

Agence de l'Eau Rhin-Meuse

Laboratoire d'Ecotoxicologie, Université de Metz  
Centre des Sciences de l'Environnement, Université de Metz



Mise au point d'un protocole visant à étudier  
l'induction de micronoyaux chez la moule d'eau douce  
*Dreissena polymorpha* exposée au benzo(a)pyrène

**Rapport final**  
présenté le 14 mai 1993

Responsables scientifiques : Jacques Mersch  
Fabrice Godet  
Laure Giamberini

Directeurs scientifiques : Prof. Jean-Claude Pihan  
Prof. Paule Vasseur

## I INTRODUCTION

Depuis que de nombreux composés chimiques ont été reconnus ou suspectés mutagènes ou / et carcinogènes, des tests de **génotoxicité** ont été développés afin d'évaluer les effets de ces molécules sur les organismes et, par voie de conséquence, leurs implications pour la santé humaine.

Parmi les organismes aquatiques, surtout les poissons, les amphibiens et les mollusques ont été employés pour la détection d'effets génotoxiques *in vivo*. Plusieurs types de modifications induites au niveau du matériel génétique sous l'action d'un composé génotoxique ont été étudiées, notamment les aberrations chromosomiques (Prein *et al.* 1978, Alink *et al.* 1980, Al Sabti & Kurelec 1985), l'échange de chromatides soeurs (Alink *et al.* 1980, Hoftman & Vink 1981, Dixon & Clarke 1982, Harrison & Jones 1982) et la formation de micronoyaux (Carrasco *et al.* 1990, Scarpato *et al.* 1990, Wrisberg & Van der Gaag 1992).

L'apparition de micronoyaux dans le cytoplasme des cellules résulte de la cassure de chromosomes par un composé clastogène ou d'une altération de l'appareil mitotique par des toxiques fusoriaux. Les micronoyaux sont donc soit des fragments acentriques de chromosomes, soit des chromosomes entiers qui ne sont pas **intégrés** dans le noyau lors de la télophase de la division cellulaire. Ces fragments de matériel **génétique** persistent dans l'une ou les deux cellules filles sous forme d'un ou de plusieurs micronoyaux. Le **mécanisme** de formation des micronoyaux implique que la cellule soit en phase de division pour qu'un effet génotoxique puisse être mis en évidence. Le critère micronoyau s'applique donc uniquement à des organismes en phase de croissance (stade larvaire ou stade juvénile) ou à des tissus dont le taux de renouvellement est rapide (moelle osseuse, cellules branchiales).

Actuellement, les moules marines du genre *Mytilus* représentent l'un des groupes d'organismes le plus utilisés dans les études de **génotoxicité in vivo**, en raison de leur contact étroit avec le milieu ambiant

Ce travail a consisté à vérifier la **possibilité** d'appliquer les procédures expérimentales développées pour *Mytilus sp.* à un bivalve d'eau douce, à savoir la moule zébrée *Dreissena polymorpha*. Le but a été de mettre au point un protocole d'exposition des dreissènes à un composé génotoxique, le **benzo(a)pyrène**, et une technique de préparation histologique du tissu branchial et des **éléments** figurés de l'**hémolymphe** du mollusque.

## II ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE : TESTS DE GENOTOXICITE UTILISANT LES MOULES MARINES DU GENRE *MYTILUS*

### 1. Test du micronoyau

Deux espèces essentiellement sont utilisées, *Mytilus galloprovincialis* et *Mytilus edulis*. La plupart des auteurs ont étudié la formation des micronoyaux (MN) dans les cellules branchiales (Gola *et al.* 1986, Brunetti *et al.* 1988, Majone *et al.* 1988, Scarpato *et al.* 1990) ou dans les hémocytes, cellules de l'hémolymphe (Wrisberg & Van der Gaag 1992, Wrisberg *et al.* 1992). Ces auteurs ont réalisé leurs essais sur des moules adultes, soit en laboratoire avec exposition pendant 48 ou 72 heures (renouvellement du milieu toutes les 24 h) à des produits chimiques ou des effluents complexes (Majone *et al.* 1988, Scarpato *et al.* 1990) soit directement sur des sites marins pollués afin d'en évaluer les potentialités génotoxiques (Brunetti *et al.* 1988, Scarpato *et al.* 1990, Wrisberg *et al.* 1992). Le résultat des essais est exprimé en nombre de cellules à micronoyau pour mille cellules observées (MN, ‰).

#### 1.1. Etudes réalisées en laboratoire

Les taux spontanés de cellules à micronoyau observés chez les moules marines sont du même ordre de grandeur que ceux trouvés chez d'autres groupes animaux, notamment les amphibiens et les poissons (tableau 1).

##### 1.1.1. Essais réalisés avec des molécules organiques

Les essais avec des molécules reconnues mutagènes telles que le benzo(a)pyrène (B(a)P), la vincristine (VC), la mitomycine C (MMC) et l'éthyméthanesulfonate (EMS) ont montré une bonne sensibilité des moules, compte tenu de leur courte durée d'exposition (tableau 2). Ainsi, pour une concentration de 25 µg/L de B(a)P, le taux de cellules à MN obtenu en 48 heures chez *Mytilus galloprovincialis* ( $24 \pm 9$  ‰) est équivalent à celui induit chez la larve de *Pleurodeles waltl* en 12 jours ( $27 \pm 5$  ‰). En revanche, la moule *Mytilus edulis* est moins sensible à l'EMS que le pleurodèle. Pour une durée d'exposition identique (10 jours), l'EMS à 100 mg/L induit un taux de cellules à MN 40 fois supérieur à celui du témoin chez le triton alors que le taux de MN est seulement multiplié par trois chez la moule, que ce soit dans les cellules branchiales ou dans les hémocytes.

L'équipe de Majone (1987) s'est intéressée à la cinétique d'apparition des cellules à MN dans les branchies de *Mytilus galloprovincialis* exposée pendant 48 heures par 30 µg/L de MMC. Il ressort de leurs travaux que le taux de MN est maximal à l'issue des deux jours d'intoxication (10 ‰), puis il chute rapidement pour se stabiliser à partir du 15<sup>ème</sup> jour après l'arrêt du traitement par la MMC à une valeur de 4.5 ‰ (témoin : 2.0 ‰). Ce taux de MN est encore observable au

Espèce	Tissu étudié	Cellules à micronoyau (‰)	Auteurs
<b>Mollusques</b>			
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	Cellules branchiales	2,9 ± 12	<b>Scarpato</b> et al. 1990 Majone et al. 1987 <b>Gola</b> et al. 1986 <b>Gola</b> et al. 1986
		2,2	
		1,6 ± 0,2	
		1,5 ± 0,3	
<i>Mytilus edulis</i>	Cellules branchiales	0.4	Van der Gaag et al. 1990 Wrisberg & Van der Gaag 1992
	Hémocytes	1,35 ± 0.8	
<b>Amphibiens</b>			
<i>Pleurodeles waltl</i>	Erythrocytes	4.0 ± 1.6	<b>Fernandez</b> et al. 1989  Grinfeld et al. 1986 Jaylet et al. 1986a
		7,0 ± 12	
		7,5 ± 2,4	
		7,0 ± 1.9	
<i>Xenopus levis</i>	Erythrocytes	1,0 ± 0,5	Van Hummelen et al. 1989
<i>Ambystoma mexicanum</i>	Erythrocytes	5,0 ± 0.8	Jaylet et al. 1986b
<b>Poissons</b>			
<i>Heteropneustes fossilis</i>	Erythrocytes	0,12 ± 0.07	Das & Nanda 1986
		0.18 ± 0.06	
<i>Umbra limi</i>	Erythrocytes	0	Metcalfe 1988
<i>Ictalurus nebulosus</i>	Erythrocytes	0.14	Metcalfe 1988

Tableau 1 : Taux spontanés de micronoyaux observés chez différentes espèces animales.

Espèce	Mutagène	Temps d'exposition et concentration	Type cellulaire étudié	Cellules à micronoyau (%)	Auteurs
<b>Mollusques</b>					
<i>Mytilus galloprovincialis</i>	B(a)P	48 h à 25 µg/L	Cellules branchiales	24 ± 9	Scarpato et al. 1990
		48 h à 75 µg/L		37 ± 7	
	v c MMC	48 h à 5 µg/L 48 h à 30 µg/L	Cellules branchiales Cellules branchiales	5,7 ± 2,4 10	Scarpato et al. 1990 Majone et al. 1987
<i>Mytilus edulis</i>	EMS	10 j à 100 mg/L	Cellules branchiales	1,2	Van der Gaag et al. 1990 Wrisberg & Van der Gaag 1992
		14 j à 100 mg/L	<b>hémocytes</b>	4.1 ± 1,4	
<b>Amphibiens</b>					
<i>Pleurodeles waltl</i>	B(a)P	12 j à 25 µg/L	<b>Erythrocytes</b>	27 ± 5	Fernandez et al. 1989 Jaylet et al. 1986a
		6 j à 50 µg/L	<b>Erythrocytes</b>	19 ± 2	
		10 j à 50 µg/L		106 ± 16	
	EMS	4 j à 100 mg/L 10 j à 100 mg/L	Erythrocytes	70 ± 13 190 ± 12	Jaylet et al. 1986a
<i>Xenopus levis</i>	B(a)P	12 j à 60 µg/L	Erythrocytes	4,0 ± 12	Van Hummelen et al. 1989
	EMS	14 j à 50 mg/L	<b>Erythrocytes</b>	8,0 ± 2,6	Van Hummelen et al. 1989
		14 j à 100 mg/L		45 ± 17	
<i>Ambystoma mexicanum</i>	B(a)P	8 j à 25 µg/L	<b>Erythrocytes</b>	9.0 ± 2,8	Jaylet et al. 1986b
		8j à 100 µg/L		167 ± 14	

Tableau 2 : Taux **significatifs** de micronoyaux induits après exposition à des molécules **mutagènes**.

B(a)P : **benzo(a)pyrène**,

VC : **vincristine**,

MMC : **mitomycine C**,

EMS : **éthylméthanesulfonate**.

N. B.: Tous les essais ont été **réalisés** avec renouvellement journalier du milieu **expérimental**.

Les taux spontanés de micronoyaux sont donnés dans le tableau 1.

28ème jour. Ces résultats sont comparables à ceux obtenus par Grinfeld *et al.* (1986) sur le pleurodèle.

Majone *et al.* (1987) ont également montré qu'une température d'expérimentation de 13 °C ou de 23 °C (température hivernale et estivale de la mer Méditerranée) n'influe pas sur le taux de cellules à MN induit chez *Mytilus galloprovincialis*.

#### 1.1.2. Essais réalisés avec des métaux

Gola *et al.* (1986) ont montré que certains composés métalliques pouvaient provoquer l'apparition de MN chez *Mytilus galloprovincialis*. En effet, le plomb aux concentrations de 3.85 mg/L (PbSO<sub>4</sub>) et de 0.9 mg/L (PbCrO<sub>4</sub>), le cadmium à 0.55 mg/L (CdCO<sub>3</sub>) et le mercure à 0.9 mg/L (HgCl) induisent une augmentation significative du taux de MN dans les cellules branchiales. L'activité génotoxique de ces sels métalliques est augmentée de façon significative en présence d'acide nitrilotriacétique (NTA, 0.5 mg/L). D'après Majone *et al.* (1988), le zinc à 0.17 mg/L, (ZnCl<sub>2</sub>) induit également des MN chez cette espèce de moule.

#### 1.1.3. Application à des effluents complexes

L'un des intérêts d'un test **écotoxicologique** est certainement son application à l'étude d'effluents complexes rejetés dans l'environnement.

Van der Gaag *et al.* (1990) ont réalisé une étude comparative de plusieurs tests de génotoxicité dont les tests du micronoyau sur *Mytilus edulis* et sur *Pleurodeles waltl*. Ils ont exposé les organismes à un effluent de station de traitement biologique recevant essentiellement des rejets d'industries chimiques. Deux concentrations ont été testées : 3.2 % et 10 % de l'effluent brut. Les durées respectives des tests moule et triton étaient de 10 et 12 jours. La moule s'est avérée moins sensible que le triton. En effet, seule la plus forte concentration a induit un taux significatif de MN dans les cellules branchiales de la moule, alors que le triton a mis en évidence une génotoxicité de l'effluent à 3.2 %.

Un taux significatif d'hémocytes à MN a également été détecté chez *Mytilus edulis* après exposition à une concentration de 1 % d'un effluent d'usine de blanchiment de pâte à papier (Wrisberg & Van der Gaag 1992).

#### 1.2. Etudes de terrain

Les mollusques présentent des avantages incontestables pour la détection d'effets génotoxiques *in situ* : la **sédentarité** et la possibilité de transférer sur des sites dont on veut étudier la contamination. Ainsi, Scarpato *et al.* (1990) ont transplanté *Mytilus galloprovincialis* pour détecter la **génotoxicité** des eaux estuariennes de Fiume Morto (Italie). Un **résultat** positif a été obtenu dès la deuxième semaine d'exposition des moules. Wrisberg *et al.* (1992) ont collecté des moules

marines autochtones au large du **Danmark** et de la Norvège. Les taux de micronoyaux étaient significativement plus élevés aux sites pollués qu'aux sites qui n'étaient pas touchés par des rejets industriels.

## **2. Autres paramètres d'évaluation de la génotoxicité chez *Mytilus sp.***

La formation de MN n'est pas le seul paramètre utilisé pour évaluer les potentialités génotoxiques de **molécules** chimiques ou de milieux complexes chez *Mytilus sp.* La mise en évidence d'**échanges** de chromatides soeurs (SCE) ou d'aberrations chromosomiques a été utilisée avec **succès** respectivement par **Dixon & Clarke (1982)** et par **Al Sabti & Kurelec (1985)**. Le critère SCE a également **été** appliqué aux larves de *Mytilus edulis* (**Harrison & Jones 1982**).

## **3. Conclusion**

Cette analyse bibliographique montre que les mollusques du genre *Mytilus* présentent un intérêt dans la détection de la génotoxicité de **molécules** chimiques et d'effluents industriels. Bien que les moules semblent être moins sensibles que d'autres organismes, comme par exemple les larves de pleurodèle, elles présentent deux avantages essentiels : la disponibilité à tout moment de l'année et la faisabilité d'études de terrain.

Une espèce d'eau douce proche de *Mytilus edulis* tant d'un point de vue anatomique que physiologique est la moule **zébrée *Dreissena polymorpha***. Tout comme la moule marine, la dreissène a été largement utilisée dans le cadre de la surveillance du milieu naturel. Ses propriétés d'accumulation de micropolluants en font un organisme indicateur (**Léglize & Crochard 1987**, **Busch et al. 1992**, **Kraak et al. 1992**) et ses facultés de détection de molécules toxiques par la modification des mouvements valvaires a conduit à la mise au point de systèmes d'alarme (**Jenner et al. 1992**). L'adaptation du test du micronoyau à la dreissène permettra donc d'étendre la gamme d'utilisation à la détection d'effets génotoxicques en milieu dulçaquicole.

### III MATERIEL ET METHODES

#### 1. Dispositif d'étude et conditions expérimentales

L'expérience a été réalisée dans une salle climatisée à 16 °C. La lumière a seulement été allumée lors des manipulations. Pendant le jour, de la lumière naturelle pouvait pénétrer par une fenêtre.

La série expérimentale **était** composée de 6 cristallisoirs de 3 L, contenant 2.5 L d'eau de conduite déchlorée par passage sur charbon actif. L'eau a été préparée 24 heures avant chaque changement de milieu afin qu'elle se trouve à la bonne température lors de son utilisation. Le milieu a **été** renouvelé toutes les 48 heures. Il a été oxygéné par bullage d'air et homogénéisé par agitation magnétique.

La molécule génotoxique choisie, le benzo(a)pyrène ou B(a)P, a été testée aux concentrations de 12.5, 25, 75 et 125 µg/L. La série a été complétée par un témoin sans traitement et par un témoin contenant uniquement du DMSO qui constitue le tiers solvant pour le B(a)P. Des prélèvements de dreissènes ont **été réalisés** dans les 6 unités après des temps d'intoxication de 2, 4, 8 et 12 jours c'est-à-dire après 1, 2, 4 et 6 cycles d'intoxication. A noter que le B(a)P est un génotoxique indirect, c'est-à-dire qu'il nécessite une activation métabolique pour exprimer sa toxicité.

Afin d'assurer une activité de filtration maximale des moules et par **conséquent** un contact optimal avec le toxique, de la nourriture a **été** fournie aux animaux sous forme d'une suspension algale de *Chlamydomonas variabilis*. Il s'agit d'une **espèce** d'algue unicellulaire verte flagellée sans coque facilement assimilable par *Dreissena polymorpha* (Ten Winkel & Davids 1982). Un apport en continu de nourriture a été assuré par une pompe péristaltique. La quantité d'algues à fournir a été estimée à partir de données publiées par Sprung & Rose (1988). La marge de manoeuvre est très étroite dans un système d'intoxication semi-statique. En effet, il faut fournir suffisamment d'algues pour stimuler la filtration et pas trop afin de ne pas saturer l'organisme; celui-ci diminuerait son taux de filtration et, par **conséquent**, le contact avec le milieu ambiant. Comme le nombre de dreissènes dans les cristallisoirs a varié en fonction du temps, la suspension algale a été diluée de manière à apporter le même volume pendant toute la durée de l'expérience. Du fait d'une augmentation de volume, les concentrations nominales finales de B(a)P doivent être corrigées en conséquence.

#### 2. Manipulation

##### 2.1. Prélèvement et conditionnement des organismes

Environ 300 moules d'eau douce d'une longueur de coquille de  $20 \pm 1$  mm ont été **prélevées** le 26 avril 1992 dans un secteur canalisé de la Meuse amont près de Commercy. AU



laboratoire, le stock de dreissènes a **été** divisé en 6 lots d'environ 45 animaux. 10 moules ont été réservées pour faire un point zéro avant le début de l'expérience. Chaque lot de dreissènes a été reparti sur 2 portoirs en PVC en vue de leur fixation. Au bout de 48 heures, les moules non fixées ont été éliminées. Pendant la phase d'acclimatation d'une semaine, les conditions du milieu ont été maintenues les plus proches possibles des conditions expérimentales.

## 2.2. Essais préliminaires

L'objectif des essais préliminaires a consisté d'une part à déterminer une quantité adéquate d'algues à fournir et d'autre part à tester la toxicité du tiers solvant, le DMSO, sur l'activité de filtration des moules. Ces essais ont été conduits avec 2 lots de 20 moules sur 5 cycles de 24 h.

## 2.3. Intoxication

Avant l'introduction des dreissènes dans les enceintes **expérimentales**, deux cycles à vide de 24 heures ont été effectués dans le but de saturer une partie des sites **d'adsorption** du **matériel** en contact avec le B(a)P. L'expérience d'exposition des moules a débuté le 3 mai 1992. Le nombre d'animaux par cristallisateur a **été** fixé à 40, sauf pour la plus forte concentration où 6 moules supplémentaires ont été intoxiquées. Ces animaux étaient destinés à une étude qualitative des micronoyaux en microscopie optique. Une demi-heure avant l'introduction des moules dans les cristallisoirs, l'oxygénation, l'agitation et l'apport de nourriture ont **été** mis en route. Après un délai compris entre 30 et 60 minutes, nécessaire aux moules pour stabiliser leur taux de filtration, le toxique a été injecté dans les cristallisoirs. Ce protocole a été répété lors de chaque changement de milieu. Deux séries de cristallisoirs -chacun recevant toujours la même concentration de **B(a)P**- ont été utilisées afin de pouvoir transvaser rapidement les moules et les soumettre ainsi le moins possible à un stress physiologique. Lors de chaque prélèvement, 10 moules ont **été** coupées de leur support et placées dans des flacons de 500 mL contenant de l'eau **déchlorée** jusqu'à la dissection **réalisée** le même jour.

## 2.4. Suivi de la filtration

L'activité de filtration des moules soumises aux différentes concentrations de B(a)P a été évaluée en suivant la disparition de biomasse algale dans les cristallisoirs. Ce critère est classiquement appelé **clearance** (Poulsen *et al.* 1982). Il permet de détecter tout effet toxique sur l'activité physiologique de base d'un organisme filtreur. La quantité d'algues restant dans le milieu a été déterminée par dosage des pigments chlorophylliens (chlorophylle-a et son produit de dégradation la phaeophytine-a). Afin de pouvoir évaluer *a posteriori* la quantité exacte d'algues **apportées**, un septième cristallisateur sans organismes a été installé. Comme le nombre de particules

par mL de suspension a été déterminé sur cellule de Malassez, on peut également exprimer la consommation d'algues en nombre de cellules ingérées par moule et par unité de temps.

Lors de chaque renouvellement de milieu, 1 L d'eau a été filtré sur une membrane en fibre de verre d'une porosité de 0.45  $\mu\text{m}$ . Après extraction, les pigments ont été dosés d'après la méthode de Marker *et al.* (1980). La quantité d'algues consommée peut être déterminée par calcul de la différence avec la quantité totale d'algues introduites mesurée dans le cristalliseur sans organismes.

### 1.5. Prélèvement d'eau

A la fin des cycles d'exposition, à l'exception du premier, le B(a)P a été dosé dans des échantillons d'eau des cristalliseurs correspondant à la plus faible et à la plus forte concentration (12,5 et 125  $\mu\text{g/L}$ ). L'eau brute a été prélevé dans des bouteilles en verre immédiatement après avoir retiré les moules et stockée à la chambre froide à 4 °C et à l'abri de la lumière. Les analyses de B(a)P ont été réalisées par l'IRH de Nancy sur commande de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse.

## 3. Préparations histologiques

Le protocole de préparation des tissus a été établi suivant des indications données dans 3 publications différentes, à savoir : Majone *et al.* (1987), Brunetti *et al.* (1988) et Scarpato *et al.* (1990).

Sur chaque moule, l'hémolymphe est prélevée par ponction près du muscle adducteur postérieur. Les hémocytes sont fixés par le formol à 5 %. Une goutte de la suspension cellulaire est déposée sur une lame de verre et étalée par la méthode du frottis. La préparation est séchée à l'air et colorée par la méthode de Grunwald-Giemsa.

Après le prélèvement de l'hémolymphe, les dreissènes sont décoquillées et les branchies sont **disséquées**. Deux méthodes différentes sont décrites dans la bibliographie : une dilacération mécanique des cellule suivie d'une filtration (Majone *et al.* 1987) et une dissociation du tissu branchial par voie enzymatique (Scarpato *et al.* 1990). Dans les deux cas, la suspension cellulaire obtenue est fixée (respectivement par le fixateur de Clark et le fixateur de Camoy) et colorée (Giemsa 5 ou 3 % dans de l'eau distillée). Comme la description de la technique est très sommaire dans les publications disponibles, la mise au point du protocole de préparation des lames a nécessité un travail important.

L'analyse cytogénétique est effectuée sur la population cellulaire à noyaux ronds et volumineux. La lecture des lames est réalisée par microscopie optique à l'immersion.

Pour l'étude histologique qualitative des micronoyaux formés, les parties molles des dreissènes sont fixées en entier par le liquide de Boin-Hollande. Elles sont incluses dans de la paraffine et **coupées** à 7  $\mu\text{m}$ . Les préparations microscopiques sont colorées par l'hématoxyline de Groat ou par le bleu de toluidine.

## IV RESULTATS ET DISCUSSION

### 1. Partie expérimentale

#### 1.1. Activité de filtration des moules

D'après les essais préliminaires, la quantité de particules algales à fournir est d'environ  $0.8 \cdot 10^6$  cellules par heure et par individu. Les dosages des pigments chlorophylliens ont montré qu'à la fin d'un cycle de 24 heures, la concentration restant dans le milieu était proche de celle attendue pour un taux de filtration maximal des organismes (Spmng & Rose 1988). Le débit de la pompe péristaltique a été réglé à  $0.123 \text{ mL/min}$  correspondant à un volume de suspension algale d'environ  $355 \text{ mL}$  en 48 heures (durée d'un cycle lors de l'essai définitif). Le DMSO testé à des concentrations de  $75$  et  $100 \mu\text{g/L}$  n'a pas révélé d'effet sur la consommation d'algues. On peut donc admettre que l'activité de filtration des mollusques n'est pas **perturbée**. La concentration de DMSO utilisée dans l'essai définitif a été de  $75 \mu\text{g/L}$  soit un ajout de  $187.5 \mu\text{L}$  dans le milieu expérimental.

La concentration en chlorophylle-a dans les différents cristallisoirs montre que la consommation d'algues (exprimée en % de la **quantité** initiale introduite) n'est pas significativement influencée par les concentrations croissantes en B(a)P (tableau 3). Aucun effet toxique sur le comportement du mollusque n'a donc pu être mis en **évidence**. Malgré une consommation de 70 à 90 % des algues fournies, la concentration résiduelle en chlorophylle-a dans le milieu reste relativement élevée. Si on considère que 80 % de la nourriture a été consommée, le nombre de cellules dans le milieu au bout de 48 heures dépasse  $100.000$  par  $\text{mL}$ . On peut donc envisager de diminuer l'apport afin d'assurer un effort de filtration maximal.

traitement	0	2	jour 4	jour 6	jour 8	jour 10	jour 12	$\bar{x} \pm s$
Témoin		68	74	73	75	69	80	$73 \pm 4$
Témoin DMSO		89	82	87	91	67	85	$83 \pm 8$
B ( a ) P $12.5 \mu\text{g/L}$		81	80	88	90	87	81	$85 \pm 5$
25		87	81	90	90	89	83	$86 \pm 4$
75		91	86	91	89	53*	64	$84 \pm 11$
125		89	91	85	87	83	84	$86 \pm 3$

Tableau 3 : Consommation d'algues dans les différents bacs, évaluée par la concentration en chlorophylle-a **exprimée** en % du total introduit

\* valeur éliminée

## 1.2. Concentrations réelles en B(a)P dans l'eau

Le dosage du B(a)P dans l'eau a montré qu'au bout de 48 heures, les concentrations réelles n'étaient plus que de 0.6 et 1.0 % des concentrations nominales respectivement de 12.5 et 125  $\mu\text{g/L}$  (tableau 4).

cycle d'exposition	concentration nominale		ratio 211
	12,5 $\mu\text{g/L}$ (1)	125 $\mu\text{g/L}$ (2)	
2ème	0,050	0,620	12,4
3ème	0,060	1,190	19,8
4ème	0,035	1,180	33,7
5ème	0,700	2,390	3,4
6ème	0.155	0,670	4,3

Tableau 4 : Concentration en B(a)P dans le milieu après 48 heures.

En partant du fait que les analyses ne sont pas **erronées** et qu'il n'y a pas eu destruction de la **molécule** pendant le temps compris entre les prélèvements et le dosage lui-même (presque 2 mois), il faut considérer que la cinétique de disparition du B(a)P de la phase aquatique est très rapide. Cette disparition du B(a)P, molécule hydrophobe, est liée à sa tendance à s'adsorber aux surfaces solides disponibles. Malgré les concentrations résiduelles observées dans l'eau après 48 heures, les organismes ont été en contact avec le xénobiotique, du moins pendant un temps court. En effet, le produit a été injecté dans les cristallisoirs une demie heure après le changement de milieu lorsque les moules avaient repris une filtration normale. Cependant, l'exposition est impossible à chiffrer; les ratios variables entre les deux concentrations extrêmes (12.5 et 125  $\mu\text{g/L}$ ) montrent que les phénomènes qui influencent la disparition du B(a)P de la phase aquatique ont été irréguliers (tableau 4). Dans des **expériences** futures, un suivi des concentrations dans l'eau s'avère indispensable afin d'évaluer l'exposition réelle de l'organisme à la molécule génotoxique.

## 2. Histologie classique

L'évaluation qualitative des micronoyaux sur les coupes histologiques s'est avérée impossible. En effet, l'**épaisseur** des coupes de 7  $\mu\text{m}$  ne permet pas d'observer une seule couche cellulaire et donc d'attribuer avec certitude un micronoyau observé à une cellule donnée.

### 3. Préparations cellulaires

Comme déjà signalé, la mise au point d'une technique de préparation des tissus de dreissène a été rendue difficile par la description très sommaire des protocoles fournis dans la bibliographie.

#### 3.1. Les hémocytes

Après fixation au formol à 5 %, les cellules de l'hémolymphe ont été étalées sur lame par la méthode du frottis. Ce **procédé** a l'inconvénient de trop disperser les cellules sur la lame, de sorte que la lecture devient **très** difficile.

Des modifications simples permettent d'améliorer la préparation. L'hémolymphe est déposé sur une lame de verre **placée** en chambre humide et on laisse les cellules s'étaler par mouvements **amiboïdes**. Après 15 à 20 min, les cellules sont fixées par le glutaraldéhyde tamponné à 1 % pendant 10 min et rincées par le tampon de **Sørensen**. Cette modification permet d'obtenir des clichés avec cellules distinctes et rapprochées, plus faciles à lire. La coloration des cellules par la méthode de Grunwald-Giemsa est maintenue.

#### 3.2. Les cellules branchiales

Les tests préliminaires ont montré que la dissociation des cellules du tissu branchial par voie enzymatique était incomplète en ce sens qu'il restait de nombreux amas cellulaires qui rendaient les préparations illisibles. Par conséquent, une autre technique, la séparation mécanique des cellules, a été appliquée lors des deux premières séries de prélèvements (2ème et 4ème jour). Or, il s'est avéré que le nombre de cellules isolées était insuffisant pour un comptage de 1000 cellules intactes.

Pour les prélèvements des 8ème et 12ème jours d'exposition, la méthode de séparation par voie enzymatique a été affinée. Après dissection, le tissu des deux branchies est dissocié par une solution de dispase (1.5 mg/mL) tamponnée par du tampon Sorensen (0.05 M, pH 7.4) à 37 °C. Après 5 mn d'incubation, le premier surnageant est éliminé en même temps que les débris cellulaires et le mucus recouvrant les branchies. La solution de dispase est renouvelée toutes les 10 minutes, 3 fois de suite. Les 3 surnageants successifs sont recueillis et préfixés par une goutte de fixateur de Clark (alcool 100 / acide acétique : 3 / 1). Les 3 surnageants sont ensuite réunis et centrifugés pendant 5 min à 1000 tpm. Le culot est repris dans quelques gouttes de fixateur, étalé sur une lame de verre et **séché** à l'air. Les préparations sont colorées par le colorant de Giemsa (5 % dans de l'eau distillée).

Les clichés obtenus ont montré que le nombre de cellules recueillies a été très élevé. Le fait d'avoir étalé toutes les cellules disponibles a considérablement surchargé les lames. L'encombrement et la superposition des cellules ont rendu la lecture difficile, voire impossible dans certains

cas (figure 1). La technique serait améliorée tout simplement en ne soumettant qu'une paire de branchies à la digestion par la dispase.

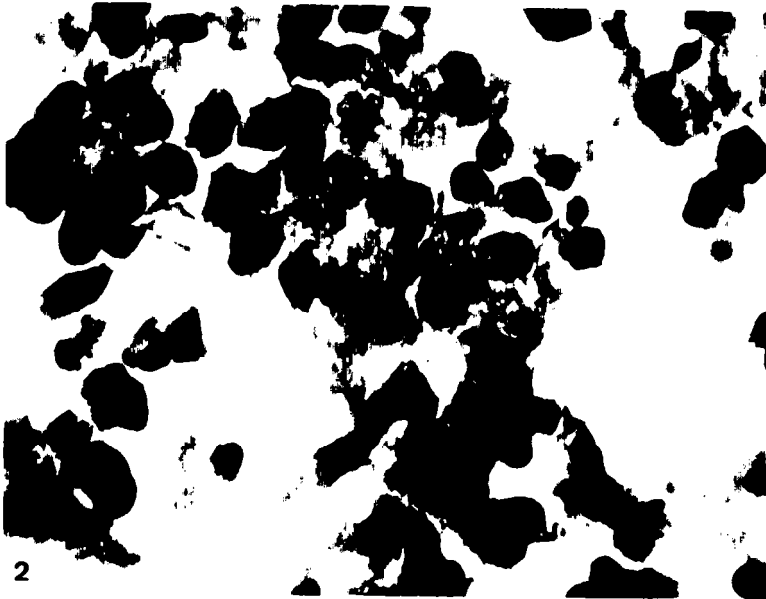
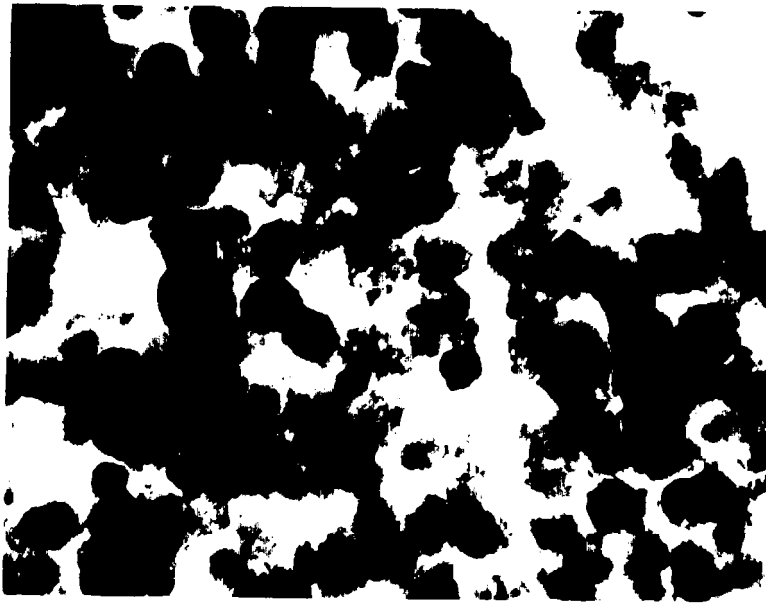
#### 4. Lecture des lames

Compte tenu de la qualité médiocre des préparations cellulaires, les frottis d'hémolymphe n'ont pas pu être exploitées de manière fiable, notamment à cause du nombre de cellules très faible (< 250). Seules les lames de cellules branchiales des prélèvements à J8 et J12 fournissent des clichés exploitables (figure 3 et figures 4 à 8). Les résultats obtenus montrent qu'aucune des concentrations en B(a)P testées n'induit un taux de micronoyaux significativement différent du témoin (test *t* de Student,  $p > 0.05$ ; tableau 5).

traitement	jour8		jour 12	
	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>
Témoin	2,9 ± 1.6	8	n.d.	
Témoin DMSO	4,4 ± 1,0	8	4,3 ± 1.0	4
B(a)P 12.5 µg/L	5,3 ± 3,3	6	5.0 ± 2.0	5
25	2,6 ± 1.3	8	3.2 ± 1.3	6
75	3.0 ± 2.1	6	n.d.	
125	3,0 ± 1.7	6	2.8 ± 1.0	4

Tableau 5 : Nombre de cellules à micronoyaux induits dans le tissu branchial (pour 1000 cellules) de *Dreissena polymorpha*.  
n.d.: non déterminé

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer ce résultat. D'abord, la dreissène ne serait pas sensible aux propriétés génotoxiques du B(a)P ou ne posséderait pas l'équipement enzymatique nécessaire à l'activer. Ceci est peu vraisemblable, car l'induction de micronoyaux a été observée chez d'autres espèces de mollusques exposées au B(a)P (Scarpato *et al.*, 1990). Stegeman (1985) a étudié, chez *Mytilus edulis*, la capacité d'activation du B(a)P par les enzymes microsomaux (cytochrome P-450, cytochrome c et cytochrome b<sub>5</sub>). Parmi les tissus étudiés, les capacités d'oxydation du B(a)P les plus élevées ont été mises en évidence dans la glande digestive et la branchie. Ces propriétés métaboliques existent également dans la branchie de *Mytilus galloprovincialis* (Michel *et al.* 1992). Les produits de dégradation du B(a)P comme des dihydrodiols, des quinones et des phénols montrent que cette moule est pourvue des enzymes de métabolisation du B(a)P. On peut donc supposer que la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha* possède également l'équipement enzymatique nécessaire à l'activation du B(a)P. Cette hypothèse



Figures 1 à 3 : Evolution de la **préparation** de cellules branchiales (grossissement : x 1000).



Figures 4 à 8 : Vues de cellules branchiales à micronoyau (grossissement : x 1000).



pourrait être **vérifiée** en comparant un **mutagène** indirect et un **mutagène** direct, tel que le EMS (éthylméthanesulfonate). On peut aussi émettre l'hypothèse que les concentrations réelles de B(a)P au contact des animaux auraient **été** trop faibles pour induire la formation de micronoyaux (voir § 1.2.). Compte tenu du contact pendant les premiers temps de chaque cycle, l'exposition réelle des moules ne peut pas être considérée comme négligeable. De plus, les concentrations résiduelles dans le cristalliseur correspondant à l'ajout de B(a)P le plus élevé sont rarement en-dessous de 1  $\mu\text{g/L}$  après 48 heures. Un renouvellement journalier du milieu plutôt que tous les deux jours augmenterait le temps de contact réel entre le toxique et l'organisme. Enfin, en troisième hypothèse, le taux de division des cellules branchiales serait trop faible pour favoriser la formation de micronoyaux chez la dreissène de deux ans. Bien que les cellules en division aient **été** peu nombreuses, cette hypothèse semble peu probable pour un tissu au contact du milieu extérieur. Chez la moule marine *Mytilus galloprovincialis*, un cycle cellulaire complet s'effectue en deux jours (Scarpato *et al.* 1990).

En dehors des problèmes **liés à** l'expérience proprement dite, il faut souligner les difficultés de lecture des clichés en raison de la petite taille des cellules de la dreissène. Ceci rend l'exploitation d'une lame relativement long, environ 30 à 45 min.

## V CONCLUSION

Cette étude préliminaire a mis en évidence les difficultés liées à l'exposition en laboratoire d'un organisme à une molécule hydrophobe. La disparition rapide du B(a)P a certainement conduit à un temps de contact réel court entre l'organisme et le xénobiotique. Ces difficultés suggèrent plusieurs améliorations à apporter au niveau du protocole expérimental, comme par exemple : le choix d'une **molécule** moins hydrophobe, le suivi de la concentration réelle de la molécule dans le milieu et le renouvellement journalier du milieu. Concernant ce dernier point, nos observations ont montré que le stress occasionné par le changement de milieu ne perturbe pas de façon notable les organismes, lorsque les manipulations sont réalisées avec précaution. A côté de toutes les **difficultés** rencontrées, un point essentiel doit être signalé : c'est l'ajout de nourriture dans le milieu comme stimulant de l'**activité** de filtration et, par voie de conséquence, du métabolisme des moules.

Les protocoles de préparation histologique des cellules de l'hémolymphe et du tissu branchial, tels qu'ils sont décrits dans la bibliographie pour les moules marines, n'ont pas pu être appliqués directement aux tissus de la dreissène. Les modifications successives des méthodes ont conduit à une amélioration significative de la **qualité** des **préparations**. Les techniques mises au point devront tout de même être validées et peut-être **affinées** lors d'un travail ultérieur.

## VI REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Al Sabti K. & B. Kurelec, 1985, Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Watch. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **35**, 660-665.
- Alink G.M., E.M.H. Frederix-Wolters, M.A. Van der Gaag, J.F.J. Van de Kerckhoff & C.L.M. Poels, 1980, Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutat. Res.*, **78**, 369-374.
- Brunetti R., F. Majone, I. Gola & C. Beltrame, 1988, The micronucleus test : exemples of application to marine ecology. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **44**, 65-68.
- Busch D., T. Lucker, M. Schirmer & W. Wosniok, 1992, The application of the bivalve *Dreissena polymorpha* for biomonitoring routine of heavy metals in rivers. In: *The zebra mussel Dreissena polymorpha*, Neumann D. and Jenner H.A. (eds.) *Limnologie Aktuell*, **4**, 197-211.
- Carrasco K.R., K.L. Tilbury & M.S. Myers, 1990, Assessment of the piscine micronucleus test as an *in situ* biological indicator of chemical contaminant effects. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **47**, 2123-2136.
- Das R.K. & N.K. Nanda, 1986, Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutat. Res.*, **175**, 67-71.
- Dixon D.R. & K.R. Clarke, 1982, Sister-chromatid exchange : a sensitive method for detecting damage cause by exposure to environmental mutagens in the chromosomes of adult *Mytilus edulis*, *Mar. Biol. Lett.*, **3**, 163-172.
- Fernandez M., L. Gauthier & A. Jaylet., 1989, Use of newt larvae for *in vivo* testing water: results of 19 compounds evaluated by the micronucleus test. *Mutagenesis*, **4**, 17-26.
- Gola I., R. Brunetti, F. Majone & A.G. Levis, 1986, Application of the micronucleus test to a marine organism treated with NTA and insoluble heavy metals. *Atti. Ass. Genet. Ital.*, **32**, 95-96.
- Grinfeld S., A. Jaylet, R. Siboulet, P. Deparis & I. Chouroulinkov, 1986, Micronuclei in the red blood cells of the newt *Pleurodeles waltl* after treatment with benzo(a)pyrene : dependence on dose, length of exposure, post-treatment time and uptake of the drug. *Environ. Mutat.*, **8**, 41-51.
- Harrison F. & I. Jones, 1982, An *in vivo* sister-chromatid exchange assay in the larvae of the mussel *Mytilus edulis* : response to 3 mutagens. *Mutat. Res.*, **105**, 235-242.
- Hoftman R. & G. Vink, 1981, Cytogenic effects on the eastern mudminnow, *Umbra pygmaea*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo(a)pyrene and river water. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **5**, 261-269.
- Jaylet A., P. Deparis, V. Ferrier, S. Grinfeld & R. Siboulet, 1986a, A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutat. Res.*, **164**, 245-257.

- Jaylet A., P. Deparis & D. Gaschignard, 1986b, Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of axolotl larvae following *in vivo* exposure to mutagenic agents. *Mutagenesis*, **1**, 211-215.
- Jenner H.A., G.H.F.M. van Aerssen & J. Terwoert, 1992, Valve movement behaviour of the mussel *Dreissena polymorpha* and the clam *Unio pictorum* for use in an early warning system. In : The zebra mussel *Dreissena polymorpha*, Neumann D. & H.A. Jenner (eds.) *Limnologie Aktuell*, **4**, 115-126.
- Kraak M.H.S., M.C.T. Scholten, W.H.M. Peeters & W.C. de Kock, 1991, Biomonitoring of heavy metals in the Western European Rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.*, **74**, 101- 114.
- Léglize L. & C. Crochard, 1987, Vérification expérimentale du choix de *Dreissena polymorpha* Pallas (lamellibranche) comme bioindicateur de contamination métallique. *Nat. Can. (Rev. Ecol. Syst.)*, **114**, 315-323.
- Majone F., R. Brunetti, I. Gola & A.G. Levis, 1987, Persistence of micronuclei in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis* after treatment with mitomycin C. *Mutat. Res.*, **191**, 157-161.
- Majone F., C. Beltrame & R. Brunetti, 1988, Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different staining techniques after treatment with zinc chloride. *Mutat. Res.*, **209**, 131- 134.
- Marker A.F.H., E.A. Nusch H. Rai & B. Riemann, 1980, Measurement of photosynthetic pigments in freshwater and standardisation of methods : conclusions and recommendations, *Arch. Hydrobiol. Beih. Ergebn. Limnol.*, **14**, 91-106.
- Metcalf C.D., 1988, Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in the erythrocytes of mudminnows *Umbra Zimi* and brown bullheads *Ictalurus nebulosus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **40**, 489-495.
- Michel X.R., P.M. Cassand, D.G. Ribera & J.F. Narbonne, 1992, Metabolism and mutagenic activation of benzo(a)pyrene by subcellular fractions from mussel (*Mytilus galloprovincialis*) digestive gland and sea brass (*Discenthrarcus labrax*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.*, **103C**, 43-51.
- Poulsen E., H.U. Riisgard & F. Mohlenberg, 1982, Accumulation of cadmium and bioenergetics in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.*, **68**, 25-29.
- Prein A., G. Thie, G. Alink & J. Koeman, 1978, Cytogenetic changes in fish exposed to the water of the river Rhine. *Sci. Total Environ.*, **9**, 287-291.
- Scarpato R., L. Migliore, G. Alfinito-Cognetti & R. Barale, 1990, Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar. Poll. Bull.*, **21**, 74-80.
- Sprung M. & U. Rose, 1988, Influence of food size and food quality on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*, *Oecologia*, **77**, 526-532.

- Stegeman J.J., 1985, Benzo(a)pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel (*Mytilus edulis*) and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic. *Mur. Biol.*, 89, 21-30.
- Ten Winkel E.H. & C. Davids, 1982, Food selection by *Dreissena polymorpha* Pallas. *Freshwat. Biol.*, 12, 553-559.
- Van der Gaag, L. Gauthier, A. Noordsij, Y. Levi & N. Wrisberg, 1990, Methods to measure genotoxines in wastewater : evaluation with *in vivo* tests. In : *Genetic Toxicology of Complex Mixtures VI*, D. Waters *et al.* (eds), Plenum Press, New York, pp 219-236.
- Van Hummelen P., C. Zoll, J. Paulussen, M. Kirsch-Volders & A. Jaylet, 1989, The micronucleus test in *Xenopus* : a new and simple *in vivo* technique for detection of mutagens in fresh water. *Mutagenesis*, 4, 12-16.
- Wrisberg M.N. & M. Van der Gaag, 1992, *In vivo* detection of genotoxicity of waste water from a wheat and rye straw paper pulp factory. *Sci. Total Environ.*, 121, 95-108.
- Wrisberg M.N., C.M. Bilbo & H. Spliid, 1992, Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 23, 191-205.