

TECHNIQUES DE PRÉPARATION  
DES ROCHES DÉTRITIQUES EN VUE DE L'ANALYSE  
PALYNOLOGIQUE QUANTITATIVE

par M. STREEL

*Chef de travaux à l'Université de Liège*

(3 figures dans le texte)

INTRODUCTION

De nombreuses méthodes d'extraction de sporomorphes des roches détritiques ont été proposées et discutées dans la littérature. Aucune cependant ne paraît avoir résolu, d'une manière complètement satisfaisante, le problème de la séparation des phases organiques et minérales. Quels que soient les solvants proposés pour dissocier la roche (dans la plupart des cas l'acide fluorhydrique), l'étape suivante, c'est-à-dire l'isolement de la matière organique du complexe minéral — solvant, est toujours tentée par des manipulations classiques partiellement inefficaces.

En effet, les processus de décantation et siphonnage ou les centrifugations n'atteignent leur but que si la phase minérale a été totalement évaporée ou mise en solution, ce qui est, en pratique, difficilement réalisable. Quant aux techniques utilisant les liqueurs denses [7, 8, 11, 14, 15], les courtes centrifugations [8], les méthodes de flottation [12], de lévigation [2, 5], du tourbillon [8], etc., c'est-à-dire les techniques qui jouent sur les différences de poids spécifiques entre phase organique et minérale, elles se heurtent toutes aux forces d'attraction qui, dans la plupart des cas lient encore entre elles les particules résiduelles en suspension dans le solvant. En pratique, ces méthodes de séparation conduisent dans les premiers cas, à des préparations microscopiques trop peu concentrées, dans les seconds, à la perte d'une quantité incontrôlable de la phase organique dont une partie reste intimement liée à la phase minérale. D'ailleurs, les techniques qui tiennent compte du facteur « poids spécifique » sont

inutilisables dès que la quantité de Carbone fixé par la matière organique s'accroît quelque peu, alourdissant les sporomorphes. Elles permettent seulement une sélection du matériel le moins métamorphique.

Le principal obstacle à la séparation complète des phases organiques et minérales réside dans la taille des particules du résidu minéral insoluble dans l'acide fluorhydrique. Ces particules sont très petites (quelques microns) et s'agglomèrent en nuages d'aspect colloïdal. On n'en connaît pas toujours la nature chimique précise. FORSMAN et HUNT [6] ont identifié des fluosilicates et fluoaluminates de Potassium et des oxyfluorures d'Aluminium dans un résidu insoluble comparable. Ces particules fines sont d'autant plus abondantes que la teneur de la roche en minéraux argileux (surtout chlorite) est élevée. Pour les éliminer, ou tout au moins empêcher leur agglomération, un certain nombre d'agents chimiques et physiques ont été essayés.

La méthode chimique classique [16] utilise l'acide chlorhydrique dilué et chaud immédiatement après le déplacement de l'HF. Lorsque le résidu minéral est abondant, ce procédé est insuffisant. Les débris minéraux subsistent et on ne peut empêcher qu'ils se réagglomèrent au cours des décantations ou centrifugations. B. DE JEKHOWSKY [10] fait intervenir des oxydants avant ( $\text{HNO}_3$ ) et pendant ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) l'attaque par l'HF et obtient un certain succès dans la dispersion des produits insolubles. Il reste cependant que l'utilisation d'oxydants forts dès les premiers stades d'une technique de macération n'autorise plus aucun contrôle quantitatif de la matière organique effectivement contenue dans le sédiment. Le pourcentage organique retenu par ces méthodes varie considérablement selon la nature lithologique du sédiment lui-même et son degré de métamorphisme.

Utilisés dans différents laboratoires [1, 4, 8], les ultrasons donnent des résultats variables en ce qui concerne la dissociation des agrégats d'insolubles. Cependant DUMAIT [4] a montré d'une manière indiscutable que les ultrasons (fréquences : 500, 250 et 100 KC) provoquent une agitation violente du milieu et sont responsables de destructions importantes dans une suspension de pollens récents acétolysés. Ces destructions sont plus importantes encore sur du matériel plus ou moins métamorphique. A la suite d'une étude détaillée sur l'action des ultrasons aux divers stades d'une méthode

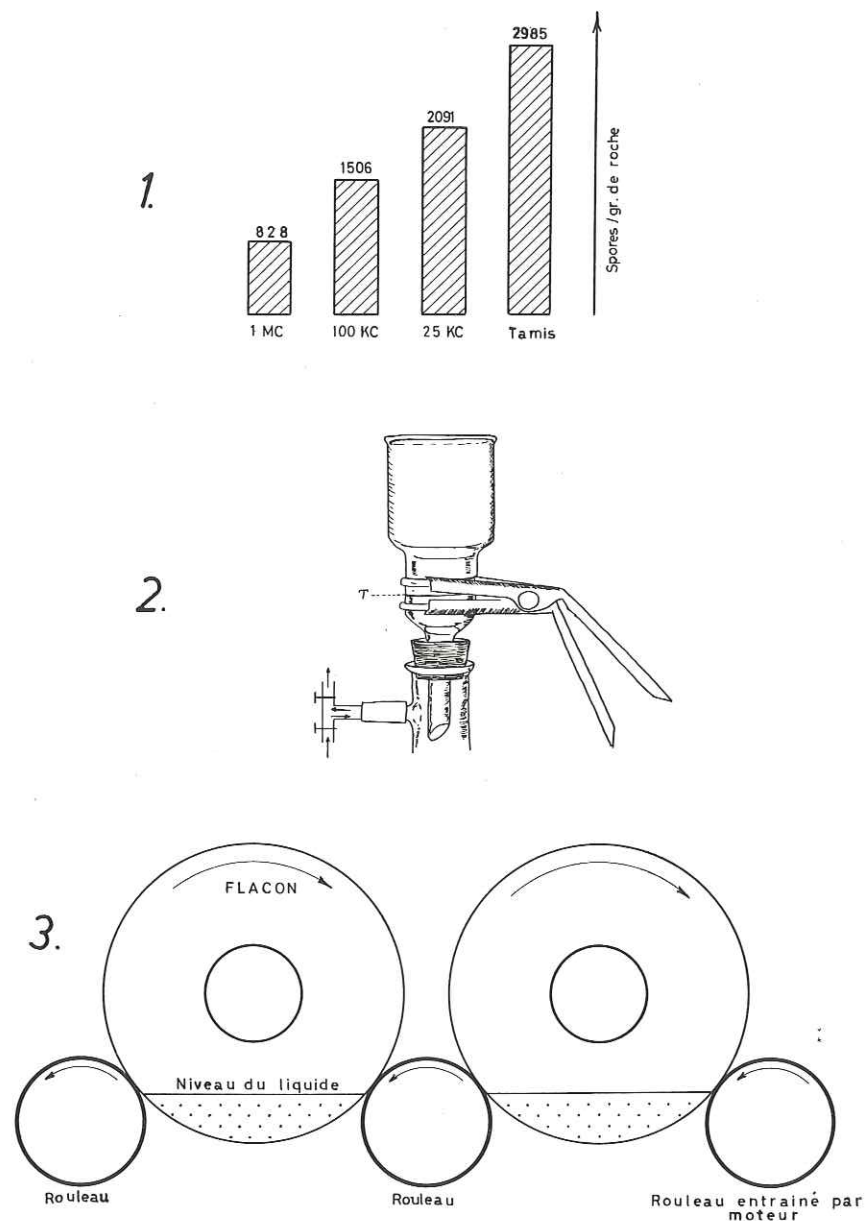


Fig. 1, 2, 3.



classique [19], nous avons conclu à un effet destructeur croissant avec la fréquence utilisée. De cette étude, nous reprenons (fig. 1) sous la forme d'un diagramme, les quantités de spores isolées par gramme de sédiment dans un psammoschiste d'âge givétien inférieur, avec l'intervention de trois fréquences différentes d'ultrasons (1 MC, 100 KC et 25 KC). Ces résultats sont comparés à la quantité de spores isolées par la nouvelle technique que nous allons détailler. La méthode utilisant les ultrasons, élimine dans le cas le moins défavorable (25 KC) un tiers environ des sporomorphes. Des tests complémentaires montrent que l'effet destructeur des ultrasons affecte surtout le matériel organique où la quantité de Carbone fixé a fait perdre à l'exine toute élasticité. Cette méthode entraîne donc une sélection du matériel le moins métamorphique.

L'utilisation de ces diverses méthodes ou de leurs combinaisons éventuelles paralyse, en fait, le développement de la palynologie quantitative et particulièrement l'estimation des fréquences absolues de sporomorphes dans les sédiments. Or nous avons souligné par ailleurs [20] le potentiel d'informations que représente la connaissance de ces fréquences absolues. Il est évident que les données quantitatives absolues, issues de roches de nature lithologique différente, prélevées en différents points d'un même bassin sédimentaire, ne seront comparables entre elles que pour autant que la méthode de macération ne détruise pas sélectivement la matière organique.

Il faut donc rechercher un enchaînement de techniques qui permettent, dans un premier stade d'obtenir des résultats quantitatifs absolus comparables d'un échantillon à l'autre et qui permettent, ensuite, si nécessaire seulement, d'améliorer la qualité du matériel organique isolé. En effet, l'estimation quantitative étant faite, on peut se permettre de détruire une partie du matériel organique, par exemple pour tenter de rendre certains types de spores plus transparents.

#### RECHERCHE D'UNE MÉTHODE EFFICACE

Pour dissocier les agglomérats de minéraux insolubles, l'eau (éventuellement additionnée d'un agent dispersant) donne les meilleurs résultats. Une dilution de 10 à 50 fois le volume d'HF utilisé vient à bout des structures « gel » les plus tenaces. Les minéraux inso-

lubles fins se présentant alors à l'état dissocié, il faut bannir à ce stade de la méthode, les processus de décantation ou de centrifugation qui réagglomèrent ces insolubles et passer les matières en suspension dans l'HF aqueux au travers d'un filtre dont la dimension des pores se situe entre la taille des corpuscules insolubles et celle des plus petites spores.

L'originalité de la méthode que nous proposons réside dans la solution apportée à ce problème de filtration qui présente au départ de grosses difficultés tant dans le choix du filtre adéquat que dans la conception d'un appareillage l'empêchant de se boucher aussitôt.

NEVES et DALE [13] utilisent un filtre en verre fritté pour séparer les sporomorphes des matières organiques fines produites pendant l'oxydation des charbons bitumineux et des schistes charbonneux. Un appareil ingénieux fait passer périodiquement un flux d'air ascendant au travers du filtre (5 sec. de flux d'air pour 50 sec. de filtration) et le débouche efficacement. Ce système ne peut être adapté au problème qui nous concerne ici puisque le filtre en verre fritté serait très rapidement détruit par la solution aqueuse d'HF.

C'est pour une raison analogue que nous n'avons pu utiliser intégralement les filtres et l'appareillage de la « Millipore filter corporation, Bedford (Massachusetts) ». Le filtre « Millipore » OS en polyéthylène à pores de 10 microns par un instant apporter une solution élégante. En plus d'une résistance excellente aux acides et aux oxydants, il présente sur les verres frittés l'avantage de n'offrir pratiquement qu'un plan de filtration alors que les verres frittés, épais de 2-3 mm sont difficilement nettoyés. Cependant cette qualité est obtenue au dépens de la résistance mécanique du filtre dont l'épaisseur est très faible. Dès que ce filtre est mouillé, on ne peut plus le déplacer facilement et le nettoyer si l'on veut fractionner la filtration, et de plus, l'appareil de filtration « Millipore » comporte, pour le soutenir, un support de verre fritté qui est détruit rapidement par la solution d'HF.

L'appareil de filtration « Millipore » s'est cependant révélé pratique et nous l'avons conservé pour maintenir en place un nouveau type de filtre plus intéressant.

### CARACTÉRISTIQUES DU TAMIS

Il s'agit d'un véritable tamis, à maille de 15 microns, de fabrication allemande (LINKER, à Kassel). Ce tamis est fait en fils de bronze phosphoreux nickelés. Il est très résistant à la fois aux acides et aux tensions mécaniques. Il peut se passer du support en verre fritté de l'appareil « Millipore » et peut être efficacement nettoyé par les ultrasons avant son réemploi. On vérifie son état de propreté sous une loupe binoculaire. Ce tamis est livrable en feuilles de 25 × 25 cms dans lesquelles on découpe des disques de 45 mm de diamètre.

### CARACTÉRISTIQUES DE L'APPAREIL DE FILTRATION

Le disque est inséré entre les surfaces rodées des deux éléments de l'appareil de filtration « Millipore » (fig. 2 : T), maintenus fortement en contact par une pince. Cet appareil, en Pyrex, est adapté à un Erlenmeyer de type classique muni d'une tubulure latérale reliée à une trompe à eau. Sur cette tubulure latérale, nous avons branché un autre conduit amenant de l'air sous faible pression (200 grs/cm<sup>2</sup>) et un système de vannes permettant de placer au choix, l'Erlenmeyer en dépression ou en surpression. Un flux d'air ascendant au travers du tamis le débouche instantanément.

### PROCÉDURE DÉTAILLÉE DE FILTRATION

En pratique, l'HF très dilué contenant en plus de la matière organique les particules minérales fines en suspension, est filtré en plusieurs fois et on ajoute de l'eau lorsque les particules minérales ont tendance à se réagglomérer. L'élimination des débris fins, de taille inférieure à 15 microns n'est vraiment effective que si l'on observe un jet continu de filtrat sous le tamis. Immédiatement avant que le jet de filtrat s'interrompe par suite du colmatage du tamis, il convient d'arrêter la filtration en plaçant l'Erlenmeyer en surpression pendant un temps le plus court possible (1 sec. environ). Il faut remarquer qu'un système automatique distribuant régulièrement la pression tel celui proposé par NEVES et DALES est sans intérêt ici, car le temps de filtration en jet continu varie au cours du traitement d'un même échantillon. D'ailleurs la filtration du

résidu de 5 grammes de roche ne prend généralement pas plus de vingt minutes de manipulation si on prend la précaution de libérer plusieurs fois le tamis du résidu organique qu'il a retenu. Ceci se fait en enlevant provisoirement le tamis de l'appareillage et en l'insérant dans un flacon à large goulot ; de courts jets d'eau suffisent à détacher la matière organique du tamis qui peut être alors remis en place. En fin d'opération, le contenu du flacon à large goulot est passé une dernière fois au travers du tamis afin de concentrer sur celui-ci la matière organique isolée qui est ensuite transférée dans une capsule de porcelaine pour l'examen sous la loupe binoculaire.

### TECHNIQUES COMPLÉMENTAIRES

1. L'utilisation d'un tamis permet de ménager l'attaque chimique du sédiment. Il n'est plus nécessaire de volatiliser ou solubiliser complètement la phase minérale. Il suffit d'en réduire le diamètre des particules à une dizaine de microns. Les réactions chimiques peuvent donc être faites « à froid ».

Plusieurs systèmes ont été proposés pour empêcher ces réactions chimiques « à froid » de se bloquer : notamment la plaque oscillante [18] et l'agitateur par barreau magnétique [10]. Ces systèmes sont généralement trop violents, érodent le matériel organique [19] et peuvent accroître la température de la réaction chimique. Nous avons préféré un système d'agitation plus lent qui consiste en une série de rouleaux (type rouleau encreur de machine à stencyler) montés sur roulements à billes et disposés parallèlement entre eux à distance constante (fig. 3). L'acide (150 cc. d'HF 40 % technique ou 200 cc d'HCl 25 % en volume) et le sédiment (5 grammes de roche, en grains compris entre 1 et 2,5 mm) sont placés dans un flacon en polyéthylène d'un litre, de forme cylindrique et à goulot étroit. Le flacon est couché sur deux rouleaux. Un de ceux-ci est entraîné en rotation lente par un moteur électrique très démultiplié. Il communique ce mouvement au flacon (12 tours/minute) qui le transmet, à son tour au rouleau suivant et ainsi de suite. La hauteur du liquide dans chaque flacon couché, n'atteignant pas le goulot, le flacon ne doit pas être bouché, ce qui permet aux gaz de réaction de s'échapper librement.



Par ce procédé, les sédiments silicatés subissent une attaque « à froid » par l'HF pendant une nuit. Cependant toute trace de carbonate dans le sédiment doit être éliminée si l'on veut éviter en cours de macération dans l'HF, la formation de fluorure de Calcium, insoluble. Un traitement préalable des sédiments carbonatés par HCl (25 %) est donc indispensable. La macération de la roche et la filtration du résidu en HCl s'effectuent dans les mêmes conditions que l'attaque et la filtration du résidu en HF. Seuls les échantillons fortement dolomitiques ont résisté jusqu'ici à ces attaques chimiques « ménagées ».

Les minéraux insolubles de diamètre supérieur à 15 microns peuvent être prélevés facilement dans le résidu organique s'ils sont de grande taille (Pyrite par exemple). Les autres ne gênent pas le montage des préparations microscopiques si l'on applique la technique en deux couches proposée par JEFFORDS et JONES [9]. Dans ce cas, en effet, la matière organique est fixée dans un plan contre la face interne du couvre-objet, ce qui permet un examen « en immersion » quelque soit l'épaisseur de la préparation.

2. Le montage des préparations microscopiques en vue de l'analyse quantitative ne peut être entrepris à ce stade de la méthode si le taux de Carbone fixé par la matière organique est trop élevé. Il convient alors de procéder à une oxydation minimum du matériel.

Préalablement, on peut prélever des exemplaires des grandes spores, des chitinizoaires, des cuticules, etc., c'est-à-dire des représentants de ce qui est susceptible d'être détruit au contact de l'oxydant.

Par oxydation minimum, il faut entendre le degré d'oxydation qui convient aux échantillons les mieux conservés du bassin sédimentaire considéré. Pour les échantillons des bassins paléozoïques ardennais, un séjour de trois heures dans une solution aqueuse de SCHULZE (2 volume d' $\text{HNO}_3$  pour 1 volume de  $\text{KClO}_3$  en solution aqueuse saturée) peut être considéré comme une oxydation minimum à condition de ramener le pH de la solution, progressivement vers la neutralité par lavage à l'eau uniquement, sans l'utilisation de bases.

En pratique la manipulation peut être simplifiée en utilisant encore le tamis. Une centrifugation est cependant nécessaire pour essorer la matière organique et permettre son transfert dans l'oxy-

dant. L'oxydation se fait dans le tube de centrifugation. Menée à son terme, la mixture est transférée, avec beaucoup d'eau dans le récipient en polyéthylène d'un litre qui a servi à l'attaque du même échantillon par HF. Le flacon est complété à l'eau et le mélange aqueux est passé rapidement au travers du tamis utilisé précédemment pour éliminer la phase minérale fine. Un grand volume d'eau supplémentaire est ajouté pour laver la matière organique et le tamis de toute trace d'acide.

Le tamis n'est que partiellement résistant aux oxydants. Après le passage d'une vingtaine d'échantillons, les fils en phospho-bronze nickelés s'oxydent et diminuent de section. L'augmentation du diamètre des mailles qui en résulte peut être facilement contrôlé au binoculaire. Le tamis est alors remplacé.

Ce minimum d'oxydation ne rend pas chaque sporomorphe suffisamment transparent pour l'observation. Il s'agit seulement d'une étape intermédiaire entre l'état non oxydé de la matière organique après l'attaque par HF et la sélection de sporomorphes bien conservés que l'on peut faire par exemple en alternant l'action d' $\text{HNO}_3$  et celle de KOH.

Les formes plus ou moins opaques peuvent être examinées, avec profit, en lumière réfléchie. Pour faciliter leur identification par comparaison avec les formes transparentes sélectionnées ultérieurement, nous utilisons un montage de préparation microscopique spécial. Après le prélèvement d'une fraction connue du résidu organique, destinée au comptage, une autre fraction est prélevée et étalée sur un carré de papier filtre fixé par quatre points de vernis sur une lame porte-objet. Il s'agit d'un papier filtre particulier (filtre en cellulose Millipore) qui présente l'avantage de devenir pratiquement transparent lorsqu'on remplit ses pores par une huile telle qu'on en utilise pour l'examen microscopique en immersion. (Le filtre peut être obtenu avec une face quadrillée, ce qui facilite le repérage). L'examen se fait en deux temps : on photographie toutes les formes intéressantes en lumière réfléchie puis on rend le filtre transparent avec de l'huile d'immersion et on photographie les mêmes formes par transparence.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [<sup>1</sup>] B. ALPERN, Méthode d'extraction des spores des roches du Houiller. *Pollen et spores*, vol. V, n° 1, pp. 169-177, 1963.
- [<sup>2</sup>] B. C. ARMS, A silica depressant method for concentrating fossil pollen and spores. *Micropaleontology*, vol. 6, n° 1, 1960.
- [<sup>3</sup>] B. E. BALME et C. W. HASSEL, Upper devonian spores from the Canning Basin, Western Australia. *Micropaleontology*, vol. 8, n° 1, 1962.
- [<sup>4</sup>] P. DUMAIT, L'action des ultrasons sur les pollens. Note préliminaire *Pollen et spores*, vol. IV, n° 1, pp. 175-180, 1962.
- [<sup>5</sup>] P. DUMAIT, L. MARCEAU, Cl. DEVIN et M. VAN CAMPO. Nouvelle méthode de concentration des pollens dans les sédiments pauvres par microflotation. *Compte-rendus de l'Acad. des Sciences*, t. 256, n° 1, 1963.
- [<sup>6</sup>] J. P. FORSMAN et J. M. HUNT, Insoluble organic matter (kerogen) in sedimentary rocks. *Geochimica and Cosmochimica Acta*, vol. 15, pp. 170 à 182, 1958.
- [<sup>7</sup>] D. G. FREY, A differential flotation technique for recovering microfossils from inorganic sediments. *New Phytologist*, vol. 54, n° 2, pp. 257-258, 1955.
- [<sup>8</sup>] J. W. FUNKHOUSER et W. R. EVITT, Preparation techniques for acid-insoluble microfossils. *Micropaleontology*, vol. 5, n° 3, pp. 369-375, 1959.
- [<sup>9</sup>] R. M. JEFFORDS et D. H. JONES, Preparation of slides for spores and other microfossils. *Journal of Paleontology*, vol. 33, n° 2, pp. 344-347, 1959.
- [<sup>10</sup>] B. DE JEKHOWSKY, Une technique standard de préparation des roches pour l'étude des microfossiles organiques. *Revue de l'I. F. P.*, vol. XIV, n° 3, 1959.
- [<sup>11</sup>] R. M. KOSANKE, Pennsylvanian spores of Illinois and their use in correlation. *State geological survey, bulletin*, n° 74, 1950.
- [<sup>12</sup>] E. B. KURTZ et R. M. TURNER, An Oil flotation method for recovery of pollen from inorganic sediments. *Micropaleontology*, vol. 3, n° 1, pp. 67-68, 1957.
- [<sup>13</sup>] R. NEVES et B. DALE, A modified Filtration System for Palynological Preparations. *Nature*, vol. 198, pp. 775-776, 1963.
- [<sup>14</sup>] W. L. NOREM, Separation of spores and pollen from siliceous rocks. *Journal of Paleontology*, vol. 27, pp. 881-883, 1953.
- [<sup>15</sup>] W. L. NOREM, An improved method for separating fossil spores and pollen from siliceous rocks. *Journal of Paleontology*, vol. 30, pp. 1258-1260, 1956.
- [<sup>16</sup>] A. REISSINGER, Die « Pollenanalyse » ausgedehnt auf alle Sedimentgesteine der geologischen Vergangenheit. I. Teil. *Paleontographica*, Abt. B, 84, pp. 1-19, 1939.
- [<sup>17</sup>] A. REISSINGER, Idem II. Teil. *Paleontographica*, Abt. B, 90, pp. 99-126, 1950.
- [<sup>18</sup>] F. L. STAPLIN, S. J. POCOCK, J. JANSONIUS and E. M. OLIPHANT, Palynological techniques for sediment (and additional notes, May 1961). *Micropaleontology*, vol. 6, n° 3, pp. 329-331, 1960.

- [<sup>19</sup>] M. STREEL, Utilisation des ultrasons à divers stades de la technique d'extraction des spores d'une roche détritique. *Compte rendu du 5<sup>me</sup> Congrès de Stratigraphie et de Géologie du Carbonifère*. Paris, sept. 1963, pp. 1239-1247, 1964.
- [<sup>20</sup>] M. STREEL, Une association de spores du Givétien inférieur de la Vesdre, à Goé (Belgique). *Ann. Soc. Géologique de Belgique*, t. 87, Bull. n° 7, 1964.

## DISCUSSION

Intervention de M. R. NOËL.

J'ai utilisé la méthode que vient de nous décrire M. STREEL pour extraire les spores de charbons du Westphalien A, B et C, après attaque nitrique en présence de  $KClO_3$ . J'ai obtenu des résultats nettement meilleurs que par la méthode traditionnelle avec centrifugation. La méthode de M. STREEL est beaucoup plus rapide et donne des préparations plus propres. De plus, en ce qui concerne les charbons très riches en spores, elle permet une réduction notable de la quantité de charbon à traiter.

Pour un charbon déterminé, la durée d'attaque oxydante du charbon a pu être réduite de deux heures à quinze minutes. De ce fait, les spores sont beaucoup moins attaquées et révèlent beaucoup plus nettement les détails de leur structure et de leur sculpture.

Après la première filtration décrite par M. STREEL, nous traitons les spores pendant 5 minutes aux ultra-sons, à 20.000 périodes-seconde. Ce traitement a pour effet de débarrasser l'exine des spores des très fines particules étrangères qui y adhèrent souvent et d'obtenir finalement des préparations de spores d'une remarquable pureté.