

MOLYSMOLOGIE. — *Évolution des teneurs en hydrocarbures chez quelques organismes marins du Nord-Finistère depuis l'échouage de l'Amoco Cadiz et comparaison des méthodes de dosage en infrarouge et spectrofluorimétrie.* — Note (*) de **Jean-Pierre Féral, Pierre Fusey, Françoise Gaill, Évelyne Lopez, Élisabeth Martelly, Jean Oudot et Michel Van Praët**, présentée par Maurice Fontaine.

La contamination par les hydrocarbures d'Invertébrés marins intertidaux ou infralittoraux et d'un Vertébré (*Anguilla anguilla* L.) est étudiée. Le dosage par spectrophotométrie infrarouge des hydrocarbures chez les animaux est déconseillé, la spectrofluorimétrie fournit des résultats précis et comparatifs. Les hydrocarbures se sont accumulés dans les zones riches en lipides endogènes; une épuration partielle des animaux est constatée 8 mois après l'accident.

Hydrocarbon contamination of marine invertebrates and of a vertebrate (Anguilla anguilla L.) was studied. IR spectrophotometry is unadvisable in the case of marine organisms, fluorescence spectrophotometry gives reliable and comparative results. Hydrocarbons accumulated in biogenic lipid-rich tissues; 8 months after the wreck, a partial purification was shown.

Afin de rechercher une contamination éventuelle par les hydrocarbures des organismes marins, des Invertébrés intertidaux ou infralittoraux, sessiles ou sédentaires et un Poisson téléostéen (*Anguilla anguilla*) sont collectés depuis mai 1978 dans la région polluée. Deux méthodes de dosage, la spectrophotométrie infrarouge (IR) et la spectrofluorimétrie (SF), sont comparées.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — Les Invertébrés sont collectés soit à marée basse dans deux sites pollués de la baie de Morlaix (Anse du Pouldu : échantillons 6, 7, 8, 10; Roscoff : 1, 2, 7 bis, 8 bis, 9), soit par dragage (Nord-Ouest de l'île de Batz : 3, 4; près de l'épave : 5). Les Anguilles jaunes ♀ sont capturées dans le port de Roscoff (11, 12, 13). Des Invertébrés considérés comme témoins sont récoltés à Dinard.

Les Invertébrés sont broyés; le poids sec de chaque échantillon est obtenu en le desséchant à 70°C jusqu'à poids constant. Après extraction au tétrachlorure de carbone (CCl_4) en appareil « Soxhlet », une seconde pesée permet de déterminer le poids des lipides totaux : lipides endogènes et pétrole. Dans le cas des Anguilles l'extraction est effectuée sur les tissus frais (branchies, ovaires, muscles). L'extrait recueilli est purifié par passage sur une colonne de sulfate de sodium (1 g) et de florisol (5 g) puis séparé en fractions aliquotes pour les dosages IR et SF.

Les dosages IR sont réalisés à $2\,925\text{ cm}^{-1}$ [1]. Pour la SF, le CCl_4 est évaporé à sec et le résidu repris à l'aide d'hexane. Les dosages sont effectués en mesurant le signal maximal obtenu en faisant varier la longueur d'onde d'excitation entre 290 et 330 nm et celle d'émission entre 350 et 420 nm [2]. En IR, comme en SF les résultats des dosages sont présentés en unités équivalentes de BAL 150 [9] (parties par million BAL 150) et rapportés au poids sec total (lipides inclus) pour les Invertébrés, ou au poids frais pour les tissus d'Anguilles.

RÉSULTATS ET DISCUSSION. — Le tableau I présente de façon comparative les résultats des dosages en IR et SF chez 3 invertébrés : *Actinia equina*, *Sidnyum argus* et *Patellavulgata*. La figure représente les spectres IR relevés, avant et après purification sur florisol, de volumes égaux de BAL 150, d'extrait d'ovaire d'Anguille et d'huile de foie de Morue.

Les résultats exposés dans le tableau I permettent de constater que les valeurs obtenues lors des dosages IR et SF ne sont proportionnelles que si l'échantillon a une faible teneur en lipides endogènes. Elles deviennent par contre aberrantes en IR lorsque cette teneur

est élevée. Les spectres représentés dans la figure 1 permettent de vérifier que la différence observée provient de la présence d'un reliquat de lipides endogènes dans l'extrait, malgré la purification sur florisil.

TABLEAU I

TABLEAU I		Roscoff, mai ppm (BAL 150)	Dinard, mai ppm (BAL 150)	% de lipides / poids sec
<i>Actinia equina</i> (animaux entiers)	IR	258	non détectable	6
	SF	19	2	
<i>Sidnyum argus</i> (colonies sans les stolons)	IR	904	non détectable	2
	SF	68	6	
<i>Patella vulgata</i> (pied)	IR	423	non détectable	1,3
	SF	15	5	
<i>Patella vulgata</i> (masse viscérale)	IR	3380	3601	19
	SF	108	1	

Des essais de saponification à l'aide de potasse alcoolique n'ont pas, non plus, permis d'éliminer ces lipides. La méthode en IR n'est donc valable que lorsque l'échantillon à doser contient très peu de lipides endogènes et devient inapplicable si celui-ci en contient une forte proportion, ce qui est le cas de certains organismes et de nombreux organes.

La méthode de dosage par SF apparaît par contre plus sensible et permet d'obtenir des résultats cohérents quel que soit l'échantillon considéré. Par cette méthode, on dose sélectivement des hydrocarbures aromatiques, alors qu'en IR on dose essentiellement les composés paraffiniques. Si aucune des deux méthodes ne permet d'obtenir la valeur absolue des hydrocarbures totaux, le dosage des composés aromatiques présente plusieurs avantages lors de l'étude d'impact d'une pollution pétrolière. Ces composés sont en effet plus toxiques et plus lentement éliminés par les organismes que les composés paraffiniques [3].

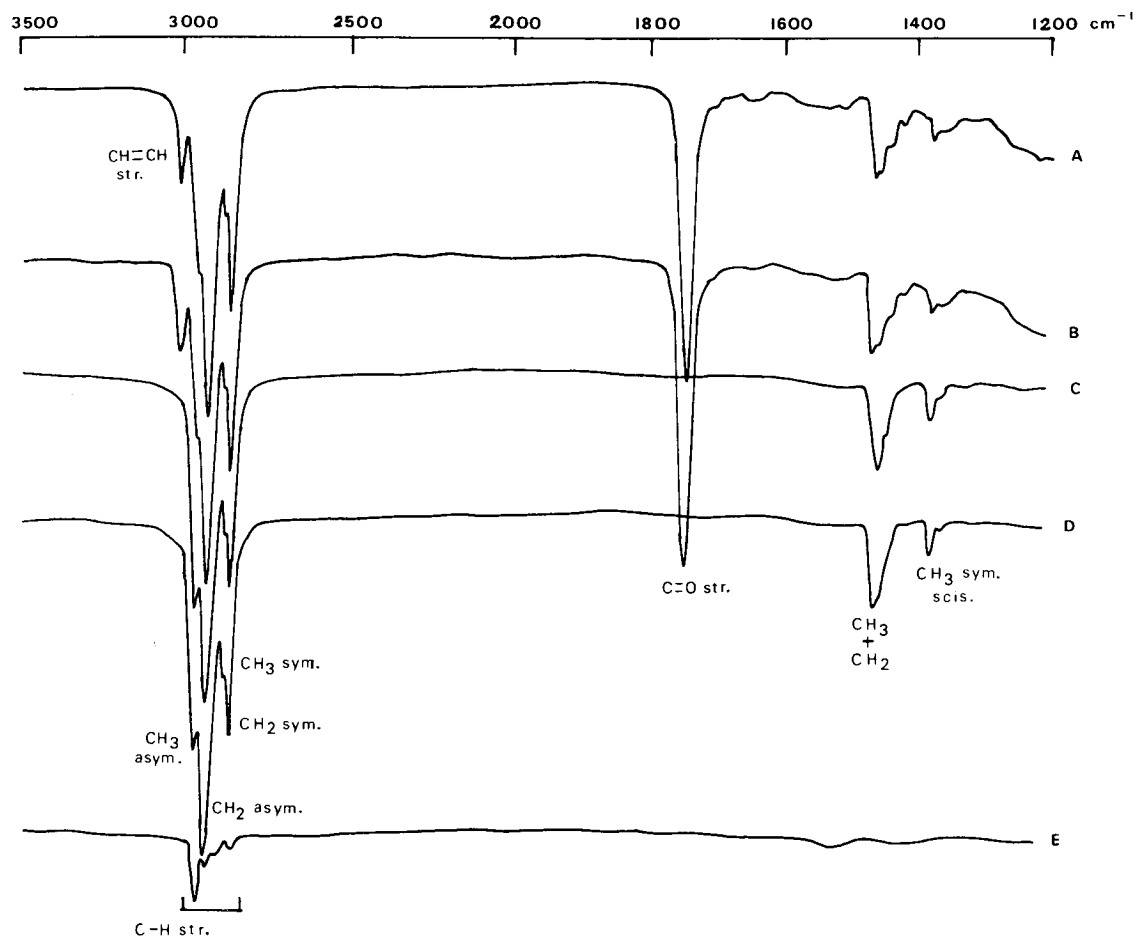
Compte tenu de ces constatations le tableau II ne fait mention que des dosages en SF, ceux-ci permettent de constater quelques faits généraux sur l'impact, de mai à octobre 1978, de la pollution due à l'*Amoco Cadiz*.

Dans un même site le mode alimentaire des animaux est le facteur déterminant de leur taux d'accumulation d'hydrocarbures. Les psammivores (*Leptosynapta galliennei*) et les carnivores sessiles (*Actinia equina*) accumulent peu les hydrocarbures. Par contre, les animaux filtreurs : Éponges et Ascidies, comme cela était connu pour les Mollusques lamellibranches [4], concentrent considérablement les hydrocarbures. Néanmoins d'autres régimes alimentaires, comme celui de *Patella vulgata* qui racle le substrat pour en collecter les microorganismes, peuvent aboutir à des taux d'accumulation élevés ($80 \cdot 10^{-6}$, pour

EXPLICATIONS DE LA PLANCHE

A, B, C. — Avant le passage sur florisil, l'huile de foie de Morue HFM (A) a un spectre analogue à celui de l'extrait d'ovaire d'Anguille (B), et se distingue du spectre du pétrole BAL (C) par les bandes d'absorption $C=O$ ($1\,745\text{ cm}^{-1}$) et $CH=CH$ ($3\,020\text{ cm}^{-1}$).

D, E. — Après purification sur florisil, le spectre de BAL (D) est inchangé. Le spectre de HFM (E) montre que le florisil a bien retenu les composés les plus polaires ($C=O$) et insaturés ($CH=CH$), mais seulement une partie (90 %) des saturés ($C-H$ stretching). L'interférence au nombre d'onde de mesure (CH_2 asym., $2\,925\text{ cm}^{-1}$) est d'autant plus forte que le rapport lipides endogènes/hydrocarbures est plus élevé.



les animaux *in toto* en mai). Cette observation sur *P. vulgata* diffère de celle de Grahl-Vielsen et coll. [5], faite lors d'une autre pollution. Cette divergence peut s'expliquer par l'exposition différente des sites de prélèvement.

TABLEAU II

TABLEAU 2	% de lipides / poids sec $\bar{x} \pm f$	Baie de Morlaix MAI ppm(BAL 150)	Baie de Morlaix OCTOBRE ppm(BAL 150)	Témoins ppm(BAL 150)
EPONGES				
1- <i>Grantia compressa</i> (20)	1,2	38	4 (nouvelle génération)	
2- <i>Halichondria panicea</i> (10)	3,6	137	75 - 57	31 (octobre)
3- <i>Phakellia</i> sp. (1)	2,9 ⁺ 0,1	117 - 34	30 - 6 - 5	
4- <i>Cliona celata</i> (1)		134		
5- <i>Lophonopsis nigriscans</i> (1)			55 - 34	
CNTIDAIRE (voir aussi tableau I)				
6- <i>Actinia equina</i> , mésentères (25)	25	232	177 - 79	72 (octobre)
MOLLUSQUE (voir aussi tableau I)				mai octobre
7- <i>Patella vulgata</i> , pied (15)	1,3 ⁺ 0,4	15 - 1 [7']	18	1 12
8- <i>Patella vulgata</i> , masse viscérale (15)	19 ⁺ 2,2	108 - 27 [8']	56	5 18
ASCIDIE				
9- <i>Sidnum argus</i> (25)	2	68	64	6 10
ECHINODERME (voir aussi tableau I)				
10- <i>Leptosynapta gallienae</i> (15)	1 ⁺ 0,1	11 - 29	1	
POISSON ■				
11- <i>Anguilla anguilla</i> , ovaire		868 ⁺ 76	188 ⁺ 148	
12- <i>Anguilla anguilla</i> , muscle		11,2 ⁺ 7,5	32 ⁺ 17	
13- <i>Anguilla anguilla</i> , branchie		470 ⁺ 350	183 ⁺ 111	

(.) Nombre d'individus ou colonies à partir duquel a été effectué chaque dosage.

[7'] et [8'] échantillons prélevés dans un site battu où le pétrole a peu adhéré aux rochers.

■ Moyennes et écart-types échantillon (f) des résultats obtenus séparément sur 4 individus en mai et 7 en octobre.

Nous remarquerons en effet que les populations d'une même espèce ont, dans des sites voisins, différemment accumulé les hydrocarbures. Dans le fond de l'anse du Pouldu où le pétrole a séjourné plusieurs semaines et adhéré aux rochers, les individus (éch. 7, 8) en ont accumulé de fortes quantités. Au contraire, dans un site battu et balayé par des courants qui ont empêché le pétrole d'adhérer, les concentrations sont beaucoup plus faibles (éch. 7 bis, 8 bis).

Les données obtenus sur les Éponges (éch. 3, 4, 5) confirment la pollution des fonds de 80 m en baie de Morlaix [6]. Malgré les conditions plus homogènes de l'infralittoral et en dépit de l'important volume d'eau filtrée par ces animaux, les variations individuelles observées chez *Phakellia* sp. draguées à peu de distance, démontrent l'hétérogénéité de la répartition spatiale des hydrocarbures sur ces fonds.

Les dosages par organes (éch. 6, 7, 8, 11, 12, 13) permettent de mettre en évidence, dans certains d'entre eux, des teneurs en hydrocarbures considérables, même chez des espèces, comme *Actinia equina*, où elles sont faibles chez les animaux *in toto*. En mai, on ne trouve que $19 \cdot 10^{-6}$ dans les animaux entiers, mais $232 \cdot 10^{-6}$ dans leurs mésentères. Des observations en microscopie ont permis de vérifier, dans ce cas, le stockage des hydrocarbures à la base des cellules phagocytaires des mésentères (van Praët, à paraître). Chez l'Anguille, on observe une teneur en hydrocarbures relativement faible dans le muscle, élevée dans les branchies et une très forte accumulation dans les ovaires, particulièrement riches en lipides endogènes [7]. La branchie et l'ovaire des individus pollués présentent des modifications pathologiques importantes (Lopez et coll., à paraître). Ces résultats confirment que les organes de stockage des lipides endogènes deviennent le lieu d'accumulation des hydrocarbures absorbés, comme on le savait pour l'hépatopancréas des Crustacés [5] et le foie de certains Poissons [8].

Enfin, nous avons constaté la tendance à une lente épuration des organismes entre mai et octobre 1978. 8 mois après la pollution, les teneurs demeurent néanmoins très supérieures à celles relevées chez les animaux témoins, et l'une des espèces considérées (*Sidnyum argus*) contient alors des quantités d'hydrocarbures encore similaires à celles mesurées en mai. Les colonies de cette espèce disparaissant pendant l'hiver, la génération de 1979 sera, de ce fait, probablement « épurée », comme nous le constatons à l'occasion du renouvellement des populations de *Grantia compressa* (éch. 1). Chez l'Anguille, malgré la dispersion des valeurs obtenues, une analyse de variance (test F) montre qu'il existe une différence significative entre les valeurs de mai et octobre ($P < 0,05$ pour la branchie, $P < 0,01$ pour l'ovaire) ce qui confirme aussi dans cette espèce la tendance à l'épuration.

Les résultats, à paraître, des analyses par chromatographie en phase gazeuse, permettront de compléter ces diverses données, mais dès à présent la SF apparaît, avec les réserves précédemment exposées, comme une méthode sensible, fiable et comparative, pouvant être mise en œuvre pour le suivi de l'impact des pollutions par hydrocarbures chez les animaux marins.

Cette recherche est effectuée dans le cadre du contrat CNEXO-Muséum 78/5737.

(*) Remise le 5 février 1979 et acceptée, après révision, le 12 février 1979.

[1] C. CAUSSE et R. MESTRES, *Manuel des méthodes de prélèvement et d'analyse*, MQV et CNEXO, 2, 1975.

[2] C.O.I., O.N.M. et P.N.U.E., *Manuel sur la surveillance continue du pétrole et des hydrocarbures en mer et sur les plages*, suppl. 2, UNESCO, 1977, p. 16-19.

[3] J. M. NEFF, B. A. COX, D. DIXIT et J. W. ANDERSON, *Mar. Biol.*, 38, 1976, p. 270-289.

[4] R. LEE, in *Fate and Effects of Petroleum Hydrocarbons in Marine Organisms and Ecosystems*, Pergamon Press, 1977, p. 60-70.

[5] O. GRAHL-NIELSEN, J. T. STAVELAND et S. WILHELMSEN, *J. Fish. Res. Board. Can.*, 35, 1978, p. 615-623.

[6] L. CABIOCH, J. C. DAUVIN et F. GENTIL, *Mar. Pollut.*, 9, 1978, p. 303-307.

[7] Y. A. FONTAINE, E. LOPEZ, N. DELERUE-LEBELLE, E. FONTAINE-BERTRAND, F. LALLIER et C. SALMON, *J. Physiol.*, Paris, 72, 1976, p. 871-892.

[8] R. HARDY, R. MACKIE, K. WITTLE et A. MCINTYRE, *Nature*, 252, 1974, p. 577-578.

[9] Pétrole de référence Brut Arabian Light étêté à 150°C pendant 30 mn, fourni par l'Institut français du Pétrole.

J.P.F., F.G. et M.V.P. : *Biologie des Invertébrés marins et Malacologie*,
57, rue Cuvier, 75005 Paris;

P.F. et J.O. : *Cryptogamie, Département Protection des Matériaux*,
12, rue Buffon, 75005 Paris;

E.L. et E.M. : *Physiologie générale et comparée*,
7, rue Cuvier, 75005 Paris.