

INTERET DE LA MICROSCOPIE ANALYTIQUE POUR L'ETUDE D'IMPACT DE METAUX TRACES ET DE TERRES RARES SUR LE MILIEU VIVANT, APPLICATION A L'ETUDE D'UNE ZONE POLLUEE: LA BAIE DE SEINE.

CHASSARD-BOUCHAUD C.\*, \*\*, NOEL P.\*, HUBERT M.\*, HALLEGOT P.\*\*.

Les organismes vivant dans la baie de Seine, où se déversent les eaux d'un bassin fluvial important, drainant de nombreux agents toxiques d'origine industrielle (en particulier phosphogypses et  $TiO_2$ ), agricole et urbaine, subissent une contamination permanente dont l'impact est actuellement peu ou mal connu. Pour déterminer les éléments bioaccumulés par les animaux, on utilise généralement des méthodes d'analyse globale qui nécessitent de longs temps d'investigation et des quantités de matériel biologique d'autant plus importantes que l'élément recherché n'existe qu'à l'état de traces. En outre, les résultats ne renseignent pas sur le métabolisme minéral propre à chaque espèce (simplement adsorption ou absorption, stockage, excrétion et détoxification) et diffèrent selon les éléments.

Pour détecter et visualiser les éléments et en connaître le métabolisme, seules les méthodes de microanalyse ponctuelle, ne nécessitant que peu de matériel, permettent de répondre, rapidement et sans ambiguïté, aux questions posées. Les analyses se font "*in situ*" sur coupe fine ou ultrafine à l'aide de microanalyseurs associés à un microscope photonique ou électronique; on peut ainsi déterminer l'organe, le tissu, la cellule ou l'organite cible de bioaccumulation.

## 1. MODELES BIOLOGIQUES ET METHODES

### 1.1. Modèles biologiques :

Ils sont constitués par les Invertébrés benthiques choisis pour l'ensemble du programme, comme organismes indicateurs faisant l'objet d'un suivi écologique :

Crustacés Décapodes : *Crangon crangon* (crevette grise), prédateur et omnivore, vivant dans le sable.

Mollusques lamellibranches : *Mytilus edulis*, filtreur, vivant en faciès essentiellement rocheux. *Abra alba* et *Cultellus pellucidus*, filtreurs et vivant dans les sédiments.

Annélides polychètes : *Owenia fusiformis*, lécheur et filtreur, vivant dans les sédiments. Ces trois dernières espèces ont été prélevées au point "A" très envasé et au point "E", plus proche de l'estuaire, très perturbé et appauvri du point de vue faunistique puisque on y assiste à la disparition totale de certaines espèces (Gentil *et al.*, 1985). En outre, des *Mytilus sp.* ont été récoltées en d'autres stations des côtes de France pour comparer leur contamination avec celle de la baie de Seine.

\* Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes marins. Université P. et M. Curie, 4, Place Jussieu, 75230 PARIS CEDEX 05.

\*\* Centre de Microanalyse appliquée à la Biologie, Laboratoire de Biophysique de la Faculté de Médecine, 6, rue du Gl. Sarrail, 94000 CRETEIL.

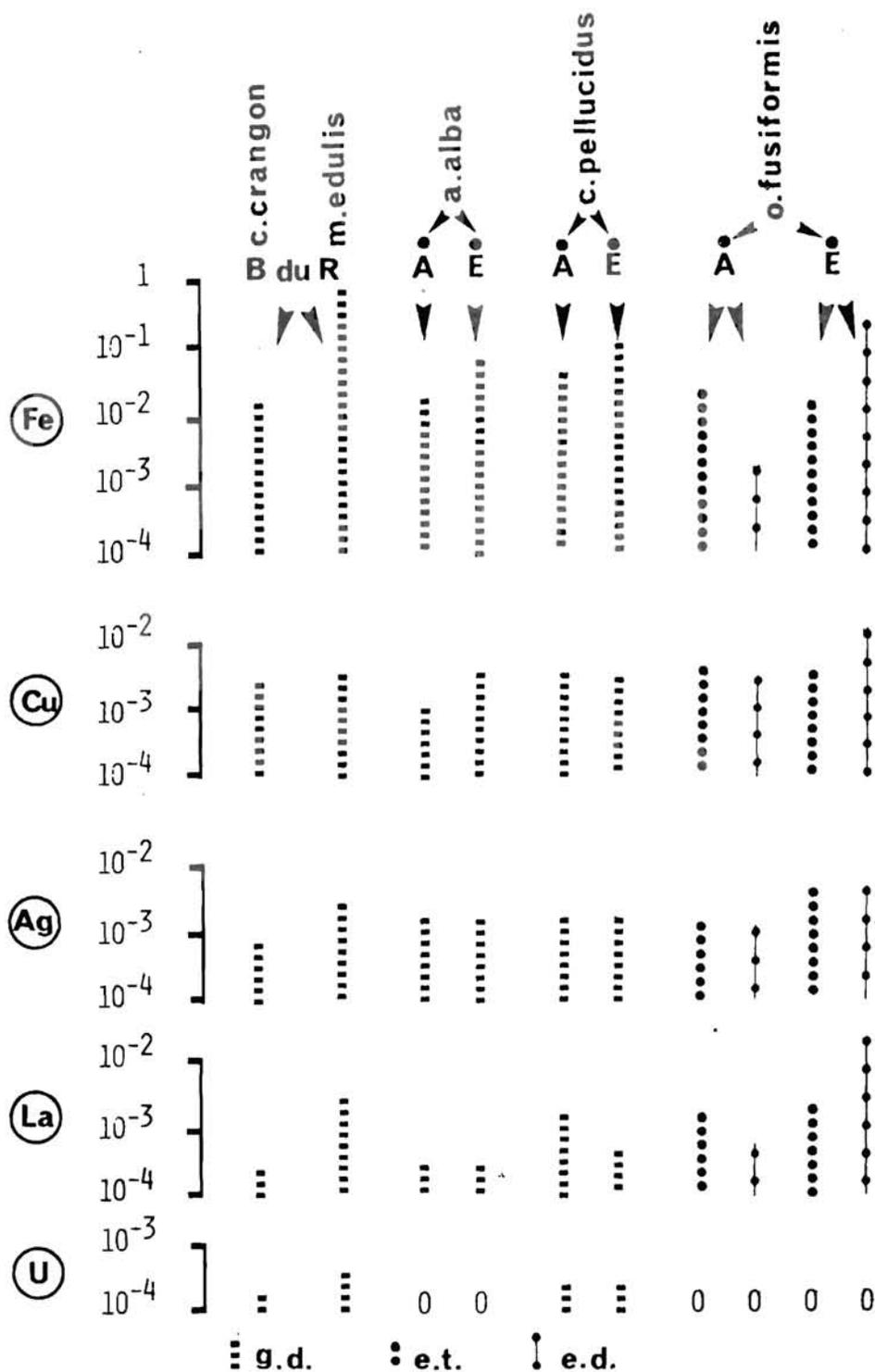


Figure 1.- Intensités d'émission ionique des différents éléments, normalisées au calcium et mesurées sur des organismes provenant du Banc de Ratier (B du R) ainsi que des points A et E de la baie de Seine. g.d. : glande digestive, e.t. : epithelium tégumentaire, e.d. : epithelium digestif.

## 1.2. Méthodes. (tableau 1).

Les échantillons subissent soit une fixation chimique (mélange de Carnoy ou glutaraldéhyde), soit une cryofixation (qui donne des résultats analogues). Les coupes sont déposées sur terphane ou sur grille pour la microanalyse X, sur lame d'or pour l'analyse ionique. La microanalyse X est effectuée sur MS 46 et sur CAMEBAX (Cameca), l'analyse ionique est effectuée sur SMI 300 (Cameca) équipé d'un secteur électrostatique. Parmi les possibilités offertes par la microscopie analytique on doit signaler notamment la grande sensibilité, de l'ordre de la ppm pour la microanalyse X et de l'ordre de la ppb pour la microanalyse ionique, qui permet en outre d'obtenir des images de répartition des isotopes de tous les éléments de la classification périodique.

Microanalyse par	Système d'analyse	Visualisation de la coupe	Obtention d'images analytiques	Eléments Analysables	Sensibilité	Plus petit volume Analysable
Microsonde Electronique (Castaing, 1951).	Spectrométrie des rayons X	Microscope optique ou Microscope Electronique à transmission à balayage.	OUI par balayage uniquement	Eléments de n° atomique > 4	De l'ordre de $10^{-17}$ g pour les éléments de n° atomique > 10	Diamètre : 0,05 $\mu$ m
Emission Ionique Secondaire (Castaing et Slodzian, 1962)	Spectrométrie de Masse	Optique Ionique ou Balayage par sonde ionique	OUI	Tous les éléments avec distinction entre les isotopes stables ou radioactifs d'un même élément.	Atteint $10^{-20}$ g pour un grand nombre d'éléments.	Diamètre : 0,05 $\mu$ m

Tableau 1.- Principales caractéristiques des méthodes de microanalyse.

## 2. RESULTATS. (\*)

### 2.1. Baie de Seine.

Les éléments suivants ont été détectés : Li, F, Al, Ti, Cr, Mn, Fe, Cu, Sr, Ag, Cd, Cs, Ba, les trois lanthanides : La, Ce, et Tm ainsi que Tl, Pb et U. Pour chaque espèce, nous avons pu déterminer les sites électifs d'accumulation, différents selon l'élément considéré. Par exemple, les lanthanides et actinides se concentrent essentiellement dans la glande digestive et dans les tissus squelettiques; ainsi, les Crustacés se détoxiquent en rejetant leur exosquelette à chaque mue.

Dans la multiplicité des résultats obtenus, nous avons choisi d'exposer, au cours de ce Colloque "Baie de Seine", les résultats convergents obtenus sur les éléments qui ont retenu notre attention et celle des participants des thèmes "Chimie des Eaux et des Sédiments" et "Dynamique des suspensions et des dépôts".

La figure 1 résume les résultats relatifs à Fe, Cu, Ag, La et U qui sont les suivants :

\* Recherches effectuées avec le support financier du CNRS et de l'INSERM (SC 27) et avec la collaboration scientifique et technique de D. Calmet, F. Escaig et P. Boumati.

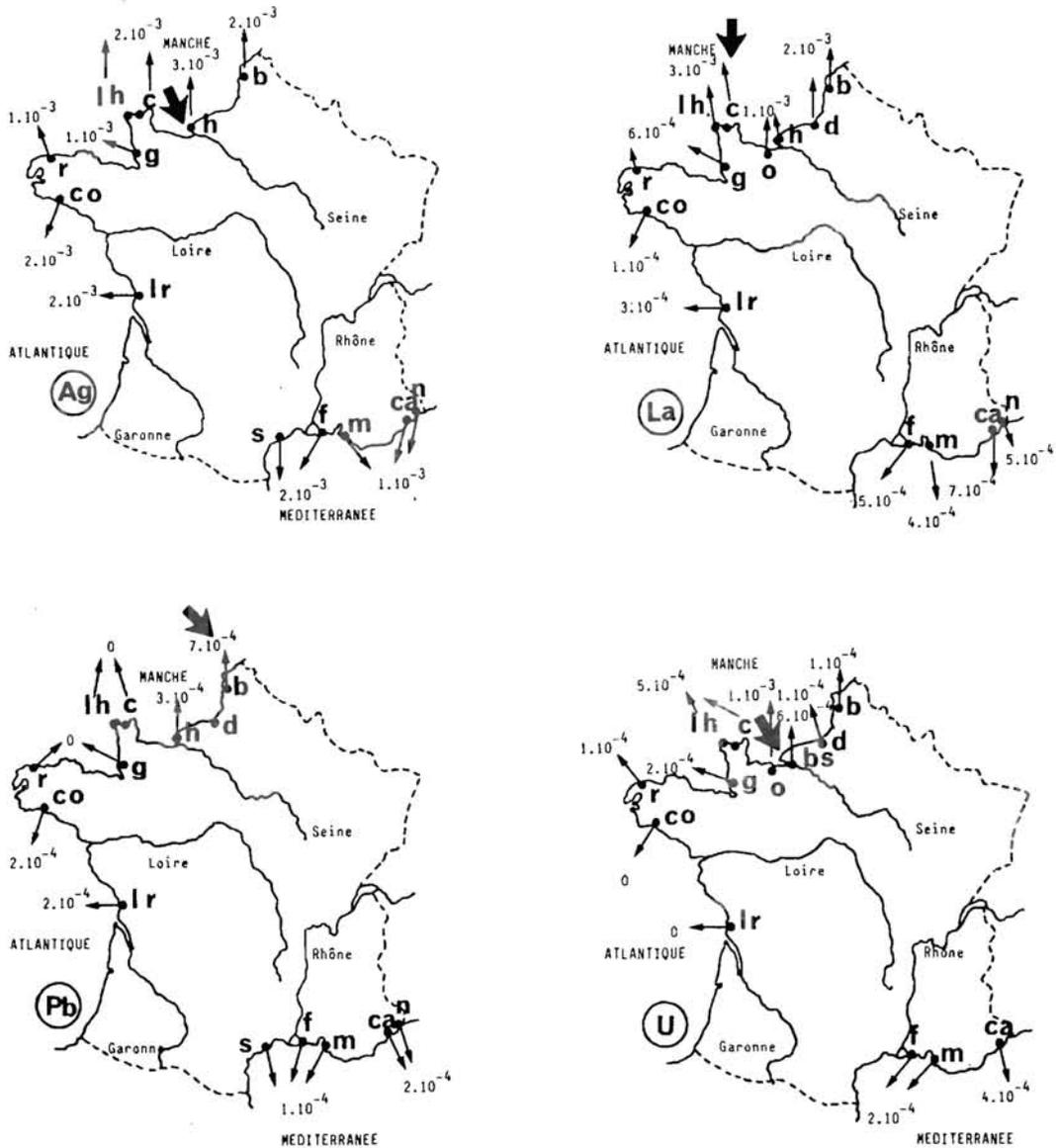


Figure 2.- Répartition géographique de la contamination de *Mytilus sp.* par l'argent (Ag), le plomb (Pb), le lanthane (La) et l'uranium (U). Résultats obtenus sur la glande digestive par émission ionique secondaire. Les intensités d'émission de chaque élément sont normalisées au calcium.

On remarque que les sites les plus contaminés (grosses flèches) par chaque métal sont les suivants :

Ag et U : Baie de Seine; La: zone comprise entre la côte Nord du Cotentin et le Pas de Calais; Pb: Le Pas de Calais.

b: Boulogne, b s: Baie de Seine, c: Cherbourg, ca: Cannes, co: Concarneau, d: Dieppe, f: Fos, g: Granville, h: Le Havre, l h: La Hague, l r: La Rochelle, m: Marseille, n: Nice, o: Ouistreham, r: Roscoff, s: Sète.

Fer : les plus hautes valeurs sont détectées chez *Mytilus edulis*. Chez les autres espèces, les teneurs sont toujours plus élevées au point "E" qu'au point "A".

Cuivre : résultats analogues à ceux obtenus pour le fer.

Argent : il montre des valeurs équivalentes aux deux points sauf pour *Owenia fusiformis* dont les teneurs relatives sont plus élevées au point "E".

Lanthane : résultats analogues à ceux obtenus pour l'argent.

Uranium : il est détecté chez *Crangon crangon*, *Mytilus edulis* et *Cultellus pellucidus* uniquement.

Des images ioniques (fig. 3) visualisent la localisation de certains des éléments précités, en microscopie photonique; en microscopie électronique on démontre, grâce à la microsonde X, que lysosomes et sphérocristaux sont les principaux organites cibles de concentration des métaux qui, associés au phosphore, se présentent sous forme de phosphates. (Fig. 3).

## 2.2. Eaux côtières de la Manche, de l'Atlantique et de la Méditerranée (fig.2).

Les résultats concernent *Mytilus sp.* (glande digestive).

Argent : les plus hautes valeurs se situent en Baie de Seine, mais les moules de toutes les eaux côtières françaises sont contaminées par ce métal.

Plomb : les plus hautes valeurs se situent dans la région du Pas-de-Calais et décroissent en Baie de Seine; elles sont en dessous du seuil de détection au large du Cotentin et du Finistère Nord mais notables sur l'Atlantique et la Méditerranée.

Lanthane : les valeurs sont dix fois plus élevées dans la zone comprise entre le Nord du Cotentin et le Pas-de-Calais, que dans les autres eaux côtières.

Uranium : les valeurs les plus hautes sont détectées en Baie de Seine; le métal est aussi présent dans les moules en Méditerranée, mais n'a pas été mis en évidence dans les échantillons de l'Atlantique.

## 3. DISCUSSION ET CONCLUSION

D'une façon générale, les bioaccumulations métalliques sont plus importantes au point "E", proche de l'estuaire, zone plus perturbée qu'au point "A". Ces faits pourraient expliquer en partie, d'une part l'appauvrissement faunistique constaté (Gentil *et al.*, 1985) et d'autre part l'observation d'indices biochimiques annonçant l'approche de conditions léthales (Batrel *et al.*, 1985).

En ce qui concerne le lanthane, nous avons mis en évidence sa bioaccumulation dans les moules (Chassard-Bouchaud et Hallégot, 1984) avec des teneurs en Baie de Seine plus élevées qu'à l'embouchure du Rhône : faits en accord avec les valeurs citées par Guéguéniat (1984). En outre, selon ce même auteur (Guéguéniat *et al.*, 1985a), si l'on compare la Seine à l'échelle mondiale, à d'autres grands fleuves, seule la Seine paraîtrait totalement perturbée (rapports La/Sc). L'intérêt de l'étude des terres rares, et notamment du lanthane, réside dans le fait que les lanthanides sont les homologues des transuraniens : l'étude du lanthane permettrait de prévoir le comportement à long terme de l'americium, plutonium, etc...

L'argent, très toxique pour les animaux marins, présent dans les suspensions, serait un des éléments les plus caractéristiques et les plus préoccupants de la pollution en Baie de Seine, au même titre que le cadmium (Guéguéniat *et al.*, 1985a). Rappelons que l'argent contamine aussi les autres eaux côtières françaises (Chassard-Bouchaud, Galle et Escaig, 1985).

Le fer, présent dans les sédiments, les suspensions et les eaux, proviendrait d'apports estuariens se superposant à un apport amont; la question qui se pose est celle de l'éventuelle responsabilité des rejets industriels, dans l'apport de ce métal, qui retient actuellement l'attention des géochimistes (Guéguéniat *et al.*, 1985b) et dans l'apport de nombreux autres métaux

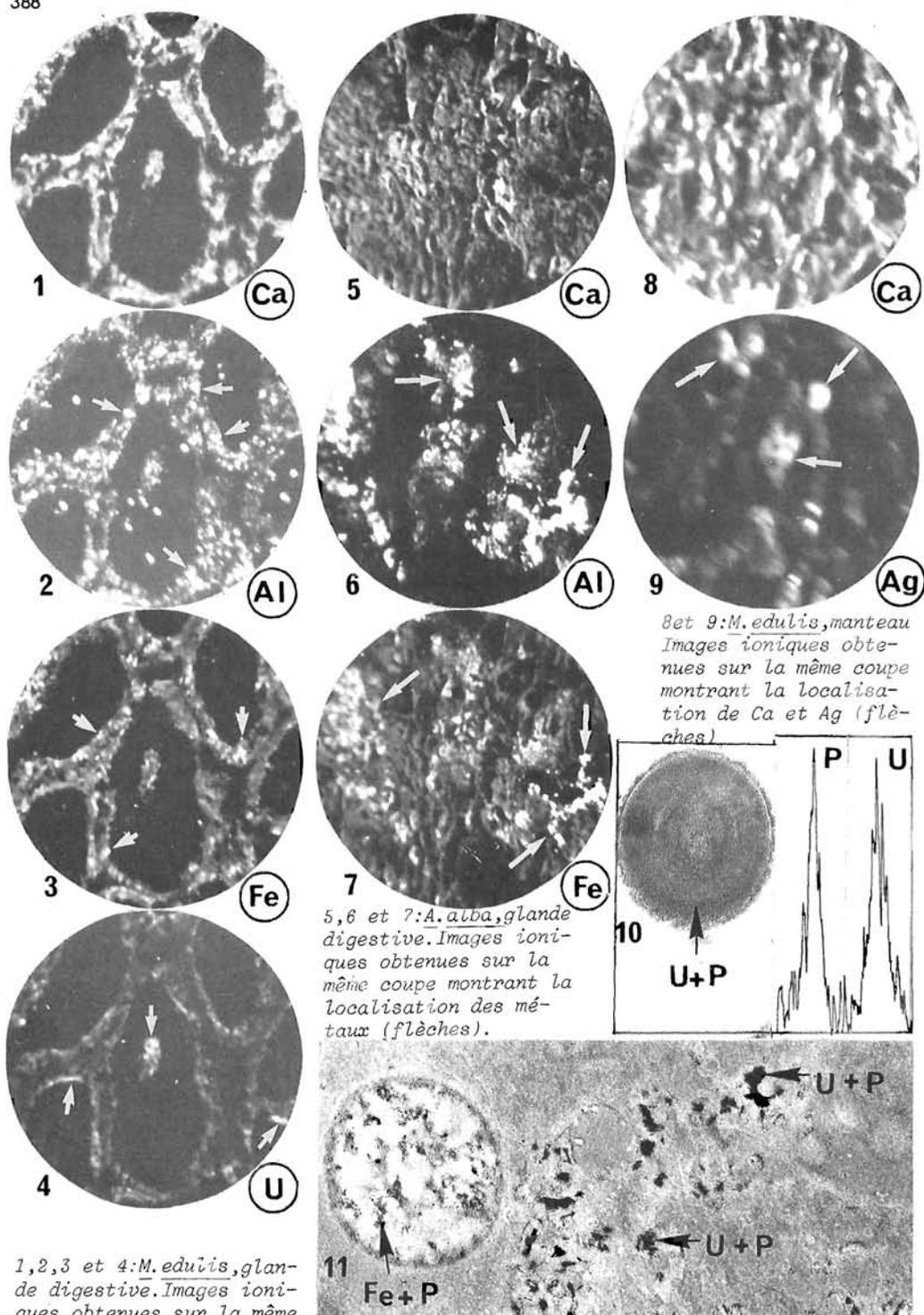


Fig. 3. Micrographies ioniques et électroniques.

en période de crue (Avoine, 1985). L'uranium détecté dans le plancton de la baie de Seine (Guéguéniat, 1984), contamine aussi les moules (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1983) et les crabes : le transfert du métal dans les maillons des chaînes alimentaires a été observé (Chassard-Bouchaud, 1983).

Nombreux sont encore les problèmes à aborder : citons par exemple celui de l'or dont les valeurs en Baie de Seine (275 ppb en crue) dépassent celles avancées pour les grands fleuves mondiaux (Guéguéniat, 1984). En outre, grâce aux meilleures performances techniques d'appareils de nouvelle génération, tels que l'analyseur ionique IMS 3F (Cameca), il sera possible d'apporter encore de meilleures réponses aux questions posées. Enfin, la numérisation et le traitement informatique des images en microscopie ionique (Cavellier *et al.*, 1985), devrait permettre, sur des surfaces de l'ordre du  $\mu\text{m}$ , d'aborder la microanalyse quantitative locale à l'échelle cellulaire.

---

AVOINE J. (1985).- Evaluation des apports fluviaux dans l'estuaire de la Seine. Ce volume, N° 9.

CASTAING R. (1951).- Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique. Thèse de Doctorat à l'Etat. ONERA éd. Paris.

CASTAING R. & SLODZIAN G. (1962).- Microanalyse par émission ionique secondaire. J. de Microscopie, 1, p. 395-410.

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. of the Cell, 53, p. 19a.

CHASSARD-BOUCHAUD C. (1983).- Cellular and subcellular localization of uranium in the Crab *Carcinus maenas* : a microanalytical study. Mar. Poll. Bull. 14, 4, p. 133-136.

CHASSARD-BOUCHAUD C., CALMET D., ESCAIG F. & KLEINBAUER F. (1983).- Bioaccumulation d'uranium par des moules *Mytilus edulis* récoltées sur les côtes françaises de la Manche et contamination expérimentale. C. R. Acad. Sc. Paris, 296, III, p. 1095-1100

CHASSARD-BOUCHAUD C., GALLE P. & ESCAIG F. (1985).- Mise en évidence d'une contamination par l'argent et le plomb de l'huître *Crassostrea gigas* et de la moule *Mytilus edulis* dans les eaux côtières françaises. Etude microanalytique par émission ionique secondaire. C.R. Acad. Sc. Paris, 300, III, p. 3-8;

CHASSARD-BOUCHAUD C. & HALLEGOT P. (1984).- Bioaccumulation de lanthane par des moules *Mytilus edulis* récoltées sur les côtes françaises. C.R. Acad. Sc. Paris, 298, 3, p. 567-572.

GENTIL F., IRLINGER J.P., ELKAIM B. & PRONIEWSKI F. (1985).- Première données sur la dynamique du peuplement macrobenthique des sables fins envasés à *Abrax alba* de la Baie de Seine orientale. Ce volume, N° 35.

GUEGUENIAT P. (1984).- GRECO MANCHE, rapport d'activité n° 3, p. 61-84.

GUEGUENIAT P., BOUST D., HEMON G., PHILIPPOT J.C., LAGARDE G. & HEITZ C. (1985).- Distribution de 40 éléments à l'état de traces dans les suspensions de la Seine. Utilisation du lanthane pour étudier les processus sédimentaires dans l'estuaire et dans la baie. Ce volume, N° 25.

- GUEGUENIAT P., BOUST D., GANDON P., HEMON G., PHILIPPOT J.C., SANCHEZ J.P., MARIN P. & PIERI J. (1985).- Etude du comportement géochimique du fer dans l'estuaire de la Seine. Ce volume, N° 29.
- SYLVESTRE C., BATREL Y. & LE GAL Y. (1985).- La détection des effets subléthaux des pollutions. Utilisation *in situ* d'un indice biochimique, la charge énergétique. Ce volume, N° 32.