

BIOACCUMULATION DE MÉTAUX STABLES ET RADIOACTIFS PAR LES ORGANISMES BENTHIQUES DE LA BAIE DE SEINE : ASPECTS STRUCTURAUX, ULTRASTRUCTURAUX ET MICROANALYTIQUES (1)

par

Colette Chassard-Bouchaud

Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes marins, Université Pierre et Marie-Curie,
4, place Jussieu, 75230 Paris Cedex 05
et Centre de Microanalyse appliquée à la Biologie, Laboratoire de Biophysique de la Faculté de
Médecine (service du Pr. P. Galle), 6, rue du Général-Sarrail, 94000 Crétell. France.

Résumé

Deux méthodes de microanalyse ont été utilisées : la spectrométrie de rayons X à l'échelle du microscope optique et électronique et l'émission ionique secondaire à l'échelle du microscope optique pour détecter *in situ* sur coupe histologique les éléments bioaccumulés dans les organismes benthiques de la Baie de Seine.

Les espèces suivantes ont été analysées : Mollusques Lamellibranches : *Abra alba*, *Cultellus pellucidus* et *Mytilus edulis* (= moule commune); Annélide Polychète : *Owenia fusiformis*; Crustacés Décapodes : *Crangon crangon* (= crevette grise) et *Palaeomon serratus* (= crevette rose).

Les éléments suivants ont été mis en évidence : lithium, fluor, aluminium, chrome, manganèse, fer, titane, zinc, cuivre, argent, cézium, cadmium, thallium, plomb, uranium et les lanthanides : lanthane, cerium et thulium; ils sont tous présents dans les phosphogypses et dans les rejets de fabrication de dioxyde de titane, déversés quotidiennement en Baie de Seine. Les organes et tissus d'accumulation sont les suivants. Lamellibranches : glande digestive, branchie et gonade; Polychètes : épithéliums tégumentaire et digestif; Décapodes : glande digestive, branchie, muscle et exosquelette. A l'échelle ultrastructurale, on montre que les organites cibles sont les sphérocristaux et les lysosomes où la plupart des éléments absorbés sous forme soluble, à l'état de trace, sont ensuite concentrés sous forme de précipités de phosphate insolubles. Le rejet de la cuticule à l'exuviation et l'élimination des corps résiduels ainsi que des sphérocristaux, dans le milieu extracellulaire, assurent la détoxication de l'espèce.

Introduction

Les secteurs d'activités industrielles responsables des rejets de métaux polluants dans la baie de Seine, sont multiples.

La Seine y apporte notamment cadmium, chrome, cuivre, fer, mercure, manganèse, nickel, plomb, titane, vanadium et zinc. La

(1) Travail réalisé dans le cadre du Groupe de Recherches Coordonnées « Manche » (GRECO 19) — programme « Baie de Seine », avec le support financier du C.N.R.S. et de l'I.N.S.E.R.M. (SC 27)

société Thann et Mulhouse rejette, par l'intermédiaire d'un émissaire débouchant dans l'estuaire, des résidus de fabrication de dioxyde de titane. En outre, les phosphogypses, qui sont des résidus de fabrication d'acide phosphorique sont déversés par l'usine Cofaz située près du Havre, par barges et par un émissaire (Boust, 1981) (fig. 1). Tous ces rejets contiennent d'une part les métaux précités mais d'autre part aussi, d'après des analyses faites par spectrométrie de masse à

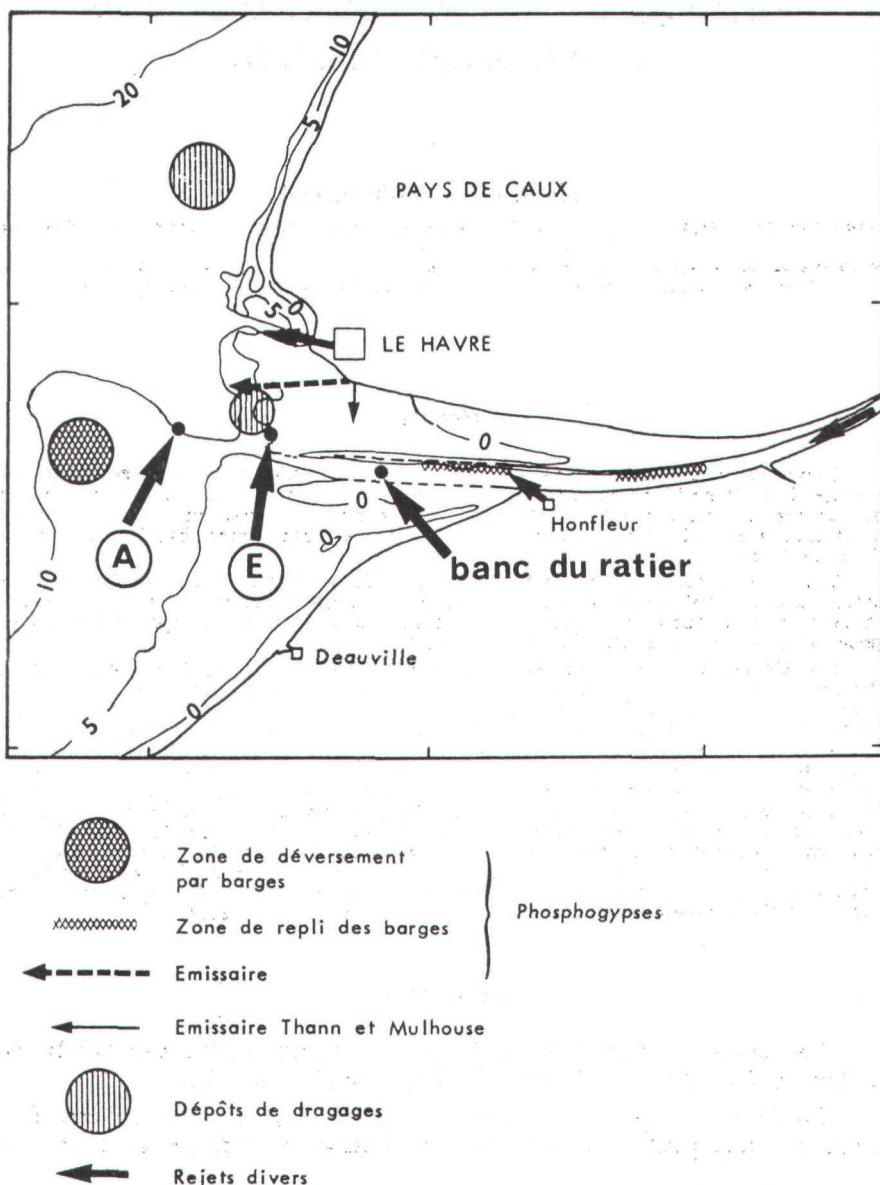


Fig. 1

Nature et localisation des rejets affectant l'estuaire et la baie de Seine orientale (Boust, 1981) et situation des points de prélèvement (points A, E et banc du Ratier).

éťincelles (rapport C.E.A., 1977) des métaux radioactifs tels que l'uranium et des terres rares telles que lanthane, cerium et thulium.

Dans le cadre d'une étude intégrée de la Baie de Seine (Cabioc'h, 1983), notre objectif est de détecter quels sont les métaux et éventuellement les halogènes, susceptibles d'être bioaccumulés par les organismes vivant dans cet écosystème pollué. Les espèces analysées ont été choisies parmi celles du benthos de cet estuaire et dont la distribution a été bien établie par Cabioc'h et Gentil (1975) et par Gentil (1976), quoique le benthos subtidal y soit caractérisé par une grande pauvreté spécifique d'après Proniewski et Elkaim (1980).

Pour notre étude, réalisée à l'échelon cellulaire et subcellulaire, nous avons utilisé deux méthodes de microanalyse particulièrement adaptées à l'étude du matériel biologique (Galle, 1974 et 1982) :

- la microanalyse par spectrométrie des rayons X, mise au point par Castaing en 1951.

- la microanalyse par émission ionique secondaire mise au point par Castaing et Slodzian en 1962.

Ces deux méthodes complémentaires permettent une analyse chimique *in situ*, de coupes de tissu à l'échelle structurale (microanalyse par émission ionique secondaire et par spectrométrie des rayons X à l'aide de la microsonde de Castaing (= MS 46) et à l'échelle ultrastructurale (microanalyse par spectrométrie des rayons X, à l'aide de la microsonde CAMEBAX).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

Il est constitué par les espèces suivantes :

Mollusques Lamellibranches : *Abra alba*
Cultellus pellucidus
Mytilus edulis (= moule commune)

Annélide Polychète sédentaire : *Owenia fusiformis*

Crustacés Décapodes : *Crangon crangon*
(= crevette grise)
Palaemon serratus
(= crevette rose)

A. alba, *C. pellucidus* et *O. fusiformis* ont été récoltés dans deux stations A et E (fig. 1). La station E, la plus proche de l'estuaire, située à une profondeur de 5 m, est constituée de vase. La station A, plus éloignée, située à une profondeur de 10 m, est constituée de sables fins envasés.

M. edulis, *C. crangon* et *P. serratus* ont été récoltés dans le banc du Ratier (fig. 1) situé en zone intertidale et à facies sablo-rocheux.

Toutes ces récoltes ont été effectuées en 1983 et 1984.

2. Préparation des échantillons

2.1. Microscopie optique :

— fixation au mélange de Carnoy, déshydratation, inclusion à la paraffine et coupe à 5 μ . Les coupes sont étalées sur lame de terphane carboné (pour la microsonde) ou sur lamelle d'or poli (pour l'analyseur ionique) puis déparaffinées.

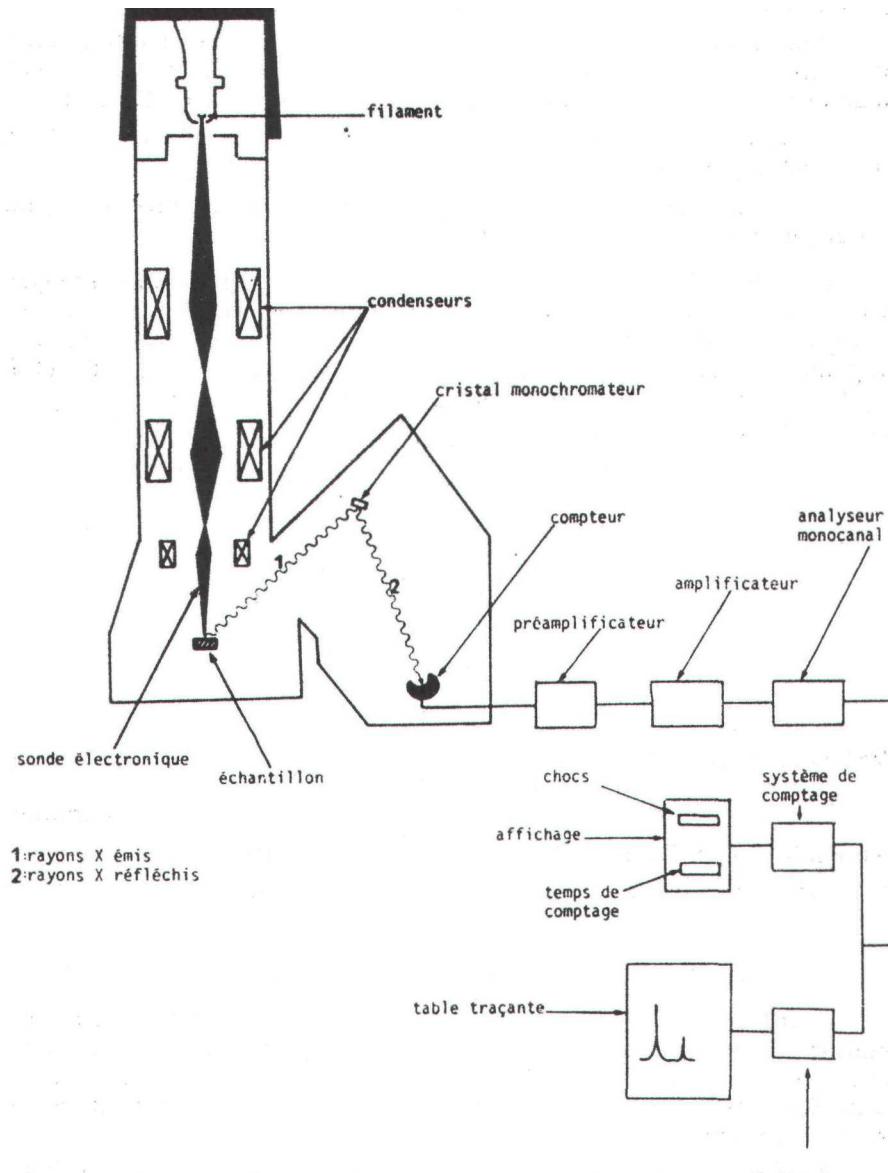


Fig. 2

Principe d'une microsonde équipée d'un spectromètre de rayons X à dispersion de longueur d'onde.

- fixation à la glutaraldéhyde, rinçage au tampon cacodylate, déshydratation, inclusion dans du Spurr et coupe à $2\text{ }\mu$. Les coupes sont déposées sur lamelle d'or poli (pour l'analyseur ionique).

2.2. Microscopie électronique :

- fixation à la glutaraldehyde, rinçage au tampon cacodylate, déshydratation, inclusion dans du Spurr. Les coupes ultrafines sont recueillies sur des grilles en titane et ne sont pas colorées pour être analysées à la microsonde CAMEBAX.

3. Méthodes de microanalyse

3.1. Principe des méthodes (tab. 0)

a) Microanalyse par spectrométrie des rayons X (fig. 2).

La microanalyse par spectrométrie des rayons X, est une méthode par laquelle les éléments constitutifs du tissu biologique sont identifiés par leurs raies X caractéristiques.

Tous les éléments de numéro atomique supérieur à 4 sont détectables. L'information obtenue peut être traitée, soit par des spectromètres sélectifs en énergie (déttection par diode), soit par des spectromètres dispersifs en longueur d'onde (déttection par cristal et compteur). Seule cette seconde méthode a été utilisée, elle est légèrement moins sensible mais donne une meilleure résolution en longueur d'onde que la première. Le volume minimum analysable a un diamètre de 1.000 \AA^0 . La sensibilité est de l'ordre de 10^{-17} pour les éléments de numéro atomique supérieur à 10.

L'échantillon à analyser, bombardé par un fin faisceau d'électrons (la sonde électronique), émet un spectre de rayons X caractéristique de ses éléments constitutifs; chaque rayonnement X correspondant à un élément peut-être réfléchi sélectivement par un cristal monochromateur orientable. L'intensité de ce rayonnement réfléchi est mesurée par la chaîne d'analyse.

b) Microanalyse par émission ionique secondaire

La microanalyse par émission ionique secondaire est une méthode fondée sur l'identification par spectrométrie de masse, des ions secondaires arrachés à l'échantillon par un bombardement d'ions primaires.

Cette méthode permet à la fois d'identifier tous les éléments de la classification périodique avec distinction entre les isotopes stables et radioactifs d'un même élément et d'en obtenir des images de distribution avec une résolution spatiale meilleure que le microscope.

La sensibilité atteint 10^{-20} g pour un grand nombre d'éléments. Le principe (fig. 3) est le suivant : l'échantillon est érodé par un faisceau d'ions primaires (O_2^+) accélérés. Parmi les particules arrachées, celles émises sous forme ionique (les ions secondaires), forment, après passage par la lentille électrostatique, une image globale

de la surface de l'échantillon. Cette image globale est décomposée en différentes images élémentaires (m_1) (m_2) par un champ magnétique réglable qui sélectionne les particules. Il est alors possible :

- d'observer et de photographier l'image filtrée de distribution des ions sélectionnés, sur un écran fluorescent ;
- de mesurer le courant ionique correspondant à ces ions.

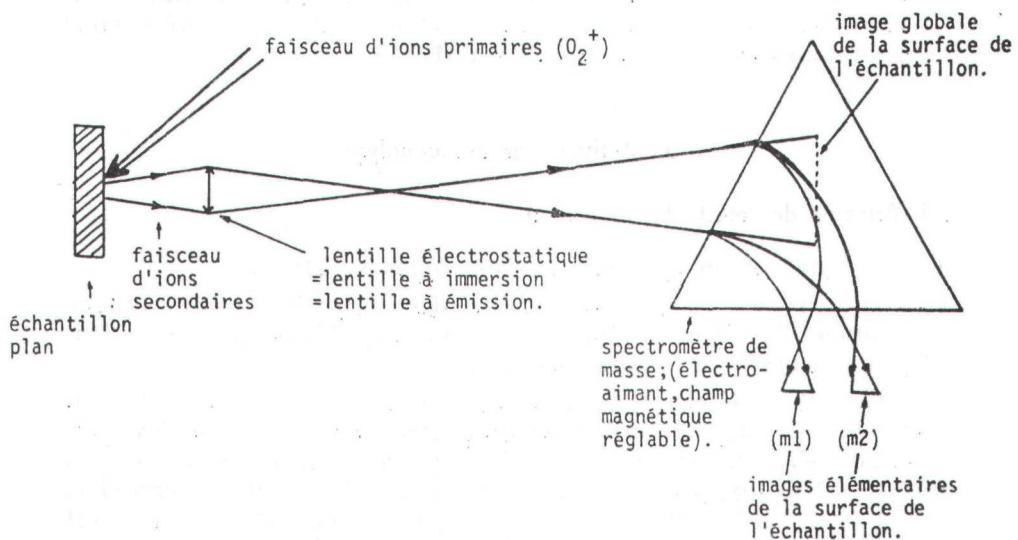


Fig. 3

Principe de la microanalyse par émission ionique secondaire.

Le couplage du défilement continu du champ magnétique et du papier d'enregistrement du spectre, permet l'obtention de spectrogrammes de masses.

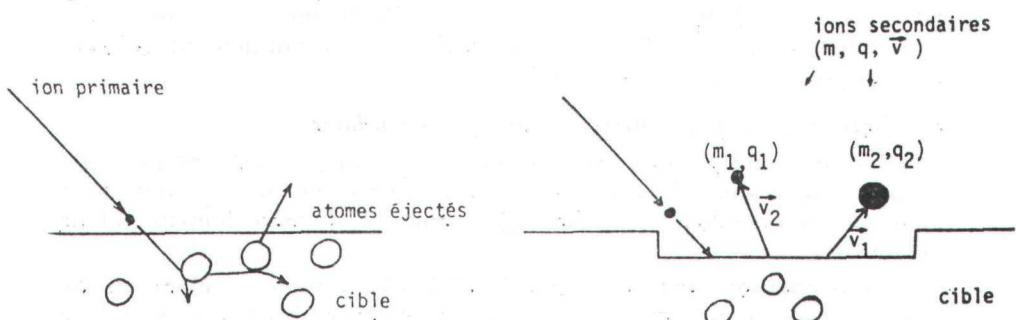


Fig. 4

Mécanisme de l'émission ionique secondaire.

Le mécanisme de l'émission ionique secondaire est le suivant : les ions primaires percutent les atomes de l'échantillon et ceux qui se trouvent au voisinage de la surface sont arrachés ; l'échantillon est pulvérisé (fig. 4).

Les particules quittent la cible sous forme neutre ou chargée (positivement ou négativement); ces dernières seulement (ions secondaires) peuvent être récupérées pour l'analyse : elles sont caractérisées par leur masse m , leur charge électrique q , leur vitesse v .

3.2. Appareils et conditions d'analyse

a) Microanalyse par spectrométrie des rayons X.

Deux microsondes électroniques à spectromètres dispersifs en longueur d'onde ont été utilisées : la « M S 46 » et le CAMEBAX.

- Microsonde M S 46 : l'intensité du rayonnement X émis par la cible est proportionnelle à l'intensité du courant de sonde ; la valeur habituellement utilisée est de 100 nA.
- Camebax : l'observation des coupes s'effectue par microscope électronique à transmission. La haute tension est réglée à 45 kV, le courant de sonde à 150 nA et le diamètre de sonde est de 500 nm environ. La détection des éléments est réalisée avec des spectromètres du type dispersif en longueur d'onde et équipés de cristaux (PET, TAP, LIF et ODPb).

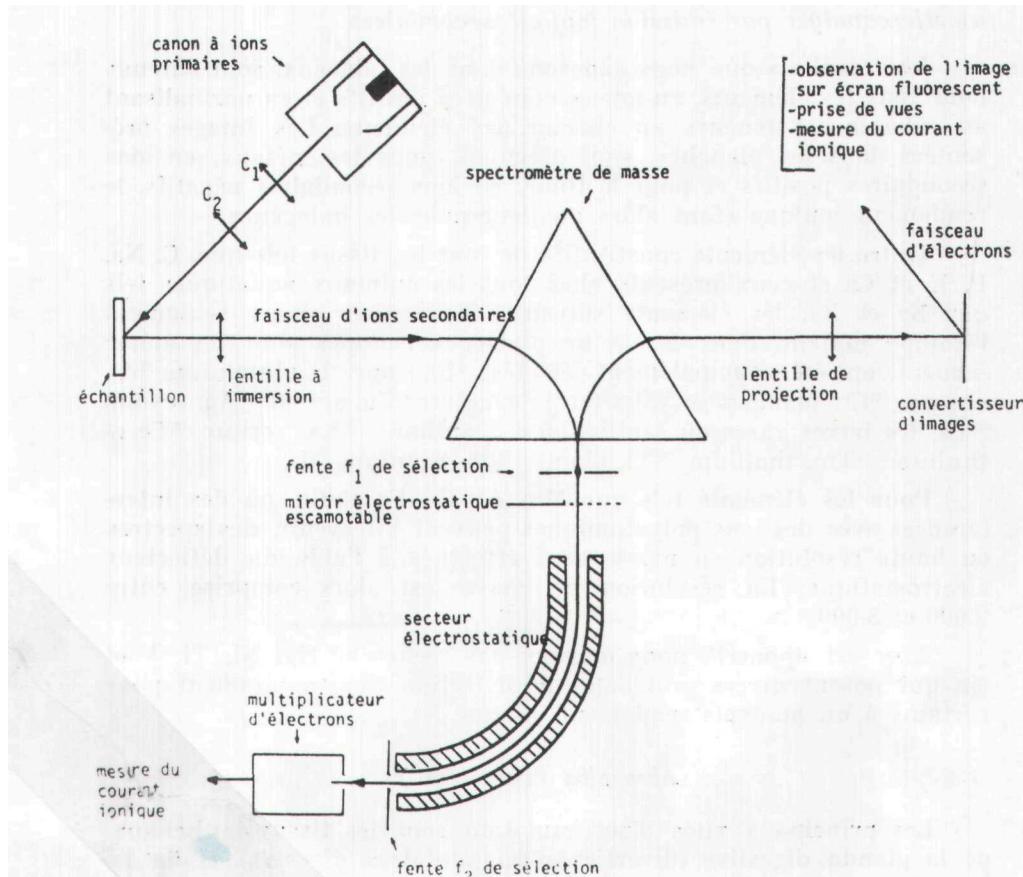


Fig. 5
Schéma de l'analyseur ionique SMI 300.

b) *Microanalyse par émission ionique secondaire.*

L'appareil S M I 300 comprend le canon à ions primaires, la lentille à immersion, le spectromètre de masse, le convertisseur d'images et le secteur électrostatique (fig. 5).

Les conditions d'analyse sont les suivantes : bombardement (O_2^+) (500 à 800 nA); 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.

RÉSULTATS

1. Résultats obtenus en microscopie optique

a) *Microanalyse par émission ionique secondaire.*

Les résultats que nous exposons dans les tableaux, sont obtenus pour tous les éléments, en ions secondaires positifs et en normalisant au calcium les teneurs en chacun des éléments. Les images présentées dans les planches, sont obtenues, pour les métaux, en ions secondaires positifs et pour le fluor, en ions secondaires négatifs, le rendement ionique étant alors meilleur pour les halogènes.

Outre les éléments constitutifs de tous les tissus tels que, C, Na, P, K et Ca et ceux présents chez tous les animaux aquatiques tels que Sr et Ba, les éléments suivants (dont nous citons seulement l'isotope majeur, dans le cas de plusieurs isotopes pour un même élément) ont été principalement détectés : 7Li , fluor ^{19}F , aluminium ^{27}Al , chrome ^{52}Cr , manganèse ^{55}Mn , fer ^{56}Fe , cuivre ^{63}Cu , argent ^{107}Ag , cézium ^{133}Cs , les terres rares ou lanthanides : lanthane ^{139}La , cerium ^{140}Ce et thulium ^{169}Tm , thallium ^{205}Tl , plomb ^{208}Pb , uranium ^{238}U .

Pour les éléments tels que Mn, Al, Cr, Fe et Cu, où des interférences avec des ions polyatomiques peuvent intervenir, des spectres en haute résolution en masse sont effectués à l'aide du déflecteur électrostatique. La résolution en masse est alors comprise entre 2.000 et 3.000.

Avec cet appareil, nous n'avons pas recherché Hg, Ni, Ti, V et Zn qui posent divers problèmes de détection dus, notamment pour certains à un mauvais rendement ionique.

Abra alba (Tab. 1 et 2)

Les principaux sites d'accumulation sont les tissus épithéliaux de la glande digestive (diverticules glandulaires digestifs) et de la branchie. Le manteau et les gonades constituent aussi des tissus de rétention. Les résultats sont donnés dans le tableau 1 (point A) et le tableau 2 (point E). Les éléments les plus abondants sont Al et Fe.

Viennent ensuite, Li, F, Cr, Mn, Cu, Ag, Cs et Pb. Il est à noter que les terres rares, La, Ce et Tm sont présentes dans tous les échantillons et particulièrement abondantes dans la branchie et la gonade des animaux prélevés au point A. Cette série de 3 éléments

TABLEAU 1

Abra alba (Baie de Seine, Point A) (*)

(*) TABLEAUX 1 à 7 : Intensité d'émission des éléments mis en évidence par micro-analyse par émission ionique (ions +), les teneurs sont exprimées par rapport au calcium.

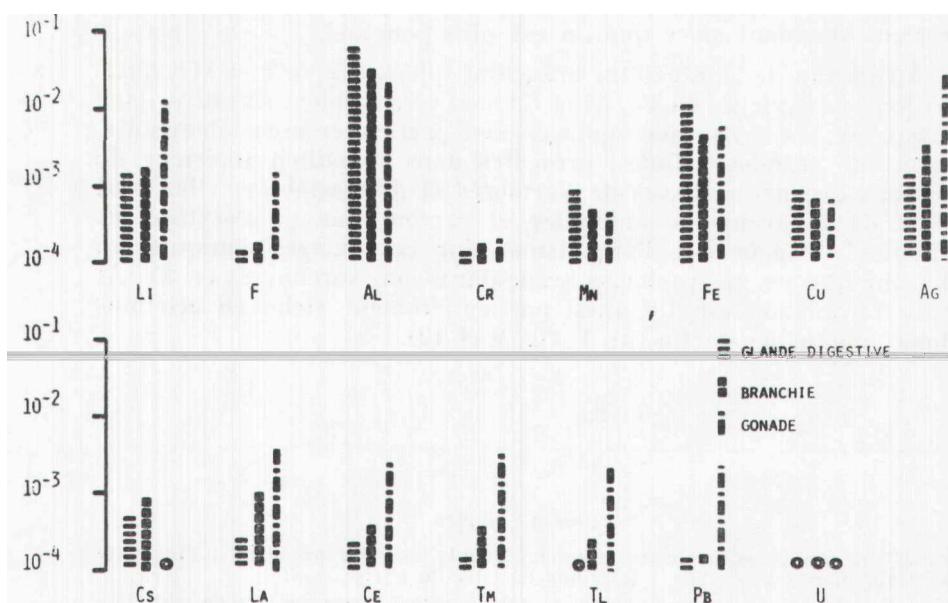
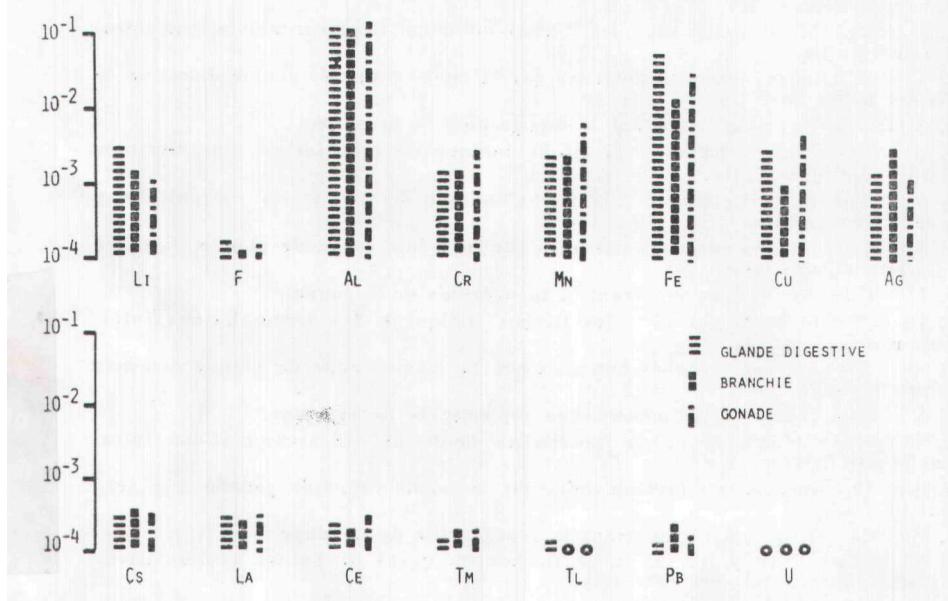


TABLEAU 2

Abra alba (Baie de Seine, Point E) (*)



mise à part et la présence plus importante de Fe au point E, il n'apparaît pas de différences significatives entre les bioaccumulations constatées au point A et celles constatées au point E.

L'obtention d'images ioniques permet la localisation exacte des éléments détectés. Pour toutes les coupes analysées et photographiées, on effectue toujours l'image Ca qui donne la topographie histologique.

Dans les diverticules de la glande digestive (pl. 2, fig. 1, 4, 7 et 10) on observe une répartition intracellulaire de Fe et Al particulièrement abondant alors que Cu est plus ponctuel.

Au niveau de l'épithélium branchial (pl. 2, Fig. 5, 8 et 11), quelques particules riches en Fe, Al et Cu sont observables; en outre, dans ce tissu, les hémocytes macrophages sont particulièrement abondants. Ce sont de grandes cellules, présentes dans le milieu intérieur de nombreux organes et tissus de Vertébrés et d'Invertébrés; elles sont douées de mouvements amiboïdes et captent par phagocytose les particules étrangères à l'organisme. Sur ces images ioniques on remarque que ces macrophages branchiaux sont surchargés en Fe, Al et Cu. La gonade est-elle aussi particulièrement riche en accumulations ponctuelles de Cu (pl. 1, fig. 9 et 12).

PLANCHE I : Gx240

Les chiffres donnés entre parenthèses indiquent, pour les premiers : l'intensité d'émission, pour les seconds : le temps de pose du cliché.

Fig. 1, 2, 3 : images ioniques obtenues sur la même coupe de glande digestive de *Cultellus pellucidus*.

Fig. 1 : $^{40}\text{Ca}^+$ (9.10^{-14} , 5 s.) montrant la topographie de la coupe.

Fig. 2 : $^{27}\text{Al}^+$ (5.10^{-15} , 100 s.) : les flèches indiquent les bioaccumulations intracellulaires d'aluminium.

Fig. 3 : $^{56}\text{Fe}^+$ (4.10^{-15} , 100 s.) : les flèches indiquent les bioaccumulations intracellulaires de fer.

Fig. 4, 5, 6 : images ioniques obtenues sur la même coupe de glande digestive de *Cultellus pellucidus*.

Fig. 4 : $^{40}\text{Ca}^+$ (10^{-13} , 5 s.) montrant la topographie de la coupe.

Fig. 5 : $^{27}\text{Al}^+$ (10^{-14} , 50 s.) : la flèche indique de très fortes concentrations d'aluminium intracellulaire.

Fig. 6 : $^{56}\text{Fe}^+$ (6.10^{-15} , 100 s.) : la flèche indique de très fortes concentrations de fer intracellulaire.

Fig. 7 et 10 : images ioniques obtenues sur la même coupe de glande digestive de *Cultellus pellucidus*.

Fig. 7 : $^{26}\text{CN}^-$ (10^{-13} , 5 s.) montrant la topographie de la coupe.

Fig. 10 : $^{19}\text{F}^-$ (6.10^{-15} , 100 s.) : les flèches indiquent des accumulations intracellulaires de fluor.

Fig. 8 et 11 : images ioniques obtenues sur la même coupe de glande digestive de *Cultellus pellucidus*.

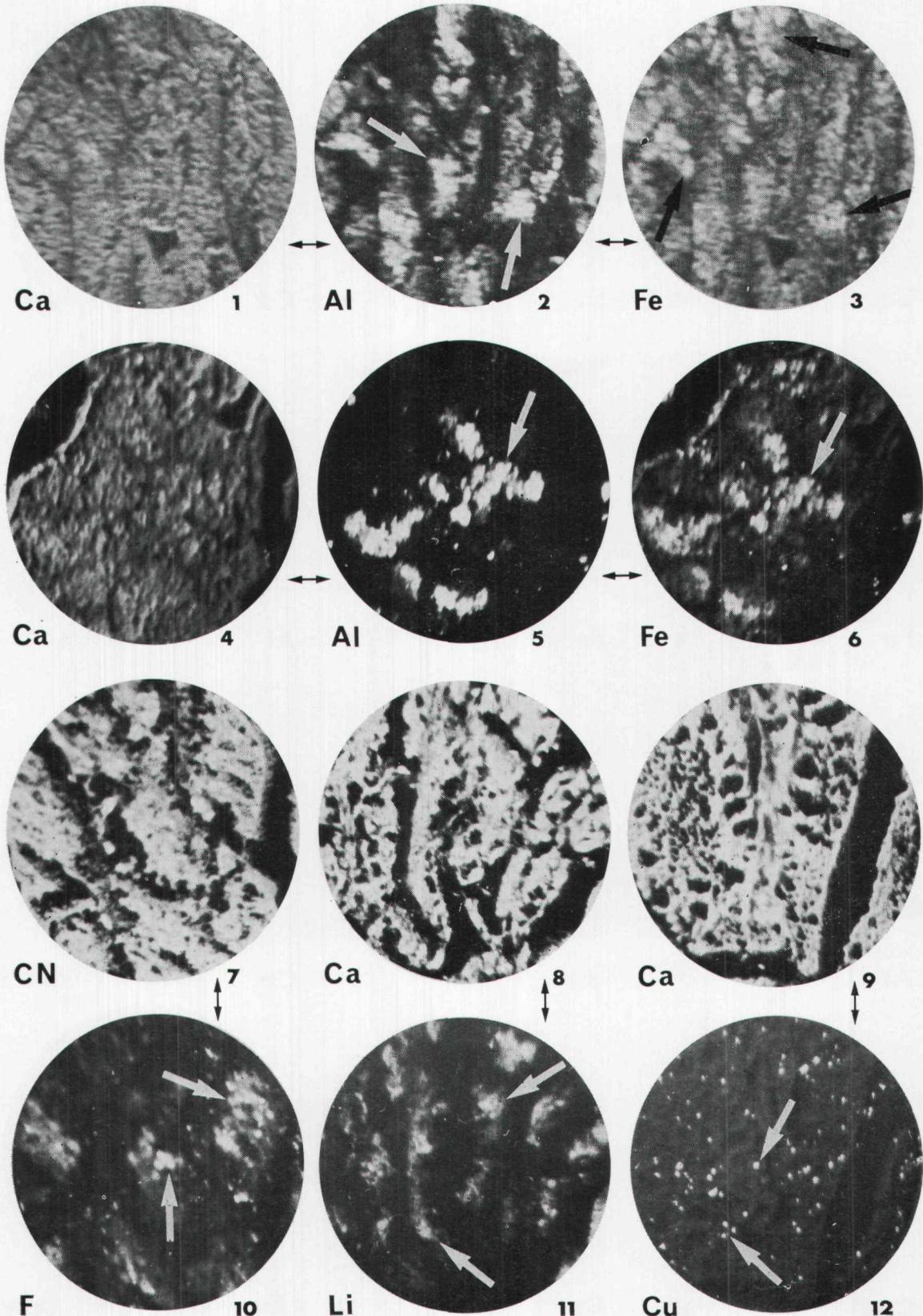
Fig. 8 : $^{40}\text{Ca}^+$ (2.10^{-13} , 5 s.) montrant la topographie de la coupe.

Fig. 11 : $^7\text{Li}^+$ (10^{-16} , 12 m.) : les flèches montrent des accumulations intracellulaires de lithium.

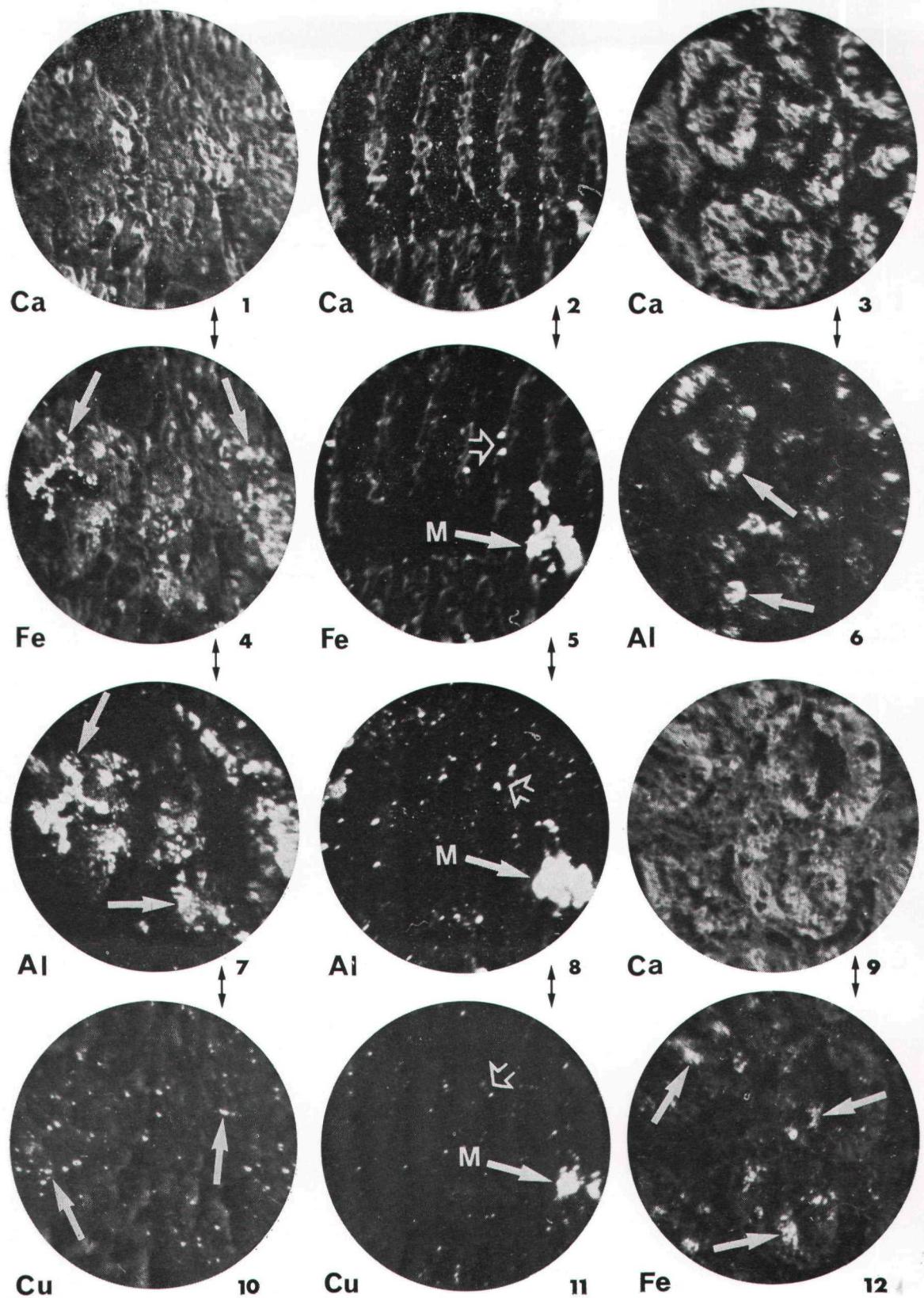
Fig. 9 et 12 : images ioniques obtenues sur la même coupe de gonade ♂ d'*Abra alba*.

Fig. 9 : $^{40}\text{Ca}^+$ (2.10^{-13} , 5 s.) montrant la topographie de la coupe.

Fig. 12 : $^{63}\text{Cu}^+$ (2.10^{-16} , 12 m.) : les flèches indiquent de petites accumulations ponctuelles intracellulaires de cuivre.



COLETTE CHASSARD-BOUCHAUD



COLETTE CHASSARD-BOUCHAUD

Cultellus pellucidus

Les tissus épithéliaux de la glande digestive (diverticules glandulaires digestifs) et de la branchie, sont les sites où les bioaccumulations les plus importantes sont constatées.

Manteau et gonade constituent aussi des sites de rétention.

Les résultats sont exposés dans le tableau 3.

Les éléments les plus abondants sont Al et Fe, Fe étant plus abondant au point E. Viennent ensuite, Lu, Cr, Mn, Cu, Ag, Cs, Tl et Pb. Les terres rares La, Ce et Tm sont présentes dans tous les échantillons. En outre, l'uranium est mis en évidence dans la majorité des organes.

Les images ioniques obtenues sur les coupes histologiques de cette espèce (pl. 1, fig. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 et 11) indiquent que cet organe est le site d'accumulations intracellulaires importantes d'Al, Fe, F et Li.

PLANCHE II : G X 240

Les chiffres donnés entre parenthèses indiquent, pour les premiers : l'intensité d'émission, pour les seconds : le temps de pose du cliché.

Fig. 1, 4, 7, 10 : images ioniques obtenues sur la même coupe de glande digestive *d'Abra alba*.

Fig. 1 : $^{40}\text{Ca}^+$ (2.10^{-14} , 20 s.) montrant la topographie de la coupe.

Fig. 4 : $^{56}\text{Fe}^+$ (2.10^{-15} , 3 m.) : les flèches indiquent les fortes concentrations de fer intracellulaire.

Fig. 7 : $^{27}\text{Al}^+$ (8.10^{-15} , 100 s.) : les flèches indiquent les fortes concentrations d'aluminium intracellulaire.

Fig. 10 : $^{63}\text{Cu}^+$ (2.10^{-16} , 12 m.) : les flèches indiquent de petites accumulations ponctuelles intracellulaires de cuivre.

Fig. 2, 5, 8 et 11 : images ioniques obtenues sur la même coupe de branchie *d'Abra alba*.

Fig. 2 : $^{40}\text{Ca}^+$ (2.10^{-14} , 20 s.) montrant la topographie de la coupe.

Fig. 5 : $^{56}\text{Fe}^+$ (3.10^{-16} , 10 m.) : la flèche creuse indique quelques particules de fer au niveau de l'épithélium branchial. La flèche pleine indique la présence de plusieurs macrophages (M) surchargés en fer.

Fig. 8 : $^{27}\text{Al}^+$ (5.10^{-16} , 8 m.) : la flèche creuse indique les particules d'aluminium au niveau de l'épithélium branchial. La flèche pleine indique la présence de plusieurs macrophages (M) surchargés en aluminium.

Fig. 11 : $^{63}\text{Cu}^+$ (2.10^{-16} , 12 m.) : la flèche creuse indique les particules de cuivre au niveau de l'épithélium branchial. La flèche pleine indique la présence de plusieurs macrophages (M) surchargés en cuivre.

Fig. 3 et 6 : images ioniques obtenues sur la même coupe de glande digestive de *Mytilus edulis*.

Fig. 3 : $^{40}\text{Ca}^+$ (2.10^{-14} , 20 s.) montrant la topographie de la coupe avec les diverticules de la glande digestive en section transversale.

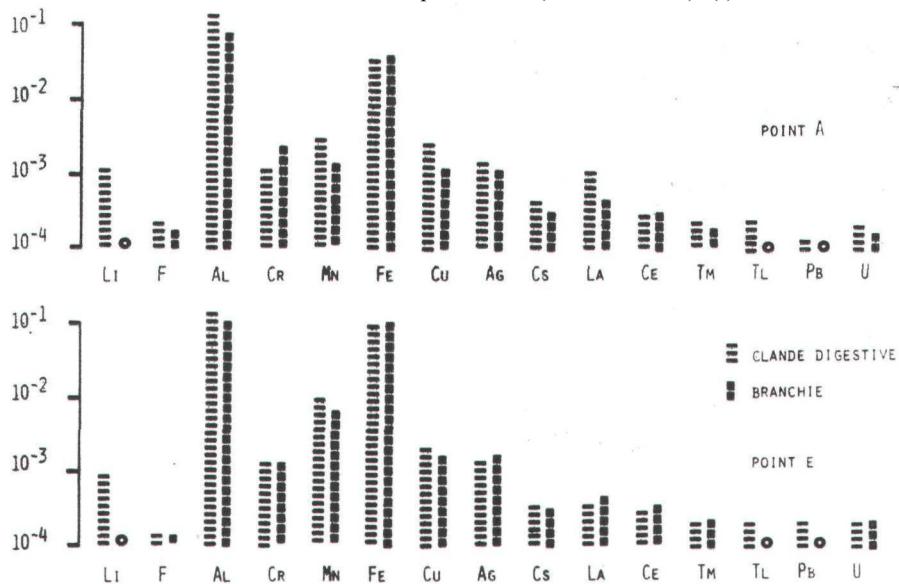
Fig. 6 : $^{27}\text{Al}^+$ (2.10^{-15} , 100 s.) : les flèches indiquent des bioaccumulations importantes d'aluminium dans l'épithélium des diverticules de la glande digestive.

Fig. 9 et 12 : images ioniques obtenues sur la même coupe de glande digestive de *Mytilus edulis*.

Fig. 9 : $^{40}\text{Ca}^+$ (2.10^{-14} , 20 s.) montrant la topographie de la coupe avec les diverticules de la glande digestive en section transversale.

Fig. 12 : $^{56}\text{Fe}^+$ (2.10^{-15} , 3 m.) : les flèches indiquent des bioaccumulations importantes de fer dans l'épithélium des diverticules de la glande digestive. Ces points fortement émissifs correspondent à des lysosomes riches en fer analogues à ceux montrés sur la micrographie électronique de la planche 3, figure 6.

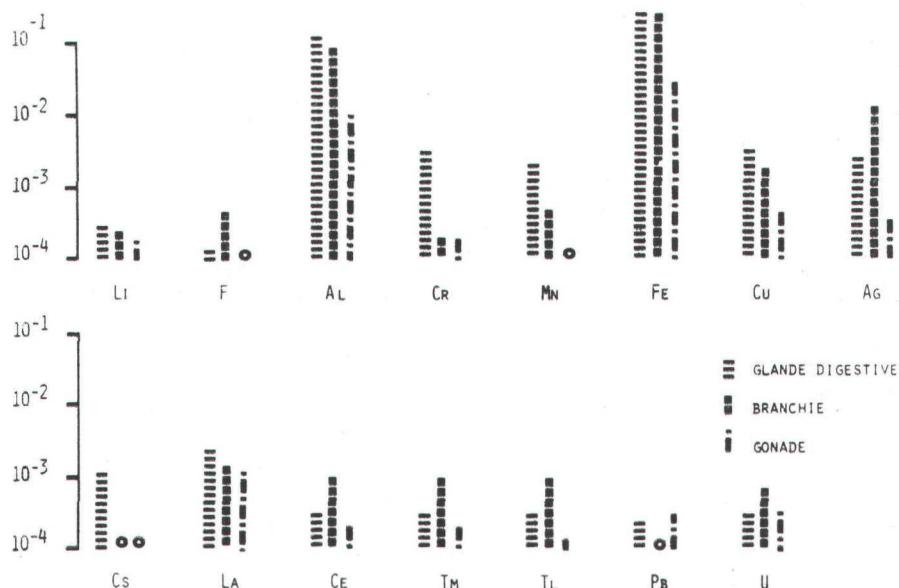
TABLEAU 3
Cultellus pellucidus (Baie de Seine) (*)



Mytilus edulis

Les tissus épithéliaux de la glande digestive (diverticules glandulaires digestifs), de la branchie, du palpe labial et la gonade sont les principaux sites d'accumulation. Dans le manteau et le rein, de nombreux éléments sont aussi détectés. Les résultats sont exposés dans le tableau 4.

TABLEAU 4
Mytilus edulis (Baie de Seine) (*)



Les éléments les plus abondants sont, comme chez les deux Lamellibranches précités, Al et Fe. Viennent ensuite : Li, F, Cr, Mn, Cu, Ag, Tl et Pb. Les teneurs en terres rares La, Ce et Tm ainsi qu'en F, Tl et U sont les plus élevées dans les branchies.

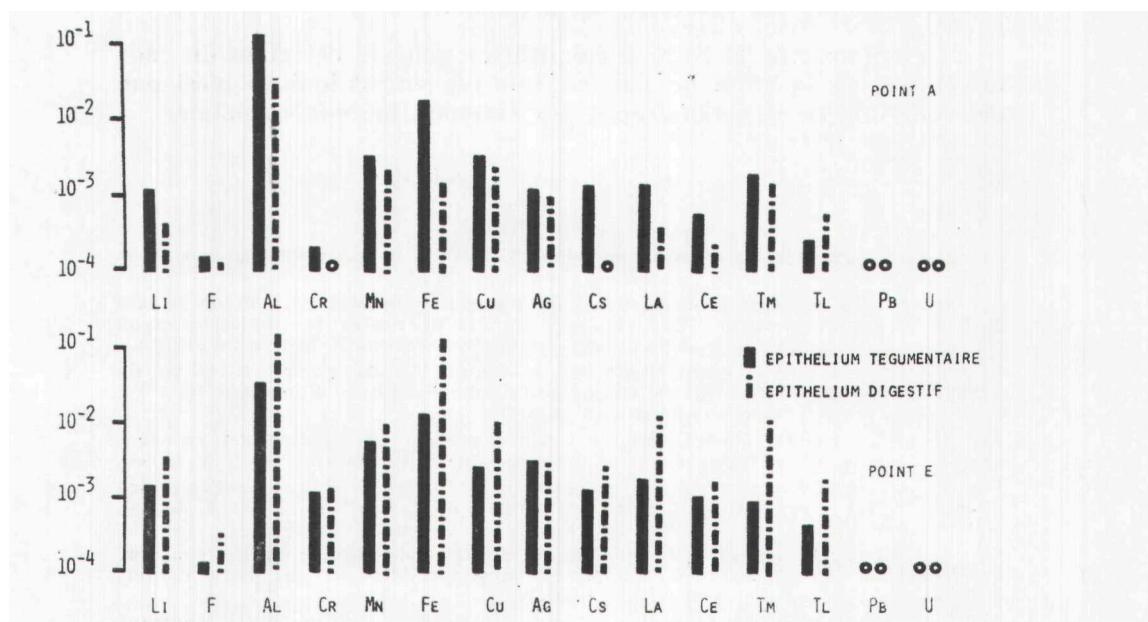
Les images ioniques obtenues sur les diverticules de la glande digestive montrent de fortes concentrations d'Al et Fe (pl. 2, fig. 3, 6, 9 et 12) ainsi que d'U (pl. 3, fig. 8 et 9) dans les cellules glandulaires épithéliales.

Owenta fusiformis

Les épithéliums tégumentaire et digestif sont les principaux sites de bioaccumulation. Les résultats sont exposés dans le tableau 5.

Al et Fe, sont, comme dans les cas précédents, les éléments les plus abondants. Pratiquement tous les éléments sont détectés à des teneurs généralement plus élevées dans les deux tissus, au point E qu'au point A. On détecte Li, F, Cr, Mn, Cu, Ag, Cs et Tl. Les teneurs en terres rares sont particulièrement importantes. Ni Pb, ni U n'ont été mis en évidence.

TABLEAU S
Oweniu fusiformis (Baie de Seine) (*)



La comparaison des teneurs de tous les éléments, relevées au point A et au point E fait nettement ressortir les faits suivants : au point A, les bioaccumulations sont toujours plus importantes dans l'épithélium tégumentaire, tandis qu'au point E, par contre, on constate l'état exactement inverse : les bioaccumulations sont plus importantes dans l'épithélium digestif avec des teneurs particulièrement élevées en lanthanides.

Crangon crangon

Les principaux sites d'accumulation sont la glande digestive (= hepatopancreas), la branchie, le muscle et l'exosquelette. Les résultats sont exposés dans le tableau 6.

Al et Fe sont les éléments les plus abondants mais à des teneurs nettement moins élevées que dans les 4 espèces précédemment étudiées et de plus, ils sont absents dans l'exosquelette. Viennent ensuite Li, Mn, Cu, Ag, Cs et Pb. F est présent à l'état de traces sauf dans l'exosquelette où sa teneur est notablement plus élevée. C'est dans l'exosquelette encore, que les teneurs en terres rares La, Ce et Tm ainsi qu'en U sont les plus élevées.

Palaemon serratus

Les principaux sites d'accumulation sont les mêmes que chez *C. crangon* : glande digestive, branchie, muscle et exosquelette. Les résultats sont exposés dans le tableau 7. Al et Fe sont toujours les éléments les plus abondants mais à un degré moindre que chez *C. crangon*, exception faite de leurs teneurs particulièrement élevées dans l'exosquelette, ce qui n'est pas le cas chez *C. crangon*. Les terres rares, absentes des branchies, sont peu abondantes dans les autres organes.

b) *Microanalyse par spectrométrie des rayons X*

La microsonde M S 46 a été utilisée pour la détection du cadmium qui, en fonction de son mauvais rendement ionique n'est pas détectable de façon satisfaisante, par émission ionique secondaire.

PLANCHE III

Fig. 1 : micrographie électronique de glande digestive de *Crangon crangon* montrant les sphérocristaux (S) intracellulaires. G X 26.000.

Fig. 2 : Enregistrements de la raie K α 1 du phosphore (cristal TAP) et de la raie M α 1 de l'uranium (cristal PET) obtenus sur les microaiguilles contenues dans le lysosome (L) de la figure 3, par spectographie des rayons X (sonde CAMEBAX). Fig. 3 : micrographie électronique de lysosome (L) de glande digestive de *Crangon crangon*, contenant des microaiguilles de phosphate d'uranium (U + P). G X 40.000. Matériel non osmié et non coloré.

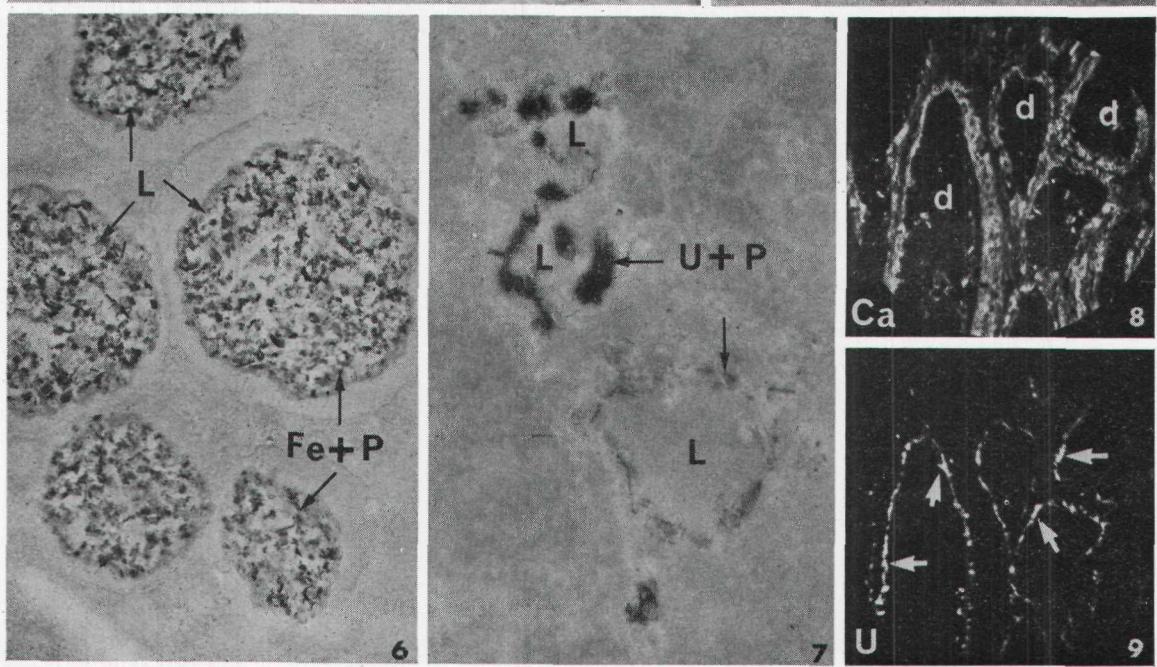
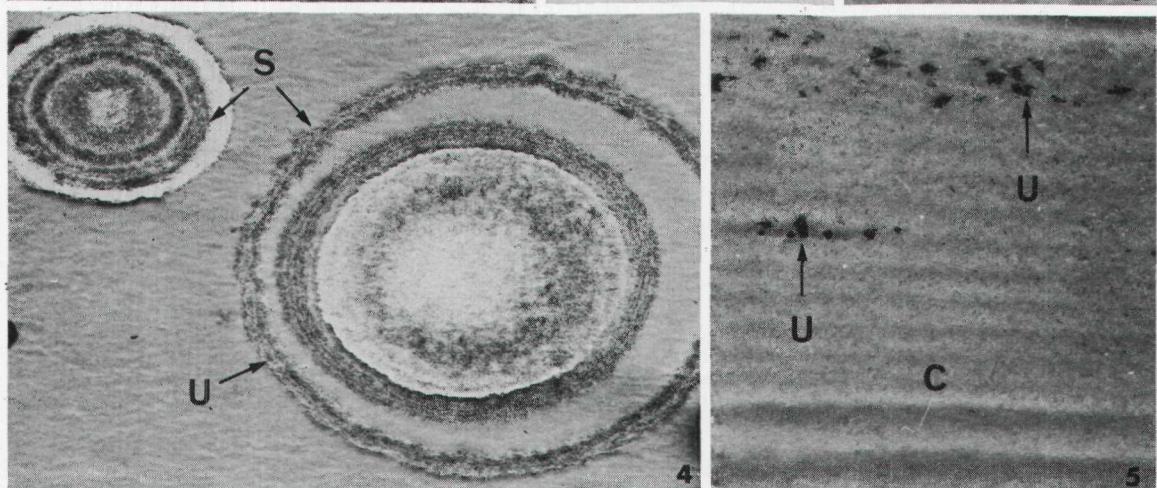
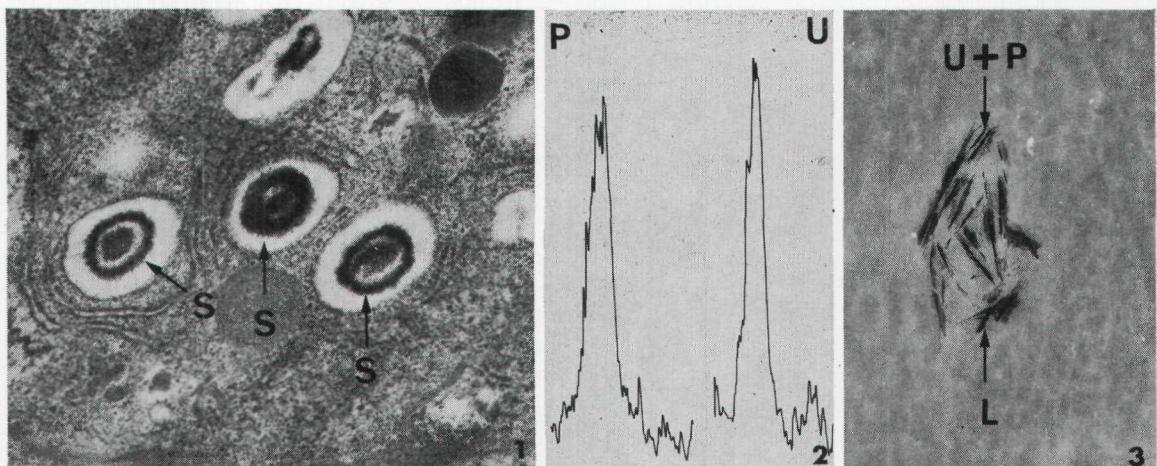
Fig. 4 : micrographie électronique de 2 sphérocristaux (S) de *Crangon crangon*, rejetés dans le milieu extracellulaire et contenant de l'uranium (U). G X 40.000. Fig. 5 : micrographie électronique de cuticule de *Crangon crangon* montrant des microprécipités d'uranium (U) entre les strates de la cuticule C. G X 40.000. Matériel non osmié et non coloré.

Fig. 6 : micrographie électronique de glande digestive de *Mytilus edulis* montrant les lysosomes (L) contenant de nombreux microprecipités de phosphate de fer. G X 20.000. Matériel non osmié et non coloré.

Fig. 7 : micrographie électronique de glande digestive de *Mytilus edulis* montrant des lysosomes (L) contenant de fines microaiguilles de phosphate d'uranium (U + P). G X 40.000. Matériel non osmié et non coloré.

Fig. 8 : image ionique de calcium ($^{40}\text{Ca}^+$) obtenue sur une coupe de diverticules (d) de glande digestive de *Mytilus edulis*, montrant la topographie générale. (4:10 $^{-6}$, 10 s.) (G X 200).

Fig. 9 : image ionique d'uranium ($^{238}\text{U}^+$) obtenue sur la même coupe de glande digestive de *M. edulis* que dans la figure 8. Les flèches indiquent des bioaccumulations ponctuelles d'uranium dans l'épithélium glandulaire; ces points fortement émissifs correspondent à des lysosomes, riches en uranium, analogues à ceux montrés sur la figure 7 de cette planche. 2.10 $^{-6}$, 10 m.) (G X 200).



COLETTE CHASSARD-BOUCHAUD

Parmi les espèces examinées, seules *Abra alba*, *Mytilus edulis* et *Crangon crangon* ont donné les résultats positifs exposés dans le tableau 8.

Chez *A. alba*, le métal n'est détecté que dans la branchie.

TABLEAU 6
Crangon crangon (Baie de Seine) (*)

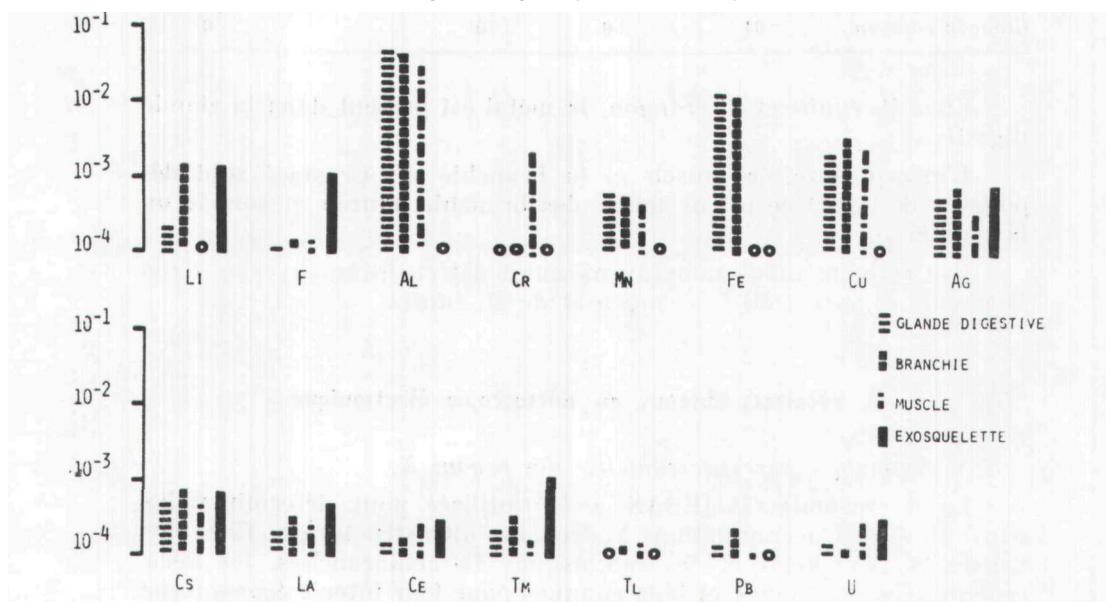


TABLEAU 7
Palaemon serratas (Baie de Seine) (*)

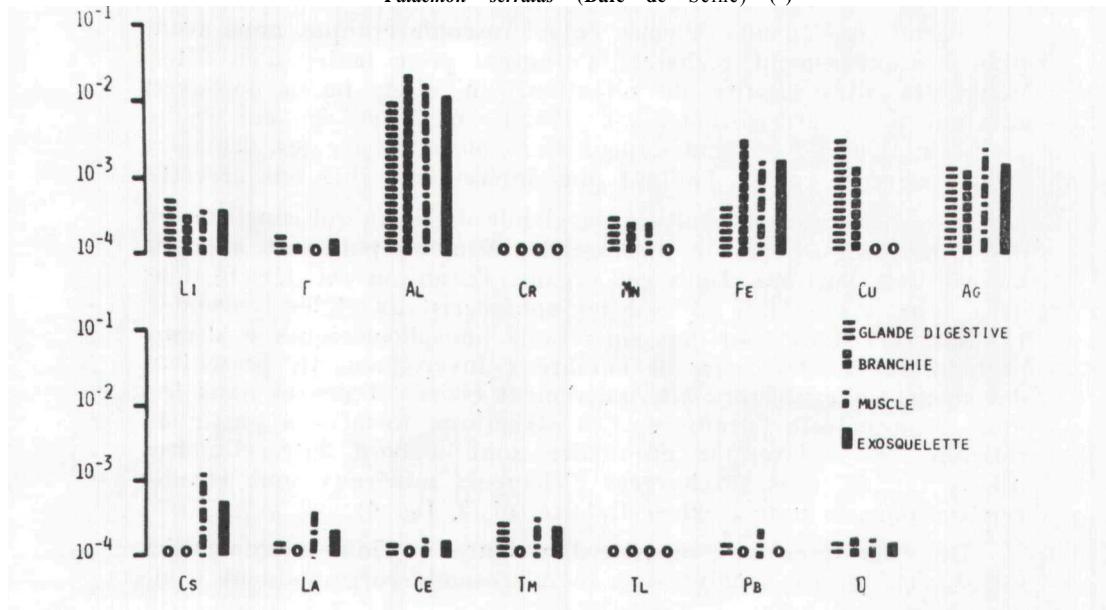


TABLEAU 8

Détection du cadmium par spectrographie des rayons X (microsonde de Castaing) dans les organismes de la baie de Seine, nombre de chocs enregistrés pendant un temps de comptage de 30 secondes.

	Glande digestive	Branchie	Muscle	Gonade	Exosquelette
<i>Abra alba</i>	0	189			
<i>Mytilus edulis</i>	69	0	0	0	
<i>Crangon crangon</i>	64	0	0		0

Chez *M. edulis* et *C. crangon*, le métal est présent dans la glande digestive.

L'exosquelette, le muscle et la branchie du Crustacé sont dépourvus de Cd; il en est de même des branchie, muscle et gonade de la moule.

Par cette méthode nous avons aussi détecté titane et zinc dans la glande digestive de *C. crangon* et de *M. edulis*.

2. Résultats obtenus en microscopie électronique

Microanalyse par spectrométrie des rayons X.

La microsonde CAMEBAX a été utilisée pour déterminer les sites électifs d'accumulation à l'échelle ultrastructurale. Chez les Crustacés Décapodes et les Mollusques Lamellibranches, les deux espèces très communes et bien connues pour leur intérêt économique et qui pour ces raisons ont été choisies, sont *C. crangon* et *M. edulis*.

Crangon crangon

Parmi les éléments détectés en microscopie optique, nous avons plus particulièrement recherché l'uranium pour tenter d'en déterminer les sites électifs de rétention. En effet, on a découvert récemment (Chassard-Bouchaud, 1982 b) que cet élément radioactif, émetteur de particules, peut être concentré par les Crustacés et sa recherche en est d'autant plus intéressante chez une crevette.

Parmi les organes analysés, la glande digestive qui constitue un des principaux organes de stockage des éléments polluants, a donné les résultats suivants. Dans cet organe, l'uranium est détecté dans deux types d'organites cibles : les sphérocristaux et les lysosomes. Les sphérocristaux sont des concréctions phosphocalciques à stroma protéique et existant chez de nombreux Invertébrés; ils présentent des strates concentriques alternativement claires et denses dans lesquelles on détecte l'uranium. Ces structures formées à partir du reticulum endoplasmique granulaire sont d'abord intracellulaires (pl. 3, fig. 1), puis surchargées d'éléments minéraux sont ensuite rejetées dans le milieu extracellulaire (pl. 3, fig. 4).

Dans les lysosomes, on note l'existence de fines microaiguilles (pl. 3, fig. 3) qui, analysées à la microsonde correspondent à de

TABLEAU 9
Principales caractéristiques des méthodes de microanalyse

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 électronique - 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 : 1.000 Å
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 : 0,5 µm

l'uranium toujours associé à du phosphore d'après les spectres obtenus (pl. 3, fig. 2) par enregistrement de la raie Mal de l'uranium (cristal PET) et de la raie K α 1 du phosphore (cristal TAP).

L'uranium est aussi détecté dans l'exosquelette (pl. 3, fig. 5) sous forme de microprécipités localisés dans les espaces situés entre les strates de la cuticule.

Mytilus edulis

Dans cette espèce, nous avons aussi recherché l'uranium, pour comparer les résultats avec ceux obtenus sur *C. crangon*. Nous avons vu que ce métal, détecté par analyse ionique dans l'épithélium des diverticules de la glande digestive (pl. 3, fig. 8 et 9) s'y présente sous forme d'accumulations ponctuelles. Ces accumulations ponctuelles correspondent à des lysosomes et d'après les informations obtenues par spectrométrie des rayons X l'uranium y est toujours associé à du phosphore (pl. 3, fig. 7); la membrane des lysosomes est ensuite détruite, libérant dans le milieu extracellulaire les précipités insolubles de phosphate d'aluminium.

On note en outre l'existence, dans ce même épithélium glandulaire, d'autres lysosomes particulièrement abondants, présentant des accumulations figurées d'aspect différent (pl. 3, fig. 6) et qui correspondent à du fer, présent comme on le sait à des teneurs élevées dans cet organe (tab. 4) (pl. 2, fig. 9 et 12).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

La microanalyse des organismes benthiques de la Baie de Seine montre que Lamellibranches, Polychètes et Crustacés Décapodes bioaccumulent à des degrés divers les métaux suivants : lithium, aluminium, chrome, manganèse, fer, titane, zinc, cuivre, argent, thallium, plomb, uranium, lanthane, cerium et thulium, ces trois derniers éléments appartenant aux lanthanides. Ils bioaccumulent aussi un halogène, le fluor, dont nous avons vu que le site électif de rétention, notamment chez le Décapode *C. crangon*, est l'exosquelette. Cet élément étant un des principaux constituants des phosphogypses, il n'est pas surprenant qu'on le trouve chez des organismes récoltés dans cette zone de rejet. On sait qu'il s'accumule dans le tissu osseux des Vertébrés et on a montré expérimentalement sa concentration dans les ostéoblastes de Poissons et dans la cuticule de la crevette *Penaeus japonicus* (Chassard-Bouchaud, 1982d).

Certains métaux comme fer, cuivre, manganèse et chrome sont des oligoéléments indispensables aux organismes, soit qu'ils interviennent dans le métabolisme enzymatique, soit qu'ils aient des fonctions physiologiques précises comme c'est le cas du cuivre ; c'est un constituant du pigment respiratoire des Mollusques et des Crustacés : l'hémocyanine. Nos résultats montrent en effet une

concentration de cuivre chez ces Invertébrés en accord avec les observations de Amiard-Triquet *et al.* (1983) faites dans l'estuaire de la Loire. Cependant nos images ioniques montrent des accumulations ponctuelles de cuivre qui s'ajoutent à la forme dissoute non visible : elles correspondent à des concentrations intracellulaires particulièrement importantes chez les Lamellibranches.

Le fer est, lui aussi un constituant du pigment respiratoire, mais le métal se présente dans nos échantillons sous forme d'importantes accumulations figurées. On sait que les déchets de fabrication du dioxyde de titane contiennent des particules d'oxyde ferrique hydraté dont les effets nocifs ont été étudiés chez *Mytilus edulis*; en effet, Winter (1972) a montré les conséquences létales de ces rejets toxiques sur la moule. Lors de nos analyses, le fer a été détecté chez toutes les espèces, dans tous les tissus, à l'exception de *C. crangon* où il est absent du muscle et de l'exosquelette, mais présent dans la glande digestive et la branchie.

Le chrome est un métal indispensable aux Invertébrés et Vertébrés chez lesquels il joue un rôle notamment dans le métabolisme de l'insuline: Cependant certains composés hexavalents et même trivalents sont très nocifs. Détecté chez tous les organismes analysés, à l'exception de *Palaemon serratus*, il est abondant chez certains Lamellibranches et dans le muscle (partie comestible) de *C. crangon*.

D'une façon générale, on sait que, pour tous les éléments, leur toxicité dépend évidemment de leurs concentrations et de leurs formes physicochimiques.

Les éléments tels que lithium, aluminium, argent, césum, thallium, plomb et uranium ainsi que les terres rares : lanthane, cerium et thulium n'ont pas de rôle physiologique connu et sont à des degrés variables, plus ou moins toxiques.

Le lithium qui est le plus léger des métaux, n'est pas un élément couramment évoqué dans le domaine de la biologie marine. Utilisé comme tranquillisant en thérapeutique humaine, il est cependant毒ique à des doses relativement faibles (Danielson *et al.*, 1984). Sa présence dans les organismes marins couramment ingérés par l'homme (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1984 a), pose le problème de son éventuel impact du point de vue économique. Le rôle et la toxicité de l'aluminium ne sont pas déterminés chez les animaux aquatiques alors que chez l'homme, ce métal provoque des encéphalopathies (Duckett *et al.*, 1977).

Plomb et cadmium sont extrêmement toxiques même à des concentrations infimes. On ne connaît pas les conséquences de la présence de plomb dans l'évolution ultérieure de la gonade du Lamellibranche *A. alba* ni celles de la présence de cadmium dans la moule commune et dans la crevette grise; chez ces deux espèces, la glande digestive est le principal organe de bioaccumulation du cadmium, conformément à ce que nous avions antérieurement démontré (Chassard-Bouchaud, 1981 et 1982a).

La détection d'uranium dans les organismes aquatiques est récente. D'abord décelé dans les branchies de Morues *Gadus morhua*

capturées en Mer du Nord (Chassard-Bouchaud 1982 c) il l'a été ensuite dans les Crustacés Décapodes (Chassard-Bouchaud, 1984) et dans des moules de la Manche (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1983) avec les plus fortes concentrations dans la zone comprise entre le Pas-de-Calais et la côte est du Cotentin, alors que les spécimens de Roscoff en sont dépourvus. Confirmant ces premières données, nos résultats montrent que ce métal radioactif est accumulé aussi par un autre Lamellibranche *C. pellucidus* et par les crevettes *C. crangon* et *P. serratus*.

La capacité de bioaccumulation des terres rares par les organismes marins a été signalée depuis longtemps (Kameda, 1962) mais leur métabolisme était inconnu. Nous avons montré que le crabe *Carcinus maenas* récolté sur les côtes françaises de la Manche concentre le thulium (Chassard-Bouchaud *et al.*, 1984 b) avec comme site principal de rétention, l'exosquelette; les moules récoltées dans la même zone accumulent le lanthane (Chassard-Bouchaud et Hallegot, 1984); ainsi les résultats présents relatifs à la moule et aux crevettes chez lesquelles la cuticule est le site électif de rétention de lanthane, cerium et thulium sont en accord avec les données précédemment acquises.

Il convient de comparer nos résultats avec ceux obtenus par des méthodes d'analyse globale, résultats obtenus sur des *Mytilus edulis* prélevées aussi dans la Manche, mais sur les côtes sud de l'Angleterre (Segar *et al.*, 1971). Les valeurs obtenues sur les parties molles des moules sont les suivantes, exprimées en $\mu\text{g g}^{-1}$ de poids sec : Fe : 1700, Mn : 3,5, Cu : 9,6, Pb : 9,1, Ag : 0,003, Cr : 1,5 et Al : 1230. Les fortes teneurs, en ordre décroissant pour Fe, Al, Cu et Pb sont tout à fait en accord avec les nôtres; par contre, nos résultats montrent des teneurs plus élevées, pour Mn, Cr et surtout Ag particulièrement abondant.

A l'échelle ultrastructurale, nos investigations portant sur l'uranium ont montré que chez les Crustacés et les Mollusques, lysosomes et sphérocristaux présents dans les épithéliums sont les organites cibles de concentration du métal.

Dans les lysosomes, l'uranium, toujours associé à du phosphore, précipite sous forme de phosphate insoluble : ceci correspond à une réaction enzymatique d'activité phosphatasique acide (Galle et Berry, 1980). Les hématocytes macrophages interviennent ensuite pour la capture, le transport et l'excration des déchets rejetés par les corps résiduels hors de la cellule (Chassard-Bouchaud et Escaig, 1984). En ce qui concerne les sphérocristaux, d'abord intracellulaires, ils sont ensuite rejetés hors de la cellule lorsqu'ils sont surchargés d'éléments toxiques.

Chez les Crustacés, à ces deux types d'organites de concentration des polluants, s'ajoute la cuticule qui constitue un autre site électif de rétention, donc de l'élimination à chaque exuviation des éléments qui y sont bioaccumulés.

En conclusion, Mollusques et Crustacés sont capables d'extraire du milieu marin, des métaux y existant sous forme soluble; à l'état de trace. Ils les concentrent ensuite dans des structures spécialisées :

exosquelette, lysosomes et sphérocristaux, sous forme de précipités insolubles, de moindre toxicité avant de les éliminer. Ces processus assurent ainsi la détoxication de l'espèce.

Dans les organismes benthiques de la Baie de Seine, on retrouve les éléments contenus dans les rejets de phosphogypse et de résidus de fabrication d'oxyde de titane, notamment uranium et lanthanides abondants dans cette zone, alors que les teneurs dans les organismes récoltés en Manche, en dehors de cette zone sont nettement plus faibles.

Si on compare les résultats obtenus au point E, le plus proche de l'estuaire et le plus perturbé, avec ceux obtenus au point A, les remarques suivantes peuvent être faites. Peu de différences significatives apparaissent chez *C. pellucidus* et *A. alba*, exception faite chez cette dernière espèce de concentration importante de terres rares dans les individus récoltés au point A et de chrome, manganèse, fer et cuivre dans les individus récoltés au point E.

Par contre, chez *O. fusiformis*, polychète sédentaire, l'épithelium tégumentaire est le site électif d'accumulation de tous les éléments au point A, alors qu'au point E, c'est l'épithélium digestif qui est le site prédominant. Nul doute que la nature physicochimique du milieu : turbidité, ph, salinité... sont autant de paramètres devant intervenir dans le métabolisme des métaux, désignant ainsi *O. fusiformis* comme une espèce particulièrement sensible aux variations du milieu.

En conclusion, la microanalyse qui permet la détection et la localisation à l'échelle cellulaire et subcellulaire des éléments les plus légers, comme le lithium, jusqu'aux éléments les plus lourds, comme l'uranium, nous apporte des données précises sur le métabolisme des métaux.

Ces méthodes sont encore peu utilisées actuellement pour des recherches sur les organismes marins : des études portant sur le métabolisme du fer sont actuellement en cours, sur le bigorneau, à l'échelle structurale et ultrastructurale (Lautié *et al.*, 1983).

Les données que nous avons obtenues permettent de montrer que les mécanismes sont les suivants : absorption par voie branchiale, tégumentaire et digestive, stockage et concentration essentiellement dans la glande digestive et l'exosquelette, puis excrétion. Parmi les résultats il convient de souligner le comportement similaire des lanthanides et des actinides dans les systèmes biologiques. Ceci est vraisemblablement dû au fait que, ces deux séries qui appartiennent à la même colonne de la classification périodique des éléments (colonne III a), ont des similitudes de configurations électroniques de leurs atomes.

Remerciements

L'auteur tient à remercier l'équipage du Pluteus II, F. Gentil et P. Noël pour les récoltes de matériel ainsi que M.F. Baucher, P. Boumati, F. Escaig, P. Hallegot, S. Halpern et F. Kleinbauer pour leur collaboration scientifique et technique.

Summary

Two microanalytical methods have been used: X ray emission at the light and electron microscope levels and secondary ion emission at the light microscope level, to detect *in situ* on histological sections, the elements stored within benthic organisms of the Seine Bay,

The following species were investigated: Bivalves: *Abra alba*, *Cultellus pellucidus* and *Mytilus edulis* (common mussel); Polychetes: *Owenia fusiformis*; Crustacean decapoda: *Crangon crangon* (shrimp) and *Palaeomon serratus* (prawn).

The following elements were detected: lithium, fluorine, aluminium, chromium, manganese, iron, titanium, zinc, copper, silver, cesium, cadmium, thallium, lead, uranium and the lanthanides: lanthanum, cerium and thulium; all these elements are present within phosphogypsum and titanium dioxide industrial wastes which are daily released into the Seine Bay. Tissues and organs storage are the following. Bivalves: digestive gland, gill and gonad; Polychetes: integument and digestive epithelia; Crustacean: digestive gland, gill, muscle and exoskeleton.

At the ultrastructural level, we have shown that the target organelles are spherocrystals and lysosomes where most of the elements, uptaken under a soluble form, at trace level, are then concentrated under the form of an insoluble phosphate.

The cuticle which is shed at the ecdysis, residual bodies and spherocrystals which are extruded out of the cells, appear to play a fundamental role in the detoxication processes.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

- AMIARD-TRIQUET, C., AMIARD, J.C., ROBERT, J.M., MÉTAYER, C., MARCHAND, J. et MARTIN, J.L., 1983. — Etude comparative de l'accumulation de quelques oligoéléments métalliques dans l'estuaire interne de la Loire et les zones néritiques voisines (Baie de Bourgneuf). *Cahiers de Biologie Marine*, 24, pp. 105-118.
- BOUST, D., 1981. — Les métaux traces dans l'estuaire de la Seine et ses abords. *Thèse de 3^e cycle*, C.E.A., Laboratoire de radioécologie marine de Cherbourg, pp. 1-207.
- CABIOCH, L., 1983. — Etude intégrée de la Baie de Seine. *Courrier du C.N.R.S.*, suppl. au n° 52, pp. 40-46.
- CABIOCH, L. et GENTIL, F., 1975. — Distribution des peuplements benthiques de la partie orientale de la Baie de Seine. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 280, série D, pp. 571-574.
- CASTAING, n., 1951. — Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle et cristallographique. *Thèse de Doctorat d'Etat*, Onera ed. Paris.
- CASTAING, n. et SLODZIAN, G., 1962. — Microanalyse par émission ionique secondaire. *J. de Microscopie*, 1, pp. 395-410.
- C.E.A., Centre d'Etudes Nucléaires de Grenoble, 1977. — Analyses effectuées pour la « Commission de lutte contre la pollution marine en Baie de Seine ».
- CHASSARD-BOUCHAUD, c, 1981. — Rôle des lysosomes dans le phénomène de concentration du cadmium. Microanalyse par spectrographie de rayons X. *C.B. Acad. Sc. Paris*, 293, série III, pp. 261-265.
- CHASSARD-BOUCHAUD, c, 1982 a. — Localisation ultrastructurale du cadmium dans la glande digestive du crabe *Carcinus maenas* (Crustacé Décapode). Microanalyse par spectrographie de rayons X. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 294, série III, pp. 153-157.
- CHASSARD-BOUCHAUD, c, 1982 b. — Concentration de l'uranium par les Crustacés. Etude structurale, ultrastructurale et microanalytique par émission ionique secondaire et par spectrographie de rayons X. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 294, série III, pp. 919-924.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C., 1982 c. — Ulcérations des Poissons et Mammifères marins péchés dans les eaux côtières françaises : épidémiologie. Etude microanalytique., *Contrat C.N.E.X.O.*: n° 79 2126.

- CHASSARD-BOUCHAUD, c, 1982 d. — Etude expérimentale des effets toxiques des fluorures et des phosphogypses. Etude microanalytique. *Contrat C.N. E. X. O.* n° 79 2126.
- CHASSARD-BOUCHAUD, c, 1984. — Secondary Ion Emission Microanalysis Applied to the Uranium Detection in Aquatic Organisms. *Secondary Ion Mass Spectrometry SIMS IV*, ed. by Benninghoven, Okano, Shimizu and Werner. Springer Verlag ed. Berlin, Tokyo, pp. 492-494.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C., CALMET, D., ESCAIG, F. et KLEINBAUER, F., 1983. — Bioaccumulation d'uranium par des moules *Mytilus edulis* récoltées sur les côtes françaises de la Manche et contamination expérimentale. Microanalyse par émission ionique secondaire. *C.R. Acad. Se. Paris*, 296, série III, pp. 1095-1100.
- CHASSARD-BOUCHAUD, c. and ESCAIG, F., 1984. — Uptake, storage and excretion of uranium by *Mytilus edulis*. A structural, ultrastructural and microanalytical study by secondary ion emission and X ray spectrometry. *Journal de Physique*, 2, 45, pp. 545-548.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C., GALLE, P., ESCAIG, F. et MIYAWAKI, M., 1984 a. — Bioaccumulation de lithium par les organismes marins des zones côtières européennes, américaines et asiatiques : étude microanalytique par émission ionique secondaire. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 299, III, 18, pp. 719-724.
- CHASSARD-BOUCHAUD, c. et HALLEGOT, p., 1984. — Bioaccumulation de lanthane par des moules *Mytilus edulis* récoltées sur les côtes françaises. Microanalyse par spectrométrie de rayons X et par émission ionique secondaire. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 298, n° 20, série III, pp. 567-574.
- CHASSARD-BOUCHAUD, c. and HALLEGOT, p. and MEIGNAN, M., 1984 b. — 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. *Journal de Physique*, 2, 45, pp. 541-544.
- DANIELSON, D.A., JICK, H., PORTER, J.B., PERERA, D.R., HUNTER, J.R. and WERRBACH, J.H., 1984. — Drug toxicity and hospitalization among lithium users. *J. of Clinical Psychopharmacology*, 4, 2, pp. 108-110.
- DUCKETT, s., GALLE, p., ESCOUROLLE, R., POIRIER, J. and HAUW, H., 1977. — Presence of zinc, aluminium, magnesium in striopallidodentate (SPD) calcifications (Fahr's disease). *Acta Neuropath.* (Berlin), 38, p. 7.
- GALLE, p., 1974. — Cellular microanalysis : a comparison between electron microprobe and secondary ion emission microanalysis. In « *Microprobe analysis as applied to cells and tissues* », Académie Press London, London, pp. 89-105.
- GALLE, P., 1982. — Tissue localization of stable and radioactive nuclides by secondary ion microscopy. *J. Nucl. Med.* 23, pp. 52-57.
- GALLE, P. and BERRY, J.P., 1980. — The role of acid phosphatases in the concentration of some mineral elements in lysosomes. *Electron Microscopy*, 3, pp. 92-93.
- GENTIL, F., 1976. — Distribution des peuplements benthiques en Baie de Seine. *Thèse 3^e cycle Université Paris VI*, pp. 1-70.
- GRECO, 19, 1982. — Groupes de recherches coordonnées « Manche ». Rapport d'activité n° 2.
- KAMEDA, K., 1962. — Study on abundance of rare earth elements in marine organisms. *J. of Rad. Research.* 3, 2, pp. 89-103.
- LAUTÉ, N., HALPERN, s. et MARTOJA, M., 1983. — Accumulation cyclique de fer et de quelques autres éléments dans le testicule de *Littorina littorea* (L) (Gastéropode Prosobranche). *Int. J. Invert. Reprod.* 6, pp. 327-337.
- PRONIEWSKI, F. et ELKAIM, B., 1980. — Benthos subtidal de l'estuaire de la Seine. Résultats préliminaires. *C.R. Acad. Sc. Paris*, 291, série D, pp. 545-547.
- SEGAR, D.A., COLLINS, J.D. et RILEY, J.P., 1971. — The distribution of the major and some minor elements in marine animals. II Molluscs. *J. of the Mar. Biol. Ass. Unit. Kingdom*, 51, pp. 131-6.
- WINTER, J.E., 1972, in « *Marine Pollution and Sea Life* », M. Ruwae, ed. *Fishing News (Books)*, London, pp. 392-396.