

**CYCLE NATUREL DU CADMIUM ET EFFETS DE L'INTOXICATION  
EXPERIMENTALE CHEZ MUREX TRUNCULUS L. (PROSOBRANCHE, NEOGASTEROPODE)**

J.M. BOUQUEGNEAU, C. CANON, M. FRANKIGNOULLE<sup>(1)</sup> et M. MARTOJA<sup>(2)</sup>

(1) Laboratoire d'Océanologie, Université de Liège,  
SART-TILMAN B-4000 LIEGE (BELGIQUE)

(2) Institut Océanographique, 195 rue Saint Jacques,  
75005 PARIS (FRANCE)

Mots-clés : cadmium, variations saisonnières.

Key-words : cadmium, seasonal variations.

*Natural cadmium cycle and effects of experimental contaminations  
by the metal in Murex trunculus.*

*SUMMARY : Our results show that the seasonal variations of the cadmium content of the soft tissues of Murex trunculus are not dependant on the reproductive cycle. However, there is a correlation between the decrease of the cadmium content and the growth of the shell. The effects of cadmium are different depending on the route of contamination (direct or indirect, acute or chronic). We suggest that cadmium could be implied in physiological processes and that the murex are able to use two different mechanisms to store the excess of metal under a detoxified form. An acute contamination induces an accumulation of cadmium in the insoluble part of the tissues, probably in lysosomes and spherocrystals, while a chronic contamination induces the synthesis of metallothioneins.*

**RESUME :** Nos résultats mettent en évidence l'existence de variations saisonnières de la teneur en cadmium des tissus mous de *Murex trunculus*, l'indépendance de celles-ci par rapport au cycle reproducteur et une coïncidence chronologique entre une baisse de concentration et la croissance de la coquille. Ils montrent que les réactions sont différentes selon le mode d'intoxication. Ces constatations suggèrent que le cadmium pourrait être impliqué dans un processus physiologique et que les murex disposent d'un double mécanisme pour en immobiliser l'excès sous une forme inoffensive. L'intoxication aiguë fait intervenir une accumulation du métal dans la phase insoluble, vraisemblablement grâce aux lysosomes et aux sphéro-cristaux. La contamination chronique induit la synthèse de métallothionéines.

## INTRODUCTION

Introduits à l'état de traces dans le milieu, les métaux lourds peuvent être concentrés par les êtres vivants, ce qui a conduit au concept d'organismes bioindicateurs. Toutefois, le milieu n'est que l'un des facteurs déterminant la concentration des métaux dans les tissus. L'existence de régulations physiologiques, différentes à la fois selon les espèces et selon les métaux, restreint l'utilisation des bioindicateurs dans l'appréciation de la qualité d'un biotope. L'accumulation du cadmium par les Mollusques, connue depuis le travail de Mullin et Riley (1956), en est un exemple que les espèces méditerranéennes, *Murex trunculus* et *M. brandaris*, illustrent bien (Bouquegneau et Martoja 1982). Dans la baie de Calvi, en Corse, certains murex détiennent, en effet, des taux de cadmium  $10^6$  fois supérieurs à ceux de l'eau de mer (Bouquegneau *et al.* 1983). Le cas de *M. trunculus* n'est d'ailleurs pas isolé et un facteur de concentration identique a été mis en évidence dans une espèce sud-africaine, très proche sur le plan zoologique et provenant également d'un site non pollué (Cuthbert *et al.* 1976). Des travaux ultérieurs suggèrent, en outre, l'existence d'une variation saisonnière de la teneur et de la spéciation chimique du cadmium dans les tissus mous (Bouquegneau et Martoja 1987).

Il nous a donc semblé intéressant de reprendre l'étude de ce cycle pendant sa période la plus caractéristique et de la compléter par la recherche des effets d'une intoxication expérimentale.

## MATERIEL ET METHODES

Les murex ont été récoltés en plongée à proximité de Calvi et de l'Ile Rousse sur la côte nord-ouest de la Corse, entre les mois de mai et de décembre 1986.

Par des essais préliminaires ou par comparaison entre divers lots, nous nous sommes assurés

- 1./ qu'il n'y avait pas de différences significatives entre les sexes,
- 2./ qu'un séjour de 6 semaines en aquarium d'eau de mer filtrée était sans incidence sur la teneur en cadmium,
- 3./ que les poids des tissus mous et de la coquille n'étaient pas sujets à des fluctuations saisonnières.

#### Technique expérimentale

Lors de la première expérience, certains animaux ont été contaminés pendant 24 jours en aquariums contenant  $0,2 \text{ mg.l}^{-1}$  de cadmium ajouté sous forme de  $\text{CdCl}_2$ . Les autres ont reçu 4 ou 6 injections, intramusculaires ou intraviscérales, d'une solution saline contenant 100, 200 ou  $1000 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$  de cadmium sous forme de  $\text{CdCl}_2$ . Les témoins ont reçu autant d'injections d'une solution saline analogue mais dépourvue de cadmium.

Le mode de contamination par injections intramusculaires de  $100 \text{ } \mu\text{g}$ , espacées d'une semaine, étant très bien supporté et n'entraînant aucune mortalité, c'est ce protocole qui a été retenu pour les expériences suivantes (tableaux III & IV).

Le pourcentage de cadmium accumulé après contamination a été calculé d'après le poids des tissus et la concentration en cadmium des témoins et des sujets expérimentaux.

#### Technique d'analyse

Les tissus mous ont été divisés en trois parties : masse viscérale, rein et ensemble céphalopodium-complexe palléal. Chacune a été homogénéisée à l'ULTRA-TURRAX, dans trois volumes de saccharose  $0,5 \text{ M}$ , puis centrifugée à  $35000 \text{ g}$  pendant 1 heure à  $4^\circ\text{C}$ . La teneur en cadmium du surnageant a été mesurée à partir d'une partie aliquote. Afin d'isoler la fraction contenant des métallothionéines, le reste du surnageant a été élué sur colonne d'AcA 54 équilibrée dans une solution tampon de formiate d'ammonium  $0,01 \text{ M}$  (pH 7,4). Les métallothionéines ont été identifiées par leur absorbance à  $250 \text{ nm}$  et par leur volume d'éluion. L'absorbance à  $215 \text{ nm}$  et à  $250 \text{ nm}$  des fractions a été mesurée par un spectrophotomètre BECKMAN DB-GT. La fraction insoluble, contenue dans les culots de centrifugation, a été minéralisée dans un mélange de  $\text{HNO}_3$  65% -  $\text{HCl}$  35%. L'analyse a été effectuée par spectrophotométrie d'absorption atomique au moyen d'un appareil PERKIN-ELMER 370 A équipé d'un brûleur air-acétylène.

## Techniques d'examen

Les coquilles ont été examinées à la loupe binoculaire. D'autre part, pour chaque individu, un fragment de gonade a été prélevé, fixé par le mélange de Bouin puis inclus et coupé à la paraffine. Les coupes ont été colorées par le rouge solide-picroindigocarmin.

## RESULTATS

### 1. Données biologiques

La période de l'année que nous avons étudiée est marquée par trois événements biologiques : l'accouplement en avril-mai, la ponte en juillet et l'édification d'un anneau de croissance de la coquille entre octobre et décembre.

### 2. Cycle naturel du cadmium

La concentration en cadmium des tissus mous augmente régulièrement entre mai et septembre, puis diminue de la même façon entre septembre et décembre. Ces variations affectent la masse viscérale où la concentration à la fin de l'été est multipliée par 3 par rapport à mai et surtout le rein où elle est multipliée par 7 (tableau I). Il est exclu qu'elles soient imputables à des fluctuations du poids des tissus, étant donné la stabilité de ce dernier.

La répartition du cadmium entre les fractions soluble et insoluble a été étudiée en août, octobre et décembre, c'est-à-dire pendant la phase de décroissance (tableau II). Quelle que soit la partie du corps, cette répartition est inégale et la teneur en métal de la fraction insoluble est toujours la plus élevée. C'est en août, où la quantité de cadmium de la fraction insoluble est environ 4 fois celle de la fraction soluble, que le phénomène est le plus net. D'autre part, la diminution de concentration totale résulte essentiellement d'une baisse du taux du cadmium de la fraction insoluble.

Durant cette période de décroissance, le cadmium de la phase soluble de la masse viscérale est principalement lié à des protéines de haut poids moléculaire. Dans le reste des fractions d'élution, sa concentration est trop faible pour que des métallothionéines aient pu être mises en évidence.

### 3. Effets de l'intoxication expérimentale

En mai, après 24 jours de contamination par l'eau de mer, la teneur en cadmium des tissus mous passe de 1,4 à 19,3  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Elle atteint 97 dans le rein, 40 dans la masse viscérale, et 7 dans la céphalopodium-complexe palléal. Pendant le même temps, après 4 injections de 100  $\mu\text{g}$ . de cadmium, ces concentrations sont

	MAI n=4	JUIN n=10	AOUT n=10	SEPT. n=9	OCT. n=9	DEC. n=10
Ensemble des tissus mous	1,8±0,3	1,4±0,2	3,7±0,5	5,9±0,6	2,7±0,8	2,3±0,5
Masse viscérale	4,0±0,9	3,0±0,5	7,5±1,1	12,5±1,5	5,7±1,8	4,3±0,7
Rein	2,8±0,7	3,0±0,5	10,8±2,0	19,0±2,5	5,9±2,0	9,1±4,2
Céphalopodium + complexe palléal	0,7±0,2	0,7±0,1	1,6±0,2	2,7±0,3	1,1±0,2	0,9±0,2

TABLEAU I. Teneur globale et répartition du cadmium dans les organes de *Murex trunculus*, à diverses époques de l'année (m +/- E.S., exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  poids frais).

respectivement de 26, 232, 53 et 7. 77% du cadmium injecté a été retenu, soit 61% par le rein, 14% par la masse viscérale et 2% par le céphalopodium-complexe palléal. Dans les deux types de contamination, c'est donc le rein qui retient le plus de cadmium.

Chez les animaux dont l'intoxication a débuté en août et qui ont été analysés en septembre, 28 jours plus tard, après avoir reçu 4 injections de 100  $\mu\text{g}$  de Cd, tout le métal injecté a été accumulé, ce qui multiplie la concentration initiale par 6 environ. La masse viscérale en détient 49%, le rein 39% et le céphalopodium-complexe palléal 12%. Compte tenu des poids relatifs, c'est encore le rein, dont la teneur passe de 14 à 307  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , qui apparaît comme l'organe principal de concentration du métal. Celui-ci s'accumule surtout dans la fraction insoluble des différents organes. La teneur de la fraction soluble varie peu,

	AOUT n=10	OCTOBRE n=9	DECEMBRE n=10
Ensemble des tissus mous	3,7±0,5	2,7±0,8	2,3±0,5
Masse viscérale	7,5±1,1	5,7±1,8	4,3±0,7
F S	1,5±0,4	2,2±0,8	1,7±0,3
F I	5,9±0,9	3,6±1,1	2,6±0,7
Rein	10,8±2,0	5,9±2,0	9,1±4,2
F S	2,1±0,5	2,1±0,6	2,9±1,0
F I	8,7±1,7	3,8±1,4	6,2±3,2
Cephalopodium + complexe palléal	1,6±0,2	1,1±0,2	0,9±0,2
F S	0,3±0,1	0,3±0,1	0,4±0,0
F I	1,2±0,2	0,7±0,2	0,6±0,1

TABLEAU II. Répartition et spéciation du cadmium naturel chez *Murex trunculus*, pendant la période décroissance (FI, fraction insoluble; FS, fraction soluble; m +/- E.S., exprimées en  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , poids frais).

sauf dans le rein où elle augmente nettement (tableau III). Dans la fraction soluble de la masse viscérale, le cadmium est lié à des protéines de haut poids moléculaire. La teneur en cadmium du reste des fractions d'éluion est trop faible pour que la présence de Cd-thionéines ait pu y être décelée.

Chez les animaux intoxiqués pendant 62 jours, entre octobre et décembre, par 6 injections de 100 µg de Cd, 88% seulement du cadmium se sont accumulés, soit 15% dans l'ensemble céphalopodium-complexe palléal, 52% dans la masse viscérale, et 22% seulement dans le rein. Les concentrations dans la masse viscérale (102 µg.g<sup>-1</sup>) et dans le rein (441 µg.g<sup>-1</sup>) sont extrêmement importantes. Elles augmentent plus particulièrement dans la fraction insoluble. La teneur en Cd de la fraction soluble est cependant élevée, surtout dans le rein avec près de 80 µg.g<sup>-1</sup> (tableau IV). Dans la masse viscérale, le cadmium est lié à des protéines de haut poids moléculaire. La teneur en Cd du reste des fractions d'éluion étant située au-dessous de la limite de détection, nous n'avons pas décelé de Cd-thionéines chez ces animaux.

L'examen histologique du testicule et de l'ovaire n'a montré aucune différence entre les témoins et les individus contaminés expérimentalement. En revanche, l'observation macroscopique de la coquille a révélé une anomalie, chez les animaux autopsiés en décembre et contaminés depuis deux mois. En octobre, les coquilles de tous les animaux étaient en phase d'allongement ce qui se traduit par la présence, au bord de l'ouverture, d'une zone mince, dentelée à l'extrémité et rayée de brun sur fond pâle. Deux mois plus tard, 9 sur 13 des individus contaminés en étaient encore à cette phase, contre 1 sur 13 pour les témoins. Les 12 autres témoins et les 10 individus capturés dans leur milieu naturel arrivaient au terme de la phase d'épaississement pendant laquelle le nouvel anneau acquiert les caractères ordinaires de la coquille.

## DISCUSSION

Nos résultats confirment l'existence de variations saisonnières de la teneur en cadmium des tissus mous de *Murex trunculus*, l'indépendance de ces variations par rapport au cycle reproducteur et la coïncidence chronologique entre la baisse de concentration et la croissance de la coquille, précédemment mises en évidence (Bouqueneau et Martoja 1987). Ils démontrent l'exceptionnelle résistance des murex qui acceptent, sans dommages apparents et immédiats, des injections répétées de 100 µg de cadmium pour un poids corporel allant de 7 à 14 g. Ces deux constatations suggèrent d'une part, que le cadmium pourrait être impliqué dans un processus physiologique encore énigmatique et, d'autre part, que les murex disposent d'un mécanisme particulier leur permettant d'immobiliser l'excès de métal sous une forme inoffensive, en cas d'agression brutale.

	témoins n=10	contaminés n=9
Ensemble des tissus mous	5,9±0,6	34,3±2,1
Masse viscérale	12,5±1,5	57,2±4,3
F S	4,2±0,6	7,8±0,7
F I	8,4±1,1	49,3±3,7
Rein	19,0±2,5	363,7±39,9
F S	4,5±0,8	56,3±4,8
F I	14,6±2,0	307,4±39,8
Cephalopodium + complexe palléal	2,7±0,3	9,0±0,5
F S	0,9±0,1	1,2±0,1
F I	1,9±0,2	7,9±0,1

TABLEAU III. Répartition et spéciation du cadmium chez des murex intoxiqués pendant 28 jours par 4 injections de 100 µg de CdCl<sub>2</sub>, entre août et septembre (FI, fraction insoluble; FS, fraction soluble; m +/- E.S., exprimées en µg.g<sup>-1</sup>, poids frais).



	témoins n=11	contaminés n=13
Ensemble des tissus mous	2,6±0,3	52,5±2,8
Masse viscérale	5,2±0,7	102,1±9,1
F S	2,0±0,4	22,9±3,2
F I	3,2±0,4	79,1±5,9
Rein	9,5±1,4	441,6±32,1
F S	2,3±0,3	78,1±9,7
F I	7,3±1,2	363,5±27,9
Cephalopodium + complexe palléal	1,4±0,2	14,0±0,9
F S	0,4±0,0	1,2±0,1
F I	1,0±0,1	12,7±0,8

TABLEAU IV. Répartition et spéciation du cadmium chez des murex intoxiqués pendant 62 jours par 6 injections de 100 µg de CdCl<sub>2</sub>, entre octobre et décembre (FI, fraction insoluble; FS, fraction soluble; m +/- E.S., exprimées en µg.g<sup>-1</sup>, poids frais).

La réalité des variations saisonnières est attestée par la stabilité du poids des animaux et un parallélisme constant entre la charge globale en cadmium et sa concentration. Il y aurait donc une différence entre *M. trunculus* et *Thais (Nucella) lapillus*, espèce proche mais plus septentrionale, où une hausse apparente de concentration serait due à une chute de poids consécutive à un jeûne hivernal (Abdullah et Ireland 1986). Par ailleurs, l'absence de métallothionéines chez les individus non intoxiqués, qui semble en contradiction avec nos résultats précédents (Bouquegneau et Martoja 1987), pose, en réalité, peu de problèmes. Les analyses ont été pratiquées à une saison où les Cd-thionéines "naturelles" sont en déclin si bien que leur taux a pu s'abaisser facilement au-dessous du seuil de détection.

Les expériences d'intoxication montrent l'importance du rein dans l'accumulation du cadmium excédentaire, déjà signalée pour la Littorine (Mason et Simkiss 1983; Mason *et al.* 1984; Langston et Zhou 1987). L'organe y est d'ailleurs sensible et, chez certains Pulmonés, des altérations ultrastructurales apparaissent en cas de doses élevées (Dillaman 1980). Comme dans le rein de la Moule (George 1983), cette part du métal est sans doute incluse dans les lysosomes des néphrocytes. Il est probable qu'elle est destinée à être éliminée. L'hypothèse est rendue plausible par comparaison avec *Pomatias elegans* où les lysosomes rénaux, chargés de métaux, sont normalement évacués selon une périodicité annuelle (Martoja 1975).

Ces mêmes expériences ont mis en évidence le rôle prépondérant de la fraction insoluble des tissus, face à une intoxication aiguë par le cadmium. Ce phénomène pourrait être corrélatif de l'absence de métallothionéines dont la synthèse n'a pu être induite par des injections de  $CdCl_2$ . En effet, il est exclu que la durée d'intoxication ait été insuffisante ou que l'intervention ait eu lieu pendant une phase du cycle où cette synthèse était impossible, puisque nous l'avons provoquée, au mois d'octobre et en 20 jours, par addition de  $CdCl_2$  dans l'eau de mer (Bouquegneau *et al.* 1983). Il faut donc admettre que la contamination par "effet bain", selon l'expression de Péres, et l'intoxication aiguë par injection dans le milieu intérieur mettent en jeu des mécanismes de défense différents. Dans le premier cas, le cadmium est capté par des métallothionéines selon un processus très répandu dans le règne animal et chez les gastéropodes eux-mêmes (voir Noël-Lambot *et al.* 1980). Dans le second, il est immobilisé dans les organites de la phase insoluble. Une telle réaction n'est possible que grâce à la multiplicité des types cellulaires pourvus de sphérocristaux et de lysosomes agissant comme pièges à cadmium : aux cellules à pores et aux cellules vésiculeuses qui en contiennent à l'état normal (Martoja *et al.* 1984), il convient probablement d'ajouter les néphrocytes. Il est évident que ce mécanisme n'existe que dans les espèces pourvues des cellules adéquates, ce qui explique certaines divergences de

résultats entre les gastéropodes les plus évolués et les bivalves, par exemple.

L'intervention possible du cadmium dans l'édification de la coquille n'est encore qu'une hypothèse et les effets de l'intoxication, peuvent être compris de deux façons : ou bien la phase d'allongement est prolongée et le métal est bénéfique à la croissance ou bien la phase d'épaississement est retardée sinon supprimée et il agit comme inhibiteur. Ce trouble métabolique serait alors à rapprocher de l'ostéomalacie que le cadmium provoque chez l'Homme et qui fut l'une des manifestations de la maladie d'Itai-itai (voir Lauwerys 1979). Est-il comparable à l'arrêt de croissance qui a été observé chez l'Escargot mais qui s'accompagne d'un état de dormance avec sécrétion d'épiphragme (Russel *et al.* 1981) ? Il serait d'autant plus prématuré de discuter de ces questions que le contrôle de la formation de la coquille est mal connu (voir Wilbur et Saleuddin 1983).

#### REFERENCES

- ABDULLAH, A.M. et M.P. IRELAND. (1986). - Seasonal studies on cadmium concentration and toxicity, oxygen consumption, digestive gland glycogen, and lipid in dog whelks collected at Aberystwyth, Wales. Marine pollution Bull., 17 : 562-566.
- BOUQUEGNEAU, J.M. et M. MARTOJA. (1982). - Teneur en cuivre et son degré de complexation chez quatre gastéropodes marins. Données sur le cadmium et le zinc. Oceanologica acta., 5 : 219-228.
- BOUQUEGNEAU, J.M. et M. MARTOJA. (1987). - Seasonal variation of the cadmium content of *Murex trunculus* in a non-cadmium polluted environment. Bull. environ. Contamination Toxicology, 39 : 69-73.
- BOUQUEGNEAU, J.M., M. MARTOJA et M. TRUCHET. (1983). - Localisation biochimique du cadmium chez *Murex trunculus* L. (Prosobranchie Néogastropode) en milieu naturel non pollué et après contamination expérimentale. C.R. Acad. Sciences Paris, 296 (série III) : 1121-1124.
- CUTHBERT, K.C., A.C. BROWN et M.J. ORREN. (1976). - Cadmium concentrations in the tissues of *Bullia digitalis* (Prosobranchiata) from the south african west coast. South african J. of Science, 72 : 57.
- DILLAMAN, R.M. (1980). - Toxicity of cadmium to *Helisoma anceps* and its effect on kidney ultrastructure. J. Invertebrate Pathology, 36, (2), : 23-234.
- GEORGE, S.G. (1983). - Heavy metal detoxication in the mussel *Mytilus edulis* - composition of Cd-containing kidney granules (Tertiary lysosomes). Compar. Biochem. and Physiol., 76 C : 53-57.

- LANGSTON, W.J. et M. ZHOU. (1987). - Cadmium accumulation, distribution and metabolism in the gastropod *Littorina littorea* : the role of metal binding proteins. J. Mar. Biol. Association, U.K., 67 : 585-601.
- LAUWERYS. (1979). - Cadmium in man. In "The chemistry, biochemistry and biology of cadmium" (Webb ed.), Elsevier/North Holland, 433-455.
- MARTOJA, M. (1975). - Le rein de *Pomatias (=Cyclostoma) elegans* (Gastéropode prosobranche) : données structurales et analytiques, Annales Sc. Nat., (12ème série), 17 : 535-558.
- MARTOJA, M., M. TRUCHET et J.M. BOUQUEGNEAU. (1984). - Accumulation naturelle de cadmium chez *Murex trunculus* et *Murex brandaris* (Prosobranches Néogastropodes); localisation histologique. C.R. Acad. Sciences, Paris, 298 (série III) : 461-466.
- MASON, A.Z. et K. SIMKISS. (1983). - Interactions between metals and their distribution in tissues of *Littorina littorea* (L.) collected from clean and polluted sites. J. Mar. Biol. Association, U.K., 63 : 661-672.
- MASON, A.Z., K. SIMKISS et K.P. RYAN. (1984). - The ultrastructural localization of metals in specimens of *Littorina littorea* collected from clean and polluted sites. J. Mar. Biol. Association, U.K., 64 : 699-720.
- MULLIN, J.B. et J.P. RILEY. (1956). - The occurrence of cadmium in seawater and in marine organisms and sediments. J. Mar. Res., 15 : 103-122.
- NOEL-LAMBOT, F., J.M. BOUQUEGNEAU, F. FRANKENNE et A. DISTECHE. (1980). - Cadmium, zinc and copper accumulation in limpets (*Patella vulgata*) from the Bristol Channel with special reference to metallothioneins. Mar. Ecology Progr. Ser., 2 81-89.
- RUSSELL, L.K., J.I. DEHAVEN & R.P. BOTTS. (1981). - Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix apersa*). Bull. Environ. Contamination Toxicology, 26 : 634-640.
- WILBUR, K.M. et A.S.M. SALEUDDIN. (1983). - Shell formation. In "The Mollusca" (Saleuddin and Wilbur ed.), Academic Press, New York, 4 : 235-287.

*Travail financé par le FNRS (Belgique, où J.M. BOUQUEGNEAU est chercheur qualifié, et par le CNRS (France), dans le cadre de l'unité associée n 680.*