivalves digestive cells and amoebocytes: EMPA and factor analysis of correspondences. *Biol. Cell*, **53**: 283-292.
- BARKA, T. & ANDERSON, P. J. 1962. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler. *J. Histochem. Cytochem.*, **10**: 741.
- BARTON, L. K. 1993. Control program for zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) at the Perry nuclear power plant, lake Erie. In: Zebra mussels: biology, impacts and control. pp. 555-562. Napela, T. F., Schloesser, D. W. (eds.), Boca Raton: Lewis Publication.
- BAYNE, B. L. 1989. Measuring the biological effects of pollution: The mussel watch approach. *Wat. Sci. Tech.*, **21**: 1089-1100.
- BAYNE, C. J. 1983. Molluscan immunobiology. In: Saleudin A. S. M. & Wilbur K. M (eds.), *The mollusca*, vol. 5, *Physiology*, part 2, pp. 407-486. Academic Press, Inc. London.
- BAYNE, C. J., MOORE, M. N., CAREFOOT, T. H. & THOMSON, R. J. 1979. Hemolymph functions in *Mytilus californianus*: the cytochemistry of hemocytes and their responses to foreign implants and hemolymph factors in phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, **34**: 1-20.
- BAYNE, C. J., SMINIA, T. & VAN DER KNAAP, W. P. W. 1980. Immunological memory: status of molluscan studies. In: Manning, M. J. (ed.), *Phylogeny of immunological memory*. pp. 57-64. Elsevier North Holland, Biomedical Press, Amsterdam.
- BENYAHIA, M. 1991. Etude de la contamination du bivalve d'eau douce *Dreissena polymorpha* par le plomb. Bioaccumulation, distribution tissulaire et élimination du métal. Indice de paramètres biotiques et abiotiques. 200 p. Th. Doct. Sciences de la vie, écotoxicologie: Metz.
- BERTHET, B., AMIARD -TRIQUET, C. & MARTOJA, R. 1990. Effets chimiques et histologiques de la décontamination de l'huître *Crassostrea virginica* Thunberg préalablement exposée à l'argent. *Wat. Air Soil Pollut.*, **50**: 355-369.
- BOER, H. H. & SMINIA, T. 1976. Sieve structure of slits diaphragms of podocytes and pore cells of gastropod molluscs. *Cell. Tiss. Res.*, **170**: 221-229.
- BORCHERDING, J. 1991. The annual reproductive cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in lakes. *Oecologia*, **87**: 208-218.
- BOUQUEGNEAU, J. M., MARTOJA, M. & TRUCHET, M. 1984. Heavy metal storage in marine animals under various environmental conditions. In: Toxins, drugs and pollutants in marine animals. Bolis, L., Zadunaisky, J. & Gilles, R. (eds.) pp. 147-160. Springer Verlag, Berlin Heidelberg.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**: 248-254.
- BROWN, B. E. 1982. The form and function of metal-containing "granules" in invertebrates tissues. *Biol. Rev.* **57**: 621-667.
- BURTON, R. F. 1983. Ionic regulation and water balance. In: A. S. M. Saleudin & K. M. Wilbur (eds.), *The Mollusca*, vol. 5, *Physiology*, Part 2, pp. 291-352. Academic Press, New York
- CARMICHAEL, N. G. & FOWLER, B. A. 1981. Cadmium accumulation and toxicity in the kidney of the bay scallop *Argopecten irradians*. *Mar. Biol.*, **65**: 35-43.

- CARMICHAEL, N. G., SQUIBB, K. S. & FOWLER, B. A. 1979. Metals in molluscan kidney: comparison of two closely related bivalve species (*Argopecten*) using X-ray microanalysis and atomic absorption spectroscopy. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, **39**: 1149-1155.
- CARMICHAEL, N. G., SQUIBB, K. S., ENGEL, D. V. & FOWLER, B. A. 1980. Metals in molluscan kidney: uptake and subcellular distribution of <sup>109</sup>Cd, <sup>54</sup>Mn and <sup>65</sup>Zn by the clam *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.* **65A**: 203-206.
- CEZARD, C. & HAGUENOER, J. M. 1992. Toxicologie du plomb chez l'homme. 350p. Cachan : EM inter.
- CHANDY, J. P. & PATEL, B. 1985. Do selenium and glutathione (GSH) detoxify mercury in marine invertebrates? Effects on lysosomal response in the tropical blood clam *Anadara granosa*. *Dis. aquat. Org.*, **1**: 39-45.
- CHARGOT, D., BOULO, V., HERVIO, D., MIAHLE, E., BACHERE, E., MOURTON, C. & GRIZEL, H. 1992. Interactions between *Bonemia ostrea* (Protozoa: Asctospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): entry mechanisms. *J. Invertebr. Pathol.*, **59**: 241-249.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C. & GALLE, P. 1988. Sites cellulaires de concentration du chrome chez la moule *Mytilus edulis*: données préliminaires. *C. R. Acad. Sc. Paris, Série III*, **306**: 467-473.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C. 1983. Rôle des lysosomes et des sphéro cristaux dans le phénomène de concentration de l'uranium chez la moule *Mytilus edulis* (L.). Microanalyse par spectrographie de RX. *C. R. Acad. Sc. Paris, Série III*, **196**: 581-586.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C., CALMET, D., ESCAIG, F. & KLEINBAUER, F. 1983. Bioaccumulation d'uranium par des moules, *Mytilus edulis* (L.) récoltées sur les côtes françaises de la Manche et contamination expérimentale. Microanalyse par émission ionique secondaire. *C. R. Acad. Sc. Paris, Série III*, **296**: 1095-1100.
- CHENG, T. C. 1975. Functional morphology and biochemistry of molluscan phagocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **266**: 343-379.
- CHENG, T. C. 1977. Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytosis in molluscs: defense and nutrition. *Comp. Pathobiol.*, **3**: 21-30.
- CHENG, T. C. 1981. Bivalves. In: N. A. Ratcliffe, A. F. Rowley (eds.), *Invertebrate blood cells*, vol. 1, pp. 231-300. Academic Press, London New York.
- CHENG, T. C. 1983 a. Triggering of immunologic defense mechanism of molluscan shellfish by biotic and abiotic challenge and its applications. *Mar. Tech. Soc. J.*, **17**: 18-25.
- CHENG, T. C. 1983 b. The role of lysosomes in molluscan inflammation. *Amer. Zool.*, **23**: 129-144.
- CHENG, T. C. 1986. Specificity and the role of lysosomal hydrolases in molluscan inflammation. *Int. J. Tiss.*, **8**: 439-445.
- CHENG, T. C. 1988a. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanism of *Crassostrea virginica*: Total and differential cell counts. *J. Invertebr. Pathol.*, **51**: 207-241.
- CHENG, T. C. 1988b. *In vivo* effects of heavy metals on cellular defense mechanism of *Crassostrea virginica*: Phagocytic and endocytic indices. *J. Invertebr. Pathol.*, **51**: 215-220.
- CHENG, T. C. & BUTLER, M. S. 1979. Experimentally induced elevations in acid phosphatase activity in hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). *J. Invertebr. Pathol.*, **34**: 119-124.
- CHENG, T. C., CHORNEY, M. J. & YOSHINO, T.P. 1977. Lysozymelike activity in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* challenged with bacteria. *J. Invertebr. Pathol.*, **29**: 170-174.

- CHENG, T. C. & DOUGHERTY, W. J. 1989. Ultrastructural evidence for the destruction of *Schistosoma mansoni* sporocysts associated with elevated lysosomal enzyme levels in *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, **75**: 928-941.
- CHENG, T. C. & DOWNS, J. C. U. 1988. Intracellular acid phosphatase and lysozyme levels in subpopulations of oyster, *Crassostrea virginica*, hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, **52**: 163-167.
- CHENG, T. C., HUANG, J. W., KARADOGAN, H., RENWRANTZ, L. R. & YOSHINO, T. P. 1980. Separation of oyster hemocytes by density gradient centrifugation and identification of their surface receptors. *J. Invertebr. Pathol.*, **36**: 35-40.
- CHENG, T. C. & RODRICK, G. E. 1974a. Identification and characterization of lysozyme from the hemolymph of the soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *Biol. Bull.*, **147**: 311-320.
- CHENG, T. C. & RODRICK, G. E. 1974b. Lysosomal and other enzymes in the hemolymph of *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **52B**: 443-447.
- CHENG, T. C., RODRICK, G. E., FOLEY, D. A. & KOEHLER, S. A. 1975. Release of lysozyme from hemolymph cells of *Mercenaria mercenaria* during phagocytosis. *J. Invertebr. Pathol.*, **25**: 261-265.
- CHENG, T. C., THAKUR, A. S. & RIFKIN, E. 1969. Phagocytosis as an internal defense mechanism in the mollusca: with an experimental study of the role of leucocytes in the removal of ink particles in *Littorina Scabra* Linn. Proceedings of the symposium on mollusca, Part II: 546-563.
- CHENG, T. C. & SULLIVAN, J. T. 1984. Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Mar. Environ. Res.*, **14**: 305-315.
- CHORNEY, M. J. & CHENG, T. C. 1980. Discrimination of self and non-self in invertebrates. In: Contemporary topics in immunobiology, Vol 9. Marchanlonis, J.J. & Cohen, N. (eds.) pp 37-54. Plenum publishing Corporation.
- CHU, F. E. 1988. Humoral defense factors in marine bivalves. In: Disease processes in marine bivalve molluscs. American Fisheries Society, Special Publication, **18**: 178-188.
- CONNORS, V. A. & YOSHINO, T.P. 1990. *In vitro* effect of larval *Schistosoma mansoni* excretory-secretory products on phagocytosis stimulated superoxide production in hemocytes from *Biomphalaria glabrata*. *J. Parasitol.*, **76**: 895-902.
- COOMBS, T. L. 1977. Uptake and storage mechanisms of heavy metals in marine organisms. *Proc. Anal. Div. Chem. Soc.*, **14**: 219-222.
- COOMBS, T. L. & GEORGE, S. G. 1978. Mechanism of immobilization and detoxication of metals in organisms. In: "Physiology and Behavior of Marine Organisms". Mc Lusky, D. S. & Berry, A. J. (eds), pp. 179-188. Pergamon Press, Oxford.
- COSSA, D. 1989. A review of the use of *Mytilus spp.* as quantitative indicators of cadmium and mercury contamination in coastal waters. *Oceano. Acta*, **12**: 417-423.
- COSSON, R. P., AMIARD -TRIQUET, C. & AMIARD, J. C. 1991. Metallothioneins and detoxification. Is the use of detoxification protein for MTs a language abuse? *Wat. Air Soil Pollut.*, **57-58**: 555-567.
- DIKKEBOOM, R., TIJNAGEL, J. M. G. H. & VAN DER KNAAP, W. P. W. 1988. Monoclonal antibodies recognized hemocyte subpopulations in juvenile and adult *Lymnea stagnalis*: functional characteristics and lectin binding. *Dev. Comp. Immunol.*, **12**: 17-32.
- DIKKEBOOM, R., VAN DER KNAAP, W. P. W., MAASKANT, J. J. & DE JONGE, A. J. R. 1985. Different subpopulations of haemocytes in juvenile, adult and *Trichobilharzia ocellata* infected *Lymnea stagnalis*: characterization using monoclonal antibodies. *Z. Parasitenk.*, **71**: 815-819.
- DOHERTY, F. G. 1990. The asiatic clam, *Corbicula spp.*, as a biological monitor in freshwater environments. *Environ. Monit. Assess.*, **15**: 143-185.

- DOYLE, L. J., BLAKE, N. J., WOO, C. C. & YEVICH, P. 1978. Recent biogenic phosphorite: concretions in molluscs kidneys. *Science*, 199: 1431-1433.
- EBERSVEILLER, N. 1988. Etude quantitative du taux de filtration de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*, influence des métaux (zinc et cuivre). 54p. Mem. D. E. A. : Toxicol.: Metz.
- ETTAJANI, H., AMIARD -TRIQUET, C. & AMIARD, J. C. 1992. Etudes expérimentales du transfert de deux éléments traces (Ag, Cu) dans une chaîne trophique marine: eau - particules (sédiment naturel, microalgue) - mollusques filtreurs (*Crassostrea virginica* Thunberg). *Wat. Air Soil Pollut.*, 65: 215-236.
- FARQUHAR, M. G. 1982. The glomerular basement membrane. In: *Cell biology of extracellular matrix*. pp. 335-378. Hay, E. D. (ed.). Plenum Press, New York, London.
- FENG, S. Y. 1988. Cellular defense mechanisms of oysters and mussels. In: *Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society, Special Publication, 18: 153-168.
- FENG, S. Y. , FENG, J. S., BURKE, C. N. & KHAIRALLAH, L. H. , 1971. Light and electron microscopy of the leucocytes of *Crassostrea virginica* (Mollusca: Pelecypoda). *Z. Zellforsch. Microsk. Anat.*, 120: 222-245.
- FISHER, W. S. 1986. Structure and function of oyster hemocytes. In: *Immunity in invertebrates*. Brehelin, M (ed.). pp 25-35. Springer Verlag, Berlin.
- FISHER, W. S. 1988. Environmental influence on bivalves hemocytes function. In: *Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society, Special Publication, 18: 225-237.
- FISHER, W. S. & DINUZZO, A. R. 1991. Agglutination of bacteria and erythrocytes by serum from six species of marine molluscs. *J. Invertebr. Pathol.*, 57: 380-394.
- FISHER, W. S. & TAMPLIN, M. 1988. Environmental influence on activities and foreign particle binding by hemocytes of american oysters, *Crassostrea virginica*. *Can. J. Aquat. Sci.*, 45: 1309-1315.
- FISHER, W. S., WISHKOVSKY, A. & CHU, F. L. E. 1990. Effects of tributyltin on defense-related activities of oyster hemocytes. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19: 354-360.
- FOLEY, D. A. & CHENG, T. C. , 1972. Interaction of molluscs and foreign substances: The morphology and behavior of hemolymph cells of the American oyster *Crassostrea virginica*, *in vitro*. *J. Invertebr. Pathol.*, 19: 383-394.
- FOLEY, D. A. & CHENG, T. C., 1974. Morphology, hematologic parameters, and behavior of hemolymph cells of the quahaug clam, *Mercenaria mercenaria*. *Biol. Bull.*, 146: 343-356.
- FOWLER, B. A. & GOULD, E. 1988. Ultrastructural and biochemical studies of intracellular metal binding patterns in kidney tubule cells of the scallops *Placopecten magellanicus* following prolonged exposure to cadmium or copper. *Mar. Biol.*, 97: 207-216.
- FRANCHINI, A. & OTTAVIANI, E. 1990. Fine structure and acid phosphatase localization of hemocytes in the freshwater snail *Viviparus ater* (Gastropoda, Prosobranchia). *J. Invertebr. Pathol.*, 55: 28-34.
- FRIES, C. R. & TRIPP, M. R. 1980. Depression of phagocytosis in *Mercenaria mercenaria* following chemical stress. *Dev. Comp. Immunol.*, 4: 233-244.
- GABE, M. 1968. Techniques histologiques. 1113 p. Masson et Cie (eds.).
- GANTER, P. & JOLLES, G. 1970. Histochimie normale et pathologique. Tome II. 1904 p. Gauthiers-Villar (eds).
- GELDER, S. R. & MOORE, C. A. 1986. Cytochemical demonstration of several enzymes associated with phagosomal processing of foreign material within hemocytes of *Mercenaria mercenaria*. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 105(1): 51-58.
- GEORGE, S. G., 1980. Correlation of metal accumulation in mussels with the mechanisms of uptake, metabolism and detoxification: a review. *Thalassia Jugoslavica*, 16: 347-365.

- GEORGE, S. G. 1982. Subcellular accumulation and detoxification of metals in aquatic animals. In "Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity" pp. 3-52. Vernberg, W. B. (ed), Academic Press, New York
- GEORGE, S. G. 1983a. Heavy metal detoxification in the mussel *Mytilus edulis* composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). *Comp. Biochem. Physiol.*, 76C: 53-57.
- GEORGE, S. G. 1983b. Heavy metal detoxification in *Mytilus* kidney. An *in vitro* study of Cd and Zn binding to isolated tertiary lysosomes. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76C: 59-65.
- GEORGE, S. G. & PIRIE, B. J. S. 1980. Metabolism of zinc in the mussel, *Mytilus edulis* (L.): A combined ultrastructural and biochemical study. *J. Mar. Biol. Ass. U. K.*, 60: 575-590.
- GEORGE, S. G., PIRIE, B. J. S., CHEYNE, A. R., COOMBS, T. L. & GRANT, P. T. 1978. Detoxification 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., PIRIE, B. J. S. & COOMBS, T. L. 1976. The kinetics of accumulation and excretion of ferric hydroxide in *Mytilus edulis* (L.) and its distribution in the tissues. *J. exp. Mar. Ecol.*, 23: 71-84.
- GEORGE, S. G., PIRIE, B. J. S. & FRAZIER, J. M. 1983. Effects of cadmium on metal containing amoebocytes of the oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.*, 76: 63-66.
- GEORGE, S. G. & VIARENGO, A., 1985. A model for heavy metal homeostasis and detoxification in mussels. In: "Marine pollution and physiology. Recent advances". Vernberg, F. J., Thurberg, F. P., Calabrese & Vernberg, W. E. (eds.), Univ. South Carolina, Columbia.
- GIAMBERINI, L. 1987. Bioaccumulation de microparticules métalliques par la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. pp 70. D. E. A. Toxicologie, Metz.
- GOLD, K., CAPRIULO, G. & KEELING, K; 1982. Variability in the calcium phosphate concretion load in the kidney of *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 10: 97-99.
- GOLDBERG, E. D., BOWEN, V. T., FARRINGTON, J. W., HARVEY, G., MARTIN, J. H., PARKER, P. L., RISEBROUGH, R. W., ROBERTSON, W., SCHNEIDER, E. & GAMBLE, E. 1978. The mussel watch. *Environ. Consev.*, 5: 101-125.
- GRAHAM, R. C. Jr. & KARNOVSKY, M. J. 1966. The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of mouse kidney: ultrastructural cytochemistry by a new technique. *J. Histochem. Cytochem.*, 14: 291.
- GRIFFITHS, R. W., SCHLOSSER, D. W., LEACH, J. H. & KOVALAK, W. P. 1991. Distribution and dispersal of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) in the great lakes region. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 48: 1381-1388.
- GROBEN, C. 1888. Die pericardialdrüse der lamellibranchiaten. Ein beitrag zur Kenntniss der anatomie dieser molluskenklasse. *Arb. Zool. Inst. Wien*, 7: 355-444.
- HANSEN, P. D. 1992. Phagocytosis in *Mytilus edulis*, a system for understanding the sublethal effects of anthropogenic pollutants and the use of AOX as an integrating parameter for the study of equilibria between chlorinated organics in *Dreissena polymorpha* following long term exposures. *Limnologie aktuell*, 4: 171-184.
- HAWKINS, W. E. & HOWSE, H. D. , 1982. Ultrastructure of cardiac hemocytes and related cells in the oyster *Crassostrea virginica*. *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 101(3): 241-252.
- HEBERT, P. D. N., MUNCASTER, B. W. & MACKIE, G. L. 1989. Ecological and genetic studies on *Dreissena polymorpha* (Pallas): a new mollusc in the great lakes. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 46: 1587-1591.

- HELMERAAD, J. & HERWIG, H. J. 1988. Cadmium kinetics in freshwater clams. IV. Histochemical localization of cadmium in *Anodonta cygnea* and *Anodonta anatina*, exposed to cadmium chloride. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 17: 333-343.
- HENRY, M. 1987. La glande digestive de la palourde méditerranéenne *Ruditapes decussatus* L. Recherches ultrastructurales, cytochimiques, écophysiologiques et écotoxicologiques. 439 p. Th. doct.: Sciences: Aix-Marseille.
- HERWIG, H. J., BRANDS, F., KRUITWAGEN, E. & ZANDEE, D. J. 1989. Bioaccumulation and histochemical localization of cadmium in *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium chloride. *Aquatic Toxicology*, 15: 269-286.
- HIGNETTE, M. 1979. Composition des concrétions minérales contenues dans les reins de deux mollusques laméllibranches: *Pinna nobilis* L. et *Tridacna maxima* (Röding). *C. R. Acad. Sc. Paris*, 289: 1069-1072.
- HOLWERDA, D. A., DE KNECHT, D. E., HELMERAAD, J. & VEENHOF, P. R. 1989. Cadmium kinetics in freshwater clams. Uptake by the exposed gills of *Anodonta anatina*. *Bull. Environ. Toxicol.*, 42: 382-388.
- HOROHOV, J., SILVERMAN, H., LYNN, J. W. & DIETZ, T. H. 1992. Ion transport in the freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*. *Biol. Bull.* 183: 297-303.
- HUFFMAN, J. E. & TRIPP, M. R. , 1982. Cell types and hydrolytic enzymes of soft shell clam (*Mya arenaria*) hemocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 40: 68-74.
- HUMASON, G. L. 1979. Animal tissue techniques. 4 th ed. Freeman, San Francisco. 661p.
- HUNTER, R. D. & BAILEY, J. F. 1992. *Dreissena polymorpha* (Zebra mussel): Colonization of soft substrata and some effects on unionid bivalves. *The Nautilus*, 106: 60-67.
- JEANJEAN, A. 1989. Evaluation de la capacité bioindicatrice de *Dreissena polymorpha* vis-à-vis des PCB et pesticides organochlorés. 64p. Mem. D. E. A. : Toxicol.: Metz.
- JEANTET, A. Y., BALLAN-DUFRAICAIS, C. & MARTIN, J. L. 1985. Recherche des mécanismes de détoxification du cadmium par l'huître *Crassostrea gigas* (mollusque, bivalve). II. Sites intracellulaires d'accumulation du métal dans les organes absorbants et excréteurs. *C. R. Acad. Sc. Paris*, III. 301: 177-182.
- JENNER, H. A. & JANSSEN-MOMMEN, P. M. 1993. Monitoring and control of *Dreissena polymorpha* and other macrofouling bivalves in the Netherlands. In : Zebra mussels: biology, impacts and control. pp. 537-554. Napela, T. F., Schloesser, D. W. (eds.), Boca Raton: Lewis Publication.
- KANWAR, Y. S. & FARQUHAR, M. G. 1979. Anionic sites in the glomerular basement membrane. *In vivo* and *in vitro* localization to the laminae rarae by cationic probes. *J. Cell. Biol.*, 81: 137-153.
- KARBE, L., ATONACOPOULOS, N. & SCHNIER, C., 1975. The influence of water quality on the accumulation of heavy metals in aquatic organisms. *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 19: 2094-2101.
- KATO, K. 1960. Excretion of the Keber's organ in some lamellibranchs. *Sci. Rep. Saitama Univ.*, Ser. B 3: 233-244.
- KEBER, G. A. F. 1851. *Beiträge zur anatomic und physiologie der Weichtiere*. Königsberg.
- KELLER, J. M., CHERRORET, G., COLIN, S., DURAND, I. DAUCA, M. & LEHR, P. R. 1992. Evaluation of the elements in the intestinal epithelial cells of rat during development : An X-Ray microanalysis study. *Eur. Arch. Biol.*, 103: 187-193.
- KHAN, H. R., ASHTON, M. L. & SALEUDDIN, A. S. M. 1986. Fine structure of the kidneys of osmotically stressed *Mytilus*, *Mercenaria* and *Anodonta*. *Can. J. Zool.* 64: 2779-2787.
- KHAN, H., ASHTON, M. L. & SALEUDIN, A. S. M. 1988. A study on the cytoplasmic granules of the pericardial gland cells of some bivalve molluscs. *Tissue & Cell*, 20: 587-597.

- KOLLER, L. D. 1980. Immunotoxicology of heavy metals. *J. Immunopharmac.*, 2: 269-279.
- KOLLER, L. D. & ROAN, J. G. 1977. Effects of lead and cadmium on mouse peritoneal macrophages. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 21(1): 7-12.
- KONDO, M., MATSUYAMA, H. & YANO, T. 1992. The opsonic effect lectin on phagocytosis by hemocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Gyobyō Kenkyū*, 27: 217.
- KRAAK, M. H. S., LAVY, D., PEETERS, W. H. M. & DAVIDS, C. 1992. Chronic ecotoxicity of copper and cadmium to the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 363-369.
- KRAAK, M. H. S., LAVY, D., TOUSSAINT, M., SCHOON, H., PEETERS, W. H. M. & DAVIDS, C. 1993. Toxicity of heavy metals to the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). In : Zebra mussels: biology, impacts and control. pp. 491-502. Napela, T. F., Schloesser, D. W. (eds.), Boca Raton: Lewis Publication.
- KRAAK, M. S. H., SCHOLTEN, M. C. T., PEETERS, W. H. M. & de KOCK, W. C. 1991. Biomonitoring of heavy metals in the western European rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environ. Poll.*, 74: 101-114.
- KROSCHINSKI, J. & RENWRANTZ, L. 1988. Determination of pH values inside the digestive vacuoles hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.*, 51: 73-79.
- KUMAZAWA, N. H. & MORIMOTO, N. 1992a. Chemotactic activity of hemocytes derived from two marine neritid gastropod molluscs, *Nerita albicilla* and *Heminerita japonica*, to *Vibrio papahaemolyticus* and *Escherichia coli* strains. *J. Vet. Med. Sci.*, 54: 243-247.
- KUMAZAWA, N. H. & MORIMOTO, N. 1992b. Chemotactic activity of hemocytes derived from a brackish-water clam, *Corbicula japonica*, to *Vibrio papahaemolyticus* and *Escherichia coli* strains. *J. Vet. Med. Sci.*, 54: 851-855.
- LE GALL, G., BACHERE, E. & MIAHLE, E. 1991. Chemiluminescence analysis of the activity of *Pecten maximus* hemocytes stimulating with zymosan and host-specific Rickettsiales-like organisms. *Dis. Aquat. Org.*, 11: 181-186.
- LEGLIZE, L. & CROCHARD, C., 1987. Vérification expérimentale du choix de *Dreissena polymorpha* Pallas (lamellibranche) comme bioindicateur de contamination métallique. *Nat. Can. (Rev. Ecol. Syst.)*, 114: 315-323.
- LEIPPE, M. & RENWRANTZ, L. 1988. Release of cytotoxic and agglutinating molecules by *Mytilus edulis*. *Dev. Comp. Immunol.*, 12: 297-308.
- LOBEL, P. B. 1987a. Intersite, intrasite and inherent variability of the whole soft tissue zinc concentrations of individual mussels *Mytilus edulis*: importance of the kidney. *Mar. Environ. Res.*, 21: 59-71.
- LOBEL, P. B. 1987b. Short term and long term uptake of zinc by the mussel, *Mytilus edulis*: a study in individual variability. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 16: 723-732.
- LOBEL, P. B. & MARSHALL, H. D. 1988. A unique low molecular weight zinc binding ligand in the kidney cytosol of the mussel *Mytilus edulis*, and its relationship to the inherent variability of zinc accumulation in this organism. *Mar. Biol.*, 99: 101-105.
- LOWE, D. M., MOORE, M. N. & CLARKE, R. 1981. Effects of oil on digestive cells in mussels: quantitative alterations in cellular and lysosomal structure. *Aquatic toxicology*, 1: 213-226.
- MAAROUF, A. 1988. Etude expérimentale de la bioaccumulation et du relargage du zinc chez *Dreissena polymorpha* (bivalve d'eau douce): Cinétique et mécanisme de contamination et de décontamination. 298p. Th. Doct. Sciences de la vie, Ecotoxicologie: Metz.
- MACKIE, G. L. 1991. Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in lake St Clair. *Hydrobiologia*, 219: 251-268.



- MARCAILLOU, C. & MARTOJA, M. 1990. Capture de macromolécules par les cellules péricardiques et rénales de la moule, *Mytilus edulis* (L.). *Can. J. Zool.*, **68**: 1866-1872.
- MARIGOMEZ, J. A., VEGA, M. M., CAJARAVILLE, M. P. & ANGULO, E., 1989. Quantitative responses of the digestive-lysosomal system of winkles to sublethal concentrations of cadmium. *Cell. Mol. Biol.*, **35**: 555-562.
- MARSHALL, A. T. & 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, A. W. 1983. Excretion. In: A. S. M. Saleudin & K. M. Wilbur (eds.), *The Mollusca*, vol. 5, *Physiology*, Part 2, pp. 353-405. Academic Press, New York.
- MARTOJA, R., BALLAN-DUFRANCAIS, C., JEANTET, A. Y. & COULON, J. 1988a. Influence de la composition chimique de l'environnement sur le bivalve *Abra alba*. étude comparative d'animaux récoltés dans des milieux naturels et d'animaux contaminés expérimentalement par l'effluent industriel. *Ann. Inst. Océanogr. Paris*, **64**: 1-24.
- MARTOJA, R., BALLAN-DUFRANCAIS, C., JEANTET, A. Y., GOUZERH, P., AMIARD, J. C., AMIARD -TRIQUET, C., BERTHET, B. & BAUD, J. P. 1988b. Effets chimiques et histologiques de la contamination de l'huître *Crassostrea virginica* Thunberg par l'argent administré sous forme dissoute et par voie alimentaire. *J. Can. Sci. Haieut. Aquat.*, **45**: 1827-1841.
- MARTOJA, R. & MARTIN, J. L. 1985. Recherche des mécanismes de détoxification du cadmium par l'huître *Crassostrea gigas* (mollusque, bivalve). I. Mise en évidence du métal dans les amœbocytes à zinc et à cuivre. *C. R. Acad. Sc. Paris*, III. **300**: 549-554.
- MARTOJA, M & TRUCHET, M. 1991. Etude histo analytique de l'intoxication par l'argent chez deux mollusques d'eau douce, *Dreissena polymorpha* et *Viviparus viviparus*. *Vie Milieu*, **41**: 21-28.
- MARTOJA, M., TRUCHET, M. & BERTHET, B. 1989. Effets de la contamination expérimentale par l'argent chez *Chlamys varia* L. (Bivalve, pectinidé). Données quantitatives, histologiques et microanalytiques. *Ann. Inst. océanogr.*, **65**: 1-13.
- MAURI, M. 1985. Les mollusques bivalves marins comme bioindicateur pour les métaux lourds. *Symbioses*, **17**: 89-98.
- MAURI, M. & ORLANDO, E. 1982. Experimental study on renal concretions in the wedge shell *Donax trunculatus* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **36**: 47-57.
- MCCORMICK-RAY, M. G. & HOWARD, T. , 1991. Morphology and mobility of oyster hemocytes: evidence for seasonal variations. *J. Invertebr. Pathol.*, **58**: 219-230.
- MERSCH, J. 1993. Modalités d'utilisation de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* en tant qu'indicateur biologique de la contamination des écosystèmes aquatiques par les métaux lourds. Comparaison avec un autre type d'organisme sentinelle: les mousses aquatiques. 210 p. Th. Doct. Sciences de la vie, Ecotoxicologie: Metz.
- MERSCH, J., JEANJEAN, A., SPOR, H. & PIHAN, J. C., 1992. The freshwater mussel *Dreissena polymorpha* as a bioindicator for trace metals, organochlorines and radionuclides. *Limnol. Aktuell.*, **14**: 227-244.
- MEYHOFER, E. & MORSE, M. P. 1986. Structural and physiological properties of the bivalve ultrafiltration barrier. *Am. Zool.*, **26**: 131A.
- MEYHOFER, E., MORSE, M. P. & ROBINSON, W. E. 1983. Functional aspects of the heart kidney complex of *Mercenaria mercenaria* with reference to heavy metal pollution. *Am. Soc. Zool.*, **23**: 1024.
- MEYHOFER, E., MORSE, M. P. & ROBINSON, W. E. 1985. Podocytes in bivalve molluscs: Morphological evidence for ultrafiltration. *J. Comp. Physiol. B*, **156**: 151-161.
- MIKSYS, S. L. & SALEUDDIN, A. S. M. 1987. Ferritin in mantle pore cells and its role in reproduction of *Helisoma duryi* (Mollusca: pulmonata). *J. exp. Zool.*, **242**: 75-83.

- MILLER, W. L., BLAKE, N. J. & BYRNE, R. H. 1985. Uptake of Zn<sup>65</sup> and Mn<sup>54</sup> into body tissues and renal concretions by the southern quahog, *Mercenaria campechiensis* (Gmelin): Effects of elevated phosphate and metal concentrations. *Mar. Environ. Res.*, 17: 167-171.
- MIX, M. C. 1976. A general model for leucocyte cell renewal in bivalve mollusks. *Marine Fisheries Review*, 38 (10): 37-41.
- MOHANDAS, A. 1986. An electron microscope study of endocytosis mechanisms and subsequent events in *Mercenaria mercenaria* granulocytes. In: Comparative Pathobiology, Parasitic and related diseases. Basic mechanisms, manifestations and control. Cheng, T. C. (ed.), Plenum Press, New York, London. 8: 143-162.
- MOHANDAS, A. & CHENG, T. C. 1985. An electron microscope study of the structure of lysosomes released from *Mercenaria mercenaria* granulocytes. *J. Invertebr. Pathol.*, 46: 332-334.
- MOHANDAS, A., CHENG, T. C. & CHENG, J. B. 1985. Mechanism of lysosomal enzyme release from *Mercenaria mercenaria* granulocytes: a scanning electron microscope study. *J. Invertebr. Pathol.*, 46: 189-197.
- MOORE, C. A. & EBLE, A. F., 1977. Cytochemical aspects of *Mercenaria mercenaria* hemocytes. *Biol. Bull.*, 152: 105-119.
- MOORE, C. A. & GELDER, S. R. 1985. Demonstration of lysosomal enzymes in hemocytes of *Mercenaria mercenaria* (mollusca: bivalvia). *Trans. Am. Microsc. Soc.*, 104(3): 242-249.
- MOORE, M. N. 1977. Lysosomal responses to environmental chemicals in some maine invertebrates. In: Pollutant effects on marine organisms. Giam, C. S. Texas A & M University (ed.). Lexington Books, D. C. Heath and compagny Lexington, Massachusetts Toronto. pp. 143-154.
- MOORE, M. N. 1985. Cellular responses to pollutants. *Mar. Pollut. Bull.* 16: 134-139.
- MOORE, M. N., BUBEL, A. & LOWE, D. M. 1980. Cytology and cytochemistry of the pericardial gland cells of *Mytilus edulis* and their lysosomal responses to injected horseradish peroxidase and anthracene. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, 60: 135-149.
- MOORE, M. N. & LOWE, D. M. , 1977. The cytology and cytochemistry of the hemocytes of *Mytilus edulis* and their responses to experimentally injected carbon particles. *J. Invertebr. Pathol.*, 29: 18-30.
- MOORE, M. N. PIPE, R. K. & FARRAR, S. V. 1982. Lysosomal and microsomal responses to environmental factors in *Littorina littorea* from Sullom Voe. *Mar. Pollut. Bull.*, 13: 340-345.
- MORSE, M. P., MEYHOFER, E. & ROBINSON, W. E. 1985. Accumulation of <sup>109</sup>Cadmium in extracellular granules in the kidney of the bivalves mollusc *Mercenaria mercenaria* (L.). *Mar. Environ. Res.*, 17: 172-175.
- MORSE, P. 1987. Comparative functional morphology of the bivalve excretory system. *Amer. Zool.*, 17: 737-746.
- MORTON, B. 1969a. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. II. Correlation of the rythms of adductor activity, feeding, digestion and excretion. *Proc. Malac. Soc. Lond.*, 38: 401-414.
- MORTON, B. 1969b. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pall. I. General anatomy and morphology. *Proc. Malac. Soc. Lond.*, 38: 301-320.
- MORTON, B. 1969c. Studies on the biology of *Dreissena polymorpha* Pallas. III. Population dynamics. *Proc. Maloc. Soc. Lond.* 38: 417-482.
- MORTON, B. 1983. Feeding and digestion in bivalvia. In: *The mollusca*, vol. 5, *Physiology*, part 2. pp. 65-142. Saleudin A. S. M. & Wilbur K.M (eds.). Academic Press, Inc. London.
- MORTON, B. 1993. The anatomy of *Dreissena polymorpha* and the evolution and success of the heteromyarian form in the Dreissenoidae. In : Zebra mussels: biology, impacts and control. pp. 185-215. Napela, T. F., Schloesser, D. W. (eds.), Boca Raton: Lewis Publication.

- MOUABAD, A. 1991. Toxicité comportementale et physiologique (filtration, respiration) des métaux lourds (Cu, Zn, Hg, Cd et Pb) chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* Pallas. 275 p. Th. doct. : Sci. vie, Ecotoxicol. : Metz.
- MOURTON, C., BOULO, V., CHARGOT, D., HERVIO, D., BACHERE, E., MIAHLE, E. & GRIZEL, H. 1992. Interactions between *Bonemia ostrea* (Protozoa: Ascetospora) and hemocytes of *Ostrea edulis* and *Crassostrea gigas* (Mollusca: Bivalvia): *in vitro* system establishment. *J. Invertebr. Pathol.*, **59**: 235-240.
- MUGEL, M & FERARD, J. F. 1978. Elaboration d'un modèle de chaîne trophique dulçaquicole et application à une étude écotoxicologique du cadmium. Th. 3e cycle. Metz.
- MULLAINADHAN, P. & RENWRANTZ, L. 1986. Lectin-dependent recognition of foreign cells by hemocytes of the mussel, *Mytilus edulis*. *Immunobiol.*, **171**: 263-273.
- NARAIN, A. S. 1973. The amoebocytes of lamellibranch molluscs, with special reference to the circulating amoebocytes. *Malacol. Rev.*, **6**: 1-12.
- NIGRO, M., ORLANDO, E. & REGOLI, F. 1992. Ultrastructural localization of metal binding sites in the kidney of the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*. *Mar. Biol.*, **113**: 637-643.
- NOLA, C. V. & DULE, E. J. 1983. Cadmium accumulation and toxicity in *Mytilus edulis*: involvement of metallothioneins and heavy molecular weight protein. *Aquatic Toxicol.*, **4**: 153-163.
- OLAFSEN, J. A. 1988. Role of lectins in invertebrates humoral defense. *In: Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society, Special Publication, **18**: 189-205.
- OLAFSEN, J. A., FLETCHER, T. C. & GRANT, P. T. 1992. Agglutin activity in pacific oyster (*Crassostrea gigas*) hemolymph following *in vivo* *Vibrio anguillarum* challenge. *Dev. Comp. Immunol.*, **16**: 123-138.
- OTTAVIANI, E. 1986. Internal defense mechanisms of the hemolymph of the freshwater snail *Planorbarius comeus* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Lavori S. I. M.*, **22**: 157-162.
- OTTAVIANI, E. 1988. Immunocytochemical study of agglutin synthesis in the haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius comeus* (L.) (Gastropoda: Pulmonata). *Bool. Zool.*, **55**: 27-29.
- OTTAVIANI, E. & FRANCHINI, A. 1988. Ultrastructural study of haemocytes of the freshwater snail *Planorbarius comeus* (L.) (Gastropoda, Pulmonata). *Acta Zoologica*, **69** (3): 157-162.
- PERTOLDI, M., FAVRETTO, G. & FAVRETTO, L. 1979. Pollution of mussel by particulate lead from sea water. *Z. Lebensm. Vinters. Forsch.*, **168**: 181-184.
- PHILLIPS, D. J. H. 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. A review. *Environ. Pollut.*, **13**: 281-317.
- PICKWELL, G. V. & STEINERT, S. A. 1984. Serum biochemical and cellular responses to experimental cupric ion challenge in mussels. *Mar. Environ. Res.*, **14**: 245-265.
- PICKWELL, G. V. & STEINERT, S. A. 1988. Accumulation and effects of organotin compounds in oysters and mussels: correlation with serum biochemical and cytological factors and tissue burdens. *Mar. Environ. Res.*, **24**: 215-218.
- PIHAN, J. C., CROCHARD, C., BENYAHIA, M., GIAMBERINI, L., MAAROUF, A., MOUABAD, A. & TOURMAN, J. L. 1988. Etude écotoxicologique *in vitro* du zinc et du plomb chez le mollusque d'eau douce *Dreissena polymorpha* Pallas (Cinétiques d'accumulation et de relargage. Voies de pénétration, excrétion. Incidence sur l'activité respiratoire et filtrante, microanalyse). *In: Deuxième Conférence Internationale des Limnologues d'Expression Française (CILEF)*. Aussois, France.

- PIPE, R. K., 1990. Differential binding of lectins to haemocytes of the mussel *Mytilus edulis*. *Cell. Tissue. Res.*, **261**: 261-268.
- PIRIE, B. J. S. & GEORGE, S. G. 1979. Ultrastructure of the heart and excretory system of *Mytilus edulis*. *J. mar. biol. Ass. U. K.*, **59**: 819-829.
- PIRIE, B. J. S., GEORGE, S. G., LYTTON, D. G. & 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.
- PODER, M., 1980. Les réactions hémocytaires inflammatoires et tumorales chez *Ostrea edulis* (L.) Essai de classification des hémocytes des bivalves marins. 144p. Th. doct. : Océanographie, Biologie: Brest.
- PULLEN, J. S. H. & RAINBOW, P. S. 1991. The composition of pyrophosphate heavy metal detoxification granules in barnacles. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, **150**: 249-266.
- PYNNONEN, K., HOLWERDA, D. A. & ZANDEE, D. I. 1987. Occurrence of calcium concretions in various tissues of freshwater mussels, and their capacity for cadmium sequestration. *Aquatic toxicol.*, **10**: 101-114.
- RAINBOW, P. S., PHILLIPS, D. J. H. & DEPLEDGE, M. H. 1990. The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates. A need for laboratory investigation of accumulation strategies. *Mar. Poll. Bull.*, **21**(7): 321-324.
- RAMCHARAN, C. W., PADILLA, D. K. & DODSON, S. I. 1992. Models to predict potential occurrence and density of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **49**: 2611-2620.
- RASMUSSEN, L. P. D., HAGE, E. & KARLOG, O., 1985. An electron microscope study of the circulating leucocytes of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *J. Invertebr. Pathol.*, **45**: 158-167.
- READE, P. & READE, E. 1976. Phagocytosis in invertebrates: studies on the hemocytes of the clam *Tridacna maxima*. *J. Invertebr. Pathol.*, **28**: 281-290.
- REGOLI, F. 1992. Lysosomal responses as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **83**: 63-69.
- REINCKE, H. 1992. Biological effect monitoring in the river Elbe using the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Limnologie aktuell*, **4**: 185-195.
- RENWRANTZ, L. 1986. Lectins in molluscs and arthropods: their occurrence, origin and roles in immunity. *Symp. zool. Soc. Lond.*, **56**: 81-93.
- RENWRANTZ, L., STAHLER, A. 1983. Opsonizing properties of an isolated hemolymph agglutinin and demonstration of lectin-like recognition molecules at the surface of hemocytes from *Mytilus edulis*. *J. Comp. Physiol.*, **149**: 535-546.
- RENWRANTZ, L., YOSHINO, T., CHENG, T. C. & AULD, K. 1979. Size determination of hemocytes from the american oyster, *Crassostrea virginica*, and the description of a phagocytosis mechanism. *Zool. Jb. Physiol.*, **83**: 1-12.
- REYNOLDS, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *J. Cell. Biol.*, **17**: 208-212.
- ROBINSON, W. E., MORSE, M. P., PENNEY, B. A., KAKAREKA, J. P. & MEYHOFER, E. U. 1985. The eulamellibranch *Mercenaria mercenaria* (L.): A review and current data on metals accumulation and the internal transport of cadmium. In: *Marine pollution and physiology: Recent advances*. F. J. Vernberg, F. P. Thunberg, A. Calabrese, & W. B. Vernberg (eds.), pp. 83-106. Univ. South Carolina Press, Columbia, S. C.
- ROBINSON, W. E. & RYAN, D. K. 1986. Metal interactions within the kidney, gill, and digestive gland of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*, following exposure to cadmium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **15**: 23-30.
- RODRICK, G. E. & ULRICH, S. A. 1984. Microscopical studies on the hemocytes of bivalves and their phagocytic interaction with selected bacteria. *Helgoländer Meeresunters.*, **37**: 167-176.
- ROESJADI, G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquatic Toxicol.*, **22**: 81-114.

- ROESJADI, G. & UNGER, M. E. 1993. Cadmium uptake in gills of the mollusc *Crassostrea virginica* and inhibition by calcium channel blockers. *Aquatic Toxicol.*, 24: 195-206.
- RUDELL, C. L. 1971a. The fine structure of oyster agranular amebocytes from regenerating mantle wounds in the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.*, 18: 260-268.
- RUDELL, C. L. 1971b. The fine structure of the granular amebocytes of the pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J. Invertebr. Pathol.*, 18: 269-275.
- RUDELL, C. L. 1971c. Elucidation of the nature and function of the granular oyster amebocytes through histochemical studies of normal and traumatized oyster tissues. *Histochemie*, 26: 98-112.
- RUDELL, C. L. & RAINS, D. W. 1975. The relationship between zinc, copper and the basophils of two crassostreid oysters, *C. gigas* and *C. virginica*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 51: 585-591.
- SCHULZ-BALDES, M. 1974. Lead uptake from seawater and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, 25: 177-193.
- SCHULZ-BALDES, M. 1977. Lead transport in the common mussel *Mytilus edulis*. In: "Physiology and Behavior of Marine Organisms". Mc Lusky, D. S. & Berry, A. J. (eds), pp.211-219. Pergamon Press, Oxford.
- SECCHI, F. & MARTOJA, M. 1986. Existence de populations uricotéliques chez *Abra alba* et *Dreissena polymorpha* (Bivalves Eulamellibranches). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 43: 2504-2508.
- SEILER, G. R. & MORSE, P. , 1988. Kidney and hemocytes of *Mya arenaria* (Bivalvia): Normal and pollution-related ultrastructural morphologies. *J. Invertebr. Pathol.*, 52: 201-214.
- SIMKISS, K. 1979. Metal ions in cells. *Endeavour*, 3: 2-6.
- SIMKISS, K. 1982. Metal detoxification and bioaccumulation in molluscs. *Mar. Biol. Lett.*, 3: 187-201.
- SIMKISS, K. & MASON, A. Z., 1983. Metal ions : Metabolic and toxic effects. In: P. W. Hochachka (ed.), *The Mollusca*, Vol. 2, *Environmental Biochemistry and Physiology*, pp. 102-156 .Academic Press, New York.
- SIMKISS, K. & MASON, A. Z. 1984. Cellular responses of molluscan tissues to environmental metals. *Mar. Environ. Res.*, 14: 103-118.
- SMINIA, T. & BARENSEN, L. 1980. A comparative morphological and enzyme histochemical study on blood cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis*, *Biomphalaria glabrata* and *Bulinus truncatus*. *J. Morph.*, 165: 31-39.
- SMINIA, T. & VAN DER KNAAP, W. P. W. 1986. Immunorecognition in invertebrates with special reference to molluscs. In: *Immunity in invertebrates*. Brehelin, M. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. pp 112-124.
- SMINIA, T. & VAN DER KNAAP, W. P. W. 1987b. The forgotten creatures: immunity in invertebrates. *Dev. Comp. Immunol.*, : 157-162.
- SMINIA, T., VAN DER KNAAP, W. P. W. 1987a. Cells and molecules in molluscan immunology. *Dev. Comp. Immunol.*, 11: 17-28.
- SMIT, H., BIJ DE VAATE, A. & FIOOLE, A. 1992. Shell growth of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha* (Pallas)) in relation to selected physicochemical parameters in the lower Rhine and some associated lakes. *Arch. Hydrobiol.*, 124(3): 257-280.
- SMOLOWITZ, R. M., MIOSKY, D. & REINISCH, C. L. 1989. Ontogeny of leukemic cells of the soft shell clam. *J. Invertebr. Pathol.*, 53: 41-51.
- SPARKS, A. K., MORADO, J. F. 1988. Inflammation and wound repair in bivalve molluscs. In: *Disease processes in marine bivalve molluscs*. American Fisheries Society, Special Publication, 18: 139-152.
- SPOR, H. 1989. Etude des modalités de la contamination du mollusque *Dreissena polymorpha* par le cobalt 60. 48 p. Mem. D. E. A. : Toxicol.: Metz.

- SPRUNG, M & ROSE, U. 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia*, **77**: 526-532.
- STEINERT, S. A. & PICKWELL, G. V. 1984. Quantitative determination of lysozyme in the hemolymph of *Mytilus edulis* by the enzyme linked immunosorbent assay (elisa). *Mar. Environ. Res.*, **14**: 229-243.
- STERNLEIB, I. & GOLDFISCHER, S. 1976. Heavy metals and lysosomes. In: *Lysosomes in biology and pathology*, Vol. 5. pp. 185-200. Dingle, J. T. & Dean, R. T. (eds.). American Elsevier publishing Company, New York.
- SULLIVAN, P. A., ROBINSON, W. E. & MORSE, M. P. 1988. Isolation and characterization of granules from the kidney of the bivalve *Mercenaria mercenaria*. *Mar. Biol.*, **99**: 359-368.
- SUMI, Y., FUKUOKA, H. R., MURAKAMI, T., SUZUKI, T., HATAKEYMA, S. & SUZUKI, K. Y. 1991. Histochemical localization of Cu, Fe, Zn in the larvae of the Mayfly *Baetis thermicus* inhabiting river polluted with heavy metals. *Zoological Sciences*, **8**: 287-293.
- SURESH, K. & MOHANDAS, A. 1990a. Hemolymph acid phosphatase activity pattern in copper-stressed bivalves. *J. Invertebr. Pathol.*, **55**: 118-125.
- SURESH, K. & MOHANDAS, A. 1990b. Effect of sublethal concentrations of copper on hemocyte number in bivalves. *J. Invertebr. Pathol.*, **55**: 325-331.
- SUZUKI, T. 1985. Comparative anatomy of the excretory organs and heart of bivalves-subclasses Pterimorphia, Paleoheterodonta and Heterodonta. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, **7**: 59-82.
- SUZUKI, T. 1986. Ultrastructural and biochemical study on the excretory system of the freshwater bivalve, *Anodonta (S.) calipygos*. *Bull. Natl. Res. Inst. Aquaculture*, **10**: 33-52.
- SUZUKI, T. 1988. Ultrastructure of the excretory organs and urinary component of the marine bivalve, *Atrina (S.) pectinata*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **90A**: 79-83.
- TABATA, M., KOBAYASHI, Y., NAKAJIMA, A. & SUZUKI, S. 1991. Evaluation of pollutant toxicity in aquatic environment by assay of enzymes released from lysosomes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **45**: 31-38.
- TEN WINKEL, E. H. & DAVIDS, C. 1982. Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas (Mollusca: bivalvia). *Freshwater Biology.*, **12**: 553-558.
- THOMSON, J. D., PIRIE, B. J. S., & GEORGE, S. G. 1985. Cellular metal distribution in the pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thun.) determined by quantitative X-ray microprobe analysis. *J. Mar. Biol. Ecol.*, **85**: 37-45.
- TIFFANY, W. J. 1974. Ultrastructural evidence for reabsorption in the nephridium of the bivalved mollusc *Mercenaria campechiensis*. *Trans. Amer. Micros. Soc.*, **93**: 23-28.
- TOURARI, A. 1988. Effets de l'échauffement des eaux sur le cycle de reproduction de la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* (bivalve : Dreissenidae). Etude "in situ" et en laboratoire: aspects histologiques, histochimiques et biochimiques. 193p. Th. doct. : Sci. vie, Ecotoxicol. : Metz.
- TRIPP, M. R. 1992a. Phagocytosis by hemocytes of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, **59**: 222-227.
- TRIPP, M. R. 1992b. Agglutinins in the hemolymph of the hard clam, *Mercenaria mercenaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, **59**: 228-234.
- TRUSCOTT, R. & WHITE, K. N. 1990. The influence of metal and temperature stress on the immune system of crabs. *Functional Ecology*, **4**: 455-461.
- TUAN, T.L. & YOSHINO, T.P. 1987. Role of divalent cations in plasma opsonin-dependent and independent erythrophagocytosis by hemocytes of the asian clam, *Corbicula fluminae*. *J. Invertebr. Pathol.*, **50**: 310-319.
- UNIVERSITE DE METZ. Laboratoire d'écologie, 1985. Partie I: Estimation du degré de pollution métallique de l'eau, des matières en suspension et des sédiments de l'Orne, affluent de la Moselle. Ministère de l'environnement, convention n° 81370.

- UNIVERSITE DE METZ. Laboratoire d'écologie, 1985. Partie II: Estimation du degré de pollution métallique de l'eau, des matières en suspension et des sédiments du secteur aval de la rivière Moselle. Ministère de l'environnement, convention n° 81370.
- VASTA, G. R., SULLIVAN, J. T., CHENG, T. C., MARCHANLONIS, J. J. & WARR, G. W. 1982. A cell membrane-associated lectin of the oyster hemocyte. *J. Invertebr. Pathol.*, **40**: 367-377.
- VIARENGO, A. 1985. Biochemical effects of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.*, **16**: 153-158.
- VIARENGO, A. & CANESI, L., 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, **94**: 225-243.
- VIARENGO, A., MOORE, M. N., MANCINELLI, G., MAZZUCOTELLI, A., PIPE, R. K. & FARRAR, S. V. 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar. Biol.*, **94**: 251-257.
- VIARENGO, A., ZANICCHI, G., MOORE, M. N. & 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. *Aquatic Toxicol.*, **1**: 147-157.
- VOGEL, G. 1981. Recognition mechanisms in phagocytosis in *Dictyostelium discoideum*. *Monogr. Allergy*, **17**: 1-11.
- WALZ, N. 1978. The energy balance of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* Pallas in laboratory experiments and in lake Constance. *Arch. Hydrobiol.*, **1**: 83-105.
- WHITE, K. M. 1942. The pericardial cavity and the pericardial gland of the lamellibranchia. *Proceedings of the Malacological Society of London*, **25**: 37-88.
- WITTKER, M. & RENWRANTZ, L. 1984. Quantification of cytotoxicity assay in agar. *J. Invertebr. Pathol.*, **43**: 248-253.
- YANG, R. & YOSHINO, T.P. 1990a. Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminae*. I. Electrophoretic and immunologic analyses of opsonic plasma components. *Dev. Comp. Immunol.*, **14**: 385-395.
- YANG, R. & YOSHINO, T.P. 1990b. Immunorecognition in the freshwater bivalve, *Corbicula fluminae*. II. Isolation and characterization of a plasma opsonin with hemagglutinating activity. *Dev. Comp. Immunol.*, **14**: 397-404.
- YOSHINO, T.P. 1986. Surface membrane components of circulating invertebrate blood cells and their role in internal defense. *In: Immunity in invertebrates*. pp 12-24. Brehelin, M. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- YOSHINO, T.P. & CHENG, T. C. 1976. Experimentally induced elevation of aminopeptidase activity in hemolymph cells of american oyster, *Crassostrea virginica*. *J. Invertebr. Pathol.*, **27**: 367-370.
- YOSHINO, T. P. & GRANATH, JR, W. O. 1983. Identification of antigenically distinct hemocyte subpopulation in *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) using monoclonal antibodies to surface membrane markers. *Cell. Tissue. Res.*, **232**: 553-564.
- YOSHINO, T.P & TUAN, T.L. 1985. Soluble mediators of cytolytic activity in hemocytes of the asian clam, *Corbicula fluminae*. *Dev. Comp. Immunol.*, **9**: 515-522.
- ZAROOGIAN, G. & YEVICH, P. 1993. Cytology and biochemistry of brown cells in *Crassostrea virginica* collected at clean and contaminated stations. *Environ. Pollut.*, **79**: 191-197.
- ZAROOGIAN, G., YEVICH, P. & PAVIGNANO, S. 1989. The role of the red gland in *Mercenaria mercenaria* in detoxification. *Mar. Environ. Res.*, **28**: 447-450.

## THESE DE L'UNIVERSITE DE METZ

---

**Auteur: Laure GIAMBERINI**

**Année: 1993**

---

### **Titre:**

**Etude des mécanismes de transport et de détoxification des métaux lourds chez le moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Rôle des hémocytes et des organes du système excréteur (Histologie, ultrastructure, microanalyse).**

---

### **Résumé:**

La capacité bioindicatrice des mollusques bivalves vis-à-vis des métaux est actuellement reconnue et utilisée dans le cadre du biomonitoring.

La compréhension de cette capacité nécessitait une étude plus fondamentale des voies d'intoxication, de transport et d'élimination des métaux. Une étude anatomique, cytologique et microanalytique des hémocytes, de la glande péricardiale et des reins a montré le rôle des granulocytes dans le transport puis le rôle de détoxification de la glande péricardiale et des reins. Le système lysosomal joue un rôle important. Le plomb est bioconcentré en association avec P, S, Ca dans les concrétions des cellules du rein distal. La microanalyse a été à ce titre performante.

Une adaptation éventuelle à la présence de micropolluants métalliques a été recherchée par numération des hémocytes, suivi de l'évaluation de l'activité enzymatique et des capacités de phagocytose. Il y a tendance à l'augmentation de nombre total d'hémocytes; augmentation de l'activité phosphatasique acide mais pas de modification significative de l'activité de phagocytose. Les réponses cytochimiques et biochimiques des hémocytes en présence de métaux peuvent être proposées comme méthodes d'évaluation précoce (7 jours) des effets de la contamination des eaux par les métaux; le niveau de bioaccumulation étant évalué par la méthode des transplantations seulement après trois semaines.

---

**Mots clés:** Bivalve, *Dreissena polymorpha*, bioaccumulation, métaux, hémocytes, reins, glande péricardiale.