



HAL
open science

RECHERCHE DE L'ARGENT CHEZ QUELQUES MOLLUSQUES MARINS, DULCICOLES ET TERRESTRES. FORMES CHIMIQUES ET LOCALISATION HISTOLOGIQUE

M Martoja , J M Bouquegneau, M Truchet, R Martoja

► **To cite this version:**

M Martoja , J M Bouquegneau, M Truchet, R Martoja. RECHERCHE DE L'ARGENT CHEZ QUELQUES MOLLUSQUES MARINS, DULCICOLES ET TERRESTRES. FORMES CHIMIQUES ET LOCALISATION HISTOLOGIQUE. *Vie et Milieu / Life & Environment*, 1985, pp.1-13. hal-03021763

HAL Id: hal-03021763

<https://hal.sorbonne-universite.fr/hal-03021763v1>

Submitted on 24 Nov 2020

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.

RECHERCHE DE L'ARGENT CHEZ QUELQUES MOLLUSQUES MARINS, DULCICOLES ET TERRESTRES. FORMES CHIMIQUES ET LOCALISATION HISTOLOGIQUE

*A Survey of silver in some marine,
freshwater and land molluscs.
Chemical forms and
histological localization*

M. MARTOJA⁽¹⁾, J.M. BOUQUEGNEAU⁽²⁾, M. TRUCHET⁽³⁾
et R. MARTOJA⁽³⁾

(1) Institut océanographique,
195, rue Saint-Jacques, 75005 Paris, France

(2) Laboratoire d'Océanologie,
Université de Liège, B 4000 Liège, Sart Tilman, Belgique

(3) Laboratoire d'Histophysiologie fondamentale et appliquée,
Université P. et M. Curie, 12, rue Cuvier, 75005 Paris, France

ARGENT
SULFURE
MÉTALLOPROTEINES
CELLULES À PORES
MOLLUSQUES

RÉSUMÉ. — Le stockage naturel d'argent a été étudié par méthode biochimique dans 2 espèces de Gastéropodes et par microanalyse dans 9 espèces de Gastéropodes et 2 espèces de Bivalves, choisies de manière à constituer un large échantillonnage sur le plan systématique et écologique. Les animaux analysés ont été recueillis dans des régions géographiques diverses, présumées indemnes de pollution. Une accumulation d'argent, non imputable à une altération du milieu, a été reconnue dans plusieurs espèces. Dans les tissus mous, le métal se présente sous au moins deux formes chimiques. La moins importante, du point de vue quantitatif, est vraisemblablement une métalloprotéine, l'autre est du sulfure d'argent, Ag₂S. Ce dernier est inclus dans les lysosomes des « cellules excrétrices du tissu conjonctif » (« pore cells » des Gastéropodes, « brown cells » des Bivalves). Il coexiste avec le sulfure de cuivre dans les espèces à hémocyanine et avec le cadmium dans les espèces qui concentrent cet élément. Le stockage de sulfure d'argent est important dans les espèces marines, *Murex trunculus*, *M. brandaris*, *Littorina littorea*, *Pecten maximus*, faible chez les Gastéropodes terrestres, *Pomatias elegans*, *Cepaea nemoralis*, et nul chez les Gastéropodes dulcicoles, *Bithynia tentaculata*, *Valvata cristata*, *Lymnaea peregra*, *Planorbarius corneus*. Le Bivalve *Crassostrea gigas*, qui n'accumule pas d'argent dans les cellules excrétrices du tissu conjonctif, constitue une exception parmi les formes marines. La précipitation de sulfure d'argent pourrait représenter le terme du catabolisme par désulfhydratation, d'une Ag-protéine naturelle dont la fonction reste à découvrir.

SILVER
SULFIDE
METALLOPROTEINS
PORE CELLS
MOLLUSCA

ABSTRACT. — The natural storage of silver was studied by a biochemical method in two species of gastropods, and by microanalysis in nine species of gastropods and two species of bivalves, all chosen with the goal of providing a wide range of samples, from both a systematic and an ecological point of view. These animals were collected from presumably unpolluted sites. An accumulation of silver, which was not related

to any alteration in the environment, was observed to exist in the tissues in at least two chemical forms : the less abundant form is probably an Ag-protein, whereas the other is silver sulfide. This sulfide is located in the lysosomes of excretory cells of connective tissue (pore cells in gastropods, brown cells in bivalves), together with copper sulfide in the species containing haemocyanin, and cadmium in those accumulating this metal. The storage of silver sulfide is important in marine species *Murex trunculus*, *M. Brandaris*, *Littorina littorea*, *Pecten maximus*, slight in land gastropods *Pomatias elegans*, *Cepaea nemoralis*, undetectable in freshwater gastropods *Bithynia tentaculata*, *Valvata cristata*, *Lymnaea peregra*, *Planorbium corneum*. The bivalve *Crassostrea gigas*, which does not store Ag in the brown cells, is an exception among marine species. The precipitation of silver sulfide could be the last stage in the catabolic process by desulfhydration of a natural Ag-protein, the identity and function of which remain to be discovered.

INTRODUCTION

L'argent, qui n'est pas un constituant universel de la matière vivante, est le plus souvent considéré comme toxique. En effet, chez le Rat, il provoque les mêmes réactions de défense que le mercure et le cadmium, puisqu'il induit la synthèse de métallothionéines (Matuk, 1983) et que le sélénium possède un pouvoir antagoniste (Alexander et Aaseth, 1981). Chez les mollusques également, il peut être complexé par une protéine assez semblable aux métallothionéines de Vertébrés (Marshall et Talbot, 1979) tandis que chez certains Poissons et Crustacés, il diminue certaines activités enzymatiques (voir Calabrese *et al.*, 1977).

La toxicité de l'ion Ag^+ à l'égard des larves d'oursins a été évaluée à 10 fois celle de Hg^{2+} , 20 fois celle de Cu^{2+} et 80 fois celle de Zn^{2+} (Soyer, 1963). Elle est également importante pour les larves de Crustacés (Amiard, 1976), moindre pour celles de Bivalves où elle est égale ou même inférieure à celle du mercure (Calabrese *et al.*, 1973; Martin *et al.*, 1981). Chez les adultes, les principaux effets physiologiques reconnus consistent en un accroissement de la consommation d'oxygène et de l'accumulation de cuivre. Toutefois, le plus remarquable est peut-être que *Crepidula fornicata* et *Mytilus edulis* supportent sans dommage une exposition de deux ans au nitrate d'argent et que les désordres histopathologiques s'y limitent à des dépôts d'argent sur les fibres conjonctives et les basales (Calabrese *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1983; Thurberg *et al.*, 1975).

La possibilité qu'ont les Mollusques de stocker l'argent explique sans doute l'absence d'effets létaux constatés lors d'intoxications à long terme. En effet, certains d'entre eux contiennent des quantités d'argent qui, par référence aux autres groupes zoologiques, paraissent singulièrement élevées. Ainsi, le facteur de concentration, par rapport au milieu, y atteint jusqu'à $1,8 \cdot 10^4$ en valeur globale et beaucoup plus encore dans les organes où l'argent s'accumule de façon préférentielle. Des teneurs de 60 et même 80 $\mu g/g$ (poids sec) ont été signalées dans la glande digestive d'animaux aussi éloignés sur le plan systé-

matique et écologique que les Bivalves *Ostrea sinuata* et *Chlamys opercularis*, le Gastéropode *Haliotis rufescens* et le Céphalopode *Loligo opalescens* (Anderlini, 1974; Brooks et Rumsby, 1965; Bryan, 1973; Martin et Flegal, 1975). L'importance de ces accumulations dépend très probablement de plusieurs facteurs. L'environnement exerce une influence (Anderlini, 1974; Bryan *et al.*, 1983; Flegal, 1980; Folsom et Young, 1965) qui se traduit par des variations géographiques au sein de la même espèce ou par la présence d'un radioisotope. Seuls les tissus mous, à l'exclusion de la coquille sont impliqués dans le stockage de cet argent excédentaire (Graham, 1972; Navrot *et al.*, 1974; Schwimer, 1973). D'autre part, le fait que des espèces voisines, d'origine géographique identique détiennent des quantités d'argent très différentes (Bryan, 1973) suggère l'existence d'une régulation spécifique interne. Cette hypothèse pourrait aussi rendre compte des relations différentes qui s'établissent entre l'argent et d'autres métaux. Ainsi, sa concentration est corrélée à celle du cuivre et du zinc chez *Crassostrea virginica* (Windom et Smith, 1972) et dans le foie de *Loligo opalescens* (Martin et Flegal, 1975). Il n'a pas de rapport avec le zinc mais semble se comporter comme le cuivre chez *Scrobicularia plana* (Bryan et Hummerstone, 1978; Bryan et Uysal, 1978). Enfin, il est indépendant de ce dernier chez les Prosobranches *Haliotis rufescens*, *H. tuberculata* et *Littorina littorea* (Anderlini, 1974; Bryan *et al.*, 1977; Bryan *et al.*, 1983).

Certaines données de biochimie, en particulier la faculté de réactiver des enzymes (Rapoport et Luebering, 1951; Skjeldal *et al.*, 1982) autorisent à imaginer que l'argent pourrait être un élément indispensable pour certains animaux. Selon les résultats de la chimie analytique et de la toxicologie expérimentale, les Mollusques apportent un grand nombre d'arguments à cette thèse. Or, la recherche d'un éventuel rôle métabolique de l'argent suppose l'identification des combinaisons chimiques dans lesquelles le métal est engagé et des types cellulaires où sa signification physiologique peut être établie; la seule localisation actuellement connue concerne des cellules impliquées dans l'absorption (Ballan-Dufrançais

et al., 1982). Nous avons donc entrepris l'étude du stockage naturel de l'argent, chez divers Gastéropodes et Bivalves, en appliquant conjointement les méthodes de l'histologie, de la microanalyse et, lorsque la taille des organes s'y prêtait, du fractionnement chimique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les espèces étudiées et leur provenance géographique sont les suivantes :

a) Gastéropodes

- *Murex trunculus* (L.), Baie de Calvi (Méditerranée)
- *Murex (Bolinus) brandaris* L., Banyuls-sur-mer (Méditerranée)
- *Littorina littorea* (L.), « bigorneau », Roscoff (Manche) et animaux du commerce
- *Valvata cristata* Müller et *Lymnaea peregra* (Müller), « limnée », Léman
- *Bithynia tentaculata* L., rivière Saône (Bourgogne)
- *Planorbarius corneus* (L.), *Pomatias elegans* (Müller) et *Cepaea nemoralis* (L.), forêts de Fontainebleau et de Saint-Germain (Ile de France).

La position systématique de ces espèces et leur habitat sont rappelés dans le tableau V.

b) Bivalves

- *Pecten maximus* L. « coquille Saint-Jacques », Roscoff (Manche) et animaux du commerce.
- *Crassostrea gigas* (Thunberg), « huître creuse », Carantec (Manche) et Bourgneuf (Atlantique). Les Huîtres provenaient de parcs, donc d'un milieu de salinité normale et stable. La taille de leur coquille était comprise entre 4 et 17 cm, ce qui correspond pour ces dernières à un âge de 5 ou 6 ans.

Méthode biochimique

La coquille a été broyée, les tissus mous finement hachés, homogénéisés à l'ULTRA-TURRAX dans trois volumes de saccharose 0.5 M, puis centrifugés à 3 500 g pendant 1 h à 4 °C.

La teneur en Ag du surnageant (nommé Ag de la fraction soluble — Ag (FS)) a été dosée après minéralisation par 0.5 ml d'HNO₃ 14N/ml de surnageant pendant 12 heures.

Le culot obtenu après centrifugation des tissus mous a été divisé en deux lots minéralisés selon la

technique décrite précédemment (Bouquegneau et Martoja, 1982) qui permet de séparer le cuivre fortement lié (sulfure principalement) du cuivre faiblement lié.

Le premier lot, destiné au dosage de l'argent total (Ag (FI)), a subi 24 heures de minéralisation à la température ambiante par un mélange d'HCl 12N et HNO₃ 14N (2 ml/g de tissu). Le second lot, pour le dosage de l'argent faiblement lié (Ag (FL)), a été minéralisé pendant 12 heures à 80 °C par HCl 0,1 N (2 ml/g de tissu). Il faut remarquer que le choix de HCl 0,1 N, qui convient bien à la détermination des divers degrés de complexation du cuivre, n'est pas, dans le cas de l'argent, tout à fait adéquat vu la faible solubilité de AgCl₂ dans ces conditions. Les valeurs trouvées pour l'argent faiblement lié (Ag (FL)) de la fraction insoluble des tissus mous risquent donc d'être légèrement sous-estimées.

La teneur en Ag a été déterminée par spectrophotométrie d'absorption atomique avec flamme (Perkin Elmer 370 A).

Histologie et microanalyse

La fixation des échantillons pour la microscopie photonique, l'analyse par émission X (microsonde CAMECA MS 46) et l'analyse par émission ionique secondaire (analyseur CAMECA SMI 300) a été effectuée par le liquide de Carnoy. Les coupes à la paraffine de 7 µm d'épaisseur ont été colorées au rouge solide-picroindigocarmin pour l'examen topographique; celles destinées à l'analyse par émission X et par émission ionique secondaire (Truchet, 1982) ont été étalées respectivement sur terphane carboné et sur or poli. Les caractères de solubilité des sels minéraux ou complexes métalliques présumés ont été déterminés par traitement des coupes à divers solvants et enzymes protéolytiques (voir chapitre résultats).

Des fragments de tortillon de *Murex brandaris* ont été fixés par le glutaraldéhyde, sans osmification ultérieure, pour examen ultrastructural et l'analyse par émission X sur coupes ultrafines (microsonde CAMECA CAMEBAX).

Les conditions d'analyse sont précisées dans les légendes des figures.

RÉSULTATS

I. *Murex (Bolinus) brandaris* et *Murex trunculus*

1. Teneurs en argent

La concentration en argent dans les *Murex brandaris* analysés en janvier, va de 1 à 3 µg/g (poids

frais) pour l'ensemble des tissus mous et de 3,5 à 18,5 pour la masse viscérale (Tabl. I). Qu'il s'agisse de l'animal entier, du céphalopodium ou de la masse viscérale, elle présente une importante variabilité individuelle et elle n'est pas liée au poids de l'animal. Elle n'est pas non plus corrélée avec la teneur en cuivre, bien que les deux métaux soient surtout abondants dans la masse viscérale.

Tabl. I. — *Murex brandaris* : teneurs en cuivre et argent, exprimées en $\mu\text{g/g}$ (poids frais), chez des animaux autopsiés au mois de janvier.

Murex brandaris : Cu and Ag concentrations ($\mu\text{g/g}$ FW) in animals collected in January.

Poids de l'animal	Animal entier		Céphalopodium		Masse viscérale	
	Ag	Cu	Ag	Cu	Ag	Cu
5,28	1,15	78,28	0,52	5,82	4,24	430,88
7,74	3,09	58,75	0,11	2,33	18,49	350,61
11,83	1,29	88,4	0	9,41	4,35	272,54
15,96	2,41	106,39	0,36	11,76	8,69	396,76
17,02	1,40	100,78	0,10	12,14	4,00	272,14
17,35	1,08	76,32	0	11,73	3,54	220,59

Les analyses de *Murex trunculus* effectuées en octobre et décembre (Tabl. II et III) confirment la variabilité de teneurs en argent et l'absence de relation entre celles-ci et le poids du Mollusque. La variabilité affecte de la même façon l'ensemble des tissus mous ou les organes considérés isolément. Le seul fait constant est que la glande digestive est toujours l'organe le plus riche en métal. Le taux d'argent de la coquille, qui est de l'ordre de $4,7 \mu\text{g/g}$, apparaît, au contraire très stable et indépendant de celui des tissus mous. Enfin, la comparaison entre les analyses d'octobre et de décembre montre une chute de valeurs qui suggère l'existence d'un cycle annuel.

Tabl. II. — *Murex trunculus* : teneurs en argent total et en argent fortement lié, exprimées en $\mu\text{g/g}$ (poids frais) dans la masse viscérale d'animaux autopsiés au mois d'octobre.

Murex trunculus : Total Ag, strongly bound Ag ($\mu\text{g/g}$ FW) and percentage of strongly bound Ag in visceral mass of animals collected in October.

Poids de l'animal	Ag total	%	
		Ag fortement lié	Ag fortement lié
2,2	28	26	93
2,3	25	22	88
2,9	24	18	75
3,1	36	35	97
4,4	22	22	100
5,4	16	14	87
7,1	35	34	97
7,8	21	21	100
8,9	36	34	94
9,4	27	26	96

2. Degré de complexation

Le degré de complexation de l'argent a été recherché chez *Murex trunculus*. Une très faible fraction de l'argent est facilement libérable par hydrolyse acide modérée, alors que l'essentiel, voire la totalité pour certains animaux, n'est extrait que par attaque à l'eau régale (Tabl. II et III). La plus grande partie de l'argent de la fraction insoluble est donc engagée dans une combinaison chimique sous une forme fortement liée (Tabl. III).

3. Localisation histologique de l'argent.

Coexistence du métal avec d'autres éléments

Qu'il s'agisse de *Murex trunculus* ou de *M. brandaris*, l'argent n'a été décelé, par microanalyse X de coupes à la paraffine, que dans les cellules à pores. Des arguments développés plus loin, joints au fait que le métal de la masse viscérale est fortement lié et que la plupart des cellules à pores sont situées dans ce complexe anatomique, prouvent que l'argent

Tabl. III. — *Murex trunculus* : répartition de l'argent entre les différents complexes anatomiques de 7 animaux autopsiés en décembre (teneurs exprimées en $\mu\text{g/g}$, poids sec). Ag (FS) : teneur en Ag de la fraction soluble; Ag (FI) : teneur en Ag de la partie insoluble; % Ag FL : % d'Ag fortement lié de la fraction insoluble.

Murex trunculus : Ag concentrations ($\mu\text{g/g}$ FW) in different « organs » of seven animals collected in December. Ag (FS) : Ag concentrations in the soluble fraction; Ag (FI) : Ag concentrations in the insoluble fraction; % Ag FL : percentage of strongly bound Ag in the insoluble fraction.

Organes	Ag (FS)			Ag (FI)			% Ag FL			Ag (FS)			Ag (FI)			% Ag FL					
	Ag (FS)	Ag (FI)	% Ag FL	Ag (FS)	Ag (FI)	% Ag FL	Ag (FS)	Ag (FI)	% Ag FL	Ag (FS)	Ag (FI)	% Ag FL	Ag (FS)	Ag (FI)	% Ag FL	Ag (FS)	Ag (FI)	% Ag FL			
Glande digestive	0,07	4,60	98	0,40	3,19	91	0,78	5,25	93	0,00	7,51	95	0,82	5,57	98	0,29	12,81	100	1,06	23,54	99
Rein	0,03	0,20	25	0,00	0,33	88	0,00	0,17	100				0,16	0,84	95	0,00	0,98	100	0,00	1,37	100
Complexe palléal	0,00	0,00		0,00	0,00		0,16	0,01	100	0,11	1,28	89	0,04	2,29	89	0,00	0,00		0,00	0,60	97
Céphalopodium	0,02	0,16	44	0,00	0,00		0,06	0,09	22	0,06	0,35	100	0,08	0,13	54	0,00	0,40	100	0,13	0,53	96
Tissus mous		1,00			1,10			0,47			2,21			1,86			2,39				5,61
Coquille		4,30			5,15			4,77			4,98			4,56			4,56				4,60
Sexe		?			♂			♂			♂			♀			♀				♀

ainsi mis en évidence correspond à la fraction fortement liée.

Dans ces cellules, l'argent coexiste avec le composé minéral majeur qui est le sulfure de cuivre (Martoja *et al.*, 1980). Les signaux argent, en spectrographie des rayons X ou en analyse ionique, sont toujours beaucoup plus faibles que ceux du cuivre (Fig. 1). Il existe même, pour la première méthode, des cellules où l'argent est indétectable alors que le cuivre l'est toujours. Ce sont également les cellules à pores qui accumulent une partie du cadmium naturel (Martoja *et al.*, 1984).

4. Forme chimique de l'argent des cellules à pores

L'éventualité d'une complexation de l'argent par un pigment, mélanine ou omochrome (Martoja et Truchet, 1983), est exclue, comme le prouve la persistance du métal après traitement acide des coupes. L'insensibilité du composé d'argent aux enzymes protéolytiques écarte aussi l'hypothèse d'un complexe métalloprotéique. Le composé est insoluble dans l'eau et dans l'ammoniaque. Après extraction du sulfure de cuivre par cette base, il persiste dans certaines cellules à pores des granules de couleur grise dans lesquels la microsonde électronique détecte des signaux argent aussi intenses que sur les coupes non traitées. Ces signaux argent sont accompagnés de signaux soufre supérieurs à ceux du soufre organique des cellules sans granules. Sur les

coupes préalablement privées de leur sulfure de cuivre par l'ammoniaque, le soufre et l'argent sont extraits conjointement par le cyanure de potassium, l'acide nitrique et l'acide sulfurique concentré. Après ces extractions, les granules de couleur grise disparaissent. On peut donc conclure à l'existence de sulfure d'argent, Ag_2S . Des tests similaires appliqués aux granules des cellules homologues de *Pecten maximus* (voir ci-dessous) confirment cette interprétation.

5. Localisation intracellulaire de l'argent

La recherche de l'argent, par microanalyse X des coupes ultrafines, montre que le métal est concentré dans les lysosomes des cellules à pores. Le contenu de ces lysosomes présente un aspect très variable, allant du semis de fins granules moyennement opaques aux électrons jusqu'aux volumineux amas d'opacité maximum et d'apparence amorphe (Fig. 2). Le cuivre, l'argent et le soufre qui leur est associé, sont situés dans les mêmes organites. Comme le suggérait l'analyse de coupes à la paraffine, l'argent n'est pas détectable dans tous les lysosomes. D'autre part, il est situé aussi bien dans les plages d'opacité moyenne que dans celles d'opacité maximum qui ne sont donc que des amas de concentration locale plus élevée.

Les intensités des signaux X de l'argent et du cuivre, mesurées sur un ensemble de lysosomes, ne font apparaître aucune corrélation Ag/Cu (Tabl. IV).

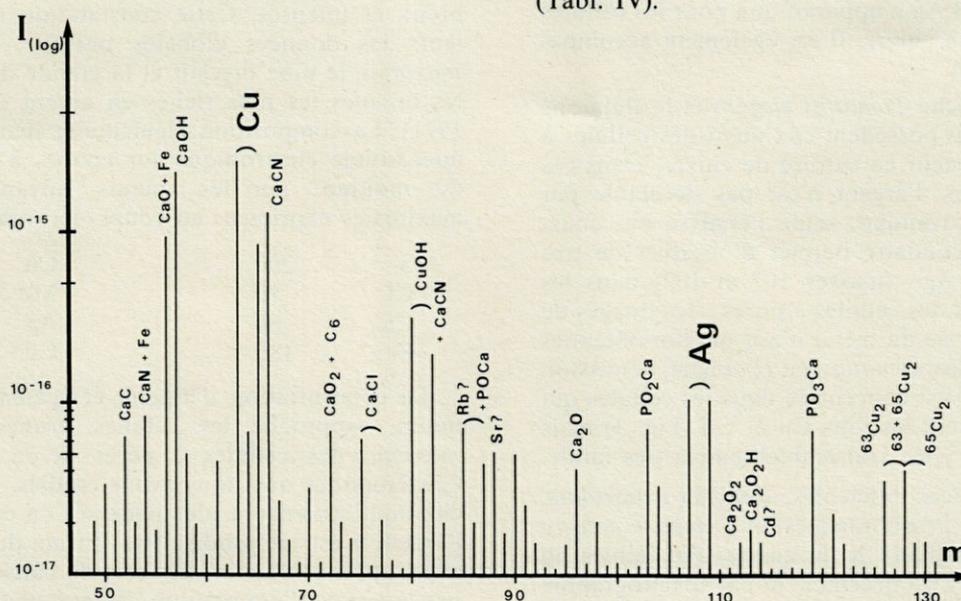


Fig. 1. — Spectre en basse résolution en masse ($m/\Delta m = 300$) d'une cellule à pores de *Murex*, montrant la coexistence de Cu et Ag naturels. Conditions opératoires : bombardement, O_2^+ , $7,5 \mu\text{A}$; diaphragme de lentille à émission, $200 \mu\text{m}$; diaphragme de champ, $600 \mu\text{m}$. En abscisses, masses; en ordonnées, intensités en ampères.

Low mass resolution spectrum ($m/\Delta m = 300$) of a pore cell of Murex, showing the coexistence of natural Cu and Ag. Analytical conditions : primary ion beam, O_2^+ , $7,5 \mu\text{A}$; diaphragm of the emission lens, $200 \mu\text{m}$; field diaphragm, $600 \mu\text{m}$. X-axis, masses; Y-axis, intensities of the secondary ions in amperes.

Tabl. IV. — *Murex brandaris* : détection du cuivre, de l'argent et du soufre, par microanalyse X de coupes ultrafines, dans onze lysosomes de cellules à pores (valeurs exprimées en nombre de coups enregistrés pendant 10 secondes). Cristaux des spectromètres : LiF pour Cu, P.E.T. pour Ag et S.

Murex brandaris : Intensities (in counts/10 s) of the characteristic peaks for Cu, Ag and S in eleven lysosomes of pore cells (wavelength analysis on ultrathin sections). Crystals : LiF for Cu, P.E.T. for Ag and S.

Aspect des plages analysées	Cu	Ag	S
fins granules peu opaques	3454 ± 118	47 ± 19	1253 ± 72
» »	6909 ± 167	24 ± 15	2629 ± 103
» »	7911 ± 179	73 ± 22	2882 ± 108
» »	9113 ± 192	55 ± 19	2699 ± 105
» »	12407 ± 224	58 ± 21	4741 ± 139
grains opaques parmi de fins granules peu opaques	5603 ± 150	48 ± 18	1518 ± 79
amas de grains opaques	6407 ± 161	0	1495 ± 79
» »	8261 ± 183	75 ± 21	2047 ± 92
» »	10917 ± 210	0	2862 ± 108
» »	19558 ± 280	72 ± 22	5022 ± 143
» »	23137 ± 305	0	6336 ± 161

II. Autres Gastéropodes

L'argent n'est décelable, par microanalyse X de coupes à la paraffine, que chez le Prosobranché marin, *Littorina littorea*. Comme chez les Murex, il est localisé dans les cellules à pores (Martoja *et al.*, 1980) et le signal Ag n'apparaît que pour les cellules les plus riches en cuivre. Il est également accompagné de cadmium.

Le Prosobranché *Pomatias elegans* et le Pulmoné *Cepaea nemoralis* possèdent eux aussi des cellules à pores à haute teneur en sulfure de cuivre. Dans ces espèces terrestres, l'argent n'est pas décelable par microsonde électronique; seule l'analyse par émission ionique secondaire permet d'observer de très faibles signaux Ag⁺ (masses 107 et 109) dans les plages contenant des cellules à pores. Des images de localisation précise du métal n'ont pu être obtenues chez *Cepaea*. Chez *Pomatias*, en revanche, l'émission ionique d'argent est concentrée dans les cellules qui émettent également les ions Cu et Cd (Fig. 3) mais le taux d'argent y est vraisemblablement très faible.

Dans les espèces dulcicoles, *Bithynia tentaculata*, *Valvata cristata* (Prosobranchés) et *Lymnaea peregra* (Pulmoné), les signaux X du cuivre sont faibles ou nuls. L'argent n'y est décelable ni par spectrographie des rayons X, ni par émission ionique secondaire.

Enfin, aucune trace d'argent n'a été détectée chez le Pulmoné « à sang rouge », *Planorbis cornutus* dont les cellules à pores accumulent non du sulfure de cuivre mais de la ferritine (Martoja *et al.*, 1982).

Les résultats relatifs aux Gastéropodes sont résumés dans le tableau V. Celui-ci appelle une remar-

que concernant le pigment respiratoire des Lymnaeïdes : un tel pigment ferait défaut selon Ghiretti et Ghiretti-Magaldi (1975) mais de l'hémocyanine a été décrite sur coupes ultrafines par Sminia (1972).

III. Bivalves

Les cellules brunes des Bivalves (brown cells, serous cells) dont l'origine, les caractères et les fonctions présumées ont été revus en détail par Cheng (1981) entrent dans la catégorie des « cellules à carminate », comme les cellules à pores des Gastéropodes. L'identité de leur aspect ultrastructural renforce l'idée d'une homologie fonctionnelle. C'est donc dans ces cellules que nous avons recherché la présence éventuelle d'argent.

1. Pecten maximus

Nous avons examiné les « cellules brunes » dans les glandes péricardiques auriculaires où elles prennent naissance et entre les diverticules digestifs. L'examen ultrastructural des premières confirme un état de différenciation peu avancé : les plages à pores caractéristiques y sont déjà présentes mais le hyaloplasme est dépourvu de lysosomes (Ballan-Dufrançais et Jeantet, communication personnelle). L'analyse des cellules de la région auriculaire ne révèle aucune accumulation significative de métaux, alors que les signaux émis par les cellules situées entre les diverticules digestifs sont à la fois nombreux et intenses. Cette constatation rejoint d'ailleurs les données globales puisque, chez *Pecten maximus*, le tube digestif et la glande digestive sont les organes les plus riches en argent (Segar *et al.*, 1971). La composition élémentaire déterminée à la microsonde électronique sur coupes à la paraffine est indiquée par les valeurs suivantes (valeurs maximales exprimées en coups/seconde) :

S	200	Cu	15
Cl	70	Mo	6
Ca	80	Ag	240
Fe	180	Cd	5

La concentration d'argent, et également de cadmium, rapproche les cellules brunes de *Pecten maximus* des cellules à pores de la plupart des Gastéropodes que nous avons étudiés. L'homologie chimique est encore plus nette si l'on considère que l'argent y est immobilisé sous forme de sulfure. En effet, après extraction des sels de calcium et de fer par le citrate d'ammonium, les granules des cellules persistent et les signaux X obtenus en microsonde électronique, demeurent inchangés. Le rapport signal X de S/signal X de Ag est en moyenne de 0,822 ± 0,025 alors qu'il est de 0,787 ± 0,045 sur une poudre de Ag₂S incluse en résine, coupée et analysée dans les mêmes conditions. Comme pour les deux espèces de *Murex*, le cyanure de potassium, l'acide

nitrique et l'acide sulfurique concentré extraient le sel d'argent. En revanche, l'accumulation de fer, vraisemblablement sous forme de phosphate et l'absence de stockage de sulfure de cuivre opposent *Pecten maximus* à ces Gastéropodes.

2. *Crassostrea gigas*

On admet que les glandes péricardiques de *Crassostrea* sont représentées par des cellules situées sur la face externe de l'oreillette (Galtsoff, 1964). Toutefois, les cellules ainsi localisées renferment déjà des inclusions naturellement colorées et leur composition chimique est la même que celle des cellules brunes dispersées entre les diverticules digestifs ou autour de la gonade. Dans tous les cas, l'élément le plus abondant et le plus caractéristique est le fer trivalent révélable par cytochimie. La composition élémentaire, déterminée dans les mêmes conditions que précédemment est indiquée par les valeurs suivantes (valeurs maximales exprimées en coups/seconde) :

P	350	Fe	800
S	110	Cu	50
Cl	30	Zn	15
Ca	30		

Le phosphate de fer est certainement le constituant majeur des inclusions de ces cellules et l'intensité des signaux cuivre est très faible. Quant à l'argent, il n'est décelable ni par sonde électronique, ni par émission ionique secondaire. Sur ce point, *Crassostrea gigas* diffère donc de toutes les autres espèces marines que nous avons étudiées. Les seules cellules contenant de l'argent naturel et du cadmium lors de contaminations (Martoja et Martin, 1985), sont les amœbocytes situés sous la paroi du tube digestif (Fig. 4).

DISCUSSION

Dans les espèces qui accumulent le plus d'argent, la présence du métal est constante et ne peut être la conséquence d'une pollution. Le taux d'argent, pour l'ensemble des tissus mous, y est d'ailleurs inférieur à celui qui, selon Bryan *et al.* (1983), signale une contamination. D'autre part, les Murex, les Littorines et les Coquilles St Jacques provenaient de régions géographiques différentes et considérées comme non polluées. En outre, quelques échantillons de Littorines et de Coquilles St Jacques étaient destinés à la consommation et l'on peut penser que la qualité de leur milieu d'origine avait été contrôlée.

Les résultats quantitatifs obtenus chez les Murex sont comparables aux données bibliographiques. Ainsi, chez *M. brandaris* où la teneur globale moyenne en argent est de 1,7 µg/g, le facteur de

concentration, calculé sur la base 0,0001 µg/g dans l'eau de mer (Riley et Chester, 1971) est de $1,7 \cdot 10^4$. Ce chiffre élevé est à rapprocher des $1,8 \cdot 10^4$ énoncés pour *Ostrea sinuata* en Nouvelle Zélande (Brooks et Rumsby, 1965) et des $1,2 \cdot 10^4$ énoncés pour *Chlamys opercularis* en Grande Bretagne (Bryan, 1973). Si l'on considère la seule masse viscérale, la valeur moyenne de 27 µg/g obtenue en octobre pour *M. trunculus* est très proche des 30 µg/g trouvés chez un autre Prosobranchie Néogastropode, *Busycon canaliculatum* (River et Greig, cités d'après Nelson *et al.*, 1983). De la même façon, le taux moyen de 4,7 µg/g dans la coquille de *M. trunculus* est tout à fait analogue à ceux de *Patella vulgata* aux environs de Tel-Aviv ou d'*Olivella biplicata* en Californie et sa stabilité, comparée à la variabilité individuelle des tissus mous, apparaît également dans les résultats de plusieurs auteurs (Bertine et Goldberg, 1972; Graham, 1972; Navrot *et al.*, 1974; Schwimer, 1973). Quant à l'hypothèse d'un cycle annuel, suggérée par la chute des valeurs qui se produit entre octobre et décembre dans les tissus mous, elle rejoint les observations relatives aux variations saisonnières d'autres éléments-traces (Bryan, 1973). Enfin, par l'absence de corrélation entre les quantités d'argent et de cuivre accumulées, les Murex se comportent comme les autres Prosobranches, *Haliotis rufescens*, *H. tuberculata* et *Littorina littorea* (Anderlini, 1974; Bryan *et al.*, 1977; Bryan *et al.*, 1983) mais s'opposent aux Céphalopodes (Martin et Flegal, 1975) et sans doute aux Bivalves (Bryan et Hummerstone, 1978; Bryan et Uysal, 1978).

L'argent a été décelé par microanalyse dans toutes les espèces marines à l'exception de *Crassostrea vulgata*. Ce résultat négatif est d'autant plus inattendu que la capacité de cette espèce à accumuler l'argent est connue (Greig *et al.*, 1975; Windom et Smith, 1972) et que nous avons pu y localiser le cuivre sans difficulté, alors qu'il s'y trouve en très faible quantité (Pirie *et al.*, 1984). Dans le genre voisin *Ostrea*, la teneur en argent, qui peut être également très forte, surtout dans le cœur, s'accroît encore sous l'effet d'une intoxication expérimentale par le cadmium (Brooks et Rumsby, 1965, 1967). Or, la haute teneur en zinc et l'élévation de la teneur en cadmium des cœurs analysés laissent penser que ces derniers renfermaient une importante population d'amœbocytes, cellules qui, à l'inverse des cellules à pores, sont très riches en zinc (George *et al.*, 1978), contiennent de l'argent naturel et accumulent le cadmium excédentaire.

Il est donc très probable que, dans ce cas, l'argent mis en évidence par méthode chimique ne correspond pas au sulfure d'argent contenu dans les cellules à pores des autres espèces. L'argent a été décelé également chez les deux Gastéropodes terrestres mais, à la différence des espèces marines, il n'y a pas d'accumulations accessibles à la microanalyse X. Enfin, il est resté indécélable dans les espèces dulcicoles, alors que l'eau douce en est trois

fois plus riche que l'eau de mer (Chester et Riley, 1971). Il en ressort qu'il n'y a pas de relation directe entre la teneur en argent du milieu et l'accumulation naturelle opérée par l'animal. Il est, en outre, remarquable que le fait d'accumuler ou non l'argent ne soit pas superposable à la position systématique du Gastéropode, mais à son habitat (Tabl. V). Ce résultat pourrait être un exemple supplémentaire des convergences physiologiques existant entre les diverses familles de Mollusques « non-marins » (voir Russell Hunter, 1964).

Les sites histologiques de capture de l'argent, chez des animaux contaminés expérimentalement, sont différents de ceux que nous avons mis en évidence. Chez les Vertébrés et chez les Mollusques *Crepidula* et *Mytilus*, ce sont en effet les lames basales des épithéliums qui captent l'argent (Calabrese *et al.*, 1984; Nelson *et al.*, 1983), comme elles captent le cuivre en cas de pollution chez *Littorina littorea* (Martoja *et al.*, 1980). Les coordinats de l'argent sont également différents puisqu'il s'agit du sélénium chez les Mammifères (Alexander et Aaseth, 1981) et d'un ommochrome chez les Insectes (Martoja et Truchet, 1983) alors que l'argent naturel des Mollusques est lié au coordinat S^{2-} . La parution récente d'un article de Mason, Simkiss et Ryan (1984) nous impose de nous expliquer à nouveau sur le problème des sulfures. En effet, selon Mason *et al.* (op. cité, p. 717), l'existence du sulfure de cuivre dans les cellules à pores de *Littorina littorea* est improbable. Cependant, notre interprétation ne saurait être remise en cause sur la base de leurs arguments. En effet, l'osmiophilie des lysosomes est imputable aux protéines en cours de dégradation qui sont d'abord très abondantes et qui régressent peu à peu au profit du sel de cuivre (Martoja *et al.*, p. 258

et fig. 5A à D; Martoja et Thiriou-Quievreux, 1980, pl. II). Quant à la destruction rapide du ligand du cuivre par un plasma d'oxygène, elle est conforme à ce que l'on sait du pouvoir oxydant de l'oxygène, même atmosphérique, sur les sulfures de cuivre artificiels, et sur la covelline naturelle, $Cu_4^+Cu_2^{2+}(S_2)_2S_2$. A ces deux arguments qui conduisent Mason *et al.* à imaginer un ligand organique du cuivre, nous opposons comme preuves : 1. les caractères de solubilité du sel de cuivre; 2. la raie Raman caractéristique (Martoja *et al.*, 1980); 3. la solidité de la liaison cuivre-soufre qui n'est rompue qu'en milieu acide fort (Bouquegneau et Martoja, 1982). En outre, le rapport

$$\frac{\text{signal X de S}}{\text{signal X de Cu}}$$

calculé d'après les données du Tableau IV (présent travail), comparé au même rapport calculé à partir de coupes ultrafines d'un standard de sulfure de cuivre, soit $0,23 \pm 0,08$, montre que ce rapport S/Cu est : 1. plus élevé (0,30 à 0,38) pour les lysosomes peu opaques aux électrons, très riches en protéines; 2. identique ou à peine supérieur (0,23 à 0,27) pour les grains opaques aux électrons que nous interprétons comme des précipités de sulfure de cuivre associé ou non à du sulfure d'argent. Nous considérons que dans le premier cas, les signaux X correspondent au soufre total, méthionine et cystéine, des protéines non encore dégradées, alors que dans le second, ils concernent le ligand S^{2-} provenant de la désulphydratation de la seule cystéine. La présence de sulfure d'argent et d'une petite quantité de protéines qui, enrobant les précipités de sulfure interfère dans l'analyse, explique que le rapport S/Cu soit légèrement supérieur à celui du standard. Rappelons enfin

Tabl. V. — Détection du cuivre et de l'argent, par microanalyse X et analyse ionique, à l'échelle structurale, dans les cellules à pores de divers Gastéropodes (les chiffres indiquent les valeurs moyennes exprimées en nombre de coups par seconde).
Detection of Cu and Ag, with electron microprobe and secondary in mass spectrometer, in the pore cells of several gastropod species (paraffin sections; for electron microprobe analysis, mean intensities of the characteristic peaks are indicated in counts/s).

Espèce	Pigment respiratoire	Position systématique		Habitat	Microanalyse X		Analyse ionique
					Cu	Ag	Ag
<i>Murex trunculus</i> <i>Murex brandaris</i>	hémocyanine	Néogastropodes	marin	1200	30	+	
Prosobranches				Mésogastropodes	marin	500	10
		dulcicole	40		0	0	
		dulcicole	30		0	0	
		terrestre	300		0	+	
<i>Cepaea nemoralis</i>		Pulmonés	Stylommatophores	500	0	+	
<i>Lymnaea peregra</i>	Basommatophores		dulcicole	40	0	0	
<i>Planorbarius corneus</i>			dulcicole	0(Fe)	0	0	

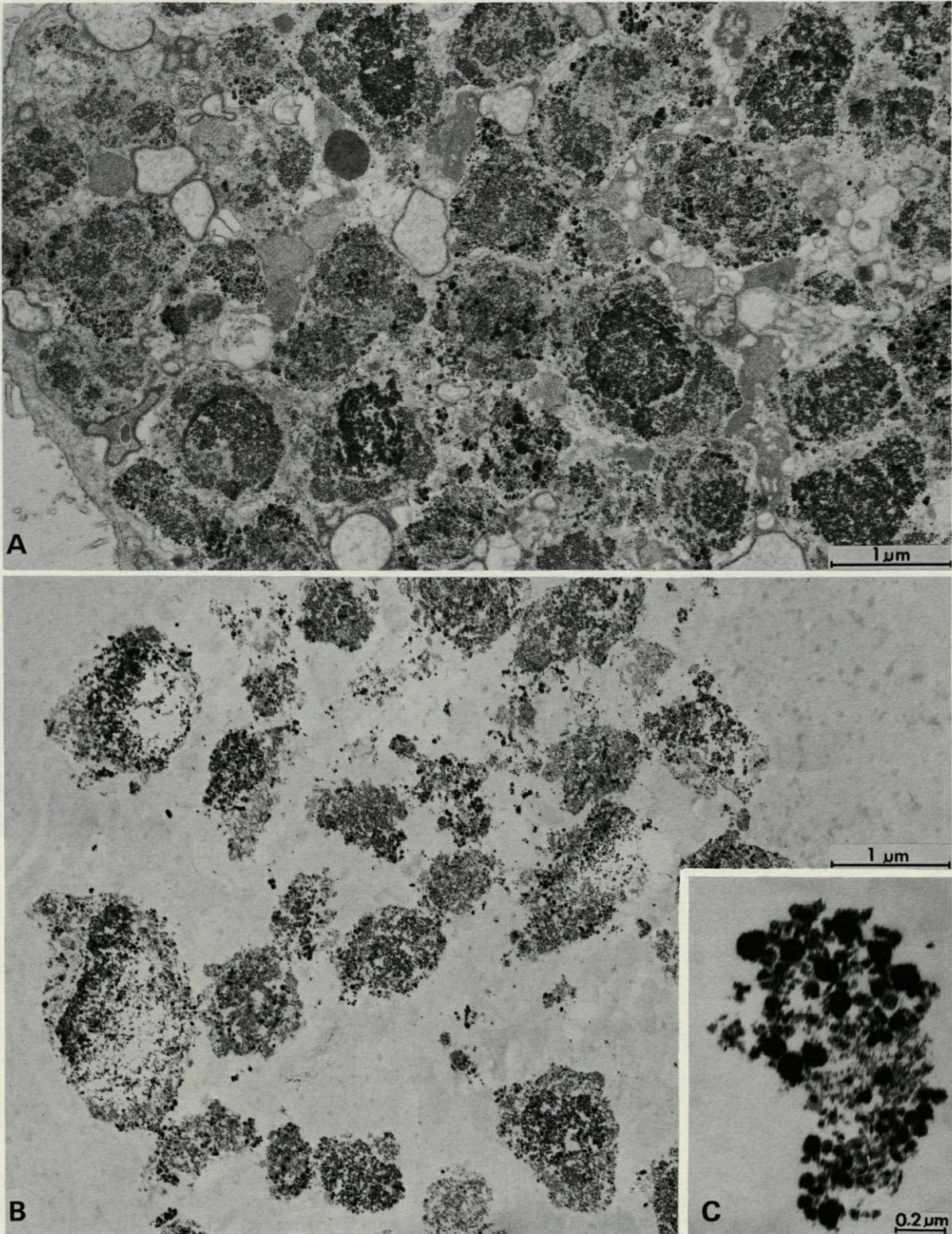


Fig. 2. — Coupes ultrafines de cellules à pores de *Murex*. A, coupe de pièce fixée au glutaraldéhyde, contrastée par l'uranyle. Noter l'abondance des lysosomes qui occupent presque tout le champ. B, coupe de pièce fixée au glutaraldéhyde et non contrastée. Noter l'opacité naturelle aux électrons du contenu des lysosomes. C, détail du contenu d'un lysosome (même technique qu'en B), montrant les précipités opaques de sulfures de Cu et Ag.

Ultrathin sections in pore cells of Murex. A, section of a cell fixed with glutaraldehyd and stained with uranyl, showing the numerous lysosomes. B, section of a cell fixed with glutaraldehyd and unstained, showing the electron opaque content of the lysosomes. C, magnification of a lysosome (technical conditions as in B) showing the electron granules of Cu and Ag sulfides.

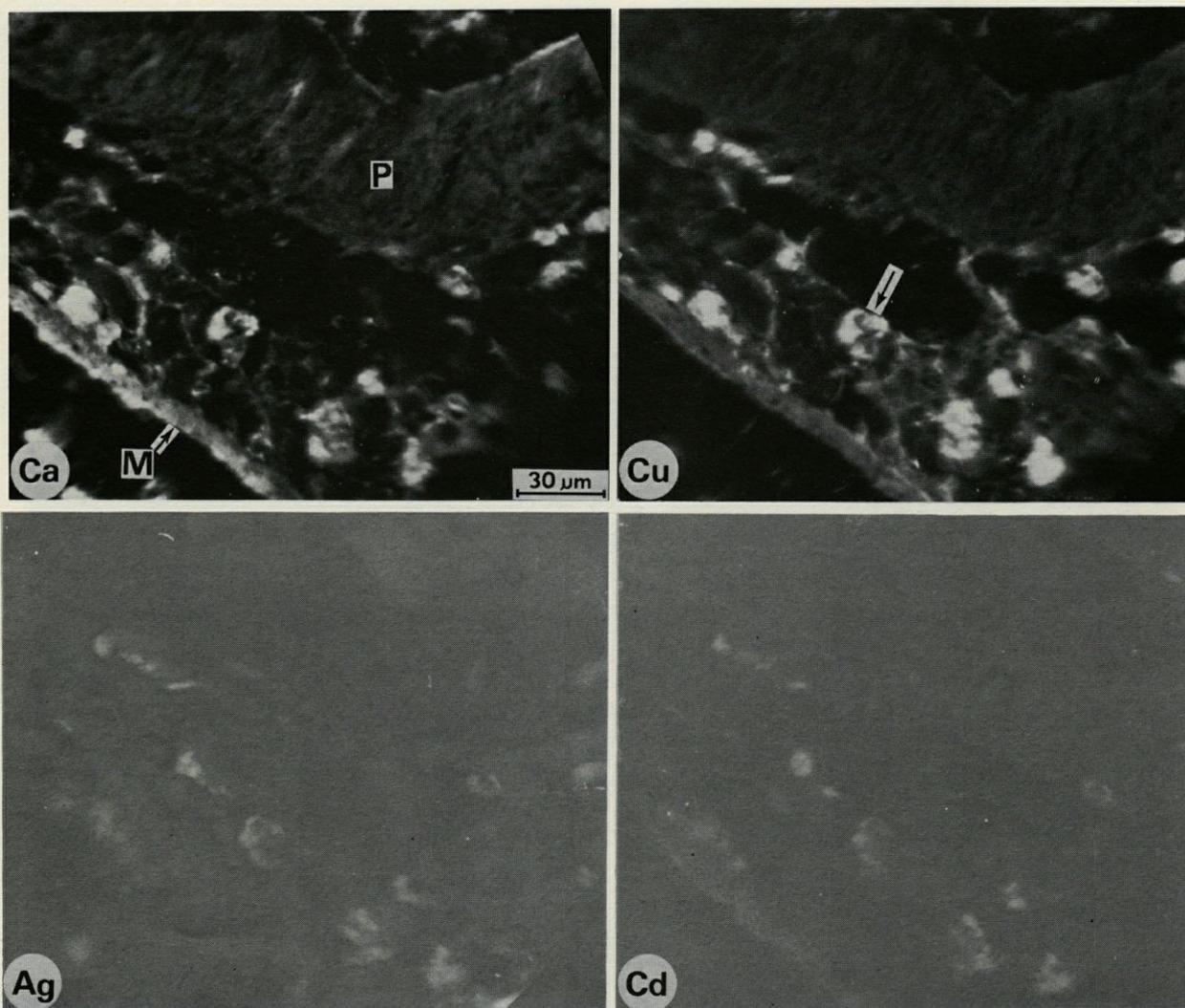


Fig. 3. — Coupes de masse viscérale de *Pomatias*. Images d'émission ionique aux masses 40^+ (Ca), 63^+ (Cu), 109^+ (Ag) et 114^+ (Cd). Noter la très forte émissivité des ions Ca et Cu des cellules à sulfure de cuivre, la plus faible émissivité des ions Ag et Cd des mêmes cellules. M, manteau; P, paroi intestinale. La flèche sur l'image Cu indique l'une des cellules à sulfures.

Histological sections in the visceral mass of Pomatias. Distribution of ^{40}Ca , ^{63}Cu , ^{109}Ag and ^{114}Cd obtained with the ion analyser. M, mantle; P, intestinal wall. The arrow indicates one of the cells containing sulfides.

que la désulfhydratation des protéines est une voie catabolique bien connue depuis les bactéries jusqu'aux Vertébrés et que l'hémocyanine contient plus de résidus cystéine qu'il n'est nécessaire pour libérer la quantité voulue de ligand S^{2-} .

Le sulfure d'argent précipite dans des cellules dont le rôle est d'épurer le sang par pinocytose de protéines et que l'on peut regrouper sous le nom de « cellules excrétrices du tissu conjonctif » selon la terminologie de Cuénot (1899). La localisation du sulfure indique donc que le métal circule dans le milieu intérieur sous forme d'un complexe métalloprotéique, interprétation conforme aux données classiques sur l'affinité de l'argent pour les protéines. Il est probable que la métalloprotéine correspond à l'argent de la fraction soluble et à celui qui

est faiblement lié dans la fraction insoluble des tissus de *Murex trunculus*. Cependant, en raison de sa faible teneur, il ne nous a pas été possible de détecter ce métal dans des fractions chromatographiques obtenues après filtration sur gel de la fraction soluble.

Chez les Gastéropodes marins, *Murex* et *Littorines*, le catabolisme de la métalloprotéine à argent et celui de l'hémocyanine doivent être identiques, si l'on en juge par la similitude chimique des deux produits de dégradation qui supposent une désulfhydratation enzymatique des protéines avec production de H_2S . Cependant, bien que l'hémocyanine possède des sites non spécifiques de liaison avec divers métaux (Brouwer *et al.*, 1982), il est peu probable que l'argent soit transporté par le pigment

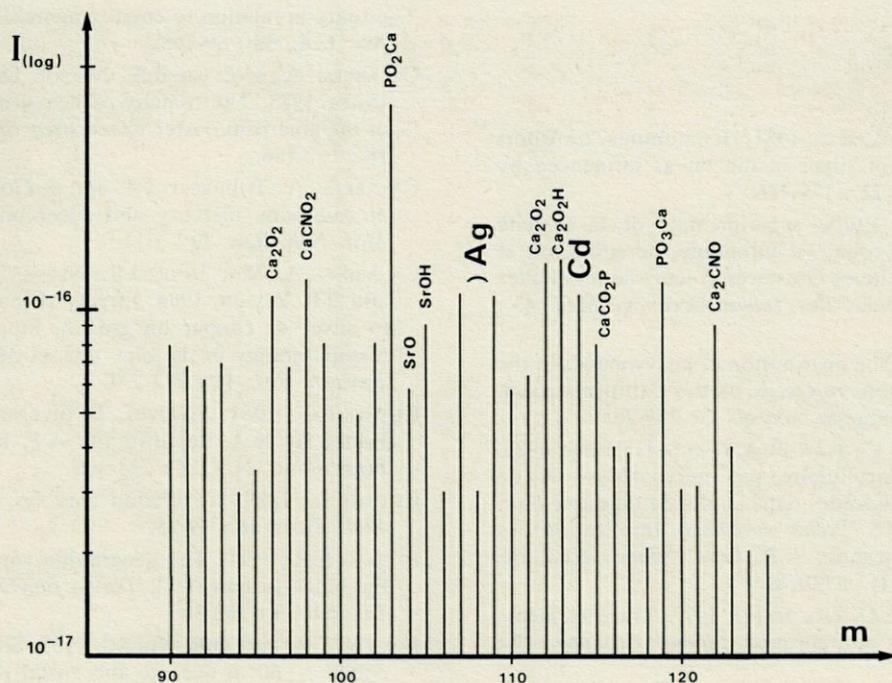


Fig. 4. — Spectre en basse résolution en masse ($m/\Delta m = 300$) d'un amœbocyte d'Huitre contaminée par CdCl_2 montrant la coexistence de Ag naturel et de Cd exogène. Mêmes conditions opératoires que Fig. 1.

Low mass resolution spectrum ($m/\Delta m = 300$) of an amœbocyte in an oyster contaminated with CdCl_2 , showing the coexistence of natural Ag and added Cd, Analytical conditions as in figure 1.

lui-même. La précipitation de sulfure d'argent chez *Pecten maximus*, dépourvu d'hémocyanine et de sulfure de cuivre, et inversement, la précipitation de sulfure de cuivre en l'absence de sulfure d'argent dans les espèces dulcicoles, sont particulièrement démonstratives à cet égard.

Les différences entre espèces marines et terrestres que nous avons mises en évidence ne concernent que le stockage de sulfure d'argent, c'est-à-dire l'excrétion de la forme présumée métabolique du métal. Les très faibles signaux argent observés en analyse ionique, dans les espèces terrestres, ne peuvent être rapportés à une accumulation de sulfure mais ils indiquent que le métal est présent dans l'organisme. Les espèces diffèreraient ainsi, non par le rôle de l'argent mais par le catabolisme des molécules qui le contiennent ou par le mode d'excrétion de celles-ci. Dans la première éventualité, on pourrait envisager que, chez les Gastéropodes terrestres qui ne fossilisent pas l'argent, l'hydrogène sulfuré provenant de la dégradation des protéines est, comme chez les Vertébrés, oxydé ou réutilisé pour la synthèse de la cystéine; l'argent n'aurait donc pas son ligand habituel. Le fait qu'ils accumulent du sulfure de cuivre en l'absence de sulfure d'argent montre que cette hypothèse ne peut être retenue. L'excrétion de l'argent par des voies différentes nous paraît donc la seule hypothèse qui puisse actuellement être retenue.

Il paraît douteux que l'argent représente, pour les Mollusques, un métal non essentiel prélevé en même temps que ceux qui le sont, puis stocké avec les déchets du métabolisme. Dans l'eau, sa concentration est inférieure à celle des éléments indispensables les plus pauvrement représentés, Se, Co, Cr, de sorte que les animaux doivent en effectuer un pompage actif. Comme pour le cadmium, présent lui-aussi à l'état d'ultra-trace et que ces animaux accumulent (Bouquegneau *et al.*, 1983; Martoja *et al.*, 1984), la question d'un rôle métabolique de l'argent doit être posée. A cet égard et ainsi que le suggéraient Brooks et Rumsby (1965), son aptitude à réactiver des enzymes que nous avons déjà mentionnée, mérite de retenir l'attention.

Les échantillons ont été préparés par H. Moysan. La microscopie électronique a été réalisée au Service commun de l'Université Pierre et Marie Curie, la microanalyse au Service commun de Microanalyse appliquée à la Biologie, C.N.R.S. et S.C. 27 I.N.S.E.R.M.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER J. and J. AASETH, 1981, Hepatobiliary transport and distribution of silver in the rat as influenced by selenite. *Toxicol.*, **21** : 179-186.
- AMIARD J.C., 1976. Etude expérimentale de la toxicité aiguë de sels de cobalt, d'antimoine, de strontium et d'argent chez quelques Crustacés et leurs larves et chez quelques Téléostéens. *Rev. Intern. Océanogr. Méd.*, **43** : 79-95.
- ANDERLINI V., 1974. The distribution of heavy metals in the red abalone, *Haliotis rufescens*, on the California coast. *Arch. environ. Contamin. toxicol.*, **2** : 253-265.
- BALLAN-DUFRANÇOIS C., JEANTET A.Y. et S. HALPERN, 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. hebd. Séanc. Acad. Sc. Paris*, **294** (sér. III) : 673-678.
- BERTINE K.K. and E.D. GOLDBERG, 1972. Trace elements in clams, mussels and shrimps. *Limnol. Oceanog.*, **17** : 878-884.
- BOUQUEGNEAU J.M. et M. MARTOJA, 1982. La teneur en cuivre et son degré de complexation chez quatre Gastéropodes marins. Données sur le cadmium et le zinc. *Oceanol. acta*, **5** : 219-228.
- BOUQUEGNEAU J.M., MARTOJA M. et M. TRUCHET, 1983. Localisation biochimique du cadmium chez *Murex trunculus* (L.) (Prosobranchie Néogastropode) en milieu naturel non pollué et après intoxication expérimentale. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sc., Paris*, **296** (sér. III) : 1121-1124.
- BROOKS R.R. and M.G. RUMSBY, 1965. Biogeochemistry of trace element uptake by some New Zealand bivalves. *Limnol. Oceanog.*, **10** : 521-527.
- BROOKS R.R. and M.G. RUMSBY, 1967. Studies on the uptake of cadmium by the oyster, *Ostrea sinuata* (Lamarck). *Aust. J. mar. Freshwat. Res.*, **15** : 53-61.
- BROUWER M., BONAVENTURA C. and J. BONAVENTURA, 1982. Heavy metal ion interactions with *Callinectes sapidus* hemocyanin : structural and functional changes induced by a variety of heavy metal ions. *Biochem.*, **21** : 2529-2538.
- BRYAN G.W., 1973. The occurrence and seasonal variation of trace metals in the scallops *Pecten maximus* (L.) and *Chlamys opercularis* (L.). *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **53** : 145-166.
- BRYAN G.W. and L.G. HUMMERSTONE, 1978. Heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* from contaminated and uncontaminated estuaries. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **58** : 401-419.
- BRYAN G.W., LANGSTONE W.J., HUMMERSTONE L.G., BURT G.R. and Y.B. HO, 1983. An assessment of the gastropod *Littorina littorea*, as an indicator of heavy metal contamination in United Kingdom estuaries. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **63** : 327-345.
- BRYAN G.W., POTTS G.W. and G.R. FORSTER, 1977. Heavy metals in the gastropod mollusc *Haliotis tuberculata* (L.). *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **57** : 379-390.
- BRYAN G.W. and H. UYSAL, 1978. Heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* from the Tamar estuary in relation to environmental levels. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **58** : 89-108.
- CALABRESE A., COLLIER R.S., NELSON D.A. and J.R. MAC INNES, 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the american oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, **18** : 162-166.
- CALABRESE A., THURBERG F.P. and E. GOULD, 1977. Effects of cadmium, mercury and silver on marine animals. *Mar. Fish. Rev.*, **39** : 5-11.
- CALABRESE A., MAC INNES J.R., NELSON D.A., GREIG R.A. and P.P. YEVICH, 1984. Effects of long-term exposure to silver or copper on growth, bioaccumulation and histopathology in the blue mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.*, **11** : 243-274.
- CHENG T.C., 1981. Bivalves. In *Invertebrate blood cells*, Edited by N.A. Ratcliffe and A.F. Rowley, Academic Press Lond. N.Y., **1** : 233-300.
- CUENOT L., 1899. L'excrétion chez les Mollusques. *Arch. Biol., Paris*, **16** : 49-95.
- FLEGAL A.R., 1980. The geographic variation of silver in the black turban snail, *Tegula funebris*. *Environment. Internat.*, **3** : 303-305.
- FOLSOM T.R. and D.R. YOUNG, 1965. Silver — 110 m and cobalt — 60 in oceanic and costal organisms. *Nature*, **206** : 803-806.
- GALTSOFF P.S., 1964. The american oyster, *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fish. Bull., U.S. Fish wildl. Serv.*, **64** : 1-480.
- GEORGE S.G., PIRIE B.J.S., CHEYNE A.R., COOMBS T.L. and P.T. GRANT, 1978. Detoxication of metals by marine Bivalves : an ultrastructural study of the compartmentation of copper and zinc in the oyster *Ostrea edulis*. *Mar. Biol.*, **45** : 147-156.
- GHIRETTI F. and A. GHIRETTI-MAGALDI, 1975. Respiration. In *Pulmonates*. Edited by V. Fretter and J. Peake. Academic Press Lond. N.Y., **1** : 33-52.
- GRAHAM D.L., 1972. Trace metal levels in intertidal Mollusks of California. *Veliger*, **14** : 365-372.
- GREIG R.A., NELSON B.A. and D.A. NELSON, 1975. Trace metal content in the american oyster. *Mar. Pollut. Bull.*, **6** : 72-73.
- MARSHALL A.T. and V. TALBOT, 1979. Accumulation of cadmium and lead in the gills of *Mytilus edulis*. X-ray microanalysis and chemical analysis. *Chem. Biol. Interact.*, **27** : 111-123.
- MARTIN J.H. and A.R. FLEGAL, 1975. High copper concentrations in squid livers in association with elevated levels of silver, cadmium and zinc. *Mar. Biol.*, **30** : 51-55.
- MARTIN M., OSBORN K.E., BILLIG P. and N. GLICKSTEIN, 1981. Toxicities of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and *Cancer magister* larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, **12** : 305-308.
- MARTOJA R. et J.L. MARTIN, 1985. Recherche des mécanismes de détoxication du cadmium par l'Huitre *Crassostrea gigas* (Mollusque, Bivalve). I. Mise en évidence d'une protéine sulfhydrilée de complexation du métal dans les amœbocytes à zinc et cuivre. *C.R. hebd. Séanc. Acad. Sc. Paris*, **300** (sér. III) : 549-554.
- MARTOJA M., QUINTANA C., JEANTET A.Y. et N. BONNET, 1982. Présence naturelle de protéines de type ferritine et hémossidérine dans le tissu conjonctif du Planorbe (Gastéropode pulmoné). *Biol. Cell*, **46** : 329-332.

- MARTOJA M., TRUCHET M. et J.M. BOUQUEGNEAU, 1984. Accumulation naturelle de cadmium chez *Murex trunculus* et *Murex brandaris* (Prosobranches néogastropodes) : localisation histologique. *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sc., Paris*, **298**, (sér. III) : 461-466.
- MARTOJA M., VU T.T. et B. ELKAIM, 1980. Bioaccumulation du cuivre chez *Littorina littorea* (L.) (Gastéropode prosobranché) : signification physiologique et écologique. *J. exp. mar. Biol. Ecol.*, **43** : 251-270.
- MARTOJA M. et C. THIRIOT-QUIEVREUX, 1980. Les cellules à sulfure cuivrique du Rissoidea, *Rissoa ventricosa*; répartition, caractères, conséquences écotoxicologiques. *Arch. Zool. exp. gén.*, **121** : 271-278.
- MARTOJA R. et M. TRUCHET, 1983. Rôle d'un omnochrome dans l'excrétion de métaux essentiels (Cu, Zn) et dans la détoxication à l'égard de contaminants métalliques (Ag, Cd) chez un Insecte (*Locusta migratoria*, Orthoptère). *C.R. Hebd. Séanc. Acad. Sc. Paris*, **297** (sér. III) : 219-224.
- MATUK Y., 1983. Distribution of radioactive silver in the subcellular fractions of various tissues of the rat and its binding to low molecular weight proteins. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **61** : 1391-1395.
- NAVROT J., AMIEL A.J. and J. KRONFELD, 1974. *Patella vulgata* : a biological monitor of costal metal pollution — a preliminary study. *Environ. Pollut.*, **7** : 303-308.
- NELSON D.A., CALABRESE A., GREIG R.A., YEVICH P.P. and S. CHANG, 1983. Long-term silver effects on the marine gastropod *Crepidula fornicata*. *Mar. Ecol., prog. ser.*, **12** : 155-165.
- PIRIE B.J.S., GEORGE S.G., LYTTON D.G. and J.D. THOMSON, 1984. Metal containing blood cells of oysters : ultrastructure histochemistry and X-ray microanalysis. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **64** : 115-123.
- RAPOPORT S. and J. LUEBERING, 1951. Glycerate-2, 3-diphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **189** : 683-694.
- RILEY J.P. and R. CHESTER, 1971. Introduction to marine chemistry. Academic Press, Lond. N.Y., **1** : 465 p.
- RUSSEL HUNTER W., 1964. Physiological aspects of ecology in non marine molluscs. In *Physiology of Molluscs*. Edited by K.M. Wilbur and C.M. Yonge. Academic Press Lond. N.Y., **1** : 83-126.
- SCHWIMMER S.R., 1973. Trace metal levels in three subtidal invertebrates. *Veliger*, **16** : 95-102.
- SEGAR D.A., COLLINS J.D. and J.P. RILEY, 1971. The distribution of the major and some minor elements in marine animals. Part II : Molluscs. *J. mar. Biol. Ass. U.K.*, **51** : 131-136.
- SKEJELDALL, K.H. DAHL and J.S. MCKINLEY-McKEE, 1982. Reactivation of apohorse liver alcohol dehydrogenase with the monovalent metal ion Ag(I). *Biosc. Rep.*, **2** : 509-514.
- SMINIA T., 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z. Zellforsch. mikrosk. Anat.*, **130** : 497-526.
- SOYER J., 1963. Contribution à l'étude des effets biologiques du mercure et de l'argent dans l'eau de mer, *Vie et Milieu*, **14** : 1-36.
- THURBERG F.P., CABLE W.D., DAWSON M.A., MAC INNES J.R. and D.R. WENZLOFF, 1975. Respiratory response of larval, juvenile and adult surf clams, *Spisula solidissima* to silver. In *Respiration of marine organisms*. Edited by J.J. Cech, J. Bridges and D.B. Horton. TRIGOM publications. South Portland, Maine, 41-52.
- TRUCHET M., 1982. Etude de deux nouvelles méthodes d'analyse histologique : analyse élémentaire par émission ionique secondaire et analyse moléculaire par diffusion Raman; méthodologie et exemples d'application. Thèse de Doctorat d'Etat, Paris, p. 1-440.
- WINDOM H.L. and R.G. SMITH, 1972. Distribution of iron, magnesium, copper and silver in oysters along the Georgia coast. *J. Fish. res. Bd Canada*, **29** : 450-452.

Reçu le 23 novembre 1984; received November 23, 1984
 Accepté le 28 février 1985; accepted February 28, 1985