

ETUDE DE LA CONTAMINATION DE *CARCINUS MAENAS* (L.) PAR LE FER 59 (1)

par J. L. M. MARTIN*

I - INTRODUCTION :

Le fer est un métal présent dans tous les organismes vivants (Granick, 1958). Il intervient dans des processus enzymatiques, c'est le cas pour la plupart des enzymes de la famille des oxygénases. Il peut également être un constituant des molécules enzymatiques mêmes, et plus particulièrement de celles intervenant dans les transferts d'oxygène, telles que dans la cytochrome oxydase (cytochrome C : oxydoréductase). Dans le règne animal, le fer est en outre un constituant de nombreux pigments parmi lesquels l'hémoglobine chez les vertébrés. Le fer est donc un métal qui potentiellement peut être accumulé par tous les organismes vivants.

^{59}Fe et ^{55}Fe sont parmi les radionucléides les plus importants obtenus par activation (Polikarpov, 1966). Les rejets éventuels de radionucléides dans le milieu environnant, et pour ce qui nous concerne, dans le milieu marin, posent le délicat problème de leur devenir et surtout de leur accumulation par les organismes marins. Ces derniers posséderont des pouvoirs de concentrations variables, liés à l'espèce et à l'élément considérés, mais également, pour un même organisme et un même élément, au métabolisme de l'élément. Par suite, son absorption et son accumulation, dépendront de son comportement physico-chimique dans le milieu marin. En effet, il a été

(1) Contribution n° 450 du Département Scientifique du Centre Océanologique de Bretagne.

* Centre Océanologique de Bretagne - B.P. 337 - 29273 BREST CEDEX, France et Laboratoire de Radioécologie Marine - C.E.A./CHERBOURG, France.

montré (Lowman, 1963) que le rôle du fer en écologie est dépendant de ses caractéristiques physiques et chimiques, et de la demande biologique de cet élément.

Pour tenter d'apporter des éléments de réponse à ces différents problèmes, nous avons observé, d'une part, le comportement du fer en milieu marin expérimental, et, d'autre part, la cinétique d'accumulation de deux formes de ce métal, soluble ou particulaire, par un crustacé décapode, ce dernier point nous permettant de déterminer les formes du fer préférentiellement absorbées par l'animal.

II - MATERIEL ET TECHNIQUES :

Notre étude a été effectuée à l'aide du fer 59 (^{59}Fe). Ce radionucléide dont la période est de 45 jours émet un rayonnement de type γ et de ce fait, est plus facile à doser que ^{55}Fe .

Deux lots de crabes de l'espèce *Carcinus maenas* (L), originaires des côtes du Cotentin, au stade C4 du cycle d'intermue, sont placés dans deux aquariums identiques contenant un même volume d'eau, soit 50 litres. Ces deux aquariums sont contaminés à raison de 12,5 μCi par litre d'eau à l'aide de chlorure de fer 59 ($^{59}\text{Fe Cl}_3$) en solution HCl. Dans le premier bac, le contaminant est ajouté sous sa forme initiale. Dans le deuxième, le ^{59}Fe a été auparavant complexé à l'aide de EDTA (acide éthylènediaminetetraacétique), à raison de 10 unités molaires de EDTA pour une unité de fer contenu dans la solution contaminante. Le ^{59}Fe a été maintenu au contact de l'EDTA pendant 24 heures avant l'introduction de la solution contaminante dans l'aquarium expérimental.

La détermination des formes physico-chimiques du ^{59}Fe introduit dans les milieux expérimentaux a été effectuée en utilisant la technique de chromatographie par échange d'ions. L'échangeur d'ions que nous avons utilisé est une résine cationique de type haut polymère synthétique organique : résine DOWEX 50 - X8 (100-200 mesh) préalablement traitée par passage continu d'eau de mer jusqu'à saturation des sites par rapport à l'ensemble des cations de l'eau de mer. Après fixation de la solution de ^{59}Fe au sommet de la colonne, le développement est assuré par passage d'eau de mer par fractions de 5 ml. Cette méthode, décrite par Marchand (1974), présente l'avantage de permettre simultanément, d'une part, la séparation des formes solubles et insolubles, et d'autre part, le fractionnement des formes ioniques.

Les mesures de l'activité des différents tissus, des crabes entiers, de l'eau de mer et des différents composants séparés sur résine ont été effectuées à l'aide d'un analyseur multicanaux (Intertechnique, type Didac 800) équipé d'un détecteur à cristal - puits standard (44 x 51 mm), Na I activé au thallium. Dans tous les cas, les niveaux sont exprimés en impulsion par minute et par gramme frais d'échantillon (i/mm/g).

III - RESULTATS :

1 - EVOLUTION DES FORMES PHYSICO-CHIMIQUES DU FER 59 DANS L'EAU DE MER :

La fraction de ^{59}Fe soluble, recueillie par élution au bas de la colonne échangeuse d'ions, peut être composée de deux fractions différentes :

- Une fraction anionique ou neutre qui, ne participant pas aux échanges d'ions sur la résine cationique, est immédiatement éluée au cours des 5 à 15 premiers ml du développement par l'eau de mer ;

- Une fraction cationique qui participe aux échanges. Le développement par élution forcera les cations de l'élément à migrer par entraînement au fur et à mesure de l'écoulement de la solution éluante et d'échanges en cascades entre l'éluant et la résine. Le développement de la partie cationique s'effectue donc, lorsqu'elle existe, beaucoup plus tardivement que la partie anionique.

Les formes colloïdales ou particulières sont, pour leur part, fixées irréversiblement sur la résine au cours du développement par l'eau de mer, la masse électrolytique de celle-ci agissant comme un agent coagulant vis-à-vis des substances colloïdales (Marchand, 1974).

La figure 1 présente la variation d'activité des différentes fractions de 5 ml recueillies au bas de la colonne échangeuse d'ions. Nous pouvons constater que cette courbe présente un aspect unimodal. En outre, après passage de 15 ml d'eau de mer, plus de 99 % de l'activité présentée par le ^{59}Fe soluble ont été recueillis. Cette activité, apparaissant dans les trois premières fractions éluantes est redevable des formes solubles anioniques ou neutres du ^{59}Fe . Par la suite, l'activité présentée par les différentes fractions est nulle, témoignant d'une absence totale de ^{59}Fe soluble cationique dans les bacs expérimentaux dans lesquels le ^{59}Fe a été

complexé ou non par l'EDTA. En effet, dans les deux cas, la courbe traduisant la variation d'activité au cours de l'élution par l'eau de mer est identique.

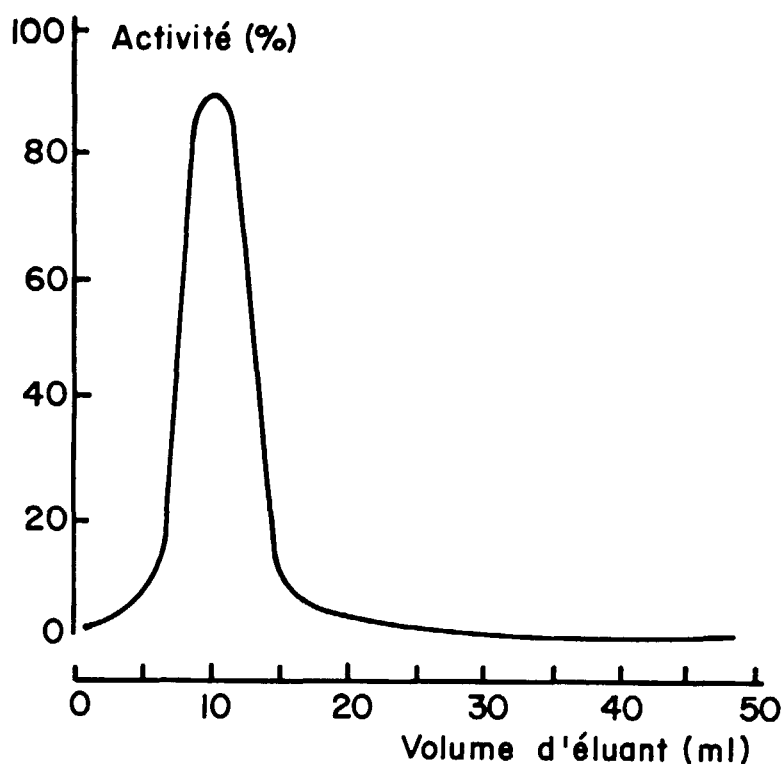


Fig. 1 - Elution du ^{59}Fe par l'eau de mer : variations du pourcentage d'activité représenté par chaque fraction de 5 ml d'éluant par rapport à l'activité totale du ^{59}Fe soluble.

La figure 2 montre l'évolution en fonction du temps du pourcentage des différentes formes solubles anioniques ou neutres et colloïdales ou particulaires dans les différents bacs expérimentaux. Les courbes présentées sont différentes selon que le métal, introduit dans les deux cas sous forme de $^{59}\text{FeCl}_3$, a été auparavant complexé ou non par l'EDTA. La courbe (1), représentative du ^{59}Fe complexé montre que celui-ci est en début d'expérience essentiellement sous forme soluble. Toutefois, en fonction du temps, la proportion de ^{59}Fe soluble décroît en faveur de formes insolubles. Après 26 jours d'expérimentation, les formes solubles ne représentent plus que 77 % environ du ^{59}Fe total contenu dans l'eau de mer. Le ^{59}Fe non complexé par l'EDTA (courbe 2) est, après une heure de contact avec l'eau de mer, essentiellement sous forme particulaire, car à peu près 80 % du ^{59}Fe est à ce moment retenu sur la résine. Le fer a été introduit sous forme de chlorure soluble.

Nous pouvons donc considérer qu'au contact de l'eau de mer, $^{59}\text{FeCl}_3$ soluble s'est transformé d'une façon quasi instantanée en colloïdes d'hydroxyde ferrique par des phénomènes d'hydrolyse et de polymérisation (Fraizier, 1974). Par la suite, le pourcentage de ^{59}Fe particulaire diminue en fonction du temps. Cette diminution des formes colloïdales ou particulaires en faveur des formes solubles anioniques ou neutres peut avoir pour origine la solubilisation de fer par certaines substances organiques contenues dans l'eau de mer (Marchand, 1972).

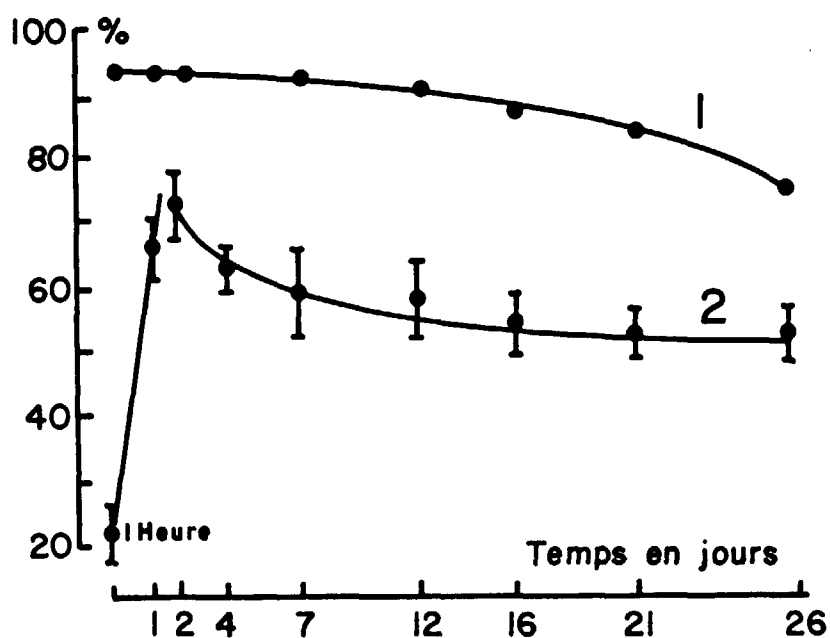


Fig. 2 - Evolution en fonction du temps des formes physico-chimiques du ^{59}Fe complexé (1) ou non complexé (2) par l'EDTA, dans les bacs expérimentaux. Les courbes témoignent de l'évolution du pourcentage du ^{59}Fe soluble ou neutre par rapport au ^{59}Fe total contenu dans l'eau.

2 - CONTAMINATION DE DIFFERENTS TISSUS DE *CARCINUS MAENAS* :

a) Contamination par une eau de mer contenant essentiellement des formes solubles anioniques ou neutres :

La figure 3 montre, en fonction du temps, la cinétique d'accumulation de ^{59}Fe dans les tissus et organes suivants : exosquelette, hépatopancréas, hypoderme, branchies, hémolymphe et muscles. La cinétique de contamination d'un animal entier, au stade C4 du cycle d'intermue, est également figurée.

Nous pouvons constater sur cette figure que la cinétique de contamination est sensiblement identique pour tous les tissus et organes étudiés. Dans tous les cas, le maximum d'activité, témoignant de l'accumulation du ^{59}Fe , est observé à la fin de l'expérience. Ces activités semblent être parvenues à un maximum dans la plupart des cas, au bout de 26 jours de contamination. Seulement, dans le cas de l'hépatopancréas, l'accumulation de ^{59}Fe semble devoir se poursuivre au-delà de 26 jours. Il est à noter que l'hémolymphe et les muscles sont les deux tissus qui sont les moins contaminés. Au bout de 26 jours d'expérimentation, les tissus et organes peuvent être classés, par ordre de contamination croissante de la façon suivante :

hémolymphe < muscles < hépatopancréas < hypoderme < exosquelette < branchies

Dans le cas de ce dernier organe, au bout de 26 jours, c'est-à-dire lorsque les activités de l'eau et de l'organe sont à peu près stabilisées, le facteur de concentration de ^{59}Fe , c'est-à-dire le quotient de l'activité spécifique du tissu par l'activité spécifique de l'eau de mer, est égal à 110.

b) Contamination par une eau de mer contenant en majorité des formes colloïdales ou particulaires :

Nous avons vu précédemment que l'évolution des formes physico-chimiques du ^{59}Fe dans l'eau de mer ne nous permettait pas d'obtenir des formes colloïdales ou particulaires d'où les formes solubles seraient exclues. En effet, si après une heure de contamination, 80 % du ^{59}Fe est sous forme colloïdale ou particulaire, après un jour, environ 70 % du ^{59}Fe contenu dans l'aquarium a été transformé en forme soluble.

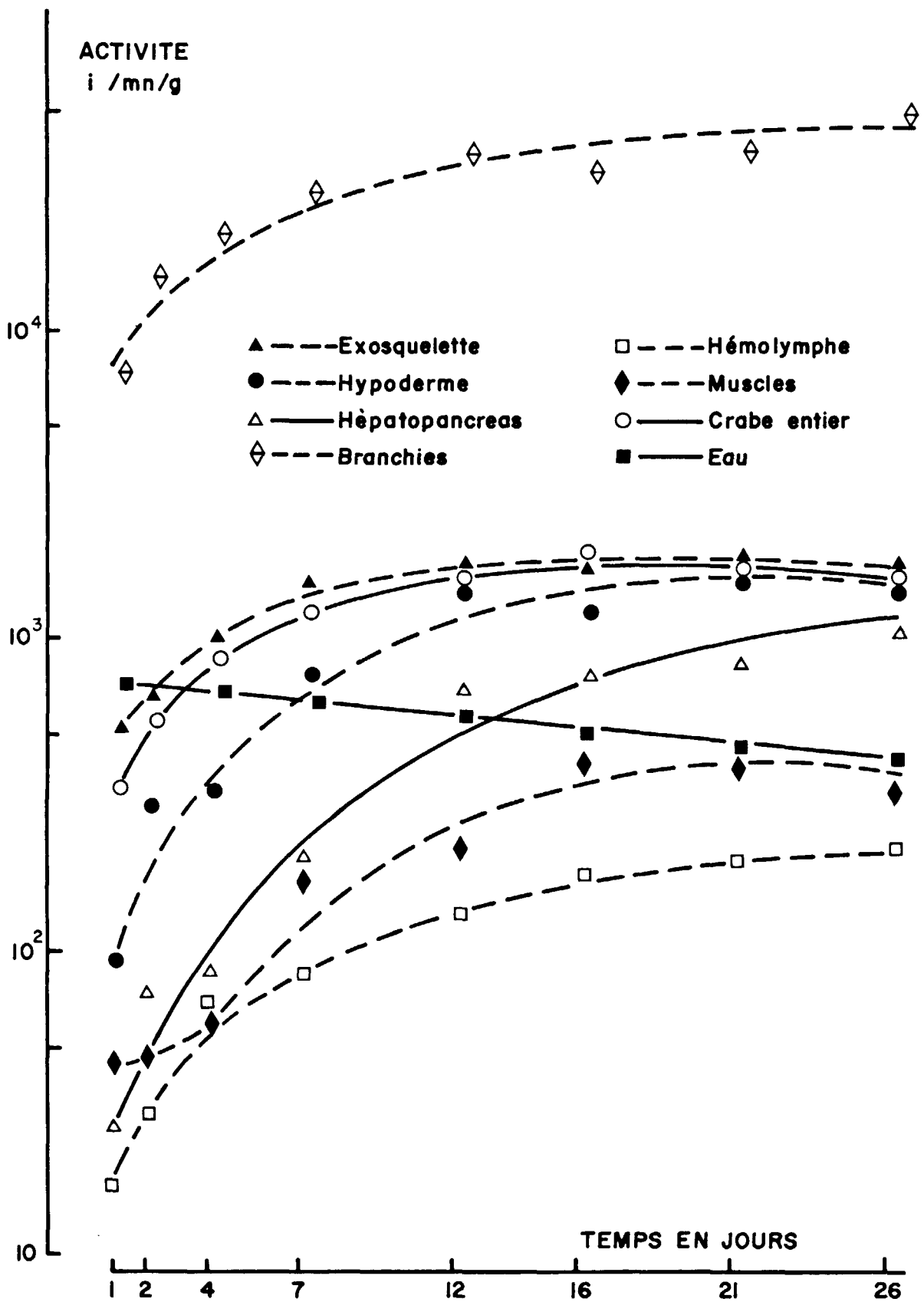


Fig. 3 - Contamination de différents tissus et organes de *Carcinus maenas* par du ^{59}Fe sous forme essentiellement soluble anionique ou neutre.

L'évolution de la contamination des différents organes est synthétisée sur la figure 4. Nous pouvons constater, contrairement à ce qui avait été observé pour des formes solubles de ^{59}Fe , que la cinétique de contamination n'est pas identique pour tous les organes. Parmi ces derniers, trois groupes peuvent être distingués :

- Les branchies et l'exosquelette pour lesquels la contamination est maximale dès le premier jour de contact avec l'eau de mer contaminée. Par la suite, l'activité présentée par ces deux tissus décroît. Pour ceux-ci, l'accumulation du ^{59}Fe s'est faite alors que les formes insolubles représentaient un pourcentage important (environ 80 %) de l'activité totale de l'eau. La diminution de l'activité des branchies et de l'exosquelette s'effectue en même temps que l'activité de l'eau diminue et que le pourcentage de la fraction ^{59}Fe particulaire se réduit en faveur des formes solubles anioniques ou neutres ;

- L'hypoderme et l'hépatopancréas : ces deux tissus présentent une activité qui croît au cours des quatre premiers jours de contamination, puis qui décroît par la suite ;

- L'hémolymphe et les muscles : dans ces deux tissus, la cinétique de contamination est identique à celle observée précédemment dans le cas des formes solubles du ^{59}Fe . Les activités présentées par ces deux tissus augmentent régulièrement, avant de se stabiliser à leur maximum.

Par ordre d'activité croissante, la classification des différents tissus peut, au bout de 26 jours de contamination, être établie comme suit :

hémolymphe < muscles < hépatopancréas << hypoderme < exosquelette < branchies

Cette classification est identique à celle précédemment établie. Après 26 jours de contamination, le facteur de concentration de ^{59}Fe dans la branchie est égal à 423.

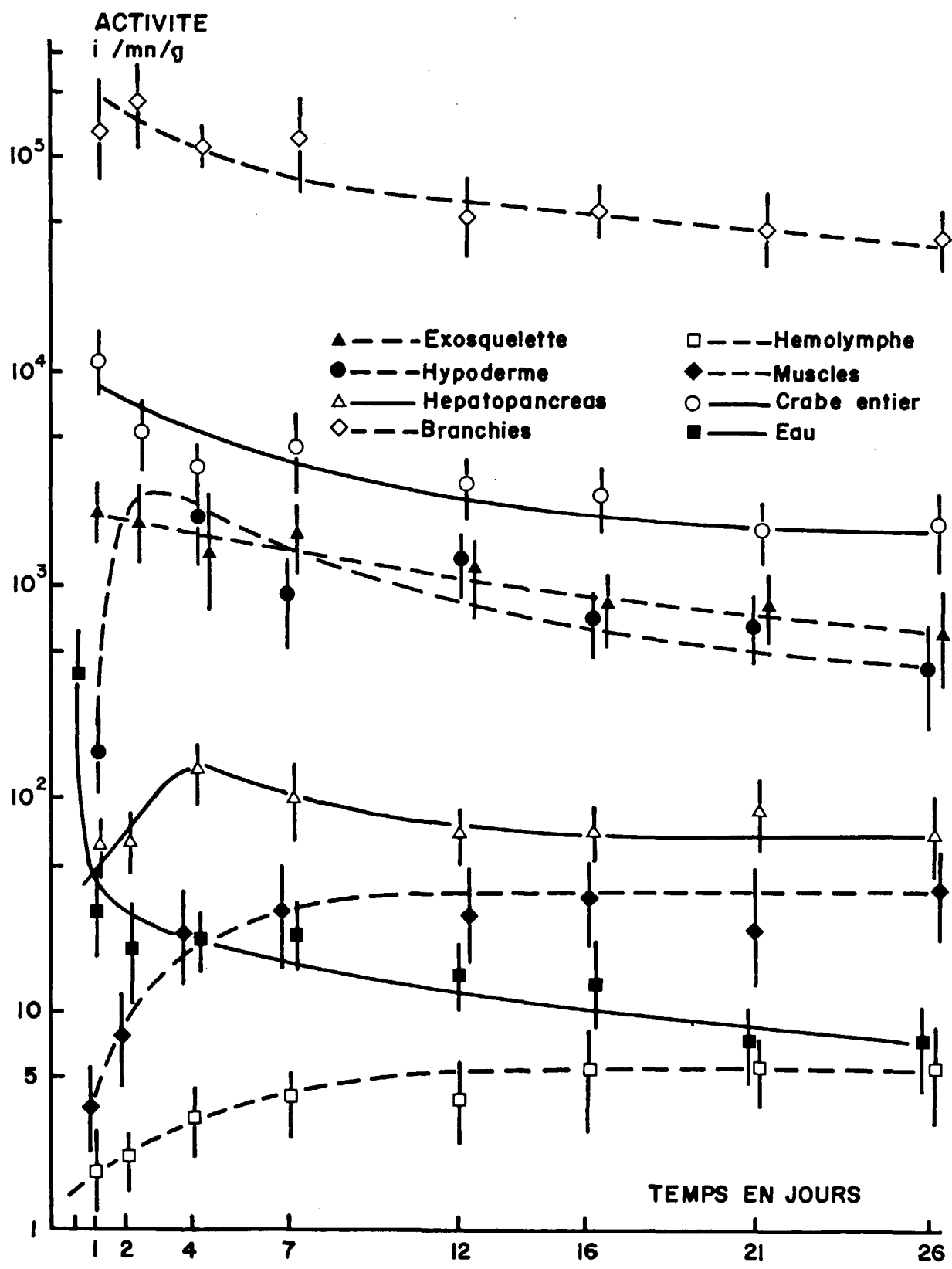


Fig. 4 - Contamination de différents tissus et organes de *Carcinus maenas* par du ⁵⁹Fe sous forme essentiellement colloïdale et particulaire.

IV - DISCUSSION :

L'étude de l'accumulation du ^{59}Fe a mis en évidence des différences d'accumulation dans les tissus selon que ce métal est complexé ou non par l'EDTA, et selon que les tissus sont en contact direct avec l'eau de mer ou non.

Lorsque le métal n'est pas complexé par l'EDTA, c'est-à-dire lorsqu'il est essentiellement sous forme colloïdale et particulaire, deux groupes de tissus et organes peuvent être considérés. D'une part, les tissus en contact direct avec l'eau de mer, branchies et exosquelette; d'autre part, les tissus internes, hépatopancréas, hémolymphe, muscles.

Pour les premiers, le maximum d'activité est observé en début d'expérimentation, alors que pour les tissus internes, l'activité croît régulièrement et est maximale en fin d'expérimentation. Dans le cas des branchies, le maximum d'accumulation est obtenu après un ou deux jours de contact de l'animal avec l'eau de mer. La décroissance de l'activité de l'organe observée par la suite semble due à la diminution très rapide de l'activité totale de l'eau. En effet, après un jour d'expérimentation, de 400 i/mm/g correspondant à l'activité de l'eau mesurée après une heure de contamination, celle-ci décroît jusqu'aux environs de 30 i/mm/g. Cette décroissance très rapide de l'activité de l'eau est due essentiellement à des phénomènes d'adsorption de ^{59}Fe sur les parois des bacs expérimentaux (Fraizier, 1974).

Le pouvoir d'adsorption de l'exosquelette semble également particulièrement important. En effet, ce tissu ne possède évidemment pas de pouvoir filtrant démontré dans le cas de la branchie (Martin, 1975). Chez *Carcinus maenas*, la surface externe du squelette tégumentaire est relativement uniforme et unie. Or, la contamination de ce tissu est, comme dans le cas de la branchie, maximale après un jour de contamination. Cette accumulation de ^{59}Fe ne peut se faire dans le cas de la carapace que par des phénomènes d'adsorption. Un phénomène identique a été observé dans le cas des coquilles de mollusques (Mc Cammon et al., 1969)

La diminution d'activité observée dans le cas de l'exosquelette et des branchies peut, outre la diminution de l'activité totale de l'eau, être due à un rééquilibrage des formes physico-chimiques du ^{59}Fe dans les bacs expérimentaux. Nous avons, en effet, montré que lorsque le fer n'était pas complexé, les formes particulières ou colloïdales diminuaient dans le milieu expérimental en faveur des formes solubles.

Il nous est toutefois permis d'affirmer qu'au niveau des tissus en contact avec l'eau de mer, les formes physico-chimiques du ^{59}Fe préférentiellement accumulées sont des formes colloïdales ou particulaires. En effet, les niveaux de contamination des branchies et de l'exosquelette sont supérieurs lorsque le ^{59}Fe est essentiellement sous forme particulaire à ceux observés lorsque le métal est sous forme essentiellement soluble, bien que l'activité totale de l'eau soit, dans le cas des formes particulaires, très inférieure à l'activité totale de l'eau mesurée dans le cas des formes solubles, dès le premier jour d'expérimentation.

Pour les tissus internes, hépatopancréas, hémolymphe et muscles, dans tous les cas, c'est-à-dire pour du ^{59}Fe complexé ou non complexé, l'activité croît régulièrement et est maximale en fin d'expérimentation. Pour une concentration initiale de $12,5 \mu\text{Ci}/\text{l}$, les niveaux de contamination de ces trois tissus sont plus importants lorsque le fer a été complexé par l'EDTA. Nous devons toutefois remarquer que la décroissance de l'activité de l'eau est moins rapide lorsque le ^{59}Fe a été complexé que lorsque celui-ci n'a pas été complexé.

L'accumulation du ^{59}Fe dans les tissus internes semble être essentiellement redevable au métal sous forme soluble. En effet, l'accumulation interne s'effectuant par simple diffusion ou par concentration active au niveau du tégument branchial ne peut intéresser que des formes solubles. En outre, Cantarow et Shepartz (1965) ont montré qu'au niveau du système digestif, le fer accumulé est sous forme soluble plutôt que particulaire ou colloïdale. L'accumulation du ^{59}Fe observée correspondrait à une absorption active du métal soluble contenu dans l'eau de mer. Il est toutefois possible de penser que l'accumulation du fer, au niveau des organes internes, peut être en partie redevable au fer sous forme particulaire, après transformation de celui-ci en forme soluble assimilable au niveau du système digestif.

Lorsque le fer 59 a été complexé, c'est-à-dire lorsque les formes solubles prédominent dans le milieu expérimental, la cinétique de contamination des tissus externes, branchies et exosquelette est identique à la cinétique de contamination des tissus internes, et témoigne d'une accumulation progressive de cet élément. En effet, les activités maximales, pour ces deux tissus, sont observées après 26 jours d'expérimentation. Nous avons toutefois remarqué que le ^{59}Fe solubilisé par complexation avec l'EDTA subissait une transformation entraînant une augmenta-

tion des formes insolubles en fonction du temps. Il y a tout lieu de supposer que l'accumulation observée dans ces deux tissus est due, en outre, à des phénomènes d'adsorption et de filtration du ^{59}Fe insoluble se formant à partir du ^{59}Fe soluble. Il est toutefois possible que l'exosquelette et la branchie accumulent de très fins colloïdes de fer. En effet, la différenciation entre le fer anionique ou neutre en solution parfaite et le fer formant des colloïdes très fins, également anionique ou neutre est difficile à effectuer. Cette difficulté est due à des raisons d'ordre technique ayant trait essentiellement à la chimie des résines utilisées pour la séparation des différentes formes physico-chimiques des éléments.

Il est à remarquer que dans tous les cas, c'est-à-dire lorsque le fer est complexé et lorsqu'il n'est pas complexé, le niveau de contamination du crabe *in toto* est supérieur à celui des tissus internes, et inférieur à celui des tissus externes, exosquelette et branchies. D'autre part, la cinétique de contamination du crabe *in toto* est dans tous les cas identique à celle de ces derniers. Le niveau de contamination globale de *Carcinus maenas* par ^{59}Fe est donc essentiellement lié à la contamination des tissus en contact direct avec l'eau de mer. De ce fait, la contamination globale de *Carcinus maenas* est plus liée à des processus de nature physico-chimique qu'à des processus de nature biochimique et physiologique.

V - CONCLUSIONS :

Deux cinétiques de contamination de *Carcinus maenas* par ^{59}Fe sont mises en évidence, et sont reliées étroitement à la forme physico-chimique du métal prépondérante dans l'eau de mer. Il apparaît que les formes particulières ou colloïdales s'accumulent préférentiellement et très rapidement au niveau des tissus en contact direct avec l'eau de mer, l'exosquelette et les branchies. La contamination de ces deux tissus est plus importante et plus rapide par les formes colloïdales et particulières que par les formes solubles anioniques ou neutres.

Les formes solubles ne semblent être accumulées que progressivement par l'organisme, essentiellement au niveau des tissus internes : hémolymphe, hétopancreas et muscle. Les niveaux de contamination de ces trois tissus semblent être liés plus à la concentration des formes solubles, anioniques ou neutres dans l'eau de mer qu'à la concentration totale du fer dans cette eau.

L'accumulation des formes solubles intéressant essentiellement les organes internes ne pourra s'effectuer que par des processus biologiques, alors que les formes colloïdales ou particulaires, au niveau des tissus en contact avec l'eau de mer, semble mettre en jeu des processus de nature physique ou physico-chimique tels que la filtration ou l'adsorption.

La contamination globale et la cinétique de contamination du crabe *in toto* est essentiellement liée à la contamination des tissus externes, exosquelette et branchies, en contact direct avec l'eau de mer.

Il est évident que la contamination totale d'un organisme et la contamination de chacun de ses tissus sont liées à différents paramètres et en particulier à la concentration de chacune des formes physico-chimiques du ^{59}Fe dans l'eau de mer, mais aussi à l'évolution de chacune de ces formes en fonction du temps. En effet, nous avons montré qu'en milieu expérimental, il n'était pas possible d'obtenir exclusivement l'une ou l'autre des formes physico-chimiques du métal, mais également que chacune de ces formes présentait un état d'équilibre instable évoluant quantitativement, très certainement par adsorption du métal sur les parois des bacs expérimentaux, et qualitativement par des phénomènes d'hydrolyse ou de complexation du métal par la matière organique présente dans l'eau de mer.

RESUME

— Deux cinétiques de contamination du crabe *Carcinus maenas* par le ^{59}Fe ont été mises en évidence en fonction de la forme physico-chimique du métal prépondérante dans le milieu expérimental. Les formes solubles semblent être accumulées essentiellement dans les tissus internes par des processus biologiques, alors que les formes colloïdales et particulaires sont accumulées préférentiellement au niveau des tissus en contact avec l'eau de mer, exosquelette et branchies, par des processus de nature physico-chimique.

La contamination globale et la cinétique de contamination de *Carcinus maenas in toto* est sous la dépendance de la contamination et de la cinétique de contamination des tissus externes, branchies et exosquelette, en contact direct avec l'eau de mer. —

SUMMARY

— Two kinetics of contamination of *Carcinus maenas* by ^{59}Fe have been determined in relation with the preponderant physico-chemical state of the metal in the experimental medium. The soluble forms seem to be accumulated essentially in internal tissues by biological process when particulate forms are accumulated in tissues in contact with sea water.

The whole contamination and the kinetics of contamination of the whole crab *Carcinus maenas* is dependant of the contamination and the kinetic of contamination of the external tissues, gills and exoskeleton, in contact with sea water. —

BIBLIOGRAPHIE

- CANTAROW A. and SCHEPARTZ B., 1965 - Biochemistry. W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- FRAIZIER A., 1974 - Contribution à l'étude de la contamination de constituants du milieu marin par des formes solubles et insolubles de radionucléides. *Thèse de Doctorat d'Université*, Caen, 81 p.
- GRANICK S., 1958 - Iron metabolism in animal and plants. In : Trace elements, C.A. Lamb and J.M. Beattie eds. *Academic Press*, New-York.
- LOWMAN F.G., 1963 - Iron and cobalt in ecology. In : Proceedings of the first National Symposium on Radioecology, Colorado State University, V. Schultz and A.W. Klement eds. *Reinhold Publishing Corp.*, New-York.
- MARCHAND M., 1972 - Contribution à l'étude de l'influence de la matière organique dissoute sur la physico-chimie d'éléments à l'état de traces dans l'eau de mer. *Thèse de Doctorat de 3e Cycle*, Paris, 132 p.
- MARCHAND M., 1974 - Considération sur les formes physico-chimiques du cobalt, manganèse, zinc, chrome et fer dans une eau de mer enrichie ou non de matière organique. *J. Cons. Int. Explor. Mer*, 35, 130-142.
- MARTIN J.L. M., 1975 - Recherches sur le métabolisme des métaux chez les crustacés décapodes ; leurs rapports avec la mue et la reproduction. *Thèse de Doctorat ès Sciences*, Marseille, 296 p.
- Mc CAMMON H.M., AULD J.A. and WATSON J.A., 1969 - Adsorption of iron to the shells of brachiopods. *Geol. Soc. Amer. Bull.*, 80, 527-530.
- POLIKARPOV G.G., 1966 - Radioecology of aquatic organisms, V. Schultz and W. Klement eds. *North Holland Publishing Co.*, Amsterdam.