

## Étude expérimentale de la bio-accumulation des lanthanides chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) du littoral méditerranéen marocain

Salima DEMNATI <sup>1</sup>, Abdelhafid CHAFI <sup>1</sup>, Benaissa ATTARASSI <sup>2</sup>,  
Mohammed KHARBOUA <sup>1</sup>, Abdellatif MAAMRI <sup>1</sup> & Mohammed RAMDANI <sup>3\*</sup>

(Reçu le 18/07/2001 ; Accepté le 08/11/2001)

### دراسة تجريبية للتكديس البيولوجي لمواد اللنتانيات عند بلح البحر *Mytilus galloprovincialis* بالسواحل المتوسطية المغربية

أجريت التحاليل بواسطة المجهر الأيوني وبالمقياس الطيفي المستعمل أشعة X لاكتشاف وظهور التكديس البيولوجي عند بلح البحر بعد تسممه في المختبر بمواد lanthum و cerium و thulium. توضح النتائج أن تتركز هذه المواد يتم في عضويات الليزوزوم على شكل محلول ثم يتركز على شكل فوسفات غير ذائب (صلب) في كل من الظهار الهضمي والغدد الهضمية والخياشيم والأعضاء الفوهية

**الكلمات المفتاحية :** التكديس البيولوجي- اللنتانيات- الليزوزوم- بلح البحر- البحر الأبيض المتوسط- المغرب

### Étude expérimentale de la bio-accumulation des lanthanides chez la moule *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) du littoral méditerranéen marocain

La microscopie ionique et la microanalyse X ont été utilisées pour détecter *in situ*, sur coupes histologiques, les éléments bio-accumulés dans la moule *Mytilus galloprovincialis*, contaminée expérimentalement *in vitro* par le cérium, le thulium et le lanthane. Les éléments absorbés, sous forme soluble à l'état de traces dans les organites cibles (les lysosomes), sont concentrés sous forme de précipités de phosphate insolubles dans les cellules épithéliales des branchies, des glandes digestives et des palpes labiaux.

**Mots clés :** Bio-accumulation - Lanthanides - Lysosome - Moule - Méditerranée - Maroc

### Experimental study bio-accumulation of rare earth by *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck) from the Moroccan mediterranean coast

Ion microscopy and X-ray spectrometry were used to detect and visualize an intracellular elements bio-accumulation within mussels *Mytilus galloprovincialis* intoxicated by lanthnum, cerium and thulium. The target organelles was shown to be the lysosomes where most of the elements, uptaken under a soluble form, at trace level, are then concentrated under the form of an unsoluble phosphate in digestive epithelia, digestive gland, gill and labial palp.

**Key words :** Bio-accumulation - Rare earth - Lysosome - Mussel - Mediterranean - Morocco

<sup>1</sup> UFR Sciences de l'Environnement en milieu aride et semi-aride, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Oujda, Maroc

<sup>2</sup> Département de Biologie, Faculté des Sciences, Kénitra, Maroc

<sup>3</sup> Institut Scientifique, Département de Zoologie et Écologie Animale, Av<sup>e</sup> Ibn Batouta, B.P. 703-Agdal, Rabat, Maroc

\* Auteur correspondant, e-mail : mramdani@israbat.ac.ma

## INTRODUCTION

Les lanthanides ou terres rares sont constitués de 15 métaux de numéro atomique 57 à 71. Ils se trouvent, en dehors de toute pollution, à l'état de traces dans le milieu marin (Brewer, 1975 ; De Baar *et al.*, 1983). Ils sont toujours chimio- et (ou) radiotoxiques et n'ont pas de rôle physiologique connu. Ils peuvent former avec certains ligands de l'eau de mer des complexes facilement adsorbés sur les particules (Klinkhammer *et al.*, 1983 ; Mauchline & Templon, 1963).

La capacité de bio-accumulation des terres rares par les organismes marins a été signalée depuis longtemps par plusieurs auteurs (Kameda, 1962), mais leur métabolisme était inconnu. L'étude du métabolisme des terres rares a donc été menée chez la moule (*Mytilus galloprovincialis*), espèce à vaste répartition géographique et bon indicateur de la pollution métallique (Augier, 1987).

L'objectif de ce travail est de déterminer les mécanismes cellulaires mis en jeu dans le processus de concentration des lanthanides.

## MATÉRIEL & MÉTHODES

Des moules, pêchées dans le littoral méditerranéen de Saïdia, d'une longueur de 4 cm ont été stabulées en aquarium pendant une semaine pour éliminer les organismes trop fragiles ou endommagés par le changement de milieu. Les animaux ont été nourris tous les deux jours avec du phytoplancton et maintenus à 15°C. Elles ont ensuite été réparties en trois lots, à raison de 10 individus par bac, et exposées, pendant 10 jours, au nitrate de lanthane  $\text{La}(\text{NO}_3)_3$  ou au chlorure de cérium  $\text{CeCl}_3$  ou au chlorure de thulium à 50 ppm chacun. Les moules ne reçoivent pas de supplément de nourriture. Elles sont observées tous les jours à la même heure pendant toute la durée de l'expérimentation.

Au dixième jour, les moules sont récupérées et autopsiées. Les organes : branchies; glande digestive et palpe labial sont prélevés. Lors de cette expérimentation, la validité des résultats est contrôlée par rapport à des témoins.

Les échantillons de tissu prélevé ont été fixés pendant 2 h 45 mn dans une solution de glutaraldéhyde à 5% dans un tampon cacodylate de sodium à 0,1 M. Le glutaraldéhyde a pour principale fonction de former des ponts méthylène

(-CH<sub>2</sub>-) entre les chaînes polypeptidiques. Les échantillons sont alors déshydratés dans des bains d'alcool éthylique de degré croissant, puis d'oxyde de propylène et inclus dans une résine époxy. Ils sont individuellement disposés dans les logettes d'un moule plat en silicone puis polymérisés à 60°C pendant 48 h.

L'étude ultrastructurale et l'analyse aux rayons X ont été faites sur coupes ultrafines. Pour l'analyse ionique, des coupes semi-fines ont été déposées sur des lames d'or (Galle, 1964).

Les analyses des tissus des moules contaminées sont effectuées au laboratoire de microanalyse à l'aide de deux méthodes de microscopie analytique. Dans la microanalyse X (sonde de Castaing), une très fine sonde électronique est dirigée sur une zone d'intérêt de la coupe, un lysosome par exemple.

Sous l'influence du bombardement électronique, les éléments chimiques présents dans les lysosomes émettent un spectre de rayons X comportant, entre autres, des raies d'émission des éléments présents dans la cible. La mesure des longueurs d'onde de ces raies, effectuée à l'aide d'un spectromètre aux rayons X, permet de caractériser sans ambiguïté la nature chimique élémentaire des atomes présents sous la sonde ainsi que leur concentration.

La méthode de microanalyse par émission ionique secondaire (microscopie ionique analytique) a été proposée par Castaing & Slodzian (1962). Son application dans le domaine de l'imagerie et de la recherche biomédicale a eu, ces dernières décennies, un impact considérable (Galle 1970, 1982, 1985 ; Spurr, 1980 ; Galle *et al.*, 1983 ; Chafi, 1995).

Le principe de cette méthode est le suivant : les atomes de la surface de la coupe histologique sont pulvérisés sous forme ionique (ions secondaires) grâce à un bombardement d'ions primaires. Ces ions secondaires, caractéristiques d'une région donnée de l'échantillon, sont focalisés en un faisceau à l'aide d'un miroir électrostatique. Ce faisceau transporte l'image de toutes les variétés d'ions émis par la surface bombardée de l'échantillon (environ 300 µm).

Ultérieurement, un spectromètre de masse sépare ce faisceau en autant de faisceaux secondaires qu'il y a, dans le faisceau initial, d'ions de charge

spécifique donnée. Chacun de ces faisceaux transporte ainsi l'image d'une seule variété d'ions. Il est donc possible, en faisant varier le champ magnétique du spectromètre de masse, de sélectionner le faisceau transportant l'image de la variété d'ion dont on désire obtenir l'image de distribution.

## RÉSULTATS

Les micrographies présentées comportent toujours, pour une coupe histologique donnée, l'image ionique du calcium ou celle du sodium qui montre la topographie du tissu et l'image ionique de l'élément recherché.

Outre les éléments constitutifs de tous les tissus comme C, Na, P, K et Ca et ceux qui sont présents chez tous les animaux aquatiques comme Sr et Ba, les éléments suivants ont été détectés :  $^{139}\text{La}$ ,  $^{140}\text{Ce}$  et  $^{169}\text{Tm}$ .

Le cérium est détecté au niveau des filaments branchiaux associé à du phosphore sous forme de petits grains (Photos 1 & 2).

Il est localisé dans l'épithélium. On détecte aussi le cérium associé à du phosphore dans les lysosomes de l'épithélium des diverticules de la glande digestive (Photo 3).

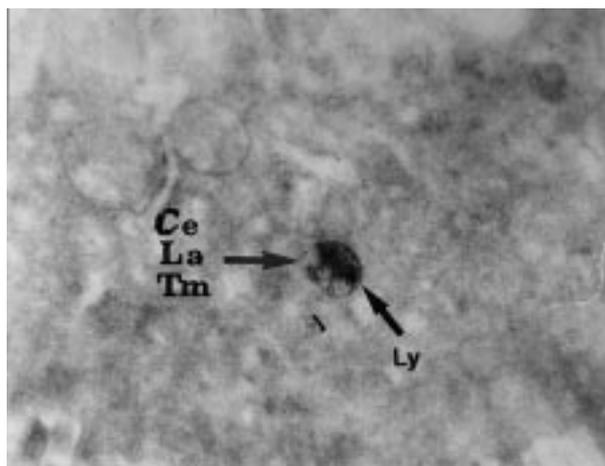
Le thulium est mis en évidence au niveau des filaments branchiaux. On le détecte également au niveau de l'épithélium des diverticules digestifs. Le Lanthane est détecté au niveau des filaments branchiaux. Il est localisé dans l'épithélium (Photo 1).

On le détecte aussi au niveau des diverticules de la glande digestive (Photo 2) et au niveau de l'épithélium du palpe labial.

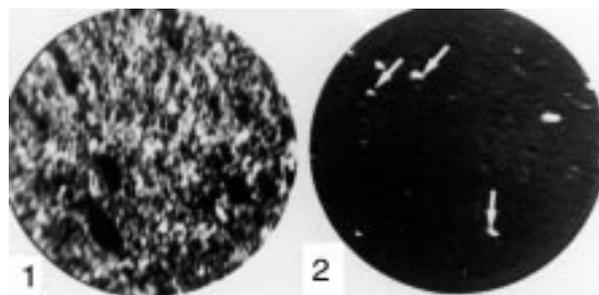
En microscopie ionique, le résultat de l'analyse des organes étudiés des moules témoins a été négatif et aucune émission des lanthanides n'a été observée. La microanalyse X n'a pas détecté de lanthanides dans les différentes structures cellulaires et notamment dans les lysosomes.

## DISCUSSION

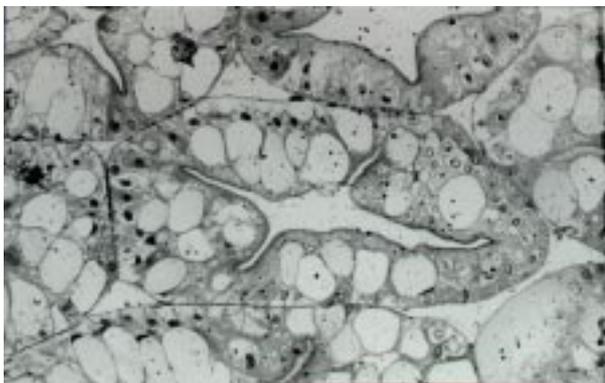
Les deux méthodes micro-analytiques utilisées, présentent chacune leurs avantages et leurs inconvénients. La microanalyse par sonde électronique s'effectuant sous contrôle visuel par



**Photo 1. Micrographie électronique du tissu branchial de la moule (*Mytilus galloprovincialis*) montrant un lysosome (Ly) intracellulaire (G x 15000)**



**Photo 2. Images ioniques obtenues à partir d'une coupe de tissu branchial de moule (*Mytilus galloprovincialis*). Les flèches indiquent les bio-accumulations ponctuelles de Ce et de La. Les points fortement émissifs correspondent aux lysosomes (Gx260) .**



**Photo 3. Image en microscopie photonique Nikon montrant la topographie des diverticules glandulaires digestifs de la moule (*Mytilus galloprovincialis*). Coloration au bleu de toluidine (G x 500)**

microscopie électronique permet seulement de préciser la localisation ultrastructurale des dépôts. En outre, l'appréciation quantitative des concentrations locales est bien codifiée.

En revanche, la sensibilité n'est pas très élevée (concentration minimale détectable de l'ordre de 0,01%) d'après Galle (1964).

La microanalyse par émission ionique secondaire a une sensibilité 100 à 1000 fois plus élevée permettant la détection et l'imagerie des lanthanides même lorsque ces éléments sont présents à une très faible concentration voire à l'état de trace.

Par ailleurs, la résolution sur les images n'est pas meilleure que 0,5  $\mu\text{m}$  et l'analyse quantitative rigoureuse n'est pas possible. Il n'est pas possible de déduire de l'intensité d'un spectre d'émission la concentration locale absolue compte tenu des différents facteurs influençant le rendement ionique. Parmi ces facteurs, la forme chimique sous laquelle se trouvent les lanthanides peut fortement modifier ce rendement.

D'après ce travail, la moule (*Mytilus galloprovincialis*) est un organisme capable d'accumuler les terres rares présents dans l'eau de mer. Selon les analyses ioniques et la microanalyse X, les sites sélectifs de concentration des lanthanides sont les lysosomes. La précipitation intralysosomale des métaux toxiques est un phénomène démontré chez les mammifères pour l'aluminium.

Le mécanisme de concentration de l'aluminium, par cet organite, sous forme de phosphate est lié à la présence locale de phosphatase acide (Galle, 1982). Ainsi, les lysosomes sont, chez les invertébrés marins, les organites cibles d'accumulation des métaux tels que l'aluminium, le cadmium, l'uranium et le chrome (Chassard-Bouchaud & Hallegot, 1984).

Au niveau des palpes labiaux, une absorption directe a lieu au niveau des branchies (Pequignat, 1973) et l'épithélium branchial est le siège d'une activité phosphatasique acide importante (Pasteels, 1967).

Les terres rares, absorbées au niveau de l'épithélium branchial, pénètrent alors dans le système lysosomal et précipitent avec du phosphore, sous forme de phosphate insoluble. Les

tissus de soutien chitineux de *Mytilus galloprovincialis* représentent une importante zone d'accumulation des terres rares qui franchissent les épithéliums des branchies et des palpes labiaux. Ces éléments précipitent dans les interstices de la trame protéique, sous forme de nombreux micro-grains.

Les lanthanides, rejetés de l'épithélium dans la cavité générale de l'animal par exocytose, sont ensuite phagocytées par les macrophages et concentrées dans leur système lysosomal. Elles y sont associées à du phosphore. Les terres rares sont alors soustraites du milieu intérieur de l'animal.

Au niveau de l'appareil digestif de *Mytilus galloprovincialis*, existe une digestion extracellulaire au niveau de l'estomac et intracellulaire au niveau des diverticules (Bayen, 1976).

Les terres rares, absorbées par les épithéliums digestifs, précipitent avec du phosphore dans les lysosomes sous forme de phosphate insoluble. Elles sont également piégées dans les interstices du tissu conjonctif du tube digestif de la moule. Ceci est à rapprocher de l'accumulation observée dans les coquilles des mollusques (Kameda, 1962) et dans les tissus squelettiques des mammifères (Masse, 1982) et des poissons (Kameda, 1962). Il est probable qu'il s'agisse là de sites définitifs de rétention.

Les moules sont ainsi capables d'extraire du milieu marin des métaux se trouvant sous forme soluble, à l'état de traces. Elles les concentrent ensuite dans des structures spécialisées, les lysosomes et sphérocristaux, sous forme de précipités insolubles, de moindre toxicité avant de les éliminer.

## CONCLUSION

La microanalyse qui permet la détection et la localisation à l'échelle cellulaire des éléments les plus légers jusqu'aux plus lourds, apporte des données précises sur le métabolisme et la localisation cellulaire des métaux.

Ces méthodes sont encore peu utilisées actuellement pour des recherches sur les organismes marins. Les données obtenues permettent de montrer que les organites cibles de concentration des lanthanides sont les lysosomes.

Les éléments, qui y sont absorbés sous forme soluble, sont concentrés sous forme de précipités de phosphates insolubles (réaction due à l'activité phosphatasique) dans les cellules épithéliales des branchies, des glandes digestives et des palpes labiaux.

La mise en évidence de la concentration des éléments toxiques, détectés dans les invertébrés marins, soulève la question d'une éventuelle source de contamination pour l'Homme.

La réponse est vraisemblablement négative car les lanthanides étant ici concentrés sous une forme insoluble, ne peuvent être absorbés par le tube digestif.

### REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier l'équipe du Professeur Galle du laboratoire de Microanalyse Appliquée à la Biologie pour sa collaboration scientifique et technique.

### RÉFÉRENCES CITÉES

- Augier H. (1987) Bio-indicateurs et indicateurs biologico-biochimiques en pollution marine. *Revue Int. Océanogr. méd.* 85-86 : 147-151
- Bayne B.L. (1976) Marine mussels : their ecology and physiology. International Biological Programme 10. Cambridge University Press
- Brewer P. (1975) Minor elements in sea water. Chemical Oceanography 2<sup>nd</sup> Ed. Riley J. & Skirrow G. Ed. Londres, Academic Press 415-496
- Bubel A. (1973) An electron - microscope study of periostracum repair in *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 20 : 235-244
- Castaing G. & Slodzian G. (1962) Microanalyse par émission ionique secondaire. *J. Microscopie* 1 : 395-410
- Chafi A.H. (1995) Mécanismes cellulaires de la Bio-accumulation d'éléments minéraux toxiques chez certains organismes aquatiques de la Méditerranée, de l'oued Moulouya, de l'oued Sebou et du moyen Atlas : toxicité de l'aluminium et impact sur la santé humaine. Thèse de Doctorat ès-Sciences, Université Mohamed 1<sup>er</sup>, 222 p.
- Chassard-Bouchaud C. & Hallegot P. (1984) Lysosomes et pollution. Communication au Colloque Annuel de la Société Française de Microscopie Électronique. Montpellier, mai, *Biology of the Cell* 51 : 21-24
- Chassard-Bouchaud C. (1985) Bio-accumulation de métaux stables et radioactifs par les organismes benthiques de la Baie de seine structuraux, ultrastructuraux et microanalytique. *Cah. Biol. Mar.* 26 : 63-86
- De Baar H.J.M., Bacon M.P. & Brewer P.G. (1983) Rare-earth distributions with a positive Ce anomaly in the Western North Atlantic Ocean. *Nature* 301 : 324-327
- Galle P. (1964) Analyse chimique ponctuelle des inclusions intracellulaires par spectrographie des rayons X. Application à l'étude des cellules rénales. Thèse de Doctorat d'État. *L'expansion Ed. Paris*
- Galle P. (1970) Sur une nouvelle méthode d'analyse cellulaire utilisant le phénomène d'émission ionique secondaire. *Ann. Phys. Biol. Med.* 83-84
- Galle P. (1982) Toxicité de l'aluminium pour l'hépatocyte. Localisation ultrastructurale et microanalyse des dépôts. *Nouv. Press Med.* 11 : 1123-1125
- Galle P. (1985) La microscopie ionique analytique des tissus biologiques. *Ann. Phys. Fr.* 10 : 287-305
- Galle P., Berry J. P. & Escaig F. (1983) Secondary ion mass microanalysis : applications in biology. *Scanning Electron Microscopy* 2 : 827-839
- Kameda K.A. (1962) Study on abundance of rare earth elements in marine organisms. *Journal of Radiation Research* 3 (2) : 89-103
- Klinkhammer G., Elderfield H. & Hudson A. (1983) Rare earth elements in seawater near hydrothermal vents. *Nature* 305 : 185-188
- Masse R. (1982) Métabolisme et toxicité des terres rares radioactives. *Toxiques Nucléaires. Ed. Masson.* 125-137
- Mauchline J. & Templton W.L. (1963) Dispersion in the Irish sea of the radioactive liquid effluent from windscale works of the U.K. Atomic Energy Authority. *Nature* 198 : 623-626

Pasteels J.J. (1967) Absorption et athrocytose par l'épithélium branchial de *Mytilus edulis*. *C. R. Acad. Sci. C.* 264 (D) : 2505-2507

Spurr A.R. (1980) Application of SIMS in biology and medicine. *Scan. Electron Microsc.* 3 : 97-109

Pequignat E. (1973) A Kinetic and autoradiographic study of the direct assimilation of amino-acids and glucose by organs of the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 19 : 227-224.