



Apport de la microanalyse par spectroscopie à dispersion d'énergie à l'écotoxicologie marine

Sabria BARKA¹

1. Unité de Recherche 09-03 Toxicologie Marine & Environnementale,
Université de Sfax, Institut Supérieur de Biotechnologie de Monastir, Tunisie.
sabriabarka2@yahoo.fr

Résumé :

Les organismes marins accumulent les métaux sous formes de concrétions minéralisées dans leurs tissus. La microanalyse est une technique qui détecte ces structures métalliques et détermine leur composition élémentaire. Cette technique permet de mieux comprendre comment les organismes marins gèrent la présence de métaux dans leur milieu et constitue une approche innovante en écotoxicologie.

Mots-clés :

Microanalyse – Métaux – Ecotoxicologie marine

1. Introduction

Les organismes aquatiques accumulent les métaux à des concentrations plusieurs fois supérieures à celles du milieu environnant (RAINBOW *et al.*, 1990). Cependant, la bioaccumulation des métaux *per se* n'est pas nécessairement une indication d'effets adverses (CAMPBELL & TEISSIER, 1996). En effet, les dosages globaux de métaux traduisent la présence d'éléments qui ne sont parfois que des constituants de particules inertes fossilisées au sein des tissus, et non pas des éléments participant au métabolisme. Ainsi, il n'est pas possible de comprendre la signification des métaux traces accumulés dans les animaux récoltés dans des zones contaminées, particulièrement dans le contexte de programmes de biosurveillance, si les mécanismes impliqués dans les processus d'accumulation, de séquestration, de stockage et d'excrétion ne sont pas pris en considération (RAINBOW, 2002).

Le but de cet article est de présenter le potentiel de la microanalyse (spectroscopie à dispersion d'énergie) en tant qu'outil analytique appliqué sur les systèmes biologiques et, combiné à l'étude ultra-structurale, sa possible application dans le domaine de l'écotoxicologie afin de comprendre comment les organismes marins gèrent la présence de métaux dans leur environnement.

2. Matériel et méthodes

2.1 Préparation des coupes pour la microanalyse

Les organismes récoltés à partir du milieu naturel ou exposé au laboratoire sont disséqués pour dégager les organes dans lesquels on souhaite réaliser l'observation. Les échantillons sont fixés puis déshydratés dans des bains d'alcools successifs et enfin inclus dans de la résine (Epon[®], Araldite[®], ...). Les blocs de résine sont ensuite coupés à l'aide d'un ultramicrotome. Des coupes d'une épaisseur de 100nm sont recueillies sur des grilles de titane (100 mesh). Celles-ci sont ensuite métallisées. Cette opération consiste à appliquer une fine couche (quelques nanomètres) de carbone sur les grilles, sous évaporateur. Ce procédé rend l'échantillon conducteur sous l'impact des électrons de la sonde microanalytique.

2.2 La microanalyse

Le principe de la microanalyse est d'intégrer un capteur de rayons X (à dispersion d'énergie) à un microscope électronique à transmission. En effet, au lieu d'arroser tout le champ observé, le faisceau d'électrons peut être focalisé sur un endroit choisi de très petites dimensions (on peut descendre à quelques centaines de nm²). Les rayons X émis sous l'impact des électrons sont spécifiques des atomes excités à cet endroit précis de la préparation. On peut ainsi analyser les éléments présents qualitativement nm² par nm². Des spectres présentant des pics, à des énergies d'émission caractéristiques des éléments, reflètent la présence de ces éléments dans les portions de coupes balayées par le faisceau d'électrons. En général, la tension d'accélération de l'appareil est fixée à 60 kV. Le temps de balayage des portions de coupes sélectionnées pour être analysées tourne autour de 300 secondes.

3. Résultats

3.1 Structures de bioaccumulation métalliques chez les organismes marins

La microanalyse a permis de détecter la présence de métaux *in situ* dans des dépôts intracellulaires dans les organismes aquatiques (NOTT, 1991). Désignées comme granules, inclusions, dépôts, corps résiduels, sphérocristaux (figure 1), sphérites ou concrétions, ces structures sont généralement associées aux tissus digestifs, excréteurs ou conjonctifs des vertébrés et des invertébrés. Le contenu métallique de ces granules varie considérablement (BROWN, 1982 ; ROESIJADI & ROBINSON, 1994). Les concrétions peuvent être *intra* ou *extra*-cellulaires et présenter des formes hautement variables. La microanalyse a permis de montrer qu'elles pouvaient être cristallines ou amorphes, de forme indéfinie ou sphérique, de composition interne pure ou riche en divers éléments. Les inclusions sectionnées montrent une structure interne organisée en

strates concentriques (BALLAN-DUFRANÇAIS, 1975), homogène (WALKER, 1977), diffuse (MASON *et al.*, 1984) ou constituée de conglomérats (REID & BRAND, 1989).

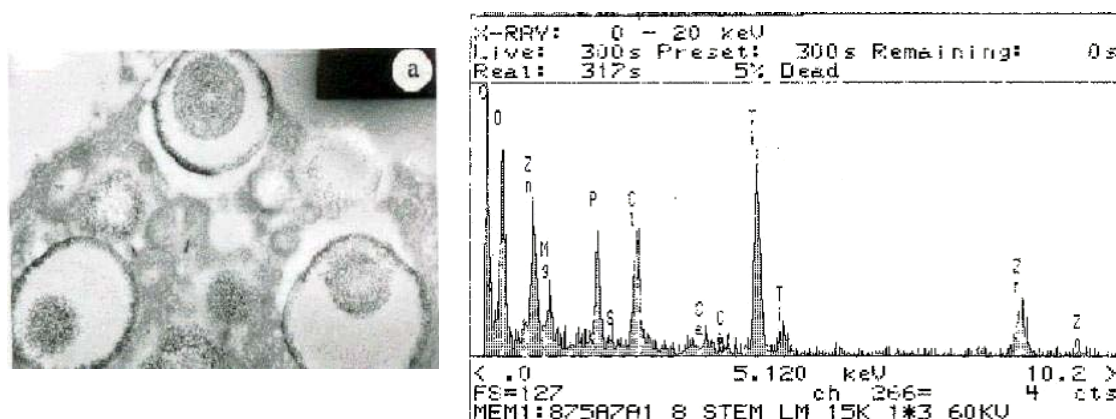


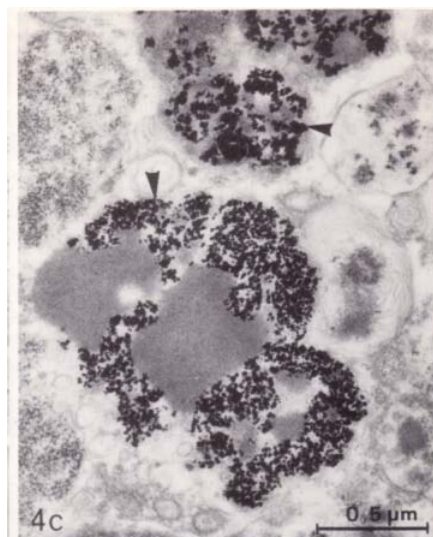
Figure 1. Présence de Zn, Mg, P, S and Ca dans un sphérocrystal (2–2.5 µm) dans l'épithélium digestif d'un copépode benthique récolté au Croisic (côte atlantique française). Noter l'alternance des couches concentriques sombres et claires. x14 000 (d'après BARKA, 2007).

3.2 Formation des concrétions

L'initiation de la formation des granules intracellulaires n'est pas encore tout à fait élucidée. Chez certaines espèces, une matrice organique pourrait être produite par le réticulum endoplasmique ou le Golgi et se retrouver dans une vacuole limitée par une membrane. Cette matrice organique serait minéralisée (FOWLER & GOULD, 1988). D'un autre côté, il est fort possible que le système lysosomal, bien développé dans les cellules digestives et excrétoires, soit impliqué dans la formation des granules (BROWN, 1982), (figure 2). La détection par microanalyse de la présence de Cu associé à du S dans les lysosomes pourrait traduire l'existence de matériel organique incorporé dans ceux-ci. De façon générale, les métaux lourds, particulièrement ceux de classe B ont tendance à former des complexes stables avec les groupes sulphydryles des acides aminés et des polypeptides. Plusieurs auteurs ont avancé l'hypothèse que ces concrétions résulteraient de l'accumulation des métallothionéines (riches en cystéine) ou d'autres métalloprotéines qui, en fin de vie, se retrouvent dans les lysosomes (RAINBOW, 1998).

Il semble que la clé pour comprendre les interactions entre les granules réside dans leur capacité à incorporer et relarguer les métaux traces, ce qui revient à préciser leur composition chimique exacte. Malheureusement, il existe si peu d'informations disponibles pour les invertébrés marins, notamment concernant les composants organiques de ces granules, à savoir les métalloprotéines et surtout les métallothionéines, qu'il est difficile de formuler des conclusions définitives quant au

mode de formation de ces concrétions et au rôle qu'elles sont susceptibles de jouer dans la détoxification (BROWN, 1982 ; MASON & JENKINS, 1995).



*Figure 2. Les lysosomes de la glande digestive du bivalve *Pecten maximus* (récolté en Manche) montrent de denses granules (flèches) dans lesquels ont été détectés de nombreux éléments (Cd, Ag, Mo, Br, Zn, Cu, Fe, Ca, S, Si, Al). x 48 600 (d'après BALLAN-DUFRANÇAIS *et al.*, 1985).*

3.3 Transfert trophique des concrétions

Différents auteurs ont avancé l'hypothèse que la distribution des métaux est critique pour leur assimilation par les prédateurs (AMIARD-TRIQUET *et al.*, 1993, REINFELDER & FISHER, 1994 ; WALLACE & LOPEZ, 1997 ; WANG & RAINBOW, 2000). Ainsi, l'incorporation des métaux, sous forme non toxique, dans des granules peut conduire au "transfert de la détoxification métallique le long de la chaîne trophique marine" puisque certains composés inorganiques très stables ne sont pas assimilés durant leur passage dans le tractus digestif des prédateurs. Cependant, des études ont prouvé que ces granules pouvaient se dissoudre et qu'une partie des métaux pouvait être relarguée durant le processus digestif (NOTT & NICOLAIDOU, 1993). Ainsi, l'étude de la composition élémentaire des granules, par le biais de la microanalyse, permet de savoir si les granules dans les tissus des proies sont disponibles pour le prédateur et si une bioréduction des métaux pour les échelons supérieurs de la chaîne alimentaire a lieu.

4. Conclusion

La microanalyse se révèle être un outil qui peut apporter des réponses lorsqu'on cherche à comprendre les mécanismes cellulaires qui régissent la bioaccumulation, la composition des concrétions minéralisées, le transfert trophique des métaux ainsi que les stratégies de détoxification. Ces informations revêtent un grand intérêt pour

comprendre comment un organisme gère la présence de métaux dans son environnement, particulièrement dans le cadre d'une étude écotoxicologique.

5. Références bibliographiques

- AMIARD-TRIQUET C., JEANTET A.Y., BERTHET B. (1993). *Metal transfer in marine food chains : bioaccumulation and toxicity*. Acta Biologica Hungarica 44(4), pp 387-409.
- BALLAN-DUFRANÇAIS C. (1975). *Bioaccumulation minérale , purique et flavinique chez les insectes. Méthodes d'étude-Importance physiologique*. Thèse d'état, université Pierre-et-Marie-Curie, 172 p.
- BALLAN-DUFRANÇAIS C., JEANTET A.Y., FEGHALI C., HALPERN S. (1985). *Physiological features of heavy metal storage in bivalve digestive cells and amoebocytes : EPMA and factor analysis of correspondences*. Biology of the Cell 53:283-292.
- BARKA S. (2007). *Insoluble detoxification of trace metals (copper, zinc, nickel, cadmium, silver and mercury) in a marine crustacean Tigriopus brevicornis (Müller)*. Ecotoxicology 16, pp 491–502.
- BROWN B.E. (1982). *The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues*. Biological Rev. 57, pp 621-667. doi:10.1111/j.1469-185X.1982.tb00375.x
- CAMPBELL P.G.C., TESSIER A. (1996). *Ecotoxicology of metals in the aquatic environment : Geochemical aspects*. In: Newman, M.C. et C.H. Jago (eds) Ecotoxicology: A hierarchical treatment. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, pp 11-58.
- FOWLER B.A., GOULD D. (1988). *Ultrastructural and biochemical studies of intracellular metal-binding patterns in kidney tubule cells of the scallop Placopecten magellanicus following prolonged exposure to cadmium or copper*. Marine Biology 97, pp 207-216.
- MASON A.Z., SIMKISS K., RYAN K. (1984). *Ultrastructural localization of metals in specimens in Littorina littorea (L.) from polluted and non-polluted sites*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 64, pp 699-720. doi:10.1017/S0025315400030368
- MASON A.Z., JENKINS K.D. (1995). *Metal detoxification in aquatic organisms*. In: Tessier A. et D.R. Turner (eds) Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. John Wiley & Sons Ltd, London, pp 479-608.
- NOTT J.A. (1991). *Cytology of pollutant metals in marine invertebrates: A review of microanalytical applications*. Scanning Microscopy 5:191.
- NOTT J.A., NICOLAIDOU A. (1993). *Bioreduction of zinc and manganese along a molluscan food chain*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, Volume 104, Issue 2, February 1993, pp 235-238. doi:10.1016/0300-9629(93)90309-R

RAINBOW P.S. (1998). *Phylogeny of trace metal accumulation in crustaceans*. In: Langston, W.J. et M. Bebianno (eds) *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Chapman and Hall, London, pp 285-319.

RAINBOW P.S. (2002). *Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?* Environ. Poll. 120, pp 497-507. doi:10.1016/S0269-7491(02)00238-5

RAINBOW P.S., PHILLIPS D.J.H., DEPLEDGE MH. (1990). *The significance of trace metal concentrations in marine invertebrates, a need for laboratory investigation of accumulation strategies*. Marine Pollution Bulletin 21, pp 321-324. doi:10.1016/0025-326X(90)90791-6

REID R.G.B., BRAND D.G. (1989). *Giant kidneys and metal-sequestering nephroliths in the bivalve Pinna bicolor, with comparative notes on Altrina vexillum (Pinnidae)*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 126, pp 95-117. doi:10.1016/0022-0981(89)90083-X

REINFELDER J.R., FISHER N.S. (1994). *Retention of elements absorbed by juvenile fish (Menidia menidia, Menidia beryllina) from zooplankton prey*. Limnology and Oceanography 39, pp 1783-1789. doi:10.4319/lo.1994.39.8.1783

ROESIJADI G., ROBINSON W.E. (1994). *Metal regulation in aquatic animals: Mechanisms of uptake, accumulation and release*. In: Martins, D.C. et G.K. Ostrander (eds). *Aquatic toxicology: molecular, biochemical and cellular perspectives*. Lewis Publishers, Boca Raton, pp 387-420.

WALKER G. (1977). *"Copper" granules in the barnacle Balanus balanoides*. Marine Biology 39, pp 343-349. doi:10.1007/BF00391937

WALLACE W.G., LOPEZ G.R. (1997). *Bioavailability of biologically sequesters cadmium and the implications of metal detoxification*. Marine Ecology Progress Series 147, pp 149-157. doi:10.3354/meps147149

WANG W.X., RAINBOW P.S. (2000). *Dietary uptake of Cd, Cr and Zn in the barnacle Balanus trigonus: influence of diet composition*. Marine Ecology Progress Series 204, pp 159-168.