

# Microanalyse et hydrothermalisme océanique. Premiers résultats et perspectives dans le domaine de la biologie

Sources hydrothermales  
Microanalyse  
Composition élémentaire  
*Alvinella caudata*  
*Bathymodiolus thermophilus*

Hydrothermal vents  
Microanalysis  
Elemental composition  
*Alvinella caudata*  
*Bathymodiolus thermophilus*

Colette CHASSARD-BOUCHAUD <sup>ab</sup>, Pierre BOUMATI <sup>b</sup>, Françoise ESCAIG <sup>b</sup>, Lucien LAUBIER <sup>c</sup>, Daniel DESBRUYERES <sup>d</sup>, Aline FIALA-MEDIONI <sup>e</sup>, Michel OUTREQUIN <sup>f</sup>, René-Louis INGLEBERT <sup>g</sup>, Pierre GALLE <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes marins, Université Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252 Paris Cédex 05, France.

<sup>b</sup> Centre de microanalyse appliquée à la biologie, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), SC 27, Laboratoire de Biophysique de la Faculté de Médecine, 8 rue du Général Sarrail, 94000 Créteil, France.

<sup>c</sup> Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer (IFREMER), 66 avenue d'Iéna, 75116 Paris, France.

<sup>d</sup> IFREMER, Centre de Brest, B.P. 337, 29273 Brest Cédex, France.

<sup>e</sup> Laboratoire Arago, Université Pierre et Marie Curie, 66650 Banyuls-sur-Mer, France.

<sup>f</sup> RIBER Instruments S.A., 133-137 boulevard National, 92503 Rueil-Malmaison, France.

<sup>g</sup> Laboratoire des Propriétés Mécaniques et Thermodynamiques des Matériaux, Université Paris-Nord, avenue J.-B. Clément, 93430 Villetaneuse, France.

## RÉSUMÉ

Des échantillons d'organismes associés aux sources hydrothermales ; *Alvinella caudata* (polychète) et *Bathymodiolus thermophilus* (bivalve) ont été récoltés en 1982, par 13°N et 103°O, sur la ride du Pacifique oriental, à une profondeur de 2600 m. La composition élémentaire de certains de leurs tissus a été déterminée à l'échelle structurale et ultrastructurale. Deux méthodes microanalytiques ont été utilisées : la spectrométrie de masse par émission ionique secondaire (microscopes ioniques : SMI 300 et IMS 3F-Cameca ; microsonde ionique : MIQ 156 - Ribier) et la spectrométrie des rayons X (microsondes MS 46 et Camebax - Cameca).

Nous avons pris comme exemples l'épiderme externe, l'épithélium et le tractus digestifs d'*Alvinella caudata* d'une part, la branchie et la glande digestive de *Bathymodiolus thermophilus* d'autre part. Des images de distribution élémentaire ont été obtenues par spectrométrie de masse et par spectrométrie des rayons X. Les éléments suivants, certains étant potentiellement très toxiques, ont été détectés à des concentrations variées chez les deux espèces : lithium, fluor, phosphore, aluminium, silicium, soufre, calcium, titane, chrome, magnésium, manganèse, fer, cuivre, arsenic, strontium, iode, baryum, plomb et des terres rares : lanthane et thulium. Chez *Alvinella caudata* seulement on a détecté : zinc, brome, thallium et uranium et chez *Bathymodiolus thermophilus*, nickel et étain. La localisation intracellulaire des éléments a été déterminée en microscopie électronique : les sphérocristaux et les lysosomes sont les organites cibles de concentration des métaux. On a montré en outre que les bactéries peuvent concentrer certains éléments, en particulier le titane.

Les hypothèses relatives à une corrélation entre les concentrations métalliques relevées dans les organismes hydrothermaux et les concentrations métalliques du milieu environnant sont envisagées. Les performances propres à chaque technique analytique utilisée ici, avec leurs avantages et leurs inconvénients sont discutées et les possibilités offertes par d'autres méthodes sont présentées.

*Oceanol. Acta*, 1988. Actes du Colloque Hydrothermalisme, Biologie et Écologie, Paris, 4-7 novembre 1985, 203-218.

## ABSTRACT

## Microanalysis as applied to hydrothermal vent biological communities. Preliminary data and perspectives

Specimens of hydrothermal vent organisms, *Alvinella caudata* (Polychaète) and *Bathymodiolus thermophilus* (Bivalve) were collected in 1982 from 13°N and 103°W, on the East Pacific Rise at a depth of 2600m. The elemental composition was determined for some of their soft tissues at the structural and ultrastructural levels. Two microanalytical methods were used : secondary ion mass spectrometry (ion microscopes : SMI 300 and ISM 3F - Cameca ; ion microprobe : MIQ 156 - Riber) and X-ray spectrometry (MS 46 Cameca and Camebax microprobes).

As examples, external and digestive epithelium and lumen of the digestive tract of *Alvinella caudata* on the one hand, gill and digestive gland of *Bathymodiolus thermophilus* on the other hand, were investigated. Images of elemental distribution were obtained by ion and X-ray spectrometry. The following elements, some of them potentially toxic, were detected in various concentrations in both species : lithium, fluorine, phosphorus, aluminium, silicon, sulphur, calcium, titanium, chromium, magnesium, manganese, iron, copper, arsenic, strontium, iodine, barium, lead and rare earth elements : lanthanum and thulium ; in *Alvinella caudata* only : zinc, bromine, thallium and uranium ; in *Bathymodiolus thermophilus* only : nickel and tin. Intracellular localization of the elements, performed by electron microscopy, showed that spherocrystals and lysosomes were the target organelles of metal concentration. Moreover, bacteria were shown to be capable of elemental concentration (titanium particularly).

The correlations between the metal concentrations within the vent organisms and the metal concentrations characteristic of the vent environment are examined. The specific performances of every microanalytical technique employed are discussed and the possibilities offered by other microanalytical methods are presented.

*Oceanol. Acta*, 1988. Hydrothermalism, Biology and Ecology Symposium, Paris, 4-7 November, 1985, Proceedings, 203-218.

## INTRODUCTION

L'exploration sous-marine de la ride des Galapagos a révélé la présence inattendue de colonies d'organismes vivant sur le fond à proximité des sources hydrothermales (Corliss *et al.*, 1979). L'isolement géographique et les conditions très spéciales de cet environnement profond, caractérisé notamment par une température élevée et par l'abondance de sulfures polymétalliques, connus pour la plupart pour leur toxicité, posent évidemment des problèmes d'adaptation physiologique et biochimique aux espèces qui y sont inféodées.

De nombreuses données existent actuellement sur la composition spécifique de ces peuplements (Laubier, Desbruyères, 1984) et sur l'influence des conditions physiques du milieu : oxygène, pression et température en particulier (Childress, Mickel, 1982; Mickel, Childress, 1982). En ce qui concerne les problèmes de nutrition, des associations symbiotiques avec des bactéries chimio-synthétiques sulfoxydantes intracellulaires ont été décrites chez plusieurs espèces. Parmi celles-ci, deux sont particulièrement intéressantes : *Alvinella caudata* (Desbruyères, Laubier, 1980), annélide polychète, qui présente d'abondantes communautés bactériennes appartenant à différents types morphologiques (Desbruyères *et al.*, 1983) et *Bathymodiolus thermophilus* (Kenk, Wilson, 1985), mollusque bivalve mytilidae, dont la branchie est colonisée par une importante population bactérienne (Cavanaugh, 1983; Fiala-Medioni, 1984 ; Le Pennec, Hily, 1984 ; Fiala-Medioni *et al.*, 1986).

Par contre, nous disposons actuellement de peu de renseignements relatifs aux rapports existant entre les organismes et les importantes concentrations métalliques caractéristiques de cet environnement hydrothermal. On peut se demander en effet si ; 1) les espèces peuvent capter, concentrer et ensuite excréter (donc se détoxiquer) les minéraux présents dans le milieu et par quels mécanismes ; 2) les bactéries symbiotiques intracellulaires jouent un rôle dans le métabolisme des éléments ; 3) ces bioaccumulations reflètent la composition du milieu environnant, et pourraient ainsi éventuellement révéler la présence de certains éléments totalement inattendus dans les sédiments métallifères et dans les apports minéraux véhiculés par les fluides. Roesijadi et Crecelius (1984) qui ont étudié la composition élémentaire du bivalve *Calyptogena magnifica*, provenant des sources hydrothermales situées à 21°N, ont tenté de répondre en partie à ces questions.

Pour atteindre les objectifs précités, nous avons choisi de focaliser nos premières investigations sur *Alvinella caudata* et sur *Bathymodiolus thermophilus*. Les polychètes et les bivalves sont en effet bien connus pour leurs capacités de bioaccumulation ; de plus, ces deux espèces présentent des bactéries chimiosynthétiques sulfoxydantes intracellulaires.

Pour effectuer cette étude, les méthodes microanalytiques qui permettent la détection, la localisation et la visualisation des éléments à l'échelle cellulaire et subcellulaire, sont particulièrement fiables. La spectrométrie des rayons X et la spectrométrie de masse par émission ionique

secondaire nous avaient en effet permis de détecter le soufre et d'en obtenir des images de répartition chez *Alvinella caudata* (Laubier *et al.*, 1983).

Dans le présent travail nous avons utilisé à nouveau ces deux méthodes en étendant nos recherches à d'autres éléments et en les approfondissant à l'échelle ultrastructurale.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Alvinella caudata*

Les spécimens ont été récoltés au cours de deux campagnes sur la dorsale du Pacifique oriental : la campagne *Rise* (1979) du submersible Alvin (plongées 914 et 921, profondeurs de 2594 et 2593 m, par 20°50' N et 109°06' O) et la campagne *Biocytherm* (1982) de la soucoupe plongeante Cyana (plongée 82-33, profondeurs de 2630 à 2635 m, par 12°48' N et 103°56' O).

Les échantillons sont fixés au formol puis conservés dans l'alcool absolu. Nous avons analysé des coupes transversales de métamères de la région postérieure, dont les particularités morphologiques ont été décrites (Desbruyères, Laubier, 1980), en nous intéressant à l'épiderme externe, à l'épithélium digestif et aux particules contenues dans la lumière intestinale. La préparation pour les observations et analyses en microscopie photonique est la suivante : inclusion à la paraffine, puis coupes à 5 µm qui sont ensuite déposées sur des supports différents selon la technique d'analyse prévue. Pour l'analyse par spectrométrie des rayons X, les coupes sont déposées sur une lame de terphane, déparaffinées puis carbonées.

Pour l'analyse par spectrométrie de masse, les coupes sont déposées sur support d'or poli, puis déparaffinées. La préparation pour les observations et analyses en microscopie électronique est la suivante : inclusion dans l'épon, puis coupes ultra-fines à 500 Å qui sont déposées sur grilles de cuivre ou de titane et qui sont ensuite carbonées ; les coupes ne sont pas colorées.

### *Bathymodiolus thermophilus*

Les spécimens ont été récoltés au cours de la même campagne *Biocytherm* qui a permis la récolte des polychètes (plongées 82-31 et 32, profondeur de 2620 m, par 13°N et 103°O). Les échantillons sont fixés au glutaraldéhyde (3 %) dans un tampon cacodylate 0,4 M à Ph 7,8. Après déshydratation et passage dans l'oxyde de propylène, le matériel est inclus dans l'épon. Nous nous sommes intéressés d'une part à la branchie, site principal de capture des éléments et dont l'ultrastructure est bien connue (Fiala-Medioni, 1984 ; Fiala-Medioni *et al.*, 1986) et d'autre part à la glande digestive, site principal de stockage et de concentration des éléments. Pour l'analyse par spectrométrie de masse, on réalise des coupes semi-fines qui sont déposées sur support d'or poli. Pour l'analyse par spectrométrie des rayons X, effectuée à l'échelle ultrastructurale, les coupes ultrafines sont déposées sur grilles de cuivre ou de titane qui sont ensuite carbonées ; les coupes ne sont pas colorées.

## MÉTHODES

Les méthodes de microscopie analytique utilisées sont la spectrométrie de masse par émission ionique secondaire (microscope ionique et microsonde ionique) à l'échelle cellulaire, proposée par Castaing et Slodzian (1962) et particulièrement bien adaptée au matériel biologique (Galle, 1985) d'une part et la spectrométrie des rayons X (Castaing, 1951) à l'échelle cellulaire et subcellulaire d'autre part.

### Spectrométrie de masse par émission ionique secondaire

#### *Microscopes ioniques*

Deux types d'appareils sont utilisés :

- l'analyseur ionique SMI 300 (Cameca) équipé d'un déflecteur électrostatique. Les conditions d'analyse sont les suivantes : bombardement par un faisceau d'ions primaires ( $O_2^+$ ) pour l'étude des ions secondaires positifs ; diaphragme de contraste de la lentille à immersion : 200 µm ; résolution sur l'image : 1 µm environ ; résolution en masse : 300 sur image ; champ observé de 250 µm de diamètre ; champ de mesure : 60 µm de diamètre ; tension objet : 4,5 kV.

- l'analyseur ionique IMS 3F (Cameca). L'échantillon est bombardé par un faisceau d'ions primaires ( $Cs^+$ ) pour l'étude des ions secondaires négatifs. Sur cet appareil, une méthode d'élimination des ions polyatomiques a été mise au point (Metson *et al.*, 1984).

#### *Microsonde ionique*

Le type d'appareil utilisé est une microsonde ionique MIQ 156 (Riber) équipée d'un filtre de masse quadrupolaire précédé d'un sélecteur électrostatique en énergie à 45°. Les conditions d'analyse sont les suivantes : bombardement  $O_2^+$  pour l'obtention des ions secondaires positifs et bombardement  $Cs^+$  pour l'obtention des ions secondaires négatifs, 14 kV (1 nA), une résolution sur l'image de 2 µm environ, une résolution en masse 250 sur image, un champ observé de 180 X 250 µm. Les images sont obtenues par balayage de la coupe par le faisceau d'ions primaires.

### Spectrométrie des rayons X

Deux types d'appareils sont utilisés :

- la microsonde MS 46 (CAMECA) ou microsonde de Castaing à spectromètres dispersifs en longueur d'onde. L'appareil est équipé de cristaux PET, LIF, KAP et quartz et associé à un microscope photonique. Les conditions d'analyse sont les suivantes : tension d'accélération de 20 kV, courant d'échantillon de 50,75 ou 100 nA, diamètre de sonde de 1 µm environ. Par balayage du faisceau, on obtient des images de répartition des différents éléments.

- la microsonde CAMECA MBX, type CAMEBAX à spectromètres dispersifs en longueur d'onde. L'appareil est équipé de cristaux PET, LIF, TAP et ODPB et couplé à un microscope électronique à transmission. Les conditions d'analyse sont les suivantes : tension d'accélération de 45 kV, courant d'échantillon de 150 nA et diamètre de sonde de 500 nm environ.

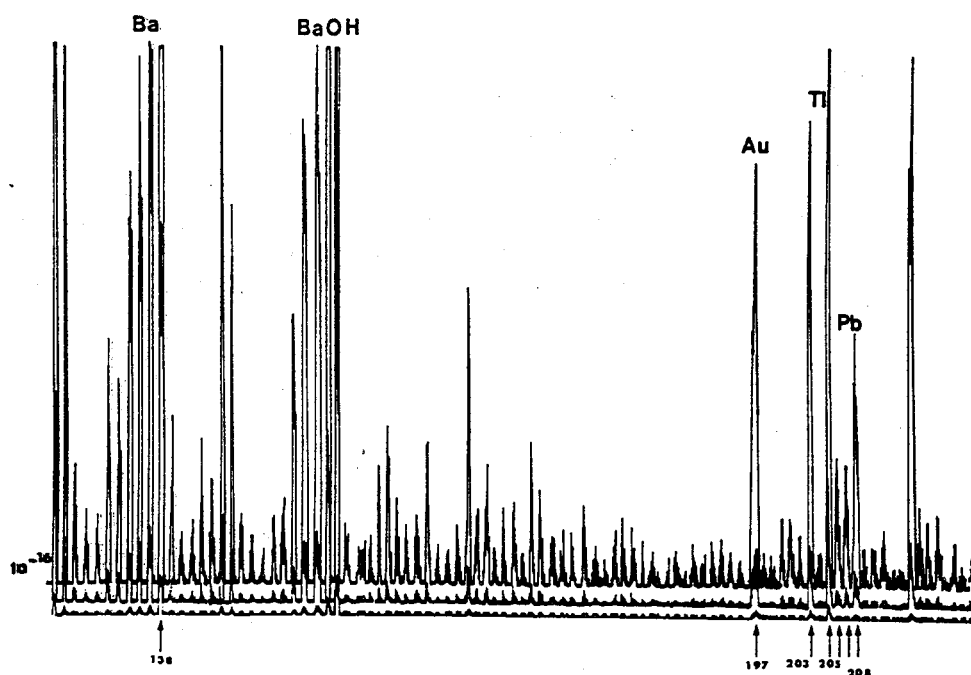


Figure 1  
*Alvinella caudata*. Spectre ionique obtenu sur les particules contenues dans la lumière du tractus digestif (microscope ionique). Il montre la présence de plusieurs éléments caractérisés par leurs différents isotopes : baryum (isotope majeur à la masse 138) accompagné par les ions polyatomiques, BaOH, thallium (isotope majeur à la masse 205) et plomb (isotope majeur à la masse 208). A la masse 197 correspond le pic de l'or du support.  
*Alvinella caudata*. Ion spectrum obtained from particles of the digestive tract lumen (ion microscope), revealing the presence of several elements with their isotopes : barium (major isotope at mass 138) followed by BaOH ions, thallium (major isotope at mass 205) and lead (major isotope at mass 208). At mass 197 is the peak of gold of the specimen holder.

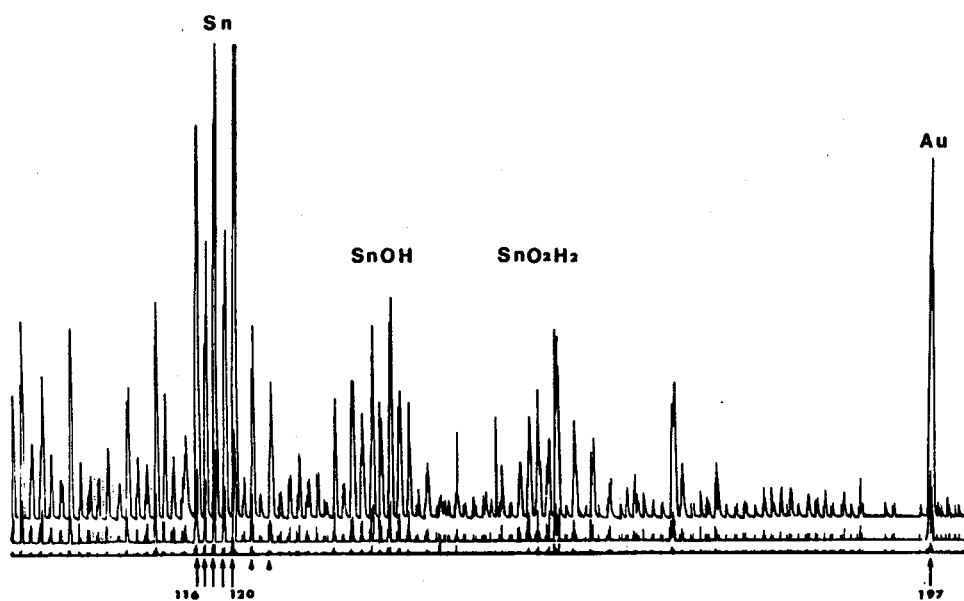


Figure 2  
*Bathymodiolus thermophilus*. Spectre ionique obtenu sur l'épithélium branchial (microscope ionique). Il montre la présence de l'étain avec ses différents isotopes (isotope majeur à la masse 120) et les ions polyatomiques (SnOH et SnO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>). A la masse 197 correspond le pic de l'or du support.  
*Bathymodiolus thermophilus*. Ion spectrum obtained from the gill epithelium (ion microscope), revealing the presence of tin with its different isotopes (major isotope at mass 120) and the polyatomic ions (SnOH and SnO<sub>2</sub>H<sub>2</sub>). At mass 197 is the peak of gold of the specimen holder.

## RÉSULTATS

### *Alvinella caudata*

#### Microanalyse par émission ionique secondaire

##### Microscope ionique

Le tableau 3 résume la liste des éléments détectés dans l'épiderme externe, l'épithélium digestif et la lumière intestinale. Ce sont : lithium (Li), fluor (F), aluminium (Al), silicium (Si), soufre (S), titane (Ti), chrome (Cr), manganèse (Mn), fer (Fe), zinc (Zn), arsenic (As), brome (Br), strontium (Sr), iode (I), baryum (Ba), thallium (Tl), plomb (Pb), et uranium (U) ainsi que des terres rares (lanthanides) : thulium (Tm) et lanthane (La). D'une façon générale, ce sont les particules présentes dans la lumière intestinale qui sont les plus chargées en minéraux ; Si, S, Ti, Mn, Fe, Zn, Ba et Tl. Si, S, Fe, Ba, Tl et Pb dominant dans l'épiderme externe. Dans l'épithélium digestif, on retrouve les mêmes éléments avec des intensités d'émission comparables, à l'exception de Ba, Tl et Pb

présents à des concentrations plus faibles. Il est à noter que l'uranium n'a été mis en évidence que dans l'épiderme externe. Calcium, phosphore et magnésium, abondants dans les tissus analysés, ne sont pas mentionnés dans le tableau 3.

La figure 1 représente une partie du spectre ionique obtenu sur les particules contenues dans la lumière intestinale : on y observe le baryum avec ses principaux isotopes aux masses 134 (2,42 %), 135 (6,59 %), 136 (7,81 %), 137 (11,32 %), 138 (71,66 %) isotope majeur, le thallium avec ses deux isotopes aux masses 203 (29,5 %) et 205 (70,50 %) isotope majeur et le plomb avec ses trois principaux isotopes aux masses 206 (23,6 %), 207 (22,6 %) et 208 (52,3 %) isotope majeur.

La planche 2 montre des images ioniques obtenues sur des coupes histologiques d'*Alvinella caudata*. L'image <sup>26</sup>CN<sup>-</sup> (fig.1) permet de reconnaître la topographie de l'épiderme externe et l'image <sup>32</sup>S<sup>-</sup> (fig.2) obtenue sur la même coupe que celle représentée sur la figure 1, représente la forte concentration intracellulaire du soufre. L'image <sup>40</sup>Ca<sup>+</sup> (fig.3) montre la topographie d'une coupe transversale de

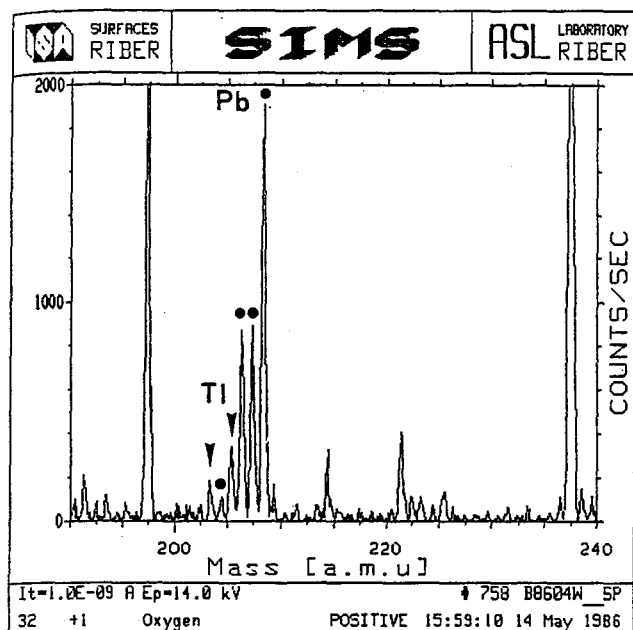


Figure 3

*Alvinella caudata*. Spectre ionique obtenu sur les particules contenues dans la lumière du tractus digestif (microsonde ionique). Il montre la présence de thallium avec ses deux isotopes aux masses 203 et 205 (marquées par des flèches) et de plomb avec ses quatre isotopes aux masses 204, 206, 207 et 208 (marquées par des points). A la masse 197 correspond le pic de l'or du support.

*Alvinella caudata*. Mass distribution spectrum obtained from particles of the digestive tract lumen (ion microprobe), revealing the presence of thallium with both isotopes at mass 203 and 205 (arrows) and lead with four isotopes at mass 204, 206, 207 and 208 (dark points). At mass 197 is the peak of gold of the specimen holder.

tube digestif où l'on reconnaît l'épithélium et les particules contenues dans la lumière. L'image  $^{205}\text{Tl}^+$  (fig.4) obtenue sur la même coupe que celle de la figure 3 montre la forte concentration du thallium dans la lumière intestinale.

La planche 3 est aussi représentative des autres éléments détectés sur une même coupe transversale de tube digestif, où l'on reconnaît l'épithélium et les particules contenues dans la lumière, constituées de calcium, aluminium, strontium, manganèse, baryum et fer.

#### Microsonde ionique

Avec cet appareil, nous avons analysé les mêmes coupes que celles observées en microscopie ionique. Sur la figure 3 est représentée une partie du spectre obtenu sur les particules intestinales ; on y reconnaît les deux isotopes du thallium aux masses 203 (190 chocs/s) et 205 (350 chocs/s) et les quatre isotopes du plomb aux masses 204 (100 chocs/s), 206 (880 chocs/s), 207 (900 chocs/s) et 208 (1900 chocs/s). Des images de répartition des différents éléments ont été obtenues, en ions secondaires positifs ou négatifs, par balayage de la coupe par le faisceau d'ions primaires.

Sur la planche 4 on peut voir la distribution des différents minéraux dans les particules intestinales : calcium (fig.3), thallium (fig. 4), strontium (fig.2), plomb (fig.1), manganèse (fig.5) et baryum (fig.6). Sur la planche 5 dont les images ont été obtenues à partir de la même coupe que celle photographiée sur la planche 4, on reconnaît la

présence d'aluminium (fig.5), de fer (fig.6), de chrome (fig.4) et de cuivre représenté par ses deux isotopes  $^{63}\text{Cu}^+$  (fig.1) et  $^{65}\text{Cu}^+$  (fig.2). La comparaison des figures 3 et 4 de cette planche permet de distinguer les ions polyatomiques associés au chrome à la masse 52 (fig.3) : la polarisation de l'échantillon permet de supprimer les interférents et de ne conserver que les ions correspondant effectivement à l'atome de chrome (fig.4) ; ces deux images montrent que la participation des ions polyatomiques à la masse 52 est particulièrement faible.

La planche 6 représente, en ions secondaires négatifs, la distribution de soufre (fig.1), de fluor (fig.2) et d'arsenic (fig.3) dans les particules digestives : ces trois éléments étant particulièrement abondants.

#### Microanalyse par spectrométrie des rayons X

#### Microsonde MS 46, microscopie photonique

La figure 4 montre quelques-uns des spectres d'émission obtenus sur les particules contenues dans le tractus digestif : fer (6000 chocs/s) et soufre (1800 chocs/s) qui sont présents à des teneurs élevées, zinc (180 chocs/s), phos-

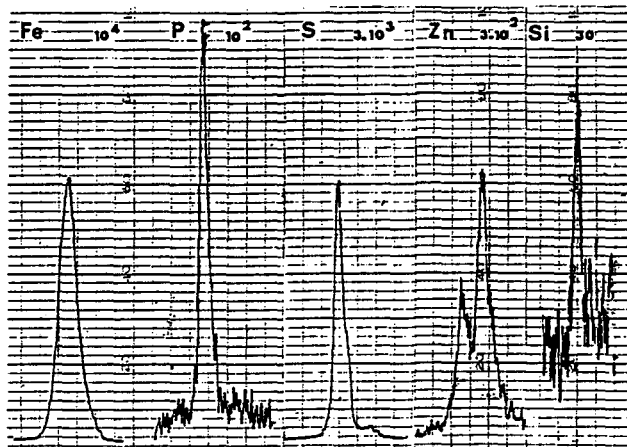


Figure 4

*Alvinella caudata*. Spectres d'émission (microsonde MS 46) obtenus sur les particules contenues dans le tractus digestif montrant la présence de fer (Fe), phosphore (P), soufre (S), zinc (Zn) et silicium (Si).

*Alvinella caudata*. Spectra (MS 46 microprobe) obtained from particles of the digestive tract showing the presence of iron (Fe), phosphorus (P), sulphur (S), zinc (Zn) and silicon (Si).

phore (100 chocs/s) et silicium (15 chocs/s) qui sont présents à des teneurs plus faibles.

Le mode balayage a permis d'obtenir des images de répartition élémentaire sur différents tissus d'*Alvinella caudata*. Les images X montrent que l'épiderme externe (pl.7) est particulièrement riche en soufre : 15 000 chocs/s (fig.5) et calcium : 15 000 chocs/s (fig.6).

Les autres images X de la planche 7 concernent l'épithélium digestif dans lequel on note l'abondance de calcium : 15 000 chocs/s (fig.1), soufre : 15 000 chocs/s (fig.2), fer : 15 000 chocs/s (fig.4), et zinc : 15 000 chocs/s (fig.3). Les images X de la planche 8 sont obtenues sur les particules digestives qui sont elles aussi très riches en éléments notamment calcium : 10 000 chocs/s (fig.1), soufre : 15 000 chocs/s (fig.2), fer : 15 000 chocs/s (fig.3), et zinc : 15 000 chocs/s (fig.4). Les soies situées dans les parapodes ont aussi été analysées et des

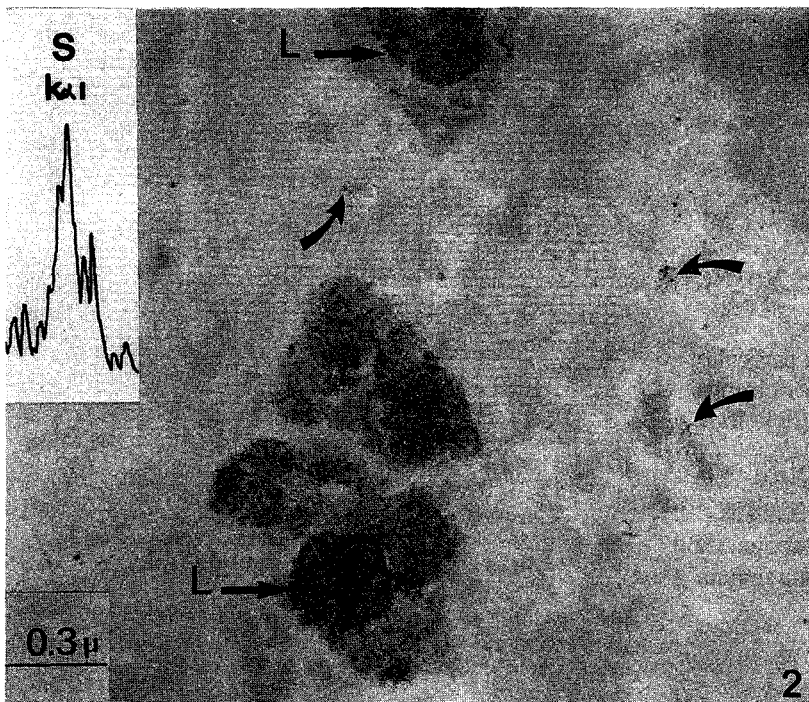
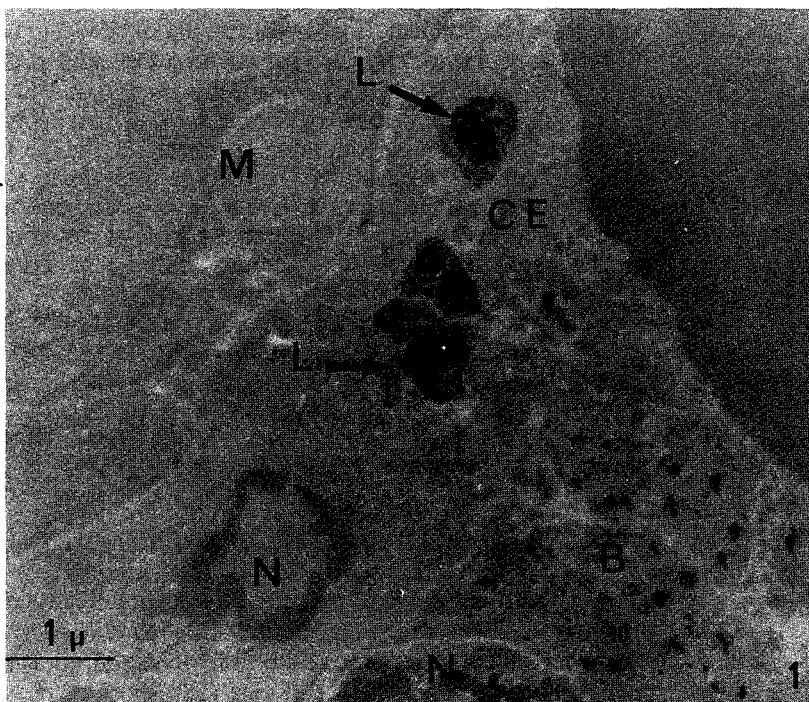


Planche 1  
Micrographies électroniques d'épithélium branchial de *Bathymodiolus thermophilus*.

1) Vue d'ensemble montrant les différents types cellulaires : B : bactériocyte contenant des bactéries, M : mucocyte, CE : cellule épithéliale banale renfermant plusieurs lysosomes (L), N : noyau.

2) Cellule épithéliale banale vue à un plus fort grossissement montrant les lysosomes (L) contenant des particules figurées qui, analysées au Camebax, sont constituées de S, Al, Si, P, Ti, Fe, Ni, As, Sn, Ba, Pb. En haut à gauche, spectre d'enregistrement du soufre. Les flèches courbes indiquent des lysosomes en formation.

*Electron micrographs of the gill epithelium of Bathymodiolus thermophilus (non osmicated and unstained material).*

1) General view showing cell types : B : bacteriocyte with bacteria, M : mucocyte, CE : common epithelial cell containing several lysosomes (L), N : nucleus.

2) The common epithelial cell seen at a higher magnification showing lysosomes (L) containing particles which were shown, using Camebax, to contain S, Al, Si, P, Ti, Fe, Ni, As, Sn, Ba, Pb. Upper left : sulphur X-ray spectrum. Bent arrows indicate lysosome first stage.

images X (pl.9) montrent de très fortes concentrations en iode : 50 000 chocs/s, soufre : 25 000 chocs/s, calcium : 25 000 chocs/s et brome : 15 000 chocs/s.

Microsonde Camebax, microscopie électronique

Nous avons recherché à l'échelle ultrastructurale, dans les organites connus pour leur capacité de bioconcentration, notamment les sphérocristaux et les lysosomes, les éléments détectés en microscopie photonique :

La planche 10, qui représente l'épithélium digestif, montre l'abondance des sphérocristaux et le détail de leur ultrastructure. Le tableau 2 donne en exemple les résultats

de comptage obtenus sur des sphérocristaux et lysosomes de l'épithélium digestif et de l'épiderme externe. On constate la présence d'un nombre élevé d'éléments dans un sphérocrystal de l'épithélium digestif : S, Al, Si, P, Ca, Mn, Fe, As et Pb sont particulièrement abondants ; Mg, Zn, et Sr sont aussi présents à des teneurs moindres. Dans un lysosome de ce même épithélium, on note l'existence de S, Si, P et Ba avec en outre une très forte concentration en Fe. Dans un lysosome d'épiderme externe, on détecte S, Al, Si, P et Ca et comme dans l'épithélium digestif, une teneur particulièrement élevée en Fe. Cet ensemble de données tend à prouver que les sphérocristaux ont un enrichissement en métaux plus important que les



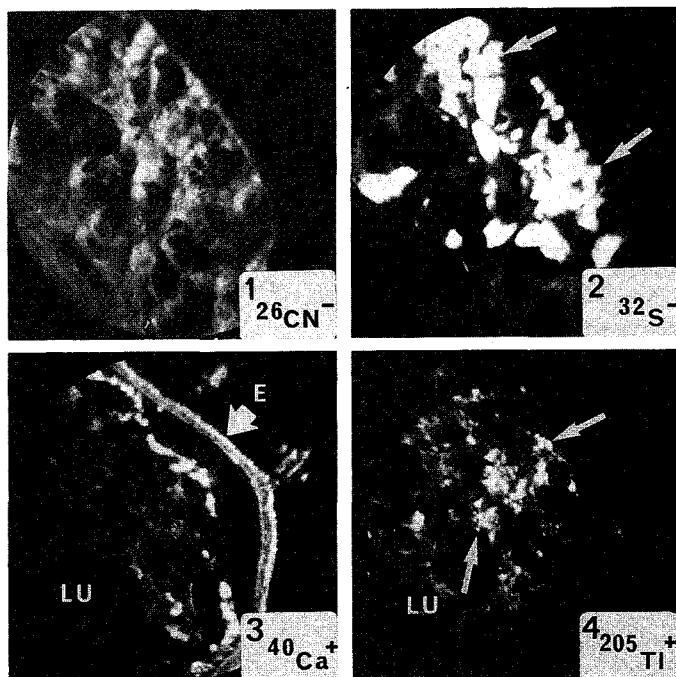


Planche 2

Images ioniques d'*Alvinella caudata* (microscope ionique).

1 et 2) Coupe transversale d'épiderme dorsal de la région postérieure du corps ; l'image 26 CN (1) montre la topographie tissulaire. Le soufre apparaît sous forme de taches blanches (2, flèches).

3 et 4) Coupe transversale du tube digestif montrant l'épithélium (E) et la lumière (Lu) contenant des particules denses constituées notamment de calcium (3) et de thallium (4) qui apparaît sous forme de taches blanches (flèches); l'épithélium est dépourvu de thallium.

*Ion images of Alvinella caudata (ion microscope).*

1 and 2) Transverse section of the posterior part of the body showing tissue topography with 26 CN (1) and sulphur which appears as white spots (2, arrows).

3 and 4) Transverse section of the digestive tract showing epithelium (E) and lumen (Lu) which contains particles made of calcium (3) and thallium (4) which appears as white spots (arrows); epithelium is thallium free.

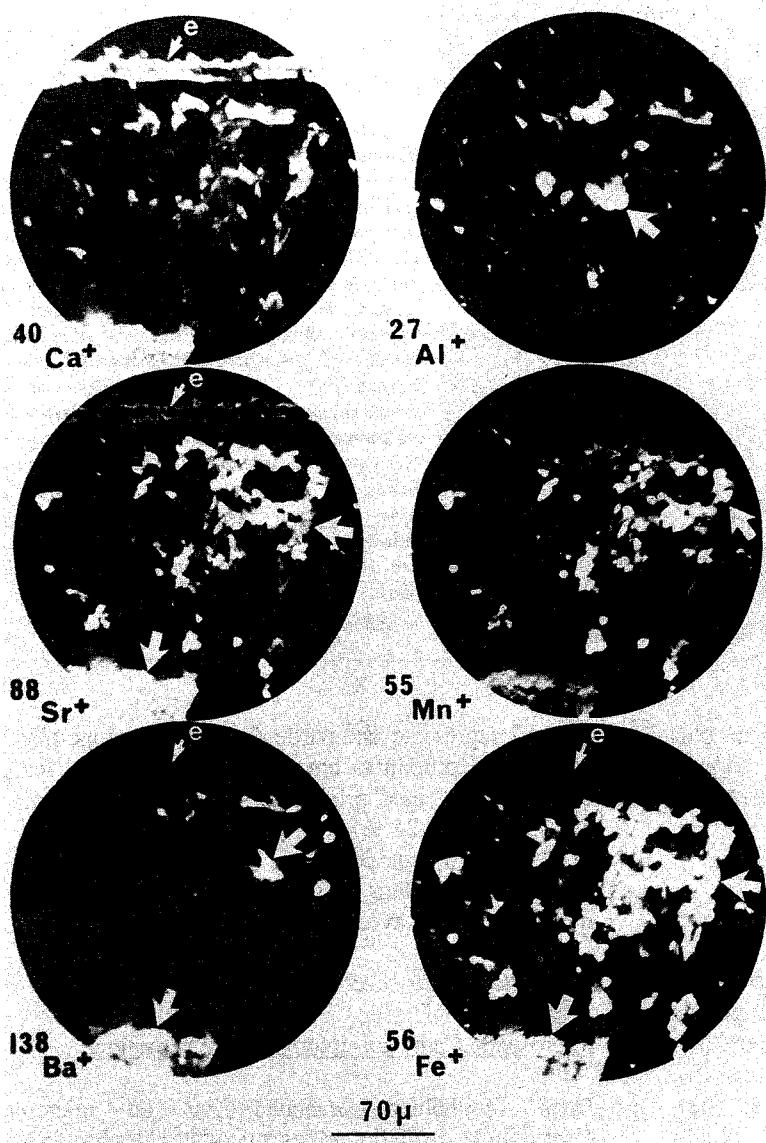


Planche 3

Images ioniques d'*Alvinella caudata* (microscope ionique). Coupe transversale montrant l'épithélium digestif (e) et les particules contenues dans la lumière du tractus digestif. Toutes les images ont été obtenues à partir de la même coupe et montrent la présence de calcium (Ca), aluminium (Al), strontium (Sr), manganèse (Mn), baryum (Ba) et fer (Fe) dans les particules alors que l'épithélium ne renferme que du calcium et du strontium.

*Ion images of Alvinella caudata (ion microscope). Transverse section showing digestive epithelium (e) and particles within the digestive tract lumen. All the images were obtained from the same section: particles are made of calcium (Ca), aluminium (Al), strontium (Sr), manganese (Mn), barium (Ba) and iron (Fe); epithelium contains calcium and strontium.*

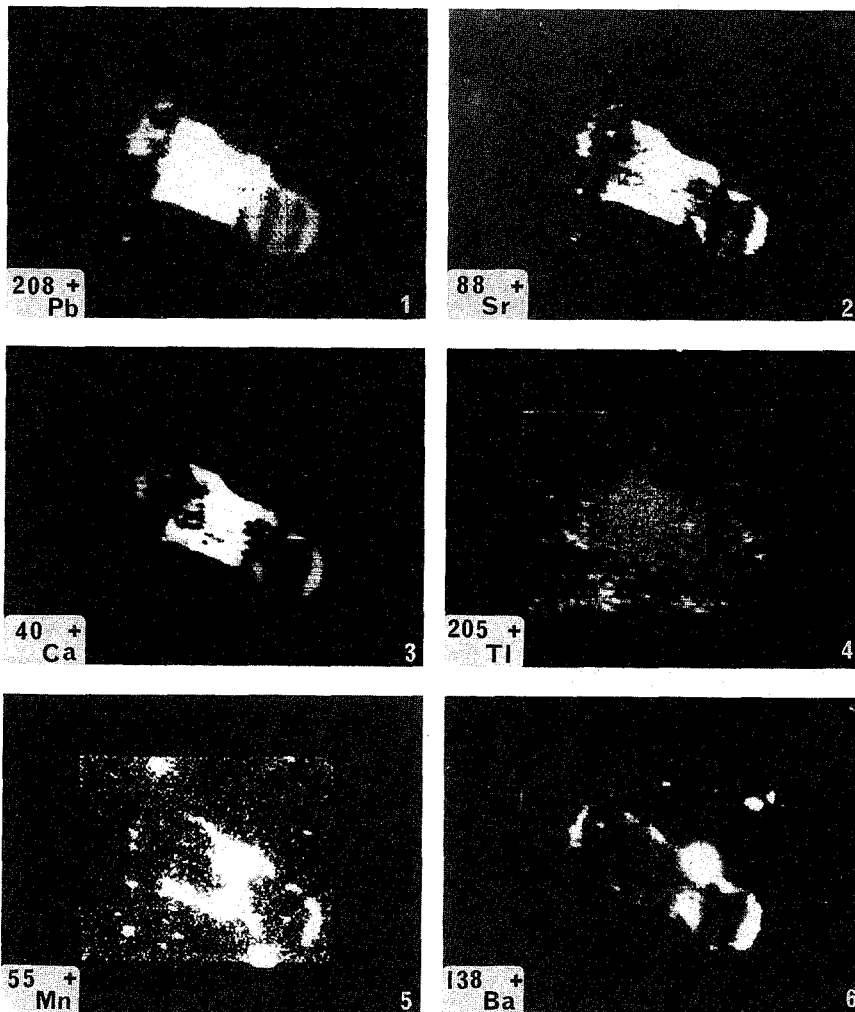


Planche 4  
Images ioniques d'*Alvinella caudata* (microsonde ionique). Coupe transversale montrant le contenu de la lumière du tractus digestif. Toutes les images ont été obtenues à partir de la même coupe qui s'abrase au fur et à mesure du bombardement : on observe la présence de plomb (Pb), strontium (Sr), calcium (Ca), thallium (Tl), manganèse (Mn) et baryum (Ba).

*Ion images of Alvinella caudata (ion microprobe). Transverse section showing the elements detected within the digestive tract lumen. All the images were obtained from the same section which was progressively destroyed by the ion bombardment : particles are made of lead (Pb), strontium (Sr), calcium (Ca), thallium (Tl), manganese (Mn) and barium (Ba).*

lysosomes, à l'exception du fer qui pourrait être plus abondant dans les lysosomes, d'une part, et du baryum détecté à l'état de trace dans les lysosomes d'autre part.

#### *Bathymodiolus thermophilus*

##### *Microanalyse par émission ionique secondaire*

Le microscope ionique nous a permis de mettre en évidence un certain nombre d'éléments, dans la branchie et la glande digestive. Dans la branchie, on détecte : fluor (F), aluminium (Al), silicium (Si), phosphore (P), soufre (S), titane (Ti), chrome (Cr), manganèse (Mn), fer (Fe), strontium (Sr), étain (Sn), iode (I), baryum (Ba), plomb (Pb) et des terres rares : lanthane (La) et thulium (Tm). La

figure 2 représente une partie du spectre ionique obtenu à partir de l'épithélium branchial : on reconnaît les pics correspondant aux principaux isotopes de l'étain aux masses 116 (14,24 %), 117 (7,57 %), 118 (24,01 %), 119 (8,58 %), 120, isotope majeur (32,97 %), 122 (4,71 %) et 124 (5,98 %). Dans la glande digestive, on détecte les mêmes éléments, avec en plus des traces de cuivre.

##### *Microanalyse par spectrométrie des rayons X*

##### Microsonde Camebax- microscopie électronique

Dans l'épithélium branchial, vu en microscopie électronique, on distingue des mucocytes, des bactériocytes et des cellules épithéliales banales (pl. 1, fig.1) ; ce sont



Tableau 1

*Bathymodiolus thermophilus* : branchie et glande digestive. Microanalyse par spectrométrie des rayons X (sonde Camebax). Nombre de chocs enregistrés pendant un temps de comptage de 100 secondes. NS : non significatif.

*Bathymodiolus thermophilus* : gill and digestive gland. X-ray spectrometry microanalysis (Camebax microprobe). Count numbers during a counting time of 100 seconds. NS : not significant.

Cristal	Raie	Élément	Branchie		Glande digestive	
			Bactérie	Lysosome (Cellule à bactéries)	Lysosome (Cellule épithéliale)	Lysosome
PET	K α1	S	111 ± 29	579 ± 55	1292 ± 75	582 ± 53
TAP	K α1	Al	166 ± 34	192 ± 40	131 ± 34	688 ± 59
TAP	K α1	Si	1100 ± 71	2002 ± 98	1929 ± 92	4373 ± 140
TAP	K α1	P	2621 ± 105	2598 ± 106	1612 ± 84	516 ± 61
PET	K α1	Ca	310 ± 45	521 ± 58	NS	7971 ± 183
PET	K α1	Ti	4098 ± 136	8058 ± 190	485 ± 72	616 ± 72
LIF	K α1	Fe	NS	131 ± 34	118 ± 37	1998 ± 93
LIF	K α1	Ni	74 ± 31	41 ± 34	97 ± 44	468 ± 53
TAP	L α1	As	NS	NS	48 ± 31	NS
PET	L α1	Sn	NS	NS	55 ± 39	127 ± 44
PET	L α1	Ba	NS	NS	654 ± 77	2207 ± 107
LIF	L α1	Pb	NS	357 ± 55	73 ± 50	103 ± 44

Tableau 2

*Alvinella caudata* : épithélium digestif et épiderme externe.

Microanalyse par spectrométrie des rayons X (sonde Camebax). Nombre de chocs enregistrés pendant un temps de comptage de 100 secondes. NS : non significatif.

*Alvinella caudata* : digestive epithelium and external epidermis.

X-ray spectrometry microanalysis (Camebax microprobe). Count numbers during a counting time of 100 seconds. NS : not significant.

Cristal	Raie	Élément	Epithélium digestif		Epiderme externe
			Sphéro-cristal	Lysosome	Lysosome
PET	K α1	S	2053 ± 73	393 ± 80	316 ± 70
TAP	K α1	Mg	350 ± 33	N.S.	N.S.
TAP	K α1	Al	1200 ± 180	N.S.	603 ± 110
TAP	K α1	Si	2650 ± 203	1050 ± 120	1360 ± 150
TAP	K α1	P	18340 ± 510	363 ± 106	506 ± 113
PET	K α1	Ca	6820 ± 320	N.S.	203 ± 86
PET	K α1	Mn	1630 ± 193	N.S.	N.S.
LIF	K α1	Fe	12430 ± 413	20663 ± 526	12440 ± 410
LIF	K α1	Zn	526 ± 140	N.S.	N.S.
TAP	L α1	As	803 ± 146	N.S.	N.S.
TAP	L α1	Sr	290 ± 156	N.S.	N.S.
PET	L α1	Ba	N.S.	110 ± 93	N.S.
LIF	L α1	Pb	1596 ± 123	N.S.	N.S.

ces deux derniers types cellulaires qui, en raison de la présence d'inclusions intracellulaires denses, ont été analysés. Nos investigations ont porté plus précisément sur les bactéries, les lysosomes des bactériocytes et les lysosomes des cellules épithéliales banales qui contiennent des particules figurées (pl.1, fig.1 et 2). Le tableau 1 résume la composition élémentaire de ces différents organites. Dans les bactéries, silicium (Si), phosphore (P) et surtout titane (Ti) dominant ; on y met aussi en évidence soufre (S), aluminium (Al), calcium (Ca) et des traces de nickel (Ni). Dans les lysosomes des bactériocytes, on détecte les mêmes éléments à des teneurs généralement plus élevées (S,Al,Si,Ca,Ti), des traces de nickel et de fer et en outre du plomb (Pb) qui n'était pas présent dans les bactéries.

Les lysosomes des cellules épithéliales banales renferment un nombre plus élevé d'éléments : d'une part ceux présents dans les bactéries et dans les lysosomes des bactériocytes : S, Al, Si, P, Ti, Ni et Pb en remarquant notamment la teneur plus élevée en soufre, et d'autre part de l'arsenic (As) de l'étain (Sn) et du baryum (Ba) absents des bactéries et de leurs lysosomes.

Dans la glande digestive, les cellules épithéliales des diverticules glandulaires renferment de nombreux lysosomes dont la composition élémentaire est résumée dans le tableau 1. Alors que Si, Ca, Fe et Ba dominant, S, Al, P, Ti, Ni, Sn et Pb sont plus faiblement représentés ; on ne détecte pas d'arsenic.

Il convient de signaler en outre l'existence dans la lumière centrale des filaments branchiaux ainsi que dans la glande digestive, de nombreux amœbocytes dont les lysosomes ont une composition élémentaire comparable à celle des lysosomes branchiaux et digestifs.

## DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'utilisation conjointe des deux méthodes d'analyse chimique locale, la spectrométrie de masse par émission ionique secondaire (microscope ionique et microsonde ionique) d'une part et la spectrométrie des rayons X (microsonde MS 46 et microsonde Camebax) d'autre part, a permis la détection et la localisation d'un nombre important d'éléments à l'échelle cellulaire et subcellulaire.

La comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes sur les mêmes tissus d'une même espèce fait apparaître quelques différences explicables par les caractéristiques propres à chaque méthode. Certains

éléments très légers, de numéro atomique inférieur à 5, sont impossibles à analyser en microanalyse X ; tel est le cas du lithium, mis en évidence par microanalyse ionique chez *Alvinella caudata*. En outre, la spectrométrie des rayons X a un faible rendement de détection ; elle permet d'obtenir des images de répartition élémentaire par balayage du faisceau, à la condition que les éléments soient présents en forte concentration : ceci a été notamment le cas pour le soufre, le fer, le manganèse, le zinc, le brome et l'iode chez *Alvinella caudata*. Par contre, la microanalyse ionique permet la détection de tous les éléments de la classification périodique, avec distinction de leurs isotopes, comme nous l'avons vu notamment pour le baryum, l'étain, le thallium et le plomb. Les concentrations minimales détectables sont de l'ordre de 100 à 1 000 ppm en microanalyse X et de l'ordre de la ppm en microanalyse ionique. Ces caractéristiques propres à chaque méthode expliquent la complémentarité des résultats obtenus ; par exemple chez *Alvinella caudata* (tab. 2 et 3), seule la microanalyse ionique a permis de détecter F, Ti, Cr, Br, I, La, Tm, Tl et U, présents à des teneurs relativement faibles, alors que Al, Si, S, Mn, Fe, Zn, As, Sr, Ba, et Pb, présents à des teneurs élevées, ont pu être mis en évidence par les deux méthodes. Rappelons aussi que seule la microanalyse X permet des investigations à l'échelle ultrastructurale.

Les deux types d'appareil utilisés en spectrométrie de masse, microscopes ioniques (SMI 300 et IMS 3F-Cameca) et microsonde ionique (MIQ 156 - Riber) ont des performances spécifiques qui ont permis l'obtention de résultats complémentaires. Le SMI 300, grâce au bombardement par un faisceau d'ions primaires ( $O_2^+$ ), donne la possibilité d'étudier les ions secondaires positifs alors que le IMS 3F, grâce au bombardement par un faisceau d'ions primaires ( $Cs^+$ ) donne la possibilité d'étudier les ions secondaires négatifs notamment les halogènes comme le fluor, brome et iode particulièrement abondants chez les organismes hydrothermaux, le soufre et l'arsenic, avec élimination des ions polyatomiques (Metson *et al.*, 1984). La spectrométrie de masse permet, comme nous l'avons vu, d'obtenir des images de répartition des éléments en microscopie photonique. Le microscope ionique fournit, grâce à une optique appropriée, de bonnes images de répartition, avec une résolution spatiale de l'ordre de 1  $\mu m$  environ, à condition que l'élément considéré ait une intensité d'émission assez élevée (de l'ordre de  $10^{-16}$ ). Les images obtenues par balayage du faisceau, avec la microsonde ionique (MIQ 156-Riber) ont une moins bonne définition, mais ne nécessitent pas une intensité d'émission aussi élevée : le rende-

Tableau 3

*Alvinella caudata* : épiderme externe, épithélium digestif et lumière intestinale.  
Microanalyse par spectrométrie de masse (microscope ionique).

Intensité d'émission de l'élément normalisée à l'intensité d'émission du carbone : \*\*\*, de l'ordre de  $10^{-1}$  ; \*\*, de l'ordre de  $10^{-2}$  ; \*, de l'ordre de  $10^{-3}$ .

*Alvinella caudata* : external epidermis, digestive epithelium and digestive tract lumen.

Mass spectrometry microanalysis (ion microscope).

Ion emission intensity of the element normalized to ion emission intensity of carbon : \*\*\*,  $10^{-1}$  ; \*\*,  $10^{-2}$  ; \*,  $10^{-3}$ .

	Li	F	Al	Si	S	Ti	Cr	Mn	Fe	Zn	Br	Sr	I	Ba	La	Tm	Tl	Pb	U
Épiderme externe	*	*	*	***	***	*		*	***	*	*	*	*	**	*	*	**	***	*
Épithélium digestif	*	*	**	***	***	*	*	**	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Lumière intestinale	*	*	*	***	***	***	*	***	***	***	*	*	*	***	*	*	***	**	*

ment ionique paraît nettement meilleur, surtout dans les hautes masses.

L'inconvénient majeur de la spectrométrie de masse est qu'il s'agit d'une technique à caractère destructif, puisque ce sont les ions arrachés à la préparation qui sont "véhiculés" par l'optique ionique, puis analysés et filtrés par le spectromètre de masse ; la succession des images obtenues grâce à la microsonde Riber montre bien les étapes de cette abrasion tissulaire (pl. 4, 5 et 6).

Les résultats obtenus sur la composition élémentaire d'*Alvinella caudata* et de *Bathymodiolus thermophilus* méritent un certain nombre de commentaires.

Chez *Alvinella caudata*, nous avons pu noter l'existence d'un nombre élevé d'éléments, la plupart existant normalement chez les organismes littoraux, mais à des teneurs plus faibles, et quelques autres non fréquents et inattendus. Parmi les éléments courants, détectés souvent chez les organismes aquatiques (Chassard-Bouchaud *et al.* 1984 a), citons : F, Si, S, Cr, Mn, Fe, Ti, Zn, Br, Sr, I, Ba, et Pb. Il en est d'autres dont les mécanismes de bioaccumulation sont connus depuis peu grâce aux méthodes microanalytiques : il s'agit notamment du lithium (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1984 b), de l'aluminium (Chassard-Bouchaud, Galle, 1986), de l'uranium (Chassard-Bouchaud, 1983 a et b) et des lanthanides : lanthane (Chassard-Bouchaud, Hallegot, 1984) et thulium (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1984 c).

Alors que la plupart des éléments sont présents dans l'ensemble des tissus analysés, l'uranium n'a été détecté que dans l'épiderme externe d'*Alvinella caudata* ; ce résultat est à rapprocher de ceux faisant état d'un enrichissement en uranium mesuré par activation neutronique (allant de 150 à 598 ppm) dans la paroi interne du tube (Valette - Silver *et al.*, 1985). Ces auteurs américains se posent la question de savoir si la présence d'uranium correspond à une simple adsorption passive d'uranium sur le support organique ou à un processus biochimique actif. Le fait que nous ayons détecté l'uranium en situation intracellulaire permettrait de répondre positivement à leur deuxième hypothèse.

Des données récentes obtenues par microanalyse (Vovelle, Gaill, 1986) ont précisé la composition élémentaire du tube d'*Alvinella caudata* : abondance de phosphore et fer, auxquels s'ajoutent calcium et soufre, ainsi que zinc et silice à un degré moindre, et magnésium et manganèse en faible abondance. Cet ensemble d'éléments, qui correspond à la fixation de minéraux d'origine exogène, est retrouvé, sensiblement avec les mêmes proportions, dans les tissus que nous avons analysés (tab. 2 et 3) avec une différence notable concernant la silice pour laquelle les teneurs intracellulaires que nous avons relevées notamment dans les sphérocristaux, sont élevées ; ainsi, *Alvinella caudata* pourrait jouer un rôle positif dans le dépôt de silice, hypothèse non retenue par Vovelle *et al.* (1983).

La présence dans les soies parapodiales de brome et d'iode est due à la richesse en tyrosine halogénée, et correspond aux données relatives aux composés impliqués dans la consolidation des soies chez les polychètes (Vovelle *et al.*, 1983) ; on y remarque aussi une biominéralisation calcique et une forte teneur en soufre.

Parmi les éléments mis en évidence chez *Alvinella*, il convient de retenir enfin l'arsenic et le thallium. Alors que le premier a déjà été signalé chez cette espèce (Gaill *et al.*, 1984), le second est inattendu. Le thallium a en effet été

détecté dans des cas exceptionnels et à l'état de traces, notamment dans des *Mytilus* sp. du golfe d'Aqaba en Mer Rouge (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1986 a). Ce métal est présent dans les eaux de mer littorales à l'état d'ultratraces (0,01 ppb). Nous manquons de données précises relatives à la présence de thallium dans les eaux profondes et à sa concentration dans les zones d'intense activité géochimique ; on sait cependant que les nodules de ferro-manganèse des sources hydrothermales de la Mer Rouge et de la ride des Galapagos présentent un facteur d'enrichissement exceptionnel en thallium (287 par rapport à la croûte terrestre ; Cronan, 1976).

La composition élémentaire de *Bathymodiolus thermophilus* et celle des microorganismes qui lui sont associés méritent quelques commentaires. La présence dans les bactéries d'un certain nombre d'éléments : soufre, aluminium, silicium, nickel associée à une richesse particulière en titane semblerait indiquer une capacité de bioaccumulation des métaux ; étant donné que les lysosomes des bactériocytes contiennent les éléments présents dans les bactéries, on peut émettre l'hypothèse d'une lyse du matériel bactérien. Les cellules épithéliales branchiales et digestives de *B. thermophilus* renferment, outre les éléments détectés dans les bactéries, notamment arsenic et étain.

Si l'on compare la composition élémentaire des deux espèces analysées, on constate que d'une part, la majorité des métaux est commune aux deux espèces, mais que d'autre part certains composants métalliques leur sont spécifiques : tels sont le cas de l'étain chez *Bathymodiolus thermophilus* et celui du thallium chez *Alvinella caudata*. Des contaminations expérimentales effectuées sur la moule *Brachydontes variabilis* (Ünsal, 1984) tendraient à prouver, d'une part que l'accumulation d'étain est inversement proportionnelle à la concentration du métal dans le milieu, d'autre part que le métal persiste dans l'organisme après une période prolongée de détoxication. Ces données seraient en faveur de l'hypothèse d'une affinité particulière de ces bivalves pour l'étain.

Parmi les questions qui se posent, rappelons celle de savoir si la composition chimique élémentaire des organismes hydrothermaux reflète celle des fluides environnants. Roesijadi et Crecelius avaient déjà posé le problème en 1984 au sujet d'un autre bivalve, *Calyptogena magnifica*, sans pouvoir le résoudre faute de données précises relatives à la composition du milieu. Les résultats récents obtenus par Fouquet (1985) sur la nature des sulfures polymétalliques présents à 13° N, zone d'où proviennent *Bathymodiolus thermophilus* et *Alvinella caudata* analysés ici, montrent que les éléments détectés chez les deux espèces existent dans le milieu, à l'exception notamment du thallium et de l'étain. Il est possible que l'étain ne soit présent dans le milieu qu'à l'état de traces, mais que l'affinité de *Bathymodiolus thermophilus* soit particulièrement forte et en fasse ainsi une espèce indicatrice de la présence du métal. Il pourrait en être de même pour *Alvinella caudata*, qui serait une espèce cible, bio-indicatrice de la présence de thallium dans les fluides hydrothermaux.

Des données récentes obtenues sur un autre mollusque bivalve, *Calyptogena phaseoliformis* (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1988) provenant des zones de subduction proches du Japon, confirment le rôle d'indicateur biologique de ces

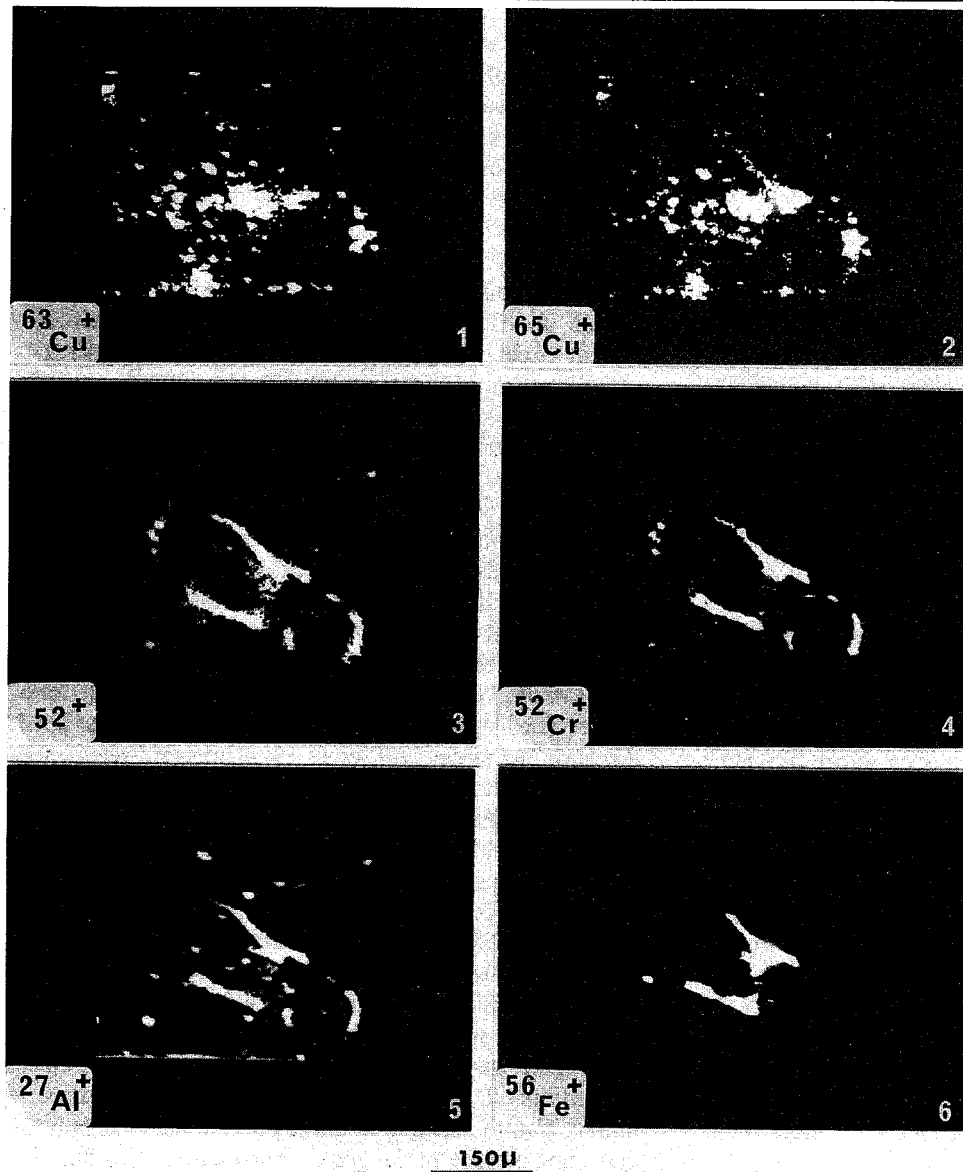


Planche 5

Images ioniques d'*Alvinella caudata* (microsonde ionique). Coupe transversale montrant le contenu de la lumière du tractus digestif. Toutes les images ont été obtenues à partir de la même coupe que celle présentée sur la planche 4 : on remarque que l'abrasion progresse encore. On observe la présence de cuivre avec ses deux isotopes  $^{63}\text{Cu}^+$  et  $^{65}\text{Cu}^+$ , de chrome  $^{52}\text{Cr}^+$  alors qu'à la masse 52<sup>+</sup> le chrome est associé à des polyatomiques, d'aluminium (Al) et de fer (Fe).

*Ion images of Alvinella caudata (ion microprobe). Transverse section showing the elements detected within the digestive tract lumen. All the images were obtained from the same section as that is shown on plate 4: tissue destruction by the ion bombardment was still in progress. One can observe copper, with both isotopes  $^{63}\text{Cu}^+$  and  $^{65}\text{Cu}^+$ , chromium  $^{52}\text{Cr}^+$  while mass 52 corresponds to chromium together with cluster ions, aluminium (Al) and iron (Fe).*

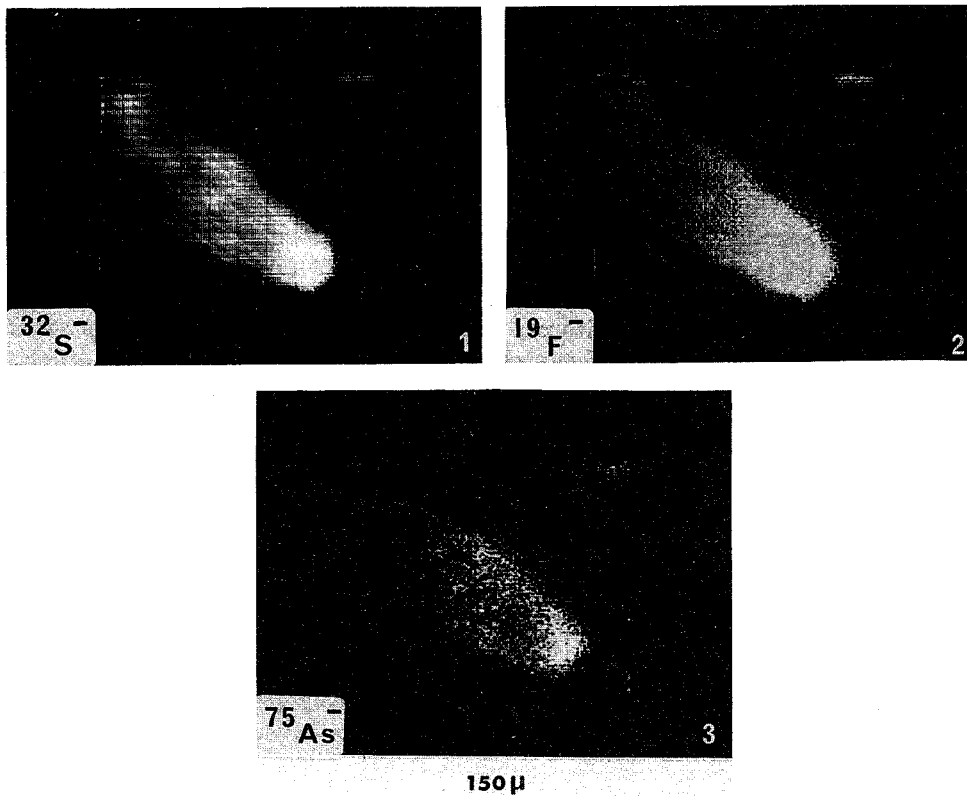
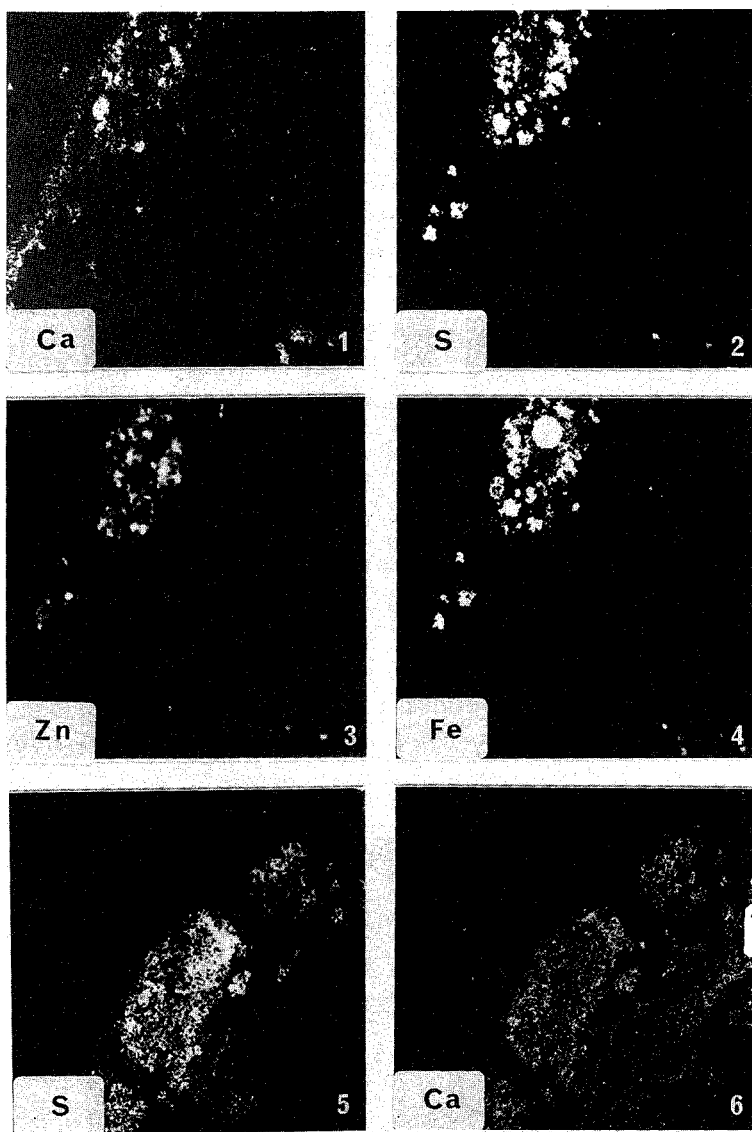


Planche 6

Images ioniques d'*Alvinella caudata* (microsonde ionique). Coupe transversale montrant le contenu de la lumière du tractus digestif. Toutes les images ont été obtenues à partir de la même coupe. On observe la présence de soufre (S), fluor (F) et arsenic (As).

*Ion images of Alvinella caudata (ion microprobe). Transverse section showing the elements detected within the digestive tract lumen. All the images were obtained from the same section. Particles are composed of sulphur (S), fluorine (F) and arsenic (As).*



80 μ

Planche 7

Images X d'*Alvinella caudata* (microsonde MS 46).

1 à 4) coupe transversale de l'épithélium digestif montrant la présence de calcium (Ca, raie  $K\alpha$ ), soufre (S, raie  $K\alpha$ ), zinc (Zn, raie  $K\alpha$ ) et fer (Fe, raie  $K\alpha$ ).

5 et 6) coupe transversale de l'épiderme externe où l'on détecte du soufre (S, raie  $K\alpha$ ) et du calcium (Ca, raie  $K\alpha$ ).

*X-ray images of Alvinella caudata (MS 46 microprobe).*

*From 1 to 4) transverse section showing the elements detected within the digestive epithelium : calcium (Ca,  $K\alpha$  line), sulphur (S,  $K\alpha$  line), zinc (Zn,  $K\alpha$  line) and iron (Fe,  $K\alpha$  line).*

*5 and 6) transverse section of the external epidermis where sulphur (S,  $K\alpha$  line) and calcium (Ca,  $K\alpha$  line) were detected.*

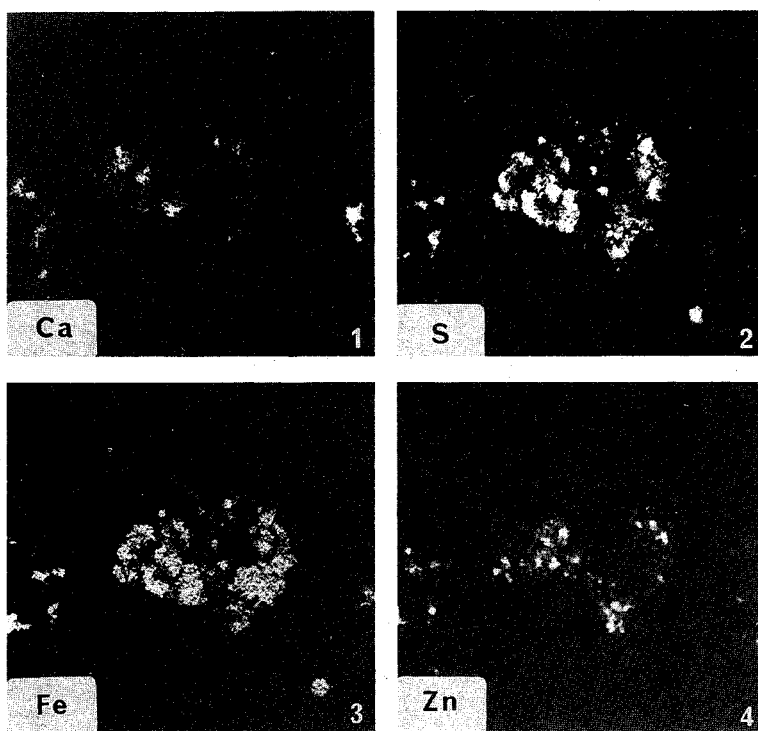


Planche 8

Images X d'*Alvinella caudata* (microsonde MS46). Coupe transversale montrant le contenu de la lumière du tractus digestif.

On observe la présence de calcium (Ca), soufre (S), fer (Fe) et zinc (Zn).

*X-ray images of Alvinella caudata (MS 46 microprobe). Transverse section showing the elements detected within the digestive tract lumen. Particles are composed of calcium (Ca), sulphur (S), iron (Fe) and zinc (Zn).*

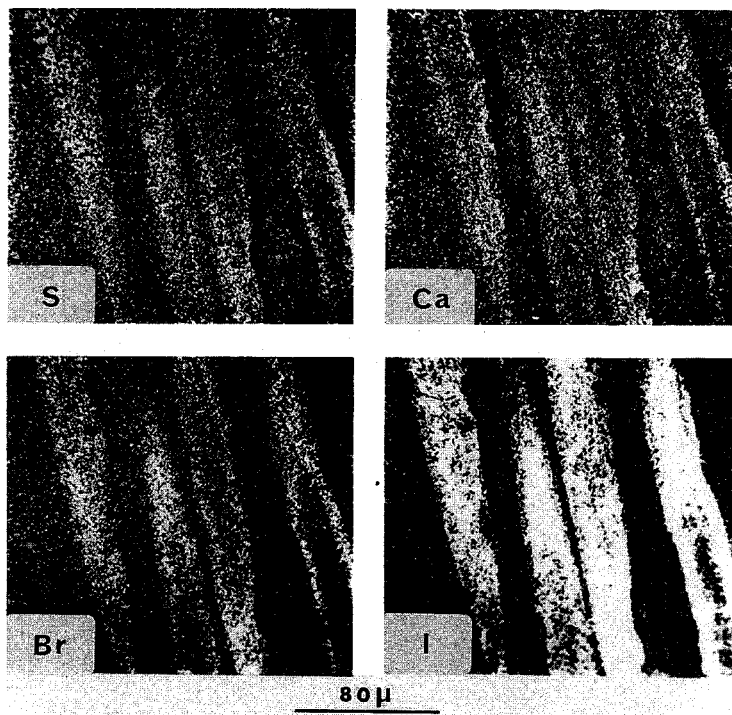


Planche 9

Images X d'*Alvinella caudata* (microsonde MS 46). Soies parapodiales vues en coupes longitudinales. Elles sont constituées de soufre (S), calcium (Ca), brome (Br) et iode (I).  
*X-ray images of Alvinella caudata (MS 46 microprobe). Transverse sections of parapodial setae showing the presence of sulphur (S), calcium (Ca), bromine (Br) and iodine (I).*

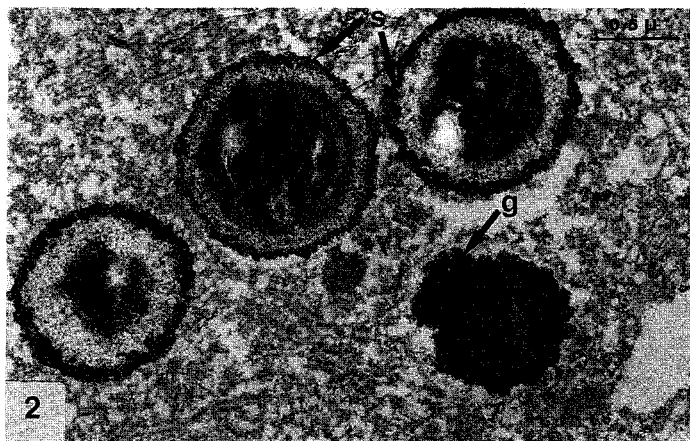
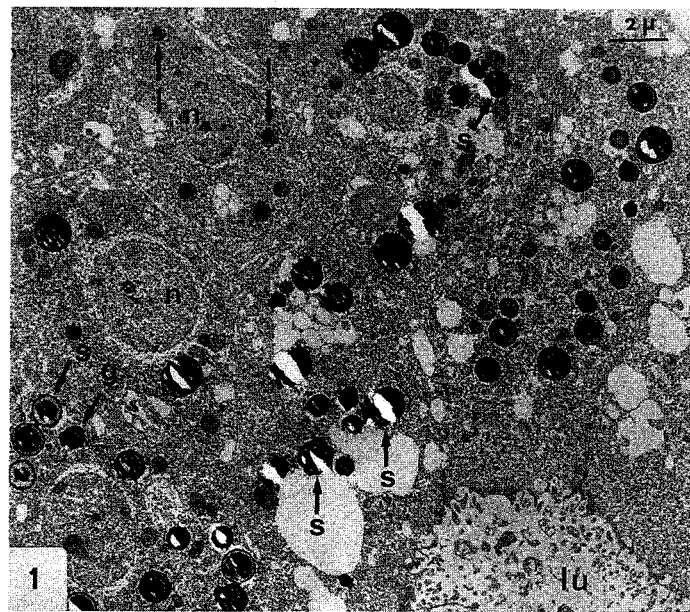


Planche 10

Micrographies électroniques d'*Alvinella caudata*.

- 1) Vue d'ensemble montrant les cellules de l'épithélium digestif où l'on constate la présence de nombreux sphérocristaux (S), de grains denses (G) et de lysosomes (L) qui renferment les éléments cités dans le tableau 2 (S, Mg, Al, Si, P, Ca, Mn, Fe, Zn, As, Sr, Ba, Pb). Lu : lumière du tractus digestif ; N : noyau.
  - 2) Même coupe vue à un plus fort grossissement montrant le détail des sphérocristaux avec leurs couches concentriques claires et opaques aux électrons (S) et un grain dense (G).
- Electron micrographs of Alvinella caudata.*
- 1) General view showing digestive epithelium cells with numerous spherocrystals (S), dense granules (G) and lysosomes (L), which contain the elements quoted in Table 2 (S, Mg, Al, Si, P, Ca, Mn, Fe, Zn, As, Sr, Ba, Pb). Lu : digestive tract lumen, N : nucleus.
  - 2) Same section seen at a higher magnification showing the details of spherocrystals (S) and a dense granule (G).



organismes associés à des biotopes particuliers. En effet, la comparaison de la composition élémentaire de *Calypptogena phaseoliformis* (Fe, Al, Si, S, Mn, Br, Sn, Cd, Pb, Tl, Zn, Ni, Cr, Ag, Ba, Cu, Ti, F, et Mo) avec celle du milieu environnant : fluides, sédiments et minéraux, montre une remarquable concordance. Cette espèce peut ainsi être considérée comme un excellent indicateur des phénomènes géochimiques associés aux zones de subduction au large du Japon. En outre, il convient de remarquer à propos de cette espèce, que thallium et étain sont bioaccumulés de même façon que présentent sous deux types dont l'un est particulièrement riche en titane et en soufre (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1986 *b*), renferment les minéraux précités, en majeure partie, sous forme de sulfures et de phosphates insolubles. Le haut degré de tolérance des espèces hydrothermales vis-à-vis des métaux très toxiques comme l'arsenic, le plomb, l'étain ou le thallium, peut s'expliquer par la présence de protéines soufrées intralysosomales, assimilables à des métallothionéines qui existeraient en particulier chez *Alvinella caudata*, chez le pogonophore vestimentifère *Riftia pachyptila* (Cosson - Mannevy *et al.*, 1986) et chez le bivalve *Calypptogena magnifica* (Roesijadi, Crecelius, 1984). Ces métallothionéines, dont la fonction est de capturer certains éléments potentiellement toxiques et de les complexer, interviendraient dans les processus de détoxification. Les sphérocristaux dans lesquels s'effectue une précipitation des ions métalliques, sont rejetés périodiquement dans le milieu extracellulaire : ils jouent un rôle aussi important que les lysosomes dans les phénomènes de détoxification. Ainsi, lysosomes et sphérocristaux, en prélevant et en isolant du milieu cellulaire, des éléments potentiellement toxiques, préservent la cellule en lui permettant d'assurer ses fonctions métaboliques normales.

En conclusion, par les premiers résultats obtenus sur *Alvinella caudata* et sur *Bathymodiolus thermophilus*, nous avons tenté de montrer comment la microanalyse peut aider à comprendre certains phénomènes biologiques liés à l'hydrothermalisme, en particulier ceux relatifs aux bioaccumulations métalliques spécifiques des organismes

et des bactéries qui leur sont associées, et d'en faire ainsi un premier bilan. Outre la spectrométrie des rayons X et la spectrométrie de masse dont nous avons présenté et discuté les avantages et les inconvénients respectifs, d'autres techniques peuvent être mises en œuvre et permettre la caractérisation élémentaire des échantillons biologiques, à des degrés divers de sensibilité et de résolution (Boumati, 1984). Citons d'abord la microautoradiographie, qui permet la localisation de certains radionucléides comme l'uranium, mais qui nécessite des temps d'exposition très longs allant de 1 jour à 6 mois, alors qu'il suffit de 1 à 1000 secondes pour obtenir une image en microscopie ionique (Galle, 1984). La microanalyse par spectrométrie des pertes d'énergie des électrons transmis (Jeanguillaume *et al.*, 1984) est une technique pratiquée au niveau submicroscopique par laquelle les masses minimales décelables sont de l'ordre de 10<sup>-20</sup>g (quelques centaines d'atomes), avec une résolution spatiale de quelques dizaines d'angströms. Signalons enfin que, dans le cas où il est utile de localiser une molécule déterminée, deux techniques sont utilisables : la spectrométrie Raman (Delhaye, Merlin, 1975) et la cathodoluminescence (Cavellier, 1980). En outre, dans un avenir très proche, il sera possible, grâce à la numérisation et au traitement informatique des images, d'aborder l'aspect quantitatif en microscopie par émission ionique secondaire (Cavellier *et al.*, 1985).

#### Remerciements

Les auteurs remercient Françoise Kleinbauer et Janine Brissard pour la préparation du matériel destiné à être analysé en microscopie photonique et électronique, ainsi que Annick Dorme pour la préparation de l'iconographie de ce travail. Ces recherches ont été effectuées en partie avec le soutien financier du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), du Ministère Français de l'Environnement (contrat n° 84244) et de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM : service commun n° 27).

#### RÉFÉRENCES

- Boumati P., 1984. Sur les méthodes de microscopie analytiques utilisées en biologie. Résultats obtenus et comparaison entre les techniques électroniques et ioniques, *Mém. DESS, Univ. Paris-Val-de-Marne*, 50 p.
- Castaing R., 1951. Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique, *Thèse Doct. État, Univ. Paris, Office National d'Etudes et de Recherches Aérospatiales (ONERA)*, 245 p.
- Castaing R., Slodzian G., 1962. Microanalyse par émission ionique secondaire, *J. Microsc.*, 1, 395-410.
- Cavanaugh C.M., 1983. Symbiotic chemoautotrophic bacteria in marine invertebrates from sulfide-rich habitats, *Nature*, 302, 58-61.
- Cavellier J.F., 1980. Étude des possibilités d'extension au domaine biologique d'une technique de microanalyse par cathodoluminescence, *Thèse Doct. État, Univ. Paris - Val-de-Marne*, 210 p.
- Cavellier J.F., Hallegot P., Escaig F., Gaume P., Boumati P., 1985. Numérisation et traitement informatique des images en microscopie par émission ionique secondaire, *Biol. Cell*, 53, 19a.
- Chassard-Bouchaud C., 1983 *a*. Cellular and subcellular localization of uranium in the crab *Carcinus maenas* : a microanalytical study, *Mar. Pollut. Bull.*, 14, 4, 133-136.
- Chassard-Bouchaud C., 1983 *b*. Rôle des lysosomes et des sphérocristaux dans le phénomène de concentration de l'uranium chez la moule *Mytilus edulis* : microanalyse par spectrographie des rayons X, *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 296, 581-586.
- Chassard-Bouchaud C., Galle P., 1986. Bioaccumulation d'aluminium par les organismes marins : mise en évidence par microscopie corpusculaire analytique, *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 302, 2, 55-61.
- Chassard-Bouchaud C., Hallegot P., 1984. Bioaccumulation de lanthane par des moules *Mytilus edulis* récoltées sur les côtes françaises : microanalyse par spectrographie des rayons X et par émission ionique secondaire, *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 298, 20, 567-572.
- Chassard-Bouchaud C., Escaig F., Hallegot P., 1984 *a*. Analyse ionique et environnement. Application à la détection des isotopes stables et radioactifs chez les organismes marins. *J.*

- Microsc. Spectr. Electron.*, 9, 481-498.
- Chassard-Bouchaud C., Galle P., Escaig F., Miyawaki M., 1984 b. Bioaccumulation de lithium par les organismes marins des zones côtières européennes, américaines et asiatiques : étude microanalytique par émission ionique secondaire, *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 299, 18, 719-724.
- Chassard-Bouchaud C., Hallegot P., Meignan M., 1984 c. Thulium bioaccumulation by the shore crab *Carcinus maenas* collected from the French coasts of the Channel : a structural, ultrastructural and microanalytical study by secondary ion mass and X ray spectrometry, *J. Phys.*, 45, C2, 541-544.
- Chassard-Bouchaud C., Escaig F., Boumati P., Lancellin D., 1986 a. Bioaccumulation de thallium par les organismes marins, *Biol. Cell*, 57, 3a.
- Chassard-Bouchaud C., Fiala-Medioni A., Galle P., 1986 b. Étude microanalytique de *Bathymodiolus* sp. (mollusque lamellibranche mytilidae) provenant des sources hydrothermales de la ride du Pacifique oriental : données préliminaires, *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 302, 4, 117-124.
- Chassard-Bouchaud C., Fiala-Médioni A., Boumati P., Escaig F., Kleinbauer F., Brissard J., Galle P., 1988. *Calyptogena phaseoliformis* (mollusque bivalve) indicateur biologique des phénomènes géochimiques associés aux zones de subduction situées au large du Japon, *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 306, 7, 237-244.
- Childress J.J., Mickel T.J., 1982. Oxygen and sulfide consumption rates of the vent clam *Calyptogena pacifica*, *Mar. Biol. Lett.*, 3, 73-79.
- Corliss J.B., Drymond J., Gordon L.I., Edmond J.M., von Herzen R.P., Ballard R.D., Green K., Williams D., Bainbridge A., Crane K., von Andel T.H., 1979. Submarine hydrothermal vents on the Galapagos Rift, *Science*, 203, 1073-1083.
- Cosson-Mannevy M.A., Cosson R., Gaill F., 1986. Mise en évidence de protéines de type métallothionéine chez deux invertébrés des sources hydrothermales, le pogonophore vestimentifère *Riftia pachyptila* et l'annélide polychète *Alvinella pompejana*, *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 302, 9, 347-352.
- Cronan D.S., 1976, *Manganese nodules and other ferromanganese oxide deposits*, edited by J.P. Riley, and R. Chester, Chemical Oceanography, Academic Press, London, New-York, 5, 217-263.
- Delhaye M., Merlin J.C., 1975. Introduction à la spectroscopie Raman : méthodes physiques en biologie, *Biochimie*, 57, 401-415.
- Desbruyères D., Laubier L., 1980. *Alvinella pompejana* gen. sp. nov. ampharetidae aberrant des sources hydrothermales de la ride Est Pacifique, *Oceanol. Acta*, 3, 3, 267-274.
- Desbruyères D., Gaill F., Laubier L., Prieur D., Rau G.H., 1983. Unusual nutrition of the "Pompei worm" *Alvinella pompejana* (Polychaetous Annelid) from a hydrothermal vent environment : SEM, TEM, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N evidence, *Mar. Biol.*, 75, 201-205.
- Fiala-Medioni A., 1984. Mise en évidence par microscopie électronique à transmission de l'abondance de bactéries symbiotiques dans la branchie de mollusques bivalves de sources hydrothermales profondes, *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 298, 487-492.
- Fiala-Medioni A., Metivier C., Herry A., Le Pennec M., 1986. Ultrastructure of the gill of the hydrothermal vent Mytilid *Bathymodiolus* sp., *Mar. Biol.*, 92, 65-72.
- Fouquet Y., 1985. Les sulfures polymétalliques de <sup>13</sup>N sur la ride du Pacifique Est : comparaison avec d'autres dépôts de l'Océan Pacifique oriental, *Les sources hydrothermales de la ride du Pacifique oriental, Colloque IFREMER, Paris*.
- Gaill F., Halpern S., Quintana C., Desbruyères D., 1984. Présence intracellulaire de As et Zn associés à S chez un polychète des sources hydrothermales (*Alvinella pompejana*), *C.R. Acad. Sci. Paris, sér. III*, 298, 331-336.
- Galle P., 1984. Tissue microlocalization of isotopes by ion microscopy and by microautoradiography, in : *Secondary Ion Mass Spectrometry, IV*, edited by Benninghoven *et al.*, Springer Verlag, Berlin, 495-497.
- Galle P., 1985. La microscopie ionique analytique des tissus biologiques, *Ann. Phys. Paris*, 10, 287-305.
- Jeanguillaume C., Berry J.P., Colliex C., Galle P., Tence M., Trebbia P., 1983. Recent results in EELS elemental mapping of thin biological sections, *J. Phys.*, 45, C2, 577-580.
- Kenk J.D., Wilson B.R., 1985. A new mussel (Bivalvia Mytilidae) from hydrothermal vent in the Galapagos Rift zone, *Malacologia*, 26, 253-271.
- Laubier L., Desbruyères D., 1984. Les oasis du fond des océans, *La Recherche*, 161, 15, 1506-1518.
- Laubier L., Desbruyères D., Chassard-Bouchaud C., 1983. Microanalytical evidence of sulfur accumulation in a Polychaete from deep-sea hydrothermal vents, *Mar. Biol. Lett.*, 4, 113-116.
- Le Pennec M., Hily A., 1984. Anatomie, structure et ultrastructure de la branchie d'un mytilidae des sites hydrothermaux du Pacifique oriental, *Oceanol. Acta*, 7, 4, 517-523.
- Metson J.B., Bancroft G.M., Mc Intyre N.S., Chauvin W.J., 1984. Molecular ion suppression in the secondary ion mass spectra of minerals, in : *Secondary Ion Mass Spectrometry, IV*, edited by Benninghoven *et al.*, Springer Verlag, Berlin, 466-468.
- Mickel T.J., Childress J.J., 1982. Effects of temperature, pressure and oxygen consumption rate of the hydrothermal vent crab *Bythograea thermydion* (brachyura), *Physiol. Zool.*, 55, 199-207.
- Roesijadi G., Crecelius E.A., 1984. Elemental composition of the hydrothermal vent clam *Calyptogena magnifica* from the East Pacific Rise, *Mar. Biol.*, 83, 155-161.
- Ünsal M., 1984. Accumulation and loss of tin by the Mussel, *Oceanol. Acta*, 7, 4, 493-498.
- Valette-Silver J.N., Bates A., Anderson D., Deming J., Zoller W.H., 1985. Uranium enrichments in smoker material collected from the East Pacific Rise, American Geophysical Union Abstract EOS.
- Vovelle J., Gaill F., 1986. Données morphologiques, histo-chimiques et microanalytiques sur l'élaboration du tube organominéral d'*Alvinella pompejana*, polychète des sources hydrothermales et leurs implications phylogénétiques, *Zool. Scripta*, 15, 1, 33-43.
- Vovelle J., Grasset M., Truchet M., 1983. Composés halogénés et éléments minéraux impliqués dans la consolidation des soies chez *Petta pusilla* Malmgren, polychète amphictenidae, *Cah. Biol. Mar.*, 24, 309-325.