

63313

E330-BER-E

PROGRAMME NATIONAL EFFLORESCENCES ALGALES

IFREMER

Contrat n° 94-1450011 du 29/03/94

ETUDE EXPERIMENTALE DES EFFETS  
D'UNE BIOTOXINE ALGALE, L'ACIDE OKADAÏQUE,  
SUR UN POISSON MARIN, *SERRANUS CABRILLA*.  
CONTROLE HISTOCYTOLOGIQUE DU FOIE.

BERTHIER Cécile

Laboratoire de Biologie marine, Université de Perpignan

30/06/95

IFREMER Bibliothèque de BREST



OEL08322

E 330

BER-E

PROGRAMME NATIONAL EFFLORESCENCES ALGALES

IFREMER

Contrat n ° 94-1450011 du 29/03/94

ETUDE EXPERIMENTALE DES EFFETS  
D'UNE BIOTOXINE ALGALE, L'ACIDE OKADAÏQUE,  
SUR UN POISSON MARIN, *SERRANUS CABRILLA*.  
CONTROLE HISTOCYTOLOGIQUE DU FOIE.

BERTHIER Cécile

Laboratoire de Biologie marine, Université de Perpignan

30/06/95

## RESUME

Ce travail consiste en une étude écotoxicologique des effets d'une biotoxine algale, l'acide okadaïque, produit par des Dinoflagellés marins (g. *Dinophysis*) sur un poisson, le serran, utilisé comme modèle. Cette toxine, administrée par voie orale, provoque des modifications hépatiques décelables à l'échelle histocytologique. Les unes sont surtout métaboliques et adaptatives (réserves cellulaires, densité des organites cytoplasmiques), les autres plutôt pathologiques (pycnose, lyse, nécrose) bien que limitées en extension (lésions focalisées).

Aux doses testées (0,1 à 0,3  $\mu\text{g/g}$  de poissons pendant respectivement 3 et 7 jours), les effets de l'acide okadaïque seraient limités et les conséquences écologiques, pour des poissons conchyliophages, consommateurs de coquillages ayant concentré de l'acide okadaïque au cours de blooms à *Dinophysis*, paraissent peu importants.

## I - PROBLEMATIQUE

Cette étude portant sur l'effet de l'acide okadaïque sur les poissons, et l'organisme producteur de cette toxine étant un Dinoflagellé marin (*Dinophysis sp.*), il convient de définir et de présenter les problèmes généraux se rapportant au phytoplancton et à son rôle dans la chaîne alimentaire.

### 1. Les blooms phytoplanctoniques

#### a) Définition

Le **phytoplancton** constitue le **maillon initial des chaînes alimentaires** des écosystèmes aquatiques. Les végétaux qui le composent sont, au même titre que les végétaux terrestres, les seules formes de vie capables de synthétiser leur matière organique en utilisant directement l'énergie solaire. Ils forment ainsi les **producteurs primaires** et servent de nourriture au plancton animal qui sera consommé, ainsi que le phytoplancton, par des animaux de plus grande taille, respectivement des carnivores et des herbivores. Les organismes qui composent le phytoplancton marin et dulçaquicole possèdent une mobilité faible ou nulle : ce sont des **algues microscopiques unicellulaires** flottantes, qui, généralement, dérivent au gré des courants.

Les espèces appartiennent à des groupes végétaux divers, dont les plus représentés sont les Diatomées et les Dinophycées (appelées aussi Dinoflagellés) (voir Figs. 1 et 1-3 annexe n°2). Les Diatomées sont des algues unicellulaires de couleur brune. Chaque cellule de Diatomée se trouve enfermée dans une sorte de capsule siliceuse (la frustule), dont l'ornementation est caractéristique de l'espèce. Ce groupe abonde dans les mers froides, alors que, dans les eaux plus chaudes, les Dinoflagellés tendent à devenir dominants. Il s'agit d'algues unicellulaires pourvues de 2 flagelles (l'un moteur, l'autre directeur) et d'une enveloppe cellulosique (la thèque).

D'autres groupes peuvent cependant atteindre des biomasses notables : il s'agit de Cyanophycées (algues bleues) et Chrysophycées.

Le phytoplancton subit des variations saisonnières d'abondance dues aux fluctuations des facteurs externes : lumière, température et teneur en sels nutritifs minéraux. Cependant, on peut parfois assister à des proliférations massives (pullulation) d'algues unicellulaires, pouvant se traduire par des colorations anormales de la surface des masses d'eau (les plus spectaculaires d'entre elles sont les célèbres "eaux rouges" et "eaux brunes"). Le terme anglais de "bloom" ou celui français "d'efflorescences" définit les variations rapides (de l'ordre de 1 à 2 jours) des concentrations cellulaires algales, sans pour autant que cela provoque un changement de couleur. On parle de "bloom exceptionnel" dans le cas d'eaux colorées contenant plus de  $10^6$  cellules/litre (ou plus de 50 mg/m<sup>3</sup> de chlorophylle a), et de "bloom saisonnier" pour des espèces qui ne dépassent pas  $10^3$  cellules/litre.

### b) Origine des "blooms" et des eaux colorées

Si des données anecdotiques révèlent l'existence de blooms depuis des époques préhistoriques et historiques (voir extrait de l'exode, annexe n° 2), leur nombre et leur intensité se sont accrus de façon spectaculaire au cours des dernières décennies, dans les divers milieux aquatiques du monde entier. Les mécanismes qui déterminent ces phénomènes sont encore mal connus.

La multiplication importante des organismes phytoplanctoniques serait favorisée, à la fois par des facteurs hydrologiques, climatiques et chimiques (voir Fig. 2, annexe n° 2). Presque tous les observateurs s'accordent sur le fait que les eaux colorées apparaissent après une période assez prolongée de fortes températures de l'air et de l'eau, qui coïncide avec l'absence d'agitation de l'air et de l'eau (Prakash et al., 1971). On observe également des efflorescences algales lors d'un abaissement de salinité dû à une forte pluviosité. Cependant, plus que la variation de salinité, la stratification consécutive (disposition en couches de la masse d'eau par différence de densités) serait l'un des principaux facteurs initiateurs de bloom. Les sources de pollution, d'origine urbaine en particulier (déchets azotés, phosphates ...), ont été souvent considérées comme des facteurs amplifiant la prolifération du plancton végétal. Toutefois aucune corrélation n'a pu, à ce jour, être clairement établie.

### c) Impact des blooms phytoplanctoniques

Bien que les zones océaniques les plus riches en poissons soient celles où la production primaire atteint des valeurs maximales, une production végétale trop importante peut nuire aux populations animales. En effet, les blooms algaux se révèlent souvent très dangereux pour les organismes marins, en particulier les poissons (Bruslé, 1995), mais

comportent également des risques pour la santé humaine (Yasumoto, 1985). Les proliférations massives (plusieurs millions de cellules/litre), suivies de mortalités brutales des populations algales provoquent une forte demande en oxygène et conduisent à des conditions hypoxiques ou anoxiques responsables de l'asphyxie des poissons.

Diverses Diatomées (*Chaetoceros convolutus*), des Dinoflagellés (*Gonyaulax polygramma*) ainsi que des Silicoflagellés peuvent provoquer des lésions cellulaires des lamelles secondaires des branchies. Les troubles de respiration et d'osmorégulation ainsi induits se révèlent souvent mortels pour les poissons, en particulier les Salmonidés d'élevage.

Mais ces perturbations phytoplanctoniques peuvent, de plus, provoquer des manifestations toxiques affectant aussi bien les animaux marins que l'homme. En effet, certains organismes phytoplanctoniques en particulier des Dinoflagellés, produisent des toxines (ou phycotoxines). Ces dernières sont classées en plusieurs catégories, selon leurs effets :

1) des toxines, neurotoxines, hépatoxines, hémolysine et ichtyotoxines affectant les animaux marins, les coquillages et les poissons

2) des toxines affectant l'homme, après concentration dans des coquillages ou des poissons consommés. Les principales catégories sont :

\* les toxines D.S.P. (Diarrhetic Shellfish Poisoning), provoquent des diarrhées, des nausées, des vomissements, des douleurs abdominales. Les manifestations morbides peuvent durer 3 jours, mais les séquelles sont rares. L'identification de ces toxines est récente. D'abord décrites au Japon (Yasumoto et al., 1978), elles furent détectées aux Pays-Bas, en Espagne, en France et en Suède (Krogh et al., 1985). Les organismes phytoplanctoniques responsables sont des Dinoflagellés, appartenant en particulier au genre *Dinophysis*, dont les espèces impliquées (*D. acuminata*, *D. fortii*, *D. acuta* et *D. norvegica*) varient selon les régions.

\* Les toxines P.S.P. (Paralytic Shellfish Poisoning). Les symptômes d'intoxication peuvent aller, de légers picotements et d'un engourdissement périoral à une paralysie totale et à la mort par insuffisance respiratoire. Ces toxines sont produites par des Dinoflagellés tels que *Alexandrium minutum* et *Gaunyalax tamarensis*. Elles s'accumulent dans les moules, les huitres et autres coquillages.

\* Les toxines N.S.P (Neurotoxic Shellfish Poisoning) sont produites par le Dinoflagellé *Ptychodiscus brevis*. Elles provoquent des intoxications par ingestion de coquillages contaminés (huitres, moules ...). Les symptômes sont multiples : anomalies sensorielles telles que des engourdissements, des picotements, des perturbations gastro-intestinales et des paralysies.

Les phénomènes de neurointoxications ont été observés en Floride (Ingle et De Sylva, 1955), dans le golfe du Mexique, les Caraïbes et dans la Caroline du Nord.

\* Les toxines ciguatériques, responsables de la ciguatera. La consommation de poissons des récifs coralliens contaminés par le Dinoflagellé *Gambierdiscus toxicus* engendre des troubles digestifs et neurologiques. Cette espèce a été notamment rencontrée dans les Océans Pacifique, Atlantique et Indien.

\* La toxine amnésique ASP (Amensic Shellfish Poisoning)

Les principaux symptômes sont des vomissements, des pertes de mémoire, des désorientations. La toxine (acide domoïque), extraite à partir de moules contaminées, est produite par une diatomée (*Nitzschia pungens*).

Les blooms algaux représentent donc un risque pour la santé humaine, mais également une menace économique importante, en provoquant des mortalités élevées de poissons ou en les rendant, tout comme les coquillages, impropres à la consommation.

## 2. Le programme national "Efflorescences Algales Marines"

Depuis 10 ans, on assiste à une extension géographique et saisonnière des phénomènes d'efflorescences algales. Plusieurs pays européens contrôlent, depuis 1975, la présence de Dinoflagellés neurotoxiques ou diarrhéiques dans les eaux côtières. La France s'est pourvue de tels systèmes de surveillance compte tenu de l'amplification des phénomènes sur les côtes atlantiques (cf. Fig. 1, annexe n°3). Depuis 1984, le suivi du "Réseau Phytoplanctonique" (le REPHY), mis en place par l'IFREMER, permet d'identifier de nouvelles phycotoxines soit dans les microalgues connues pour leurs effets, soit chez de nouvelles espèces.

Les études fondamentales et appliquées nécessaires en amont de ces opérations de surveillance peuvent être regroupées sous trois thèmes :

- écotoxicologie générale et pathologie des poissons

Ce domaine est déficitaire en connaissances. Plusieurs questions se posent quant à savoir si les poissons sont capables de détecter les souches toxiques et surtout quant au devenir (métabolisation, détoxification, excrétion, stockage ...) de ces toxines.

- impact écologique et économique

Les effets négatifs des blooms algaux s'exercent sur les pêcheries marines et surtout sur les populations d'élevage où les pertes peuvent être considérables. Des troubles sont provoqués aux niveaux les plus élevés de la chaîne alimentaire, notamment chez les oiseaux piscivores (mouettes, cormorans, ...) et les Mammifères marins (dauphins, phoques...).

- risques pour la santé humaine

Divers cas de morbidité et même de mortalité ont été recensés chez des humains, après consommation de poissons et coquilles toxiques.

Compte tenu de la complexité de ces études pluridisciplinaires, il a été nécessaire d'accroître le potentiel scientifique.

C'est pourquoi, un Programme National "Efflorescences en milieu marin" a été mis en place en 1989. Ce programme pluriannuel bénéficie d'un financement collégial qui permet à une douzaine d'équipes scientifiques (CNRS, Universités IFREMER, Laboratoires Maritimes) de collaborer sur 14 opérations de recherche. Cependant, ces opérations n'ont pris en compte, en 1989, que les aspects écophysologiques et systématiques du problème. Dans une deuxième phase, il était donc nécessaire de considérer la partie écotoxicologique, indispensable à l'étude des microalgues toxiques.

A la demande conjointe du Ministère de l'Environnement, et de l'IFREMER et avec l'accord du Comité Directeur (Ministères de l'Environnement et de la Mer, MRT, CNRS, IFREMER), un nouveau programme "Phycotoxines Marines" a été organisé en 1990. Il s'articule autour de trois thèmes de recherche :

- 1 : l'origine des phycotoxines
- 2 : leur détection et l'étude de leur structure chimique
- 3 : les effets toxiques et l'accumulation de ces composés

### 3. Objectif de l'expérience menée lors de ce stage

L'expérience que j'ai réalisée est une étude préliminaire qui s'inscrit dans le cadre du Programme National sur les efflorescences algales toxiques. Le laboratoire de biologie marine a en effet passé une convention avec l'IFREMER de Nantes et travaille donc avec cet Institut (Dr Marcaillou-Lebaut) sur le thème : "Effets toxique et accumulation des phycotoxines marines".

L'objectif de l'expérience était d'étudier, après intoxication alimentaire d'un poisson, *Serranus cabrilla*, les perturbations hépatiques induites par une biotoxine algale, l'acide okadaïque et ceci par un contrôle histocytologique.

L'acide okadaïque (AO) est une toxine qui fait partie, avec les dinophysistoxines 1 (DTX1) et 3 (DTX3), des dinophysistoxines, une des trois familles de molécules constituant les toxines D.S.P. L'acide okadaïque est le poison diarrhéique le plus fréquemment retrouvé dans les échantillons de coquillages européens (France, Suède, Hollande et Espagne). Il s'accumule dans la glande digestive de Bivalves ayant consommé des algues du genre *Dinophysis* (Fig. 14 annexe n° 3).

L'acide okadaïque a été isolé successivement à partir des éponges *Halichondria okadai* et *H. melanodocia* (Tachiband et al., 1981), puis d'un Dinoflagellé marin *Prorocentrum lima* (Murakami et al., 1982) (Fig. 17, annexe n° 3). Après avoir remarqué une fréquence élevée des cancers de l'estomac dans les pays consommateurs de coquillages



contaminés par les dinophysistoxines, l'activité tumorale de l'acide okadaïque a été testé positivement (Fugih, 1987 et 1988). L'acide okadaïque est également un inhibiteur des phosphatases cellulaires PP1 et PP2. En dépit de quelques expériences réalisées sur les souris (Takagi et al., 1984) et sur culture d'hépatocytes (Underdal et al., 1985), l'état actuel des connaissances sur les modifications induites chez les poissons ayant ingéré de l'acide okadaïque reste inconnu. Deux études (Barsoum & Bouchage, 1995) ont été conduites, au sein du laboratoire, sur les effets de l'ingestion par *Serranus cabrilla*, de moules contaminées lors d'un bloom de *dinophysis* sur la côte atlantique.

Les moules ne contenant que très peu d'acide okadaïque, les résultats ne se sont pas avérés pleinement concluants. C'est pour cette raison qu'il a été proposé de réaliser une expérience complémentaire en utilisant directement l'acide okadaïque, ajouté à un aliment expérimental.

## II - DEROULEMENT DU STAGE

### 1. Principe de l'expérience

Pour la réalisation de cette expérience, nous avons décidé d'effectuer une intoxication par voie orale. Cette voie d'administration est peu fréquente chez les poissons, chez lesquels les intoxications se font généralement en dissolvant le produit toxique dans l'eau ou bien en l'injectant par voie intrapéritonéale ou intramusculaire. Nous avons voulu ainsi nous situer **au plus près des conditions naturelles** de transmission de la toxine algale.

Deux doses d'acide okadaïque ont été testées. Elles ont été déterminées à partir des deux études précédemment réalisées par L. Bouchage et N. Barsoum et également en prenant en compte le coût élevé du produit (3000 F les 300  $\mu$ g). La durée de l'intoxication varie de 3 à 7 jours selon la série expérimentale. Nous avons ainsi distingué 6 lots de poissons :

- 2 lots de témoins ingérant une nourriture non toxique
- 1 lot recevant une dose de 0,1  $\mu$ g d'AO/g de poisson/j. pendant 3 jours
- 1 lot recevant cette même dose mais pendant 7 jours
- 1 lot recevant une dose de 0,3  $\mu$ g d'AO/g de poisson/j pendant 3 jours
- 1 lot recevant une dose de 0,3  $\mu$ g d'AO/g de poisson/j pendant 7 jours.

Au terme des 3 ou 7 jours, les poissons intoxiqués ainsi que des témoins sont sacrifiés. Des fragments de leur foie sont prélevés en vue d'une observation histocytologique (réalisation de coupes à la paraffine, de coupes semi-fines et ultra-fines en résine épon), afin d'étudier les éventuelles perturbations hépatiques induites par l'acide okadaïque.

## 2. Le matériel

### a) Les poissons

#### *\* Choix de l'espèce*

Les poissons utilisés dans cette expérience sont des Téléostéens marins appartenant à l'ordre des Perciformes, à la famille des Serranidés et à l'espèce *Serranus cabrilla* (Linné, 1758).

Le serran a été choisi en raison des avantages suivants :

- sa **rusticité**, permettant une bonne disposition à l'élevage en laboratoire
- sa **voracité**, assurant une bonne ingestion de l'aliment proposé
- sa **faible valeur commerciale**, réduisant les frais d'expérience
- son **abondance dans le golfe du Lion** qui assure des captures aisées (laboratoire Arago de Banyuls/mer)
- son **hermaphroditisme synchrone** qui évite des réponses différentielles entre mâles et femelles.

Ce poisson a été initialement testé dans le laboratoire lors d'études de contamination expérimentale par les toxines ciguatériques (thèse Gonzalez, 1992). Il s'est révélé constituer une **excellente espèce-cible** et a été recommandé comme **modèle** pour la réalisation de tests écotoxicologiques (Gonzalez et coll., 1993).

#### *\* Caractéristiques générales de l'espèce*

Ce serranidé est de petite taille (longueur maximale : 25 cm). Son corps est allongé et comprimé latéralement (voir Fig. 1 p. 17). Sa tête est longue, son museau se termine en pointe obtuse et sa mandibule est légèrement proéminente. Le préopercule est finement dentelé, avec deux épines pointues au niveau angulaire.

La couleur de son corps varie du rouge brique au gris jaune très pâle, selon l'âge et l'habitat. On peut observer, sur son dos, 8 à 9 bandes transversales brunâtres. Sur les flancs et les joues, il présente trois ou quatre bandes longitudinales jaunâtres ou orangées (voir photo n° 1, p. 17).

Prédateur vorace, carnivore, le serran se nourrit de proies animales variées, surtout des crustacés et petits poissons. Il présente la caractéristique d'être un hermaphrodite synchrone commun dans toute la Méditerranée, mais également présent dans l'Atlantique (de la Manche à l'Angola) et en Mer Rouge.

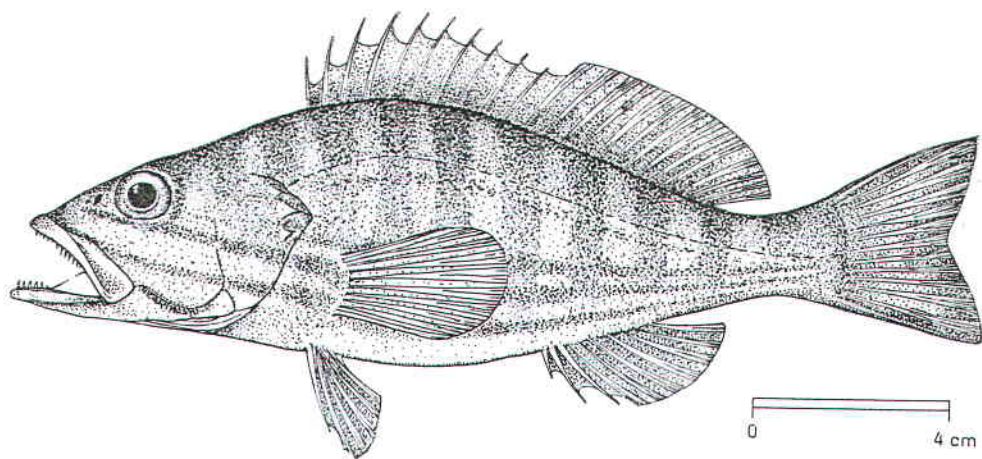


Fig. 1 : Morphologie de *Serranus cabrilla* (Fiches F.A.O.)



Photo 1 : *Serranus cabrilla* (photo J. LECONTE)

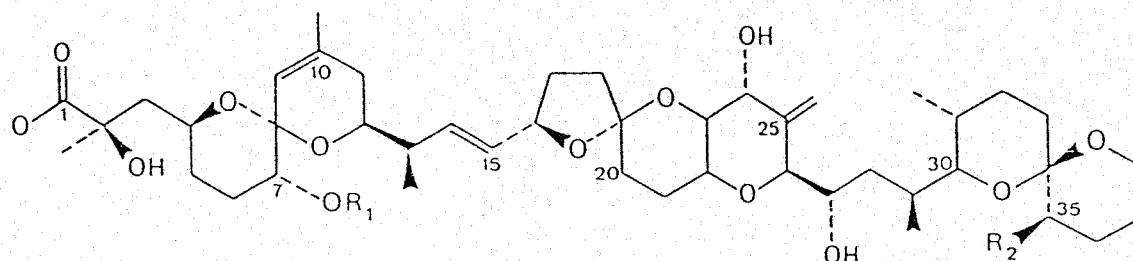
### \* *Choix des individus*

Les poissons dont nous avons disposés étaient des juvéniles (Lt = 12 à 13 cm, Pt = 25 g), n'ayant pas atteint la taille de maturité sexuelle. Leur foie ne présente donc pas les modifications structurales et métaboliques liées à la maturation sexuelle. Le choix de jeunes individus répond également à des critères de commodité d'élevage : les adultes manifestant davantage des tentatives de fuite. De plus, il a été établi qu'ils présentent, d'une façon générale, une plus grande sensibilité que les adultes vis à vis des substances toxiques (Biagianti, 1990).

Les juvéniles ont été récoltés vivants dans la réserve de Banyuls - Cerbère (pêche à la palangrote).

### *b) L'acide okadaïque*

L'acide okadaïque, toxine de type D.S.P., est une polyether d'acide gras en C38. Sa structure moléculaire est la suivante :



Acide okadaïque :  $R_1 = H$ ,  $R_2 = H$

L'acide okadaïque (molécule de synthèse) nous a été fourni par INC Biomedicals (91893 Orsay).

Les caractéristiques de ce produit sont décrites en annexe n°4.

### *c) L'organe-cible : le foie*

Le foie constitue un organe vital impliqué dans de nombreuses fonctions essentielles (stockage des réserves énergétiques, digestion, détoxification, défense immunitaire). Il est susceptible de répondre rapidement à toute perturbation environnementale qu'elle soit d'ordre physique, chimique ou biologique inductrice de stress. Diverses substances chimiques (xénobiotiques et biotoxines marines) sont connues présenter des caractères d'hépatotoxicité.

Des modifications structurales touchant à la fois les hépatocytes, le système hépatobiliaire et le système vasculaire hépatique ont été précédemment inventoriées, en réponse à diverses intoxications : par des pesticides (l'atrazine : Biagianti-Risbourg, 1990), des

métaux lourds (le cadmium : Gony-Lemaire, 1990) et des toxines ciguatériques (ciguatoxine, CTX et MTX : maitotoxine : Gonzalez, 1992).

### 3. Les techniques d'élevage

#### a) Les aquariums d'élevage

Nous avons réparti les serrans (18) dans sept aquariums, d'une capacité individuelle de 80 litres, contenant de l'eau de mer artificielle (eau douce + sel "Instant Océan"). Un aquarium est un "micro-écosystème" dans lequel il convient d'essayer de maintenir un équilibre écologique le plus proche possible du milieu naturel d'où proviennent les poissons. Il est important d'assurer une bonne oxygénation de l'eau ainsi qu'une filtration convenable. Pour cela, l'aquarium est équipé de différents éléments, comme le montre le schéma ci-dessous :

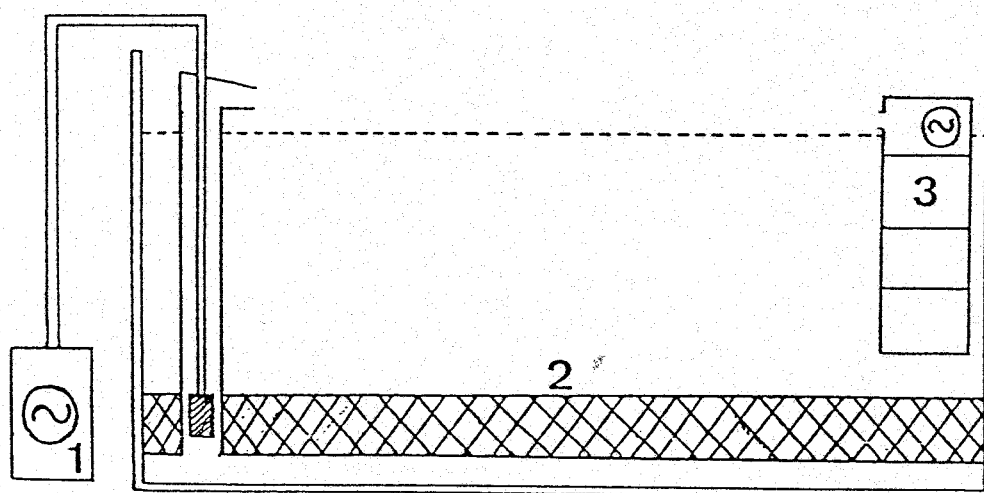


Schéma de l'aquarium. 1: aérateur; 2: lit bactérien; 3: pompe.

- Une pompe EHEIM (3) fait circuler l'eau à l'intérieur de l'aquarium (circuit fermé). Elle homogénéise la masse d'eau et en assure une première filtration.

- Le lit bactérien (2) est un filtre biologique neutralisant les substances azotées toxiques contenues dans l'eau. La flore microbienne (*Nitrosomonas* et *Nitibacter*) installée dans un lit de sable, transforme les déchets azotés (ammoniaque ( $\text{NH}_3$ ) et nitrite ( $\text{NO}_2$ ) issus des aliments non consommés et des excréments) en nitrate ( $\text{NO}_3$ ) composé moins nocif.

- L'aérateur RENA-301R (1) fournit une oxygénation optimale (6 mg  $\text{O}_2$ /l).

En ce qui concerne le cycle photopériodique, il est réglé par une horloge à 12 heures de luminosité par cycle de 24 heures.

Des contrôles de salinité (moyenne 37 ‰), de température (20°C) et de concentration en nitrites (< 0,1 mg/l) sont effectués tous les deux jours. Les deux premiers

contrôles sont réalisés grâce à un salinomètre de terrain. Le taux de nitrites est vérifié à l'aide de tests TETRA. Si ce dernier est supérieur à 0,1 mg de nitrites par litre ce qui est arrivé au cours de l'expérience, il est alors nécessaire de renouveler l'eau et de vérifier le bon fonctionnement de la pompe.

#### b) La stabulation des poissons

Les 18 serrans disposés dans sept aquariums qui avaient été préalablement stabulés pendant deux mois (période nécessaire à la stabilisation des constantes aquariologiques précédemment décrites et au développement de la microflore). Trois des aquariums accueillent 6 poissons témoins référencés comme suit :

- A0T1, A0T2, A0T3, sacrifiées après 3 jours.
- A0T4, A0T5, A0T6, sacrifiées après 7 jours

Les quatre autres reçoivent les poissons à intoxiquer, soit trois poissons par aquarium :

- A01, A02, A03, ingérant une dose de 0,1  $\mu\text{g/g/j}$ . pendant 3 jours
- A04, A05, A06, ingérant une dose de 0,3  $\mu\text{g/g/j}$ . pendant 3 jours
- A07, A08, A09, ingérant une dose de 0,1  $\mu\text{g/g/j}$ . pendant 7 jours
- A10, A011, A012, ingérant une dose de 0,3  $\mu\text{g/g/j}$  pendant 7 jours.

Les poissons sont stabulés une à deux semaines avant le début de l'expérience, afin de réduire le stress de capture, de transport et de vie en milieu confiné.

#### 4. L'alimentation contrôlée

Pendant la période d'accumulation aux conditions d'élevage, les poissons sont nourris avec des moules crues (1 moule par serran tous les deux jours).

La nourriture de base, servant à l'intoxication, est constituée d'un mélange de chair de moules crues, d'agar-agar et d'eau distillée dans les proportions suivantes : 1 g de moule, 0,66 g d'eau et 0,33 g d'agar). Le tout est compacté par une légère cuisson au bain-marie.

Quelques jours avant le commencement de l'expérience, les serrans sont nourris avec cet aliment expérimental pour qu'ils s'habituent à celui-ci. Les témoins continueront à ingérer cette nourriture ; par contre, pour les poissons expérimentés, nous procéderons de la façon suivante.

- une ration journalière est fixée à 0,7 g d'aliment par poisson, ce qui nous permet de calculer la quantité de nourriture à préparer pour chaque lot de serrans.
- on prépare la même nourriture que pour les témoins, mais après la cuisson, on ajoute l'acide okadaïque (qui est normalement thermostable)

- la quantité d'acide okadaïque à mélanger à la nourriture a été calculée en estimant le poids moyen d'un poisson à 25 g. Prenons l'exemple de la dose  $03 \mu\text{g/g/j}$ , les 3 premiers jours de l'expérience. La nourriture est préparée pour trois jours. 6 poissons recevant cette dose d'AO, on ajoute à l'aliment  $135 \mu\text{g}$  d'AO ( $0,3 \mu\text{g} \times 25 \text{ g} \times 3 \text{ j} \times 6 \text{ poissons}$ )

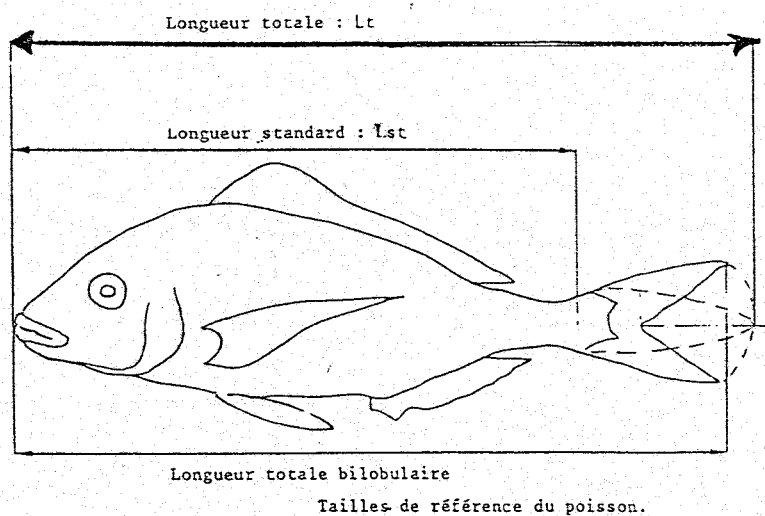
- l'acide okadaïque se présentant sous forme de poudre et les quantités à utiliser étant trop faibles pour être pesées, nous avons décidé de le mettre en solution. N'étant miscible que dans les alcools, nous avons dissout l'AO dans 1 ml de méthanol. Nous avons estimé que ce faible volume d'alcool s'évaporerait lors de l'ajout de l'aliment et de la confection des rations.

En effet, la nourriture est distribuée, aussi bien pour les témoins que pour les poissons à intoxiquer, sous forme de "boulettes" de poids connu (entre 0,2 et 0,4 g). Ces petites rations préparées après refroidissement et "solidification" de l'aliment, sont pesées avec une balance de précision, enveloppées dans du papier aluminium, référencées et conservées au réfrigérateur.

Les poissons sont nourris **quotidiennement**, à heure fixe, et **individuellement**. On peut ainsi contrôler, pour chacun d'eux, la quantité d'aliment effectivement ingérée afin qu'elle ne soit pas supérieure à 0,7 g. L'identification des poissons se fait par leurs caractéristiques externes (taille, livrée et/ou amputations sélectives pratiquées sur la nageoire caudale).

### 5. Prélèvement du foie

Après 3 ou 7 jours, selon les séries expérimentales, les poissons sont anesthésiés à l'aide d'éthyle - m - aminobenzoate (MS-222 de Sandoz), dissout dans un cristalliseur contenant de l'eau d'élevage. Les serrans sont alors pesés, mesurés à l'aide d'un ichtyomètre. (On relève la longueur totale et la longueur standard) (voir schéma ci-dessous). Leur foie est ensuite prélevé puis pesé.



## 6. Techniques histocytologiques

Après dissection des serrans, quelques fragments de foie sont prélevés afin d'y réaliser des coupes observables :

- soit au microscope photonique, pour avoir une vision d'ensemble de l'organe (topographie). Ce sont les coupes à la paraffine et les coupes semi-fines dans l'épon (observation histocytologique)
- soit au microscope électronique qui permet une observation détaillée des structures cellulaires : ce sont les coupes ultrafines dans l'épon (observation cytologique).

### a) Les coupes à la paraffine

Ces coupes sont réalisées sur des fragments d'1cm<sup>3</sup>, prélevés sur chaque poisson, dans la même partie du foie. Ces pièces sont fixées, incluses dans un bloc de paraffine, avant d'être découpées en "tranches" de 5 µm d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Après coloration, les coupes obtenues sont observées au microscope photonique. Ces différentes étapes sont résumées sur le document n° 3, p. 24 et explicitées ici :

#### *\* la fixation*

La fixation est une **étape importante** permettant de conserver l'organe dans un état **aussi proche que possible de l'état vivant**. Fixer une pièce, c'est donc :

- la protéger contre l'attaque bactérienne
- s'opposer à l'autolyse de ses constituants fondamentaux sous l'action des enzymes cellulaires (hydrolases des lysosomes)
- s'opposer aux distorsions et rétractions
- insolubiliser ses constituants cellulaires en particulier les protéines
- préparer les structures aux traitements ultérieurs comme les colorations ou imprégnations métalliques.

Le fixateur utilisé ici est le Bouin-Holland (voir composition annexe n° 5). Il n'insolubilise pas la plupart des lipides et est, de ce fait, mauvais fixateur cytologique. Par contre, il prépare très bien les pièces à l'observation histologique.

Les fragments de foie sont immergés pendant 24 heures dans ce fixateur, à température ambiante.

#### *\* La déshydratation des pièces*

Comme l'inclusion se fait dans un milieu anhydre, la paraffine, les pièces doivent être parfaitement déshydratées. Après rinçage à l'eau distillée pour éliminer l'excès de fixateur, les pièces sont immergées dans des bains d'alcool de titre croissant, jusqu'à



disparition de toute trace d'eau :

- 3 bains dans l'alcool 70°
- 2 bains dans l'alcool 95°
- 3 bains dans l'alcool 100°

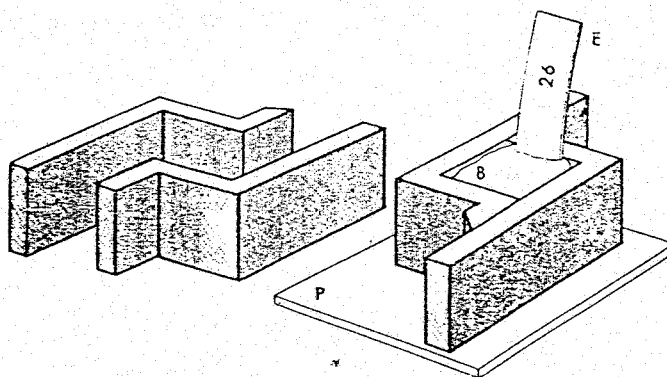
Chaque bain dure de 5 à 10 minutes.

Afin d'éliminer les traces d'eau qui demeurent et assouplir les pièces que la fixation et la déshydratation ont durci, les échantillons sont placés dans l'alcool butylique pendant 48 heures. Cet alcool est un liquide d'attente couramment utilisé : les pièces peuvent y être stockées pendant plusieurs mois.

#### \* *L'inclusion*

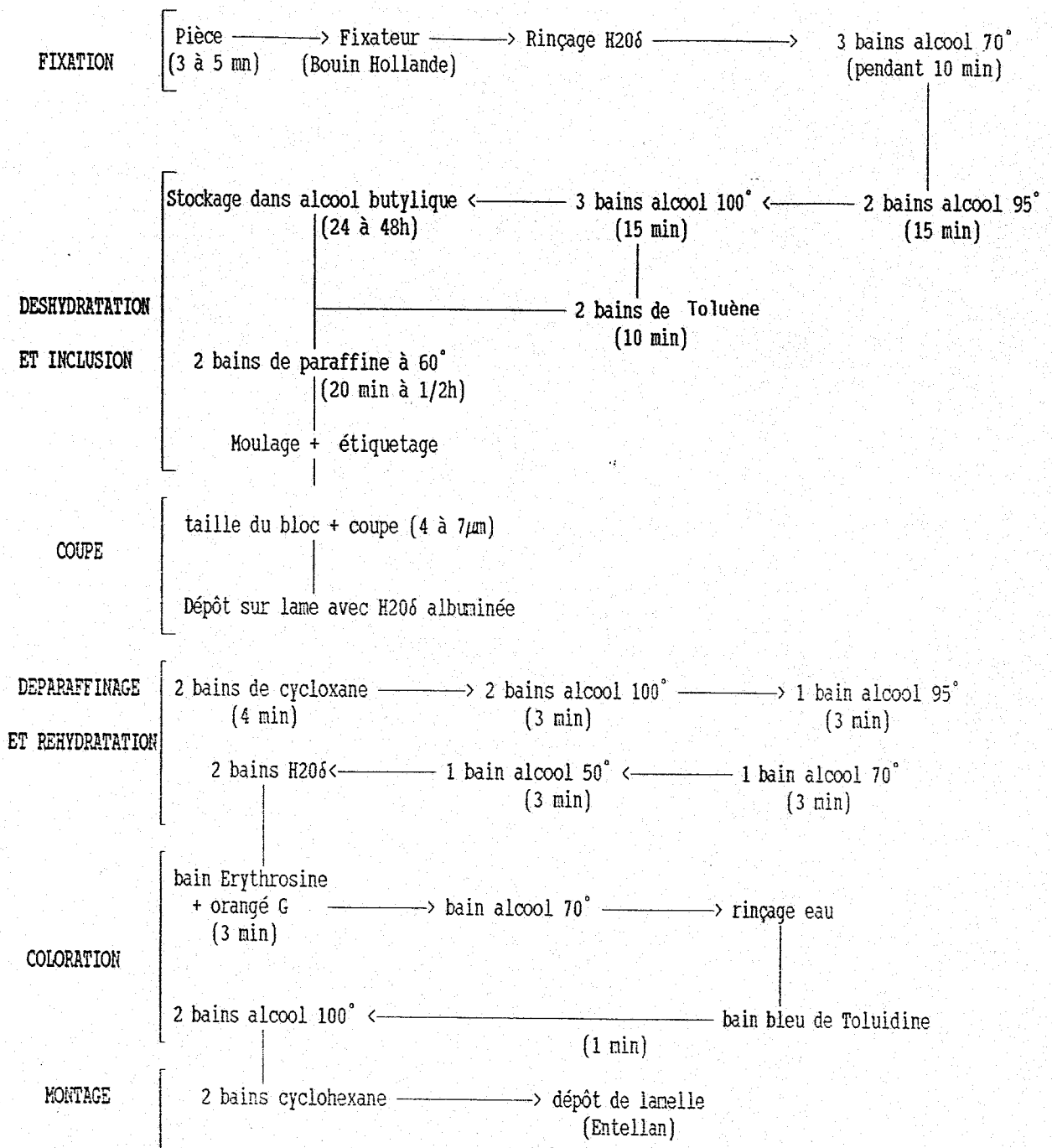
L'inclusion se fait dans la paraffine, milieu neutre chimiquement qui enrobe la pièce et l'imprègne jusqu'à l'échelle cellulaire. Cette substance est constituée d'hydrocarbures saturés et de cires. Les échantillons, retirés de l'alcool butylique, subissent une imprégnation par la paraffine liquide. Cette imprégnation se fait en étuve réglée à la température du point de fusion de la paraffine (60°C). On réalise deux bains successifs de 15 minutes chacun. La mise en bloc se fait dans des moules spéciaux dits "barres de Leuchart" posés sur une plaque de verre. On y verse la paraffine neuve liquide préalablement filtrée. Lorsqu'une fine pellicule de paraffine s'est solidifiée au contact du moule, les pièces y sont incorporées et orientées à l'aide d'une pince passée à la flamme.

Les pièces sont placées à l'avant du bloc et une étiquette d'identification est située à l'arrière : on repère ainsi aisément les échantillons lors de la coupe (voir schéma ci-dessous).



— Barres de Leuchart, pour inclusion à la paraffine.  
P, plaque support, B, bloc de paraffine, E, étiquette portant la référence.

Après complet refroidissement (qui peut être accéléré en plaçant les moules au réfrigérateur), les parallélépipèdes de paraffine se détachent facilement des barres de Leuchart. Cette mise en bloc est réversible (on peut faire fondre la paraffine), ce qui peut présenter un intérêt lorsqu'on souhaite modifier l'orientation d'une pièce.



Document 4 : Réalisation et traitements des coupes à la paraffine

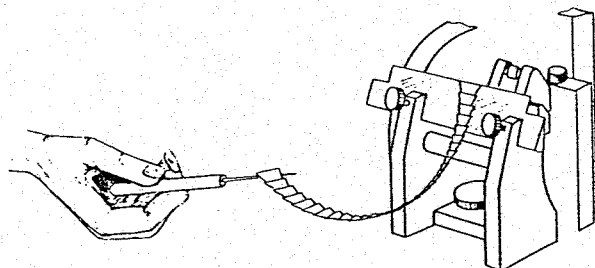
### \* Réalisation des coupes

Les coupes sont réalisées à l'aide d'un microtome Reichert-Jung, qui comporte trois parties essentielles :

- un support d'objet
- un support de rasoir
- un système d'avance mécanique

L'objet se déplace en direction du rasoir qui, lui, est fixé. Entre chaque mouvement de coupe, l'avance de l'objet détermine évidemment l'épaisseur de la section, qui a été ici fixée à  $5 \mu\text{m}$ . Avant de réaliser ces coupes, il est nécessaire d'enlever l'excès de paraffine qui entoure la pièce. Ceci est fait à l'aide d'une lame de scalpel, de manière à ce que soit dégagé un prisme contenant la pièce.

Le bloc taillé est fixé sur le support objet et par avancée mécanique, on obtient des coupes fines qui s'accrochent entre elles pour former un ruban (voir schéma ci-dessous).



Les coupes ainsi obtenues sont ensuite étalées et collées sur lames. Le principe de l'étalement est basé sur une dilatation des coupes à la chaleur. Ces dernières sont déposées sur lames de verre, recouvertes d'eau albuminée (qui coagule à la chaleur). Au contact d'une plaque chauffante, les coupes sont collées en même temps qu'étalées.

### \* Coloration et montage des coupes

Le déparaffinage, qui consiste à éliminer le milieu d'inclusion, précède la coloration. Les coupes, préalablement chauffées sur plaque, sont plongées dans deux bains successifs de cyclohexane. Les colorants étant en solution aqueuse, il convient de réhydrater les coupes dans des bains d'alcools de titres décroissants (alcools  $100^\circ$ ,  $95^\circ$ ,  $70^\circ$ ,  $50^\circ$ ) puis dans un bain d'eau distillée.

Deux colorants sont utilisés :

- l'érythrosine - orange G (voir composition annexe n° 5), sont plongées environ 3 min., avant d'être rincées dans l'alcool 70, puis l'eau distillée.
- le bleu de toluidine (composition annexe n° 5) durée 1 min.

Les noyaux des cellules sont alors colorés en bleu, le cytoplasme en rose et les globules rouges en orangé.

Le montage des coupes s'effectuant dans un milieu anhydre, l'entellan, une nouvelle déshydratation, dans les 2 bains d'alcool 100, est nécessaire. Après 2 bains de

cyclohexane, solvant de l'entellan, les coupes sont montées entre lame et lamelle. Après avoir séché les lames à l'étuve, celles-ci sont prêtes à être observées au microscope photonique.

### b) Les coupes semi-fines et ultra-fines

Ces coupes se font à partir de fragments d' $1\text{mm}^3$  de volume environ. Le principe est le même que pour la réalisation des coupes à la paraffine. Mais la fixation et l'inclusion des pièces dans la résine épon, demandent un travail plus minutieux que précédemment. Il s'agit de préserver au maximum les structures membranaires, afin d'optimiser l'observation.

Pour cela, il est nécessaire de travailler à une osmolarité proche de celle du milieu intérieur du serran. En général, on opère 150 à 200 mOsm au dessus de l'osmolarité interne de l'animal. Pour le serran, on a fixé la concentration osmotique du fixateur à 550 mOsm/l.

Au cours de cette manipulation, nous avons utilisé quatre solutions :

- une solution tampon de cacodylate de Na, solution mère apportant l'osmolarité nécessaire

- un fixateur

- une solution de rinçage

- une solution de post-fixation

La composition de chaque produit est présentée en annexe n° 6.

#### *\* La fixation*

Les pièces, réalisées sous la coupe binoculaire, sont placées dans des piluliers contenant le fixateur (glutaraldéhyde + tampon), pendant 3 heures au réfrigérateur.

#### *\* Le rinçage*

Afin d'éliminer l'excès de fixateur, on immerge les pièces dans trois bains successifs de solution de rinçage. Le saccharose contenu dans cette solution apporte l'osmolarité complémentaire, identique à celle du fixateur.

#### *\* La post-fixation*

La post-fixation complète la fixation précédente et prépare les pièces à l'observation en microscopie électronique. La solution de post-fixation contient du tétraoxyde de l'osmium  $\text{OsO}_4$  (improprement appelé "acide osmique"). Ce métal lourd se dépose sur les structures cellulaires et accentue les contrastes membranaires. Les pièces sont laissées dans cette solution une heure à  $5^\circ\text{C}$ .

Cette manipulation se réalise sous la hotte, avec gants et lunettes car l'osmium est un produit très toxique et très volatile.

#### \* *Déshydratation et inclusion dans la résine*

Après un rinçage des pièces il est nécessaire comme pour la paraffine, de les déshydrater, la résine épon étant un milieu anhydre. La déshydratation se fait par passage dans des bains d'acétone de titre croissant. On réalise donc :

- un passage dans l'acétone 50 %
- 2 bains de 5 min dans l'acétone 70 %, puis 95 %
- 3 bains de 5 min dans l'acétone 100 %

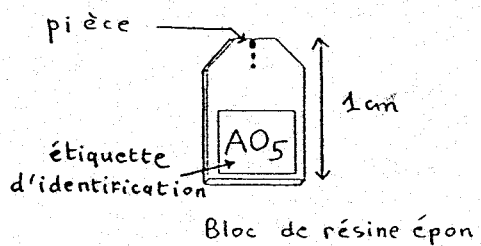
On place ensuite les pièces dans un mélange 50 % - 50 % d'acétone 100 et de résine. L'acétone facilite la pénétration de la résine au sein des cellules.

Au bout d'une heure, on change ce bain et on le remplace par un mélange résine + polymérisant ou "durcisseur" (5 %).

On laisse les piluliers bouchés une nuit au réfrigérateur, ce qui permet une bonne imprégnation des pièces.

Le lendemain, on inclut les pièces dans des moules contenant une résine neuve et son polymérisant durcisseur, ainsi qu'une étiquette identifiant les pièces.

La polymérisation de la résine se fait à l'étude (60°) en 2 à 3 jours. On obtient des blocs comme décrit sur le schéma ci-dessous :



#### \* *Réalisation des coupes et colorations*

##### # Coupes semi-fines

Les coupes semi-fines sont réalisées à l'aide d'un ultra-microtome LKB. A la différence de la technique de microtome, le bloc de résine est fixé et c'est le rasoir qui avance. On procède tout d'abord à la taille du bloc à l'aide d'un rasoir de verre, afin d'enlever l'excès de résine et de tailler une pyramide. Pour effectuer les coupes, on utilise un autre rasoir de verre possédant un réservoir. Celui-ci, rempli d'eau, permet de recueillir des coupes de 1  $\mu$ m d'épaisseur qui sont réalisées par avancée mécanique (voir annexe n° 7, Figs. 2 et 3).

Les coupes sont ensuite déposées sur une lame puis mises à sécher sur une platine chauffante. Une fois sèches, elles sont colorées au bleu de Richardson : les coupes placées sur une platine réglée à 50°C sont recouvertes, pendant 1 min., de ce colorant, puis rincées.

On réalise ensuite un montage entre lame et lamelles avec de l'entellan.

#### # Coupes ultra-fines

Ces coupes sont également réalisées avec l'ultramicrotome, mais on utilise un rasoir en diamant. Ce dernier, possède également un réservoir servant à récupérer les coupes. L'avancée (thermique) du rasoir est cette fois automatique et permet de réaliser des coupes de 500 Å d'épaisseur.

Les coupes sont placées sur de petites grilles de cuivre à maille fine. Pour la "coloration", on utilise en fait des contrastants métalliques : l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (voir composition annexe n°6). Ces deux métaux lourds se déposent sur les structures cellulaires et accentuent les contrastes en particulier membranaires.

On procède de la façon suivante, sous la hotte :

- les coupes sont mises en contact avec l'acétate d'uranyle pendant 30 min. à température ambiante, puis les grilles sont immergées pendant 10 secondes dans trois bains consécutifs d'alcool 50°

- les grilles, séchées sur papier filtre, sont mises en contact avec le citrate de plomb pendant 10 minutes à température ambiante

Les coupes sont rincées pendant 10 secondes dans trois bains consécutifs d'eau distillée et séchées sur papier filtre.

Les coupes sont alors prêtes à être observées au microscope électronique à transmission HITACHI HU12A (voir schéma, annexe n°7, Fig. 3).

## 7. Résultats

### a) Données morphométriques

A partir des mesures effectuées sur les serrans lors de leur sacrifice, nous avons calculé le rapport hépato-somatique (RHS)

$$\text{RHS} = \frac{\text{Poids du foie}}{\text{Poids total}} \times 100$$

Ce rapport exprime les variations pondérales du foie qui peuvent être induites, chez le poisson, par différents paramètres comme le stade de développement, le sexe ou l'état sanitaire.

Les données morphométriques acquises sont regroupées dans le tableau suivant :

Serran	Dose A0 reçue ( $\mu\text{g/g/j}$ )	Longueur standard (mm)	Poids total (g)	Poids du foie (g)	RHS
A0T1	témoin	130	47,70	0,590	1,2
A0T2	témoin	106	27,04	0,51	1,9
A0T3	témoin	110	26,14	0,56	2,1
A0T4	témoin	132	48,79	1,00	2,1
A0T5	témoin	111	20,91	0,36	1,7
A0T6	témoin	110	27,71	0,38	1,3
A01	0,1 - 3 jours	113	25,72	0,39	1,5
A02	0,1 - 3 jours	106	23,81	0,49	2
A03	0,1 - 3 jours	116	33,72	0,66	1,9
A04	0,3 - 3 jours	138	53,00	0,98	1,8
A05	0,3 - 3 jours	111	28,25	0,37	1,3
A06	0,3 - 3 jours	127	37,78	0,62	1,6
A07	0,1 - 7 jours	114	22,28	0,57	2,5
A08	0,1 - 7 jours	106	23,17	0,45	1,9
A09	0,1 - 7 jours	127	41,8	0,74	1,8
A010	0,3 - 7 jours	94	15,97	0,35	2,2
A011	0,3 - 7 jours	148	60,12	0,42	0,7
A012	0,3 - 7 jours	99	18,69	0,41	2

Nous avons réalisé un test de student t sur les valeurs de longueur standard afin de vérifier l'homogénéité de la population entre témoins et intoxiqués. Le test (voir annexe n° 8) confirme qu'il n'y a pas de différence significative entre ces deux échantillons.

De même, une comparaison entre valeurs du RHS des témoins et des différents lots intoxiqués pouvait être intéressant. Mais les échantillons (3 individus) sont trop faibles pour effectuer un test statistique significatif. Nous l'avons tout de même réalisé mais en regroupant d'une part tous les témoins et d'autre part tous les intoxiqués (12 individus) : aucune différence significative entre ces deux échantillons n'a été révélée (voir annexe n° 8).

#### b) Observations histo-cytologiques du foie

##### **A - Les témoins**

Les coupes histologiques des témoins permettent de mettre en évidence l'organisation structurale du foie des serrans qui, à la différence de celui des Vertébrés supérieurs, est un organe unilobé. Le parenchyme hépatique apparaît homogène faiblement basophile donc clair (Pl. I ; Fig. 1). Il est constitué de cellules polygonales : les hépatocytes (Pl. I ; Fig. 2). Ces cellules sont disposées en travées ou cordons selon le plan de coupe. Les travées hépatocytaires, bicellulaires, s'intercalent entre deux capillaires sanguins

appelés sinusoides (Pl. I ; Fig. 1).

Les sinusoides sont limités par un endothélium simple, au dessous duquel n'existe pas de lame basale (Pl. I ; Fig. 1). Ils constituent un réseau capillaire assurant la communication entre les artères et les veines hépatiques (mais aussi entre les veines hépatiques et les veines porte-hépatiques). Chez le serran, aucune caractéristique histologique ne permet de différencier afférences et efférences sanguines. De plus, aucune infiltration pancréatique ("hépatopancréas") n'est observable. Les canaux biliaires sont limités par épithélium cubique simple (avec une bordure en brosse) (Pl. III ; Fig. 4).

L'observation en microscopie électronique révèle l'organisation cellulaire de l'hépatocyte. L'arrangement en travées bicellulaires impose, chez les poissons, une double polarité cellulaire biliaire. L'hépatocyte possède 2 pôles : le pôle sanguin sinusoidal et le pôle biliaire canaliculaire.

Au niveau du pôle sinusoidal, la membrane plasmique de l'hépatocyte se spécialise en de nombreuses microvillosités qui augmentent la surface d'échanges, entre le sang et la cellule hépatique (Pl. I ; Fig. 3). Ces échanges sont également facilités par la présence de pores dans l'endothélium des sinusoides (capillaires fenestrés), (Pl. I ; Fig. 3). Des microvillosités sont également présentés au niveau du pôle canaliculaire (nous ne les avons pas observées). Le noyau des hépatocytes, sphérique (Pl. I ; Fig. 3) ou ovoïde, se trouve excentré vers le pôle sinusoidal (Pl. I ; Figs 2 et 3). Il contient de la chromatine granulaire plus condensée à la périphérie (hétérochromatine) et ainsi associée au nucléole qui occupe une position sub-centrale (Pl. I ; Fig. 3).

Le cytoplasme contient des organites (mitochondries, réticulum endoplasmique) regroupés en position périnucléaire. Le reste du cytoplasme est occupé par du glycogène, principale réserve énergétique hépatique. Il est présent sous forme de particules et forme de grandes plages glycogéniques. Ces plages glycogéniques regroupent le noyau et les organites cytoplasmiques périnucléaires en position pariétale.

Chez la plupart des poissons témoins, sont également présentes quelques inclusions lipidiques.

Notons enfin l'existence de quelques lyses hémorragiques, caractères pathologiques.

## **B - Les poissons intoxiqués**

### 1/ Serrans intoxiqués par 0,1 µg d'A0/g/j pendant 3 jours

Les réponses hépatiques, à l'échelle histologique, sont relativement variables d'un individu à l'autre. Cependant, le parenchyme hépatique présente la même organisation que celle des témoins. On observe, chez les individus A02 et A03, une "vacuolisation" des cellules hépatiques, traduisant la présence d'inclusions lipidiques.

En ce qui concerne le serran A01, deux lyses (dissociation du parenchyme et débris



cellulaires dispersés) ont été observées une lyse du parenchyme et une lyse péricanalaire (Pl. III ; Fig. 4), toutes deux focalisées, le reste du parenchyme étant normal.

#### 2/ Serrans intoxiqués par 0,3 µg d'AO/g/j pendant 3 jours

Différentes modifications structurales du parenchyme ont été observées. Elles demeurent comme nous l'avons constaté pour le premier lot d'intoxiqués, focalisées.

Des inclusions lipidiques sont présentes dans les hépatocytes. Des centres mélanomacrophages (CMM), absents chez les témoins, ont été observés chez le serran A04 (Pl. II ; Fig. 3). Ces CMM sont couramment situés au voisinage des vaisseaux sanguins ou associés aux canaux biliaires. Ce sont des nodules formés de lymphocytes, de macrophages, de mélanomacrophages et de débris cellulaires divers. Ils sont de tailles très variables et à contenu hétérogène de nature lipoprotéique (lipofuscines).

Les individus A05 et A06 présentent des lyses de deux types : des lyses hémorragiques du parenchyme où des érythrocytes et des lymphocytes sont visibles (Pl. II ; Fig. 2 et Pl. II, Fig. 3) et des lyses péricanalaires (Pl. III ; Fig. 4).

On observe également une dualité du parenchyme hépatique. Celui-ci apparaît plus dense à certains endroits (Pl. II ; Fig. 2), en raison d'une répartition plus longue des organites (à la différence des organites regroupés autour du noyau chez les témoins).

#### 3/ Serrans intoxiqués par 0,1 µg d'AO/g/j pendant 7 jours

Des inclusions lipidiques cytoplasmiques sont présentes en plus grand nombre (Pl. IV ; Fig. 1) que dans les cas précédents.

De nombreuses lyses sont observées chez A07 et A08. Elles sont périvasculaires (Pl. IV ; Fig. 3) et péricanalaires mais affectent également le parenchyme.

Des cordons nécrotiques s'infiltrent dans le parenchyme et on assiste à une pycnose des noyaux (Pl. III ; Fig. 1) (La cellule se déshydrate et le noyau se condense).

A l'échelle ultrastructurale, une fibrose péricanalaire a été identifiée chez l'individu A09. Des fibres de collagène; sécrétées par des fibroblastes, s'accumulent au contact de la lame basale du canalicule biliaire.

#### 4/ Serrans intoxiqués par 0,3 µg d'AO/g/j pendant 7 jours

Comme dans le lot précédent, les inclusions lipidiques cytoplasmiques sont plus volumineuses et plus nombreuses (Pl. V ; Fig. 2). A l'échelle ultrastructurale, des inclusions lipidiques intranucléaires sont présents chez l'individu A011 et des noyaux présentent des altérations de leurs contours (Pl. V ; Fig. 1 et Pl. V ; Fig. 1). Des cordons nécrotiques corticaux contenant des noyaux pycnotiques sont observables (Pl. II ; Fig. 4).

Les individus de ce lot expérimental présentent des lyses focalisées ainsi que plusieurs centres mélano-macrophages (Pl. II ; Fig. 4). On note en outre, une disparition

des réserves glycogéniques (Pl. V ; Figs. 1 et 2).

Les modifications hépatiques observées sont résumées dans le tableau suivant :

Poisson	Dose d'A0 reçue	Lip cyt	CMM	PHd	Fib	Cc	Np	Ly	DeFN	Lip N	Glyc.
A0T1	témoin	+	0	0	0	0	0	+	N	N	N
A0T2	témoin	+	0	0	0	0	0	0	N	N	N
A0T3	témoin	+	0	0	0	0	0	0	N	N	N
A0T4	témoin	+	0	0	0	0	0	0	N	N	N
A0T5	témoin	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
A0T6	témoin	+	0	0	0	0	0	+			
A01	0,1 µg/3j.	+	0	0	0	0	0	+	N	N	N
A02	0,1 µg/3j.	+	0	0	0	0	0	+	N	N	N
A03	0,1 µg/3j.	+	0	0	0	0	0	0	N	N	N
A04	0,3 µg/3j.	+	+	0	0	0	0		N	N	N
A05	0,3 µg/3j.	+	+	+	0	0	0	+	N	N	N
A06	0,3 µg/3j.	+	0	0	0	0	0	+	0	0	-
A07	0,1 µg/7j.	++	+	0	0	0	+	+	N	N	N
A08	0,1 µg/7j.	++	0	0	0	0	0	+	N	N	N
A09	0,1 µg/7j.	++	0	+	+	0	0	0	0	0	-
A010	0,3 µg/7j.	++	0	0	0	0	+	0	N	N	N
A011	0,3 µg/7j.	++	0	0	0	+	+	+	+	+	-
A012	0,3 µg/7j.	++	0	0	0	0	0	+	N	N	N

Cc : cordons nécrotiques corticaux  
 CMM : centre melano macrophage  
 DefN : noyaux aux contours déformés  
 Fib : fibrose  
 gly : réserves glycogéniques  
 Lip cyt : inclusions lipidiques cytoplasmiques  
 LipN : inclusions lipidiques nucléaires  
 LipN : inclusions lipidiques nucléaires  
 Ly : lyse  
 Np : noyaux pycnotiques  
 PHd : parenchyme dense

- : réduction  
 0 : absence  
 + : présence  
 ++ : abondance  
 N : non observé au M.E.T.

### 8. Discussion - Conclusion

Nous noterons tout d'abord l'importante variabilité individuelle des réponses hépatiques entre poissons d'une même série expérimentale. Ces variations ne peuvent pas être liées à l'âge : les individus sont tous des juvéniles issus d'une même population si l'on en croit les tests statistiques. Le sexe ne peut pas être mis en cause car cette espèce présente un hermaphrodisme synchrone. Ces différences peuvent, peut-être, provenir d'un passé

sanitaire différent ou d'autres facteurs non connus y compris des différences génétiques ...

L'étude des coupes histo et cytologiques a montré, par comparaison avec les témoins, l'existence de **diverses réponses hépatiques** chez les individus intoxiqués : réduction des réserves glycogéniques, accumulation importante de lipides, développement de fibres de collagène, présence d'altérations nécrotiques (condensation cytoplasmique par déshydratation et pycnose nucléaire) et des plages de lyse focalisées. Ces modifications structurales du parenchyme peuvent être interprétées conformément aux **différentes étapes d'un stress**. En effet, **dans un premier temps**, l'intoxication provoque une **réaction adaptative des hépatocytes**. Quand l'organisme est agressé, on assiste généralement à une mobilisation rapide des défenses : sous la stimulation hormonale (cortisol), les réserves glycogéniques sont utilisées (glycogénolyse), provoquant une augmentation de la glycémie. Des mécanismes de résistance se mettent en place sous forme de processus de détoxication. Les organites, réticulum endoplasmique et mitochondries, se développent et tendent à occuper tout le volume cellulaire. Ils assurent la synthèse d'enzymes de détoxication telles que des hydrolases (phosphatases) et monooxygénases (cytochrome P450). Un tel développement des organites cytoplasmiques expliquerait l'augmentation de densité (colorabilité) du parenchyme.

La toxine liposoluble peut aussi être séquestrée à l'intérieur de la cellule dans les inclusions lipidiques. Selon Kamazawa (1982), l'apparition de telles inclusions lipidiques constitue un **mécanisme bioprotecteur** particulièrement efficace. Ceci constituerait une explication à l'augmentation en nombre et en volume de globules lipidiques chez les serrans intoxiqués. De même, le développement des fibres de collagène constituant une fibrose (péricanalaire et/ou périvasculaire), peut être interprétée comme une forme de résistance du foie par réduction des échanges (sang-hépatocyte et hépatocyte-bile).

Dans un **second temps**, les modifications histopathologiques peuvent aboutir à de **véritables lésions cellulaires**, sous la forme de pycnoses nucléaires (mort cellulaire) et de zones de lyse. Ces lésions témoignent d'une **souffrance physiologique du foie**, d'un épuisement des défenses cellulaires. Il convient cependant d'insister sur le **caractère focalisé des lésions** : l'essentiel du parenchyme hépatique ne paraît pas perturbé.

L'ingestion d'acide okadaïque induit donc certaines altérations hépatiques qui peuvent conduire à une mort cellulaire de certains secteurs du parenchyme. De telles modifications histopathologiques observées au cours de notre expérience sont comparables à celles décrites lors de contamination par divers xénobiotiques en particulier des pesticides : l'atrazine (Biagianti, 1990), des métaux lourds : le cadmium (Gony-Lemaire, 1990) et en réponse à des biotoxines algales, toxines ciguatériques (Gonzalez, 1992). Ces modifications doivent donc être considérées comme des **lésions non spécifiques** pouvant être induites par de nombreux agents étiologiques. Remarquons, cependant, chez les serrans intoxiqués ici, la faible présence de centres mélano-macrophages alors que ceux-ci ont été observés en

grand nombre dans les diverses expériences de contamination précédentes. En effet, la présence de CMM traduirait une stimulation des activités immunitaires, une mobilisation des macrophages et une concentration des déchets cellulaires dans ces CMM.

En conclusion, cette étude doit être considérée comme essentiellement préliminaire et les résultats ne peuvent être qu'**indicatifs de tendances**, en raison de l'absence de données ayant une signification statistique. Les **différentes faiblesses** de cet travail peuvent être soulignées :

1/ Petit nombre d'échantillons testés en raison de la faible quantité d'acide okadaïque disponible (300  $\mu\text{g}$ ) et aussi à cause des difficultés d'élevage et de maintenance.

2/ Le choix de la méthode de contamination (voie trophique) qui offre l'avantage de se rapprocher des conditions naturelles de transmission de la toxine mais présente cependant l'inconvénient, à la différence de l'injection intrapéritonéale (i.p.) de ne pas permettre de connaître avec précision la quantité exacte de toxine ingérée.

3/ L'absence de travaux antérieurs qui ne permet pas de savoir si le foie constitue le meilleur organe-cible vis-à-vis de l'acide okadaïque ni quel est le seuil de sensibilité de cet organe.

En dépit de ces réserves, l'**intérêt de ce travail** réside dans les points suivants :

1/ confirmation de l'intérêt du serran en qualité de modèle par des tests d'écotoxicologie

2/ révélation de l'existence de modifications hépatiques, qu'elles soient métaboliques (réduction des réserves glycogéniques, accroissement des réserves lipidiques) ou structurales (parenchyme clair à cytoplasme "ségrége" ou parenchyme dense à organites plus développés et distribués dans l'ensemble du compartiment cytoplasmique) qui, toutes pourraient être interprétées comme des réponses adaptatives à un stress.

3/ démonstration d'effets pathologiques sous la forme de nécroses, pycnoses, fibroses et lyses du parenchyme hépatique, d'extension toujours limités. Ces phénomènes sont surtout sensibles pour la dose la plus élevée (0,3  $\mu\text{g}$ ) pendant la plus grande période (7 jours). De nouveaux tests, réalisés pour des doses et périodes de contamination plus élevées, pourraient révéler des effets plus sérieux.

4/ affirmation d'une relative faiblesse de toxicité de l'acide okadaïque : absence de létalité induite et réponses pathologiques toujours focalisées, l'ensemble du parenchyme hépatique reste normal ou subnormal.

On peut en déduire que, du moins pour des concentrations et des périodes d'intoxication faibles, de l'ordre de celles testées ici, les effets écologiques sur des poissons conchyliophages consommateurs de coquillages contaminés lors de blooms à *Dinophysis* paraissent peu inquiétants.

## CONCLUSION GENERALE

La réalisation de ce stage me tenait à coeur, car la biologie marine, peu abordée dans le programme de l'I.U.T, est un domaine que je voulais découvrir.

Cette expérience, bien que limitée dans le temps, s'est avérée très positive, même si les résultats obtenus n'ont pas été aussi démonstratif que prévus. J'ai eu, en effet, la possibilité, à travers la lecture de plusieurs publications scientifiques, thèses et rapports, d'acquérir des connaissances concernant l'écotoxicologie et plus particulièrement le problème des biotoxines algales.

Mon stage m'a permis d'apprendre de nouvelles techniques : méthodes d'élevage de poissons en aquarium qui exigent une attention journalière, techniques d'histocytologie mais également photographiques. J'ai, de plus, pris conscience de la difficulté de conduire une expérience sur du matériel vivant avec les problèmes d'une part d'acclimatation des poissons aux conditions d'élevage, et d'autre part d'intégration des résultats (essayer de différencier "normal" et "pathologique"). Du point de vue relationnel, j'ai eu la chance d'être très bien accueillie par toute l'équipe du laboratoire. Ceci m'a permis de profiter de l'expérience et des connaissances aussi bien des enseignants-chercheurs que du personnel technique, qui m'ont accorder leur aide.

BIBLIOGRAPHIE

## BIBLIOGRAPHIE

- Biagianti-Risbourg S., 1990 - Contribution à l'étude du foie de juvéniles de muges (Téléostéens, Mugilidés) contaminés expérimentalement par l'atrazine (s-triazine herbicide) : approche ultrastructurale et métabolique : intérêt en écotoxicologie. *Thèse Univ. Perpignan*, 451 pp.
- Bruslé J., 1995 - The impact of harmful algal blooms on finfish : occurrence of fish kills, pathology, toxicological mechanisms, ecological and economic impacts. *Repères Océan* (sous presse).
- Gony-Lemaire S., 1990 - Etude expérimentale de l'action du cadmium sur les juvéniles (civelles et anguillettes) de l'anguille européenne *Anguilla anguilla* (L. 1758) : analyse structurale et fonctionnelle de certains organes-cibles. *Thèse Univ Perpignan*, 173 pp.
- Gonzalez G., Crespo S. & Brusle J., 1993 - Histo-cytological study of the liver of the *cabrilla* sea bass, *Serranus cabrilla*, an available model for marine fish experimental studies. *J. Fish. Biol.*, 43 : 363-373.
- Gonzalez i Anadon G., 1992 - Contribution à la connaissance des processus ciguatériques : étude anatomo-physiologique et histo-cytologique des effets de(s) toxine(s) de *Gambierdiscus toxicus* chez *Serranus cabrilla*. Etude hépatique de poissons de zones ciguatériques. *Thèse Univ. Perpignan*, 297 pp.
- Krogh et al., 1985 in John B. Mahomey - The detrimental biological effects of phytoplankton blooms deserve increased attention.
- Mosconi-Bac N., 1991 - Effets de l'alimentation sur les caractères structuraux et métaboliques du foie de loup *Dicentrarchus labrax* en aquaculture. *Thèse Univ. Perpignan*, 193 pp.
- Murakami Y., Oshima Y. & Yasumoto Y., 1982 - Identification of okadaic acid as a toxic component of a marine dinoflagellate : *Prorocentrum lima*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish*, 48 : 69-72.

Prakash A., Medcof J.C. & Tennant A.D., 1971 - Paralytic shellfish poisoning in eastern Canada. *Fish. Res. Bd. Can. Bull.*, 177 : 88.

Tachibana<sup>o</sup> K., Scheuer P.J., Tsukitami Y., Kikuchi H., Engen D.V., Clardy J., Gopichaud Y. & Schmitz F.J., 1981 - Okadaic acid, a cytotoxic polyether of two marine sponges of the genus *Halichondria*. *J. Am. Chem. Soc.*, 103 : 2469-2471.

Takagi T., Hayashi K. & Itabashi Y., 1984 - Toxic effect of free unsaturated fatty acids in the mouse assay of *Dinophysis* toxin by intraperitoneal injection. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 50 : 1413-1418.

Underhal<sup>o</sup> B. & Yndestad M. & Aune T., 1985 - DSP intoxication in Norway and Sweden, autumn 1984 - spring 1985. In : *Toxic dinoflagellates (Anderson, White & Baden eds) Elsevier*, 489-494.

Yasumoto T., Murata M., Oshima Y., Sano M., Matsumoto G.K. & Clardy J., 1985 - Diarrhetic shellfish toxins. *Tetrahedron*, 41 : 1019-1025.

Yasumoto T., Oshima Y. & Yamaguchi M., 1978 - Occurrence of a new type of shellfish poisoning in the Tonoku District. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 44 : 1249-1255.



ICONOGRAPHIE

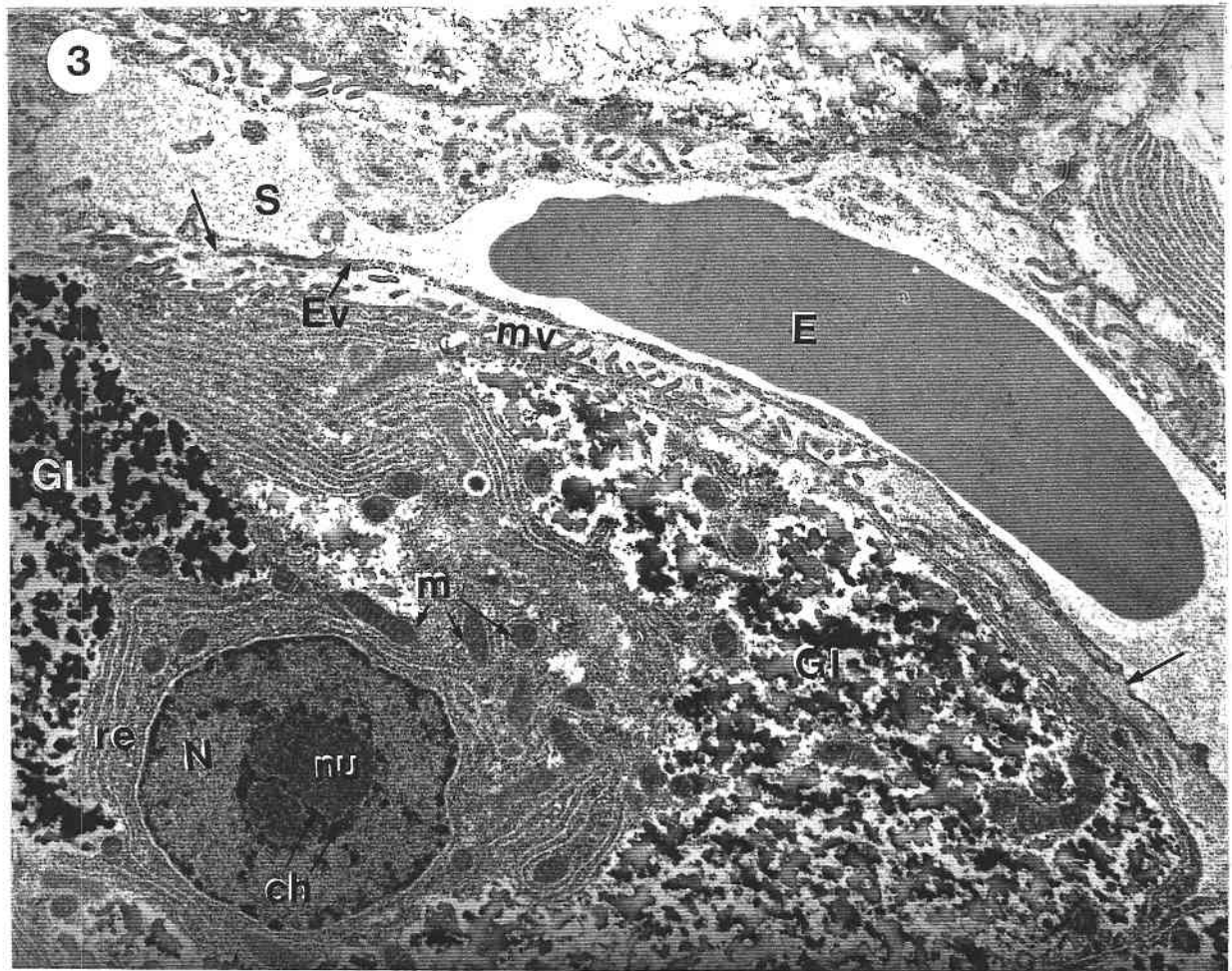
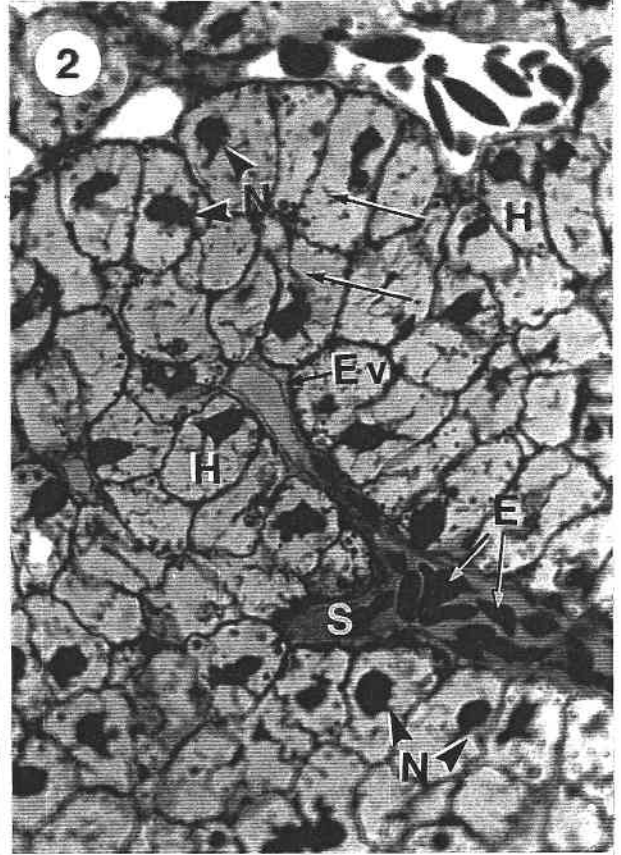
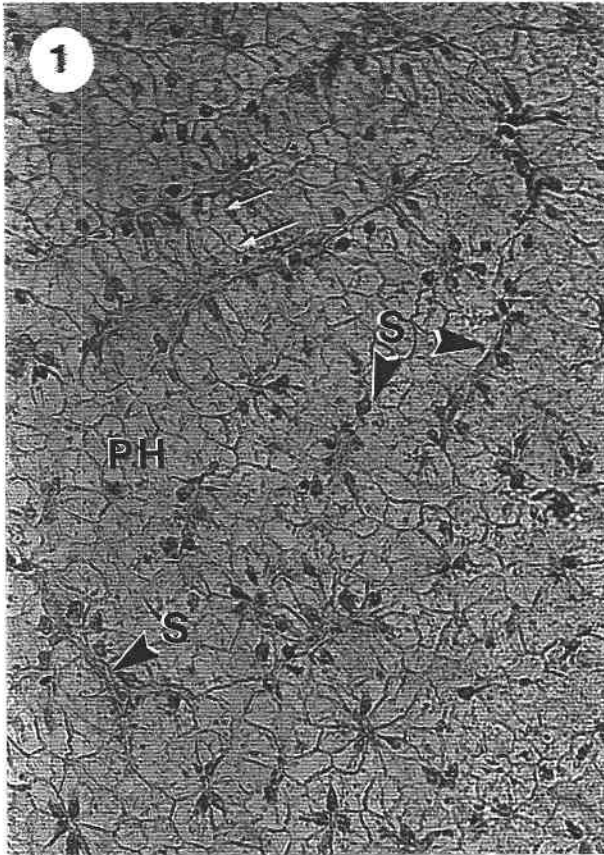
# PLANCHE I

## FOIE TEMOIN

- Fig. 1 :** **Parenchyme hépatique clair (coupe à la paraffine)**  
Entre deux sinusoides, deux rangées d'hépatocytes ( ) dont les noyaux sont proches des sinusoides.  
Serran AOT5 (LT = 130 cm ; PT = 20,91 g)  
(x 368)
- Fig. 2 :** **Parenchyme hépatique clair (coupe semi-fine)**  
Hépatocyte clair à noyau et organites périnucléaires denses (fortement basophiles) généralement disposés au pôle vasculaire.  
Erythrocyte dans la lumière d'un sinusoides.  
Deux rangées d'hépatocytes (⇔) entre deux sinusoides.  
Serran AOT1 (LT = 160 cm ; PT = 47,7 g)  
(x 993)
- Fig. 3 :** **Un hépatocyte au contact d'un sinusoides (coupe ultra-fine)**  
Hépatocyte à noyau contenant un nucléole et de la chromatine associée  
Organites (mitochondrie, réticulum endoplasmique) en position périnucléaire.  
Cytoplasme riche en réserves glycogéniques  
Le pôle vasculaire de l'hépatocyte est différencié en microvillosités.  
L'endothélium vasculaire est fenestré (←).  
Un érythrocyte occupe la lumière du sinusoides  
Serran AOT2 (LT = 134 cm ; PT = 27,04 g)  
(x 12 800)

### Légendes :

ch	:	chromatine
E	:	érythrocyte
Ev	:	endothélium vasculaire
Gl	:	glycogène
H	:	hépatocyte
m	:	mitochondrie
N	:	noyau
nu	:	nucléole
PH	:	parenchyme hépatique
re	:	réticulum endoplasmique
S	:	sinusoides
⇔	:	2 rangées d'hépatocytes
←	:	épithélium fenestré



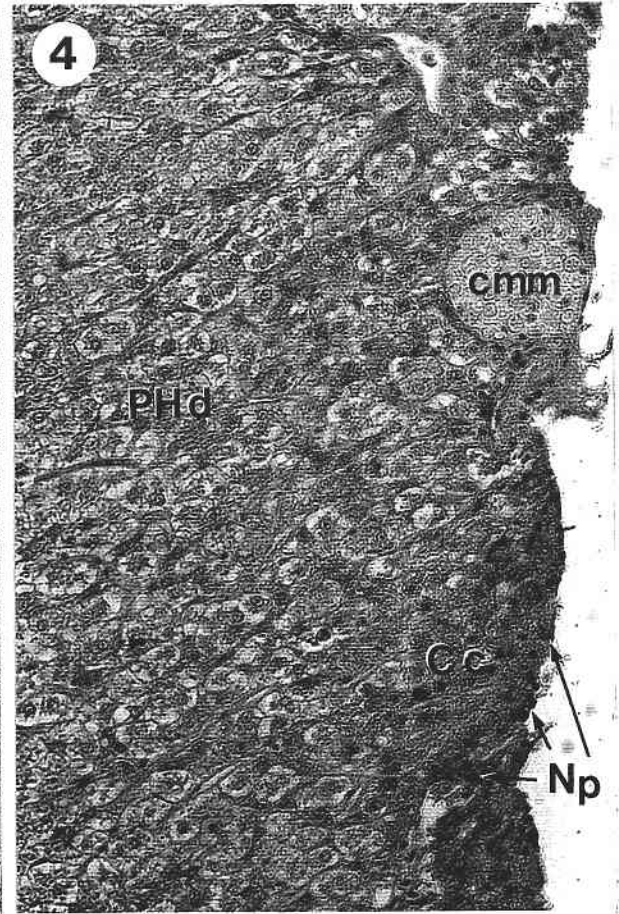
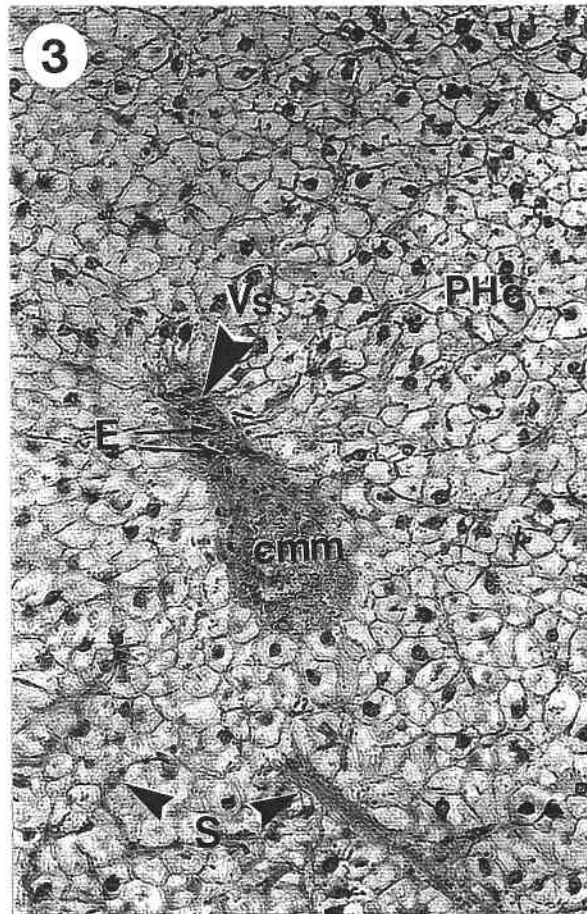
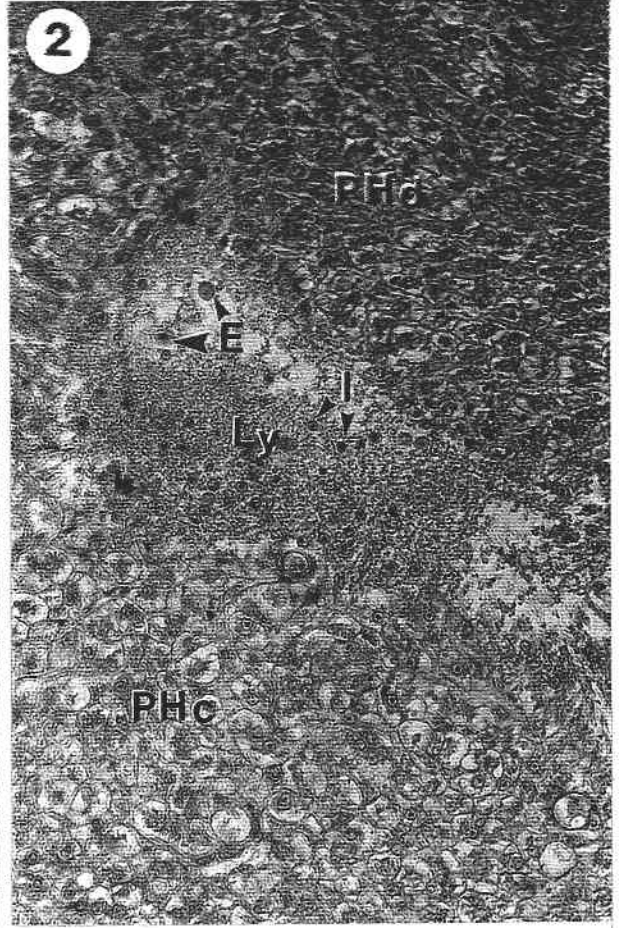
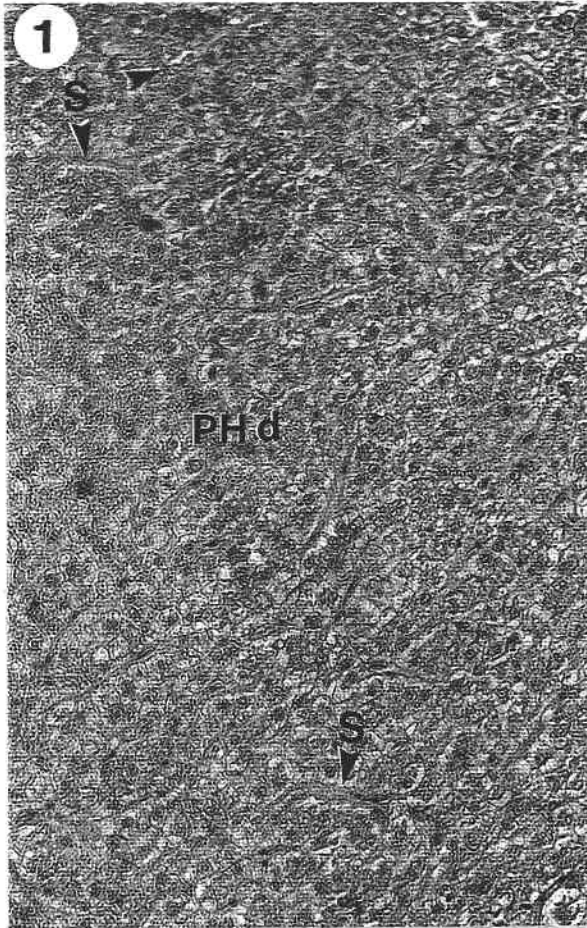
## PLANCHE II

### MODIFICATION HEPATIQUES (coupes à la paraffine)

- Fig. 1 :** Parenchyme hépatique dense.  
Serran A011 (LT = 182 cm ; PT = 60,12 g)  
(x 937)
- Fig. 2 :** Dualité entre un parenchyme hépatique clair et un parenchyme hépatique dense.  
Présence de lymphocytes et d'érythrocytes au niveau d'une lyse hémorragique  
Serran A05 (LT = 137 cm ; PT = 28,25 g)  
(x 937)
- Fig. 3 :** Présence d'un centre mélanomacrophage adjacent à un vaisseau sanguin  
Serran A04 (LT = 169 ; PT = 53,00 g)  
(x 937)
- Fig. 4 :** Cordons nécrotiques corticaux.  
Présence d'un centre mélanomacrophage au voisinage de la zone nécrotique contenant des noyaux pycnotiques.  
Serran A011 (LT = 182 cm ; PT = 60,12 g)  
(x 993)

#### Légendes :

Cc	:	cordons nécrotiques corticaux
CMM	:	centre mélanomacrophage
E	:	érythrocyte
l	:	lymphocyte
Ly	:	lyse
Np	:	noyaux pycnotiques
PHc	:	parenchyme hépatique clair
PHd	:	parenchyme hépatique dense
S	:	sinusoïde
Vs	:	vaisseau sanguin



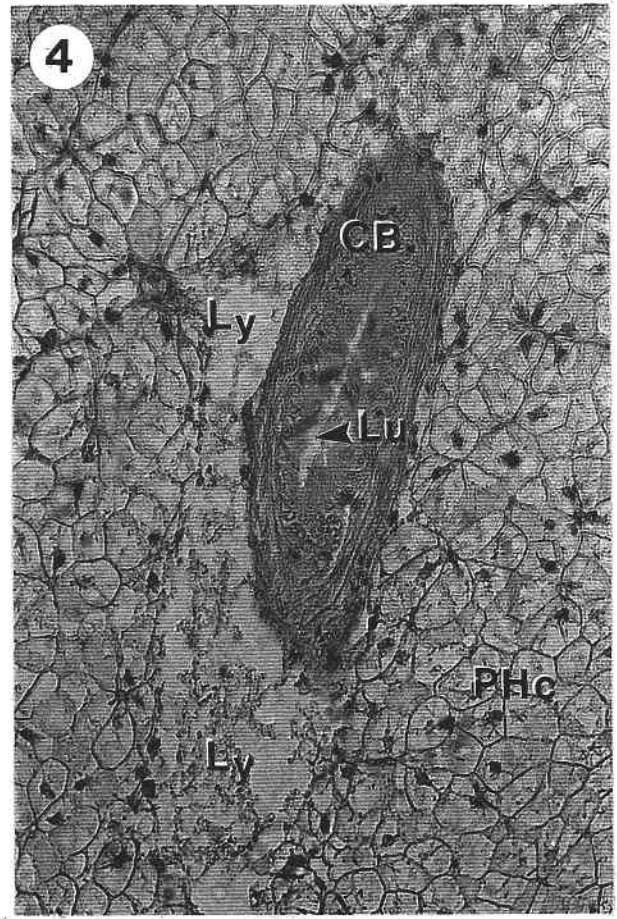
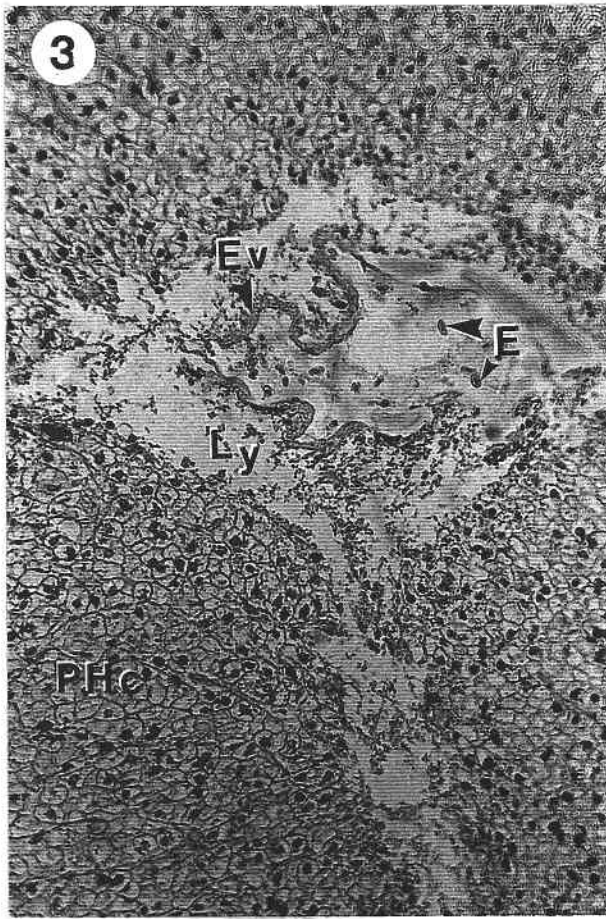
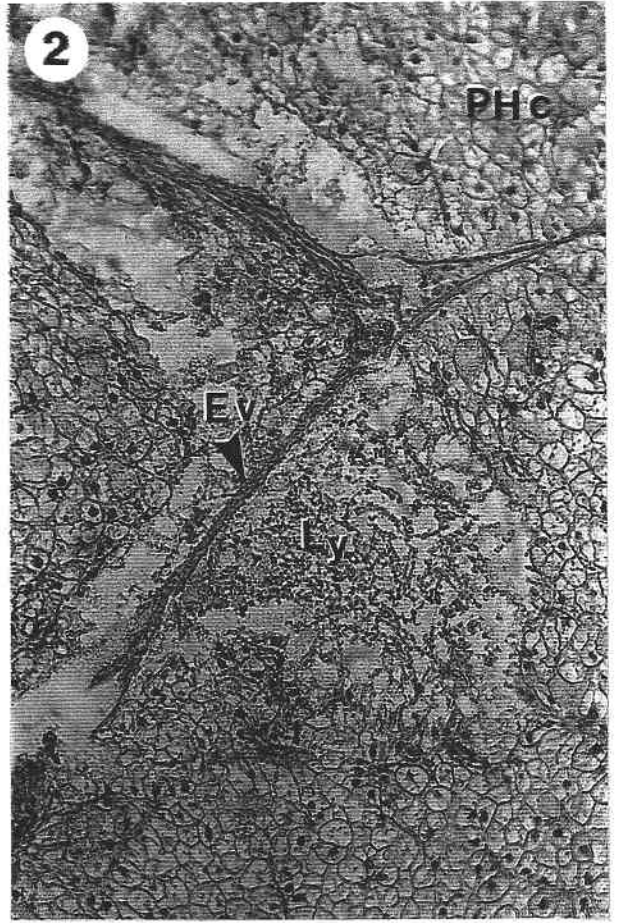
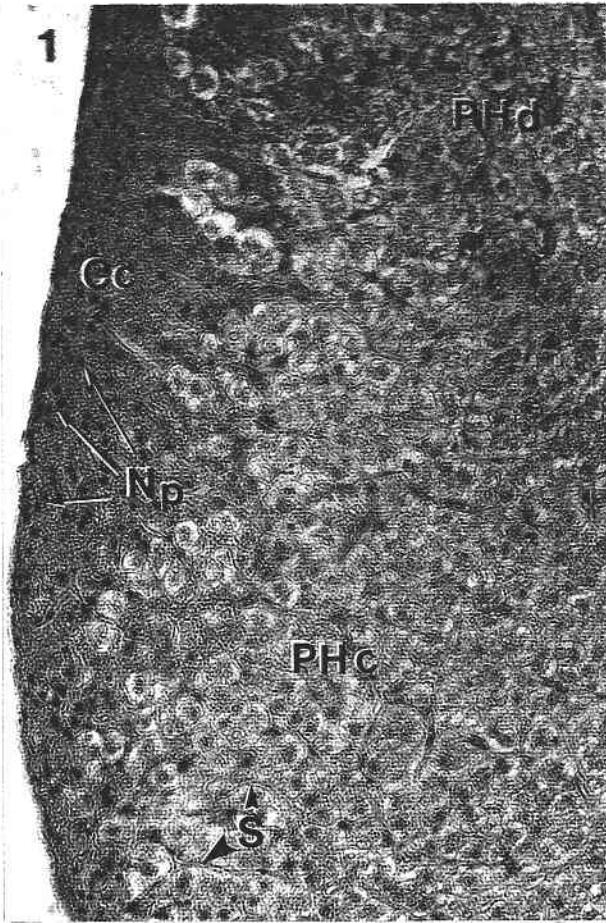
## PLANCHE III

### MODIFICATIONS HEPATIQUES (coupes à la paraffine)

- Fig. 1 :**            **Cordons nécrotiques corticaux et noyaux pycnotiques.**  
Serran 07 (LT = 127 cm ; PT = 22,28 g)  
(x 937)
- Fig. 2 :**            **Lyse périvasculaire.**  
L'endothélium vasculaire reste visible au niveau de la zone de lyse  
Serran A07 (LT = 127 cm ; PT = 22,28 g)  
(x 937)
- Fig. 3 :**            **Lyse hémorragique périvasculaire.**  
Erythrocytes dispersés dans la zone de lyse. Lambeaux d'endothélium  
vasculaire  
Serran A06 (LT = 158 cm ; PT = 37,78 g)  
(x 937)
- Fig. 4 :**            **Lyse péricanalaire.**  
Serran A07 (LT = 127 cm ; PT = 22,28 g)  
(x 937)

#### Légendes :

CB	:	canal biliaire
Cc	:	cordons nécrotiques corticaux
CMM	:	centre mélanomacrophage
E	:	érythrocytes
Ev	:	endothélium vasculaire
Lu	:	lumière
Ly	:	lyse
Np	:	noyaux pycnotiques
PHc	:	parenchyme hépatique clair
S	:	sinusoïde



## PLANCHE IV

### MODIFICATIONS HEPATIQUES (coupes semi-fine)

- Fig. 1 :** Hépatocytes riches en inclusions lipidiques  
Noyau avec des organites plurinucléaires denses (basophiles)  
Serran A06 (LT = 158 cm ; PT = 37,78 g)  
(x 896)
- Fig. 2 :** Parenchyme hépatique dense présentant des inclusions lipidiques coalescentes.  
Hépatocytes à noyaux bien visibles  
Serran A01 (LT = 137 cm ; PT = 25,72 g)  
(x 947)
- Fig. 3 :** Lyse périvasculaire avec globules lipidiques.  
Serran A07 (LT = 127 cm ; PT = 22,28 g)  
(x 1100)
- Fig. 4 :** Parenchyme hépatique présentant une lyse hémorragique.  
Serran A02 (LT = 130 cm ; PT = 23,81 g)  
(x 896)

#### Légendes :

E	:	érythrocytes
Ev	:	endothélium vasculaire
Gl	:	globules lipidiques
H	:	hépatocytes
IL	:	inclusions lipidiques
Ly	:	lyse
N	:	noyau
PHd	:	parenchyme hépatique dense
S	:	sinusoïde
Vs	:	vaisseau sanguin



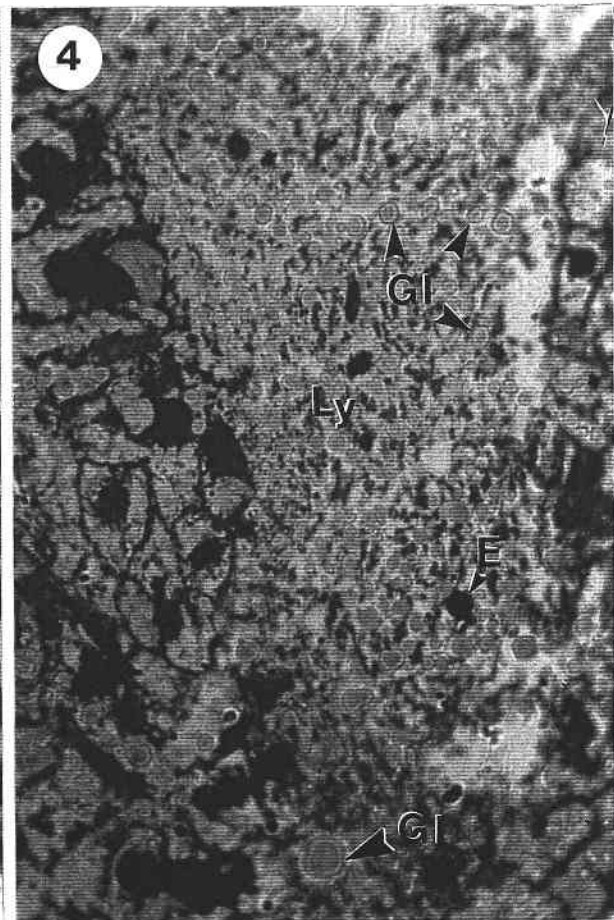
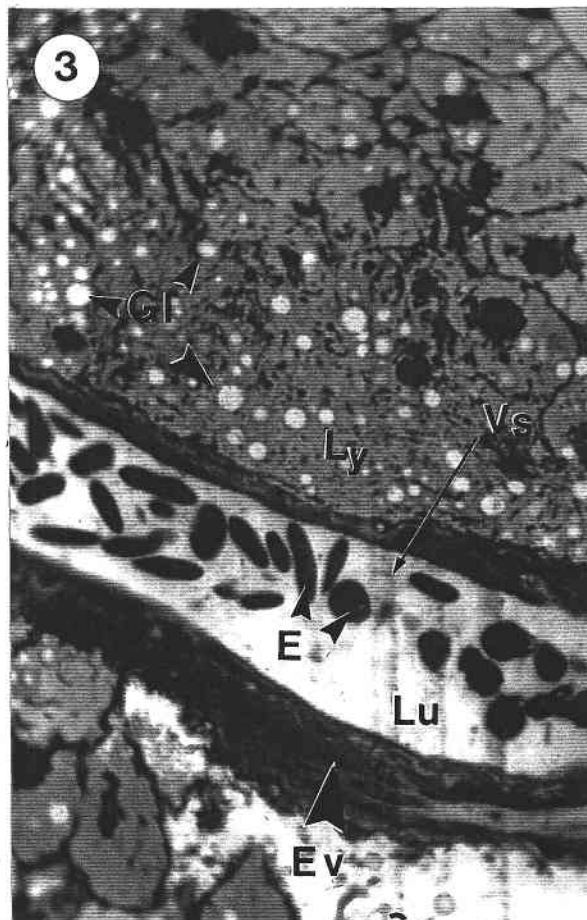
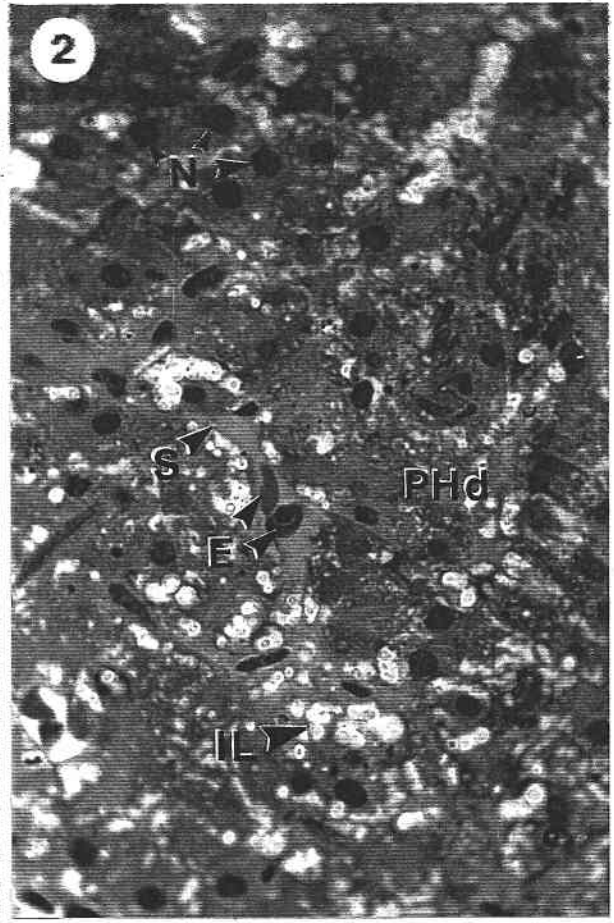
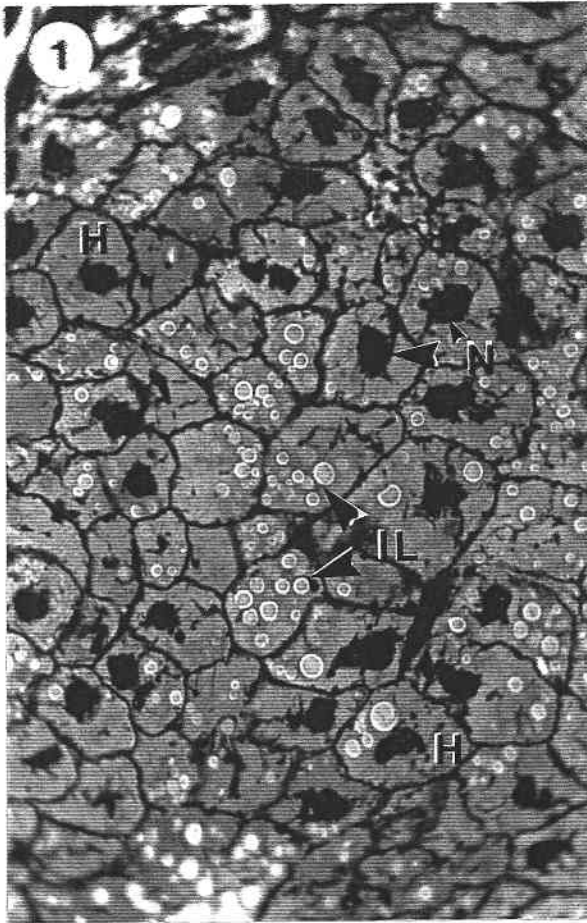


PLANCHE V

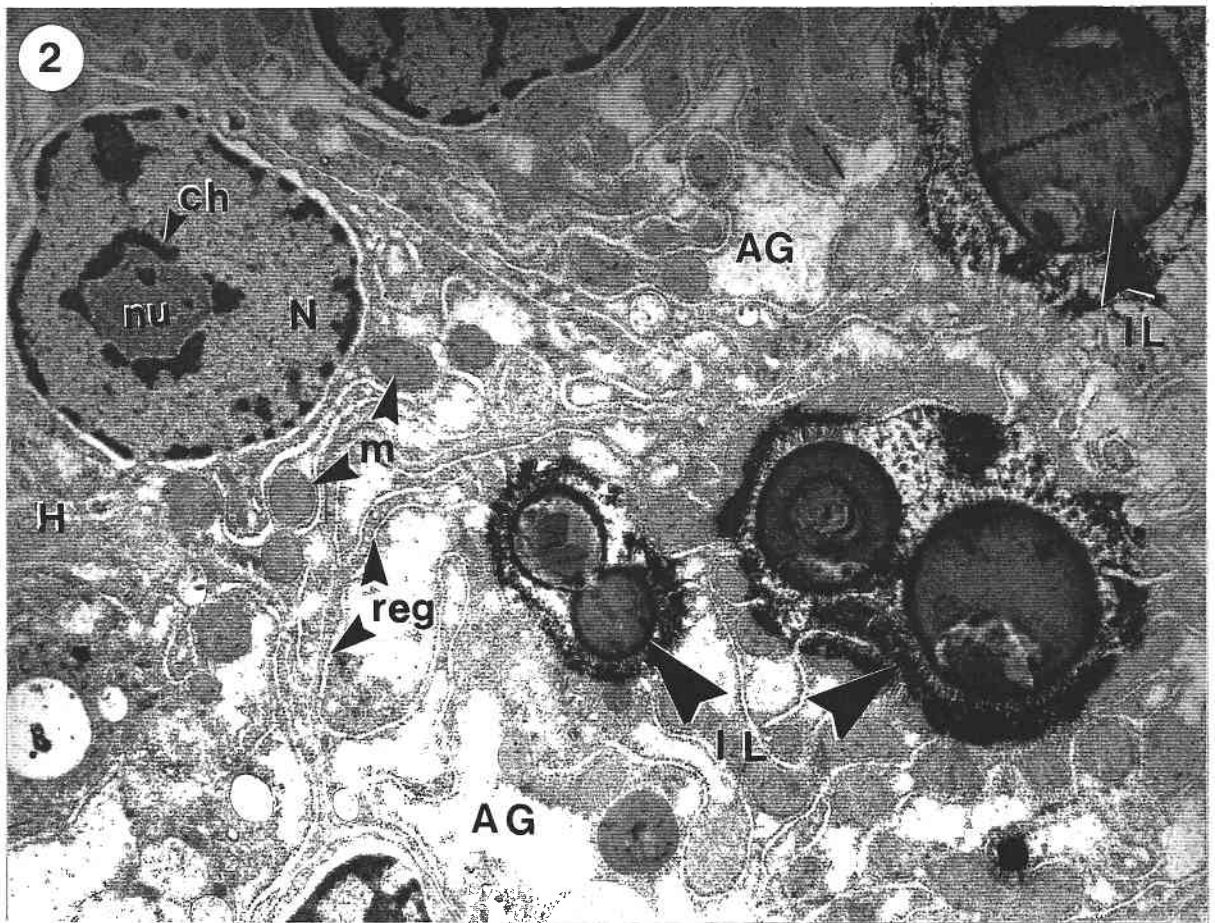
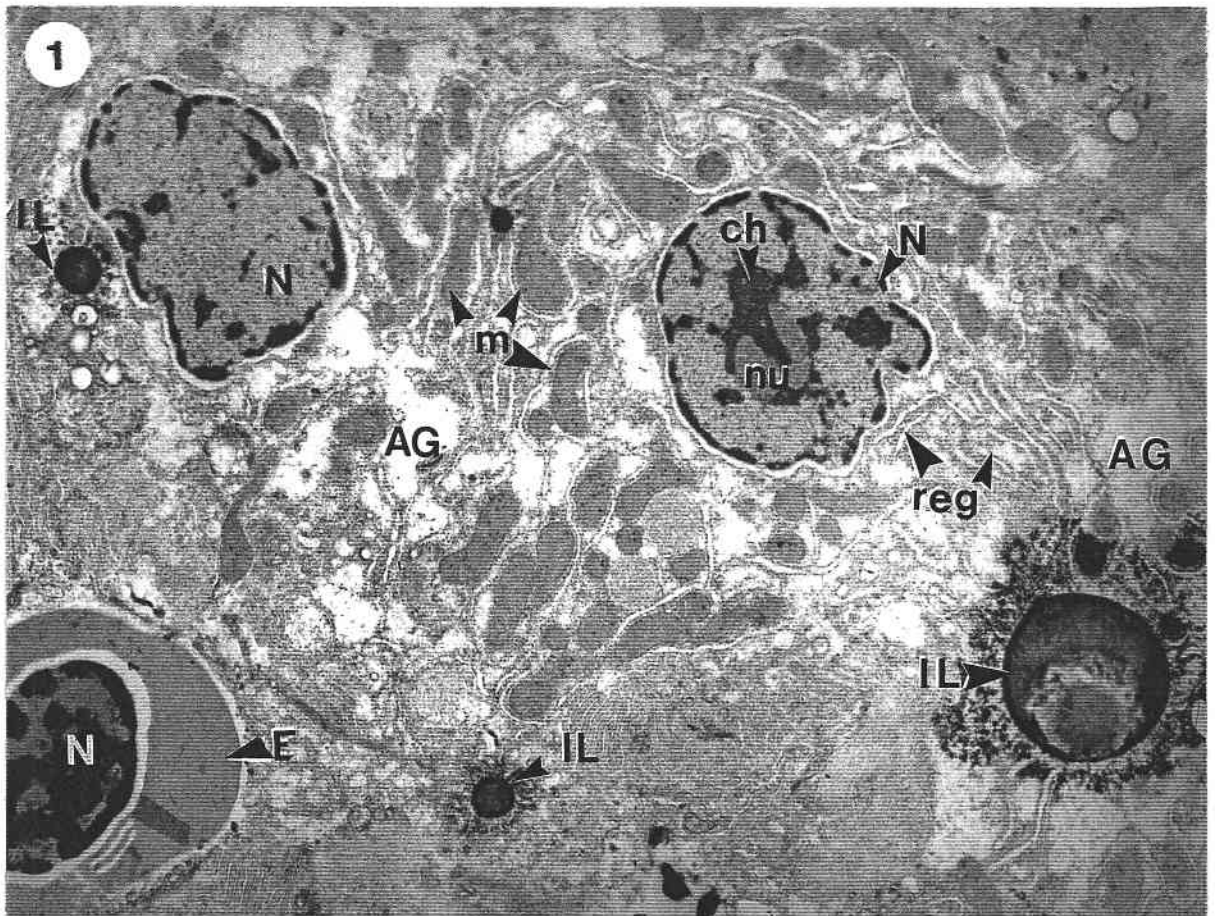
**MODIFICATIONS HEPATIQUES (coupe ultra-fines : MET)**

**Fig. 1 :** Hépatocytes à noyaux à contours irréguliers.  
Chromatine associée au nucléole.  
Organites cytoplasmiques, réticulum endoplasmique granuleux et mitochondries régulièrement distribuées.  
Inclusions lipidiques hétérogènes.  
Erythrocyte infiltré.  
Serran A011 (LT = 182 cm ; PT = 60,12 g)  
(x 12000)

**Fig. 4 :** Inclusions lipidiques intracytoplasmiques volumineuses et hétérogènes.  
Serran A011 (LT = 182 cm ; PT = 60,12 g)  
(x 15480)

*Légendes :*

AG	:	aire glycogénique
ch	:	chromatine
E	:	érythrocyte
H	:	hépatocyte
IL	:	inclusion lipidique
m	:	mitochondrie
N	:	noyaux
Nu	:	nucléole
Reg	:	réticulum endoplasmique granuleux



## PLANCHE VI

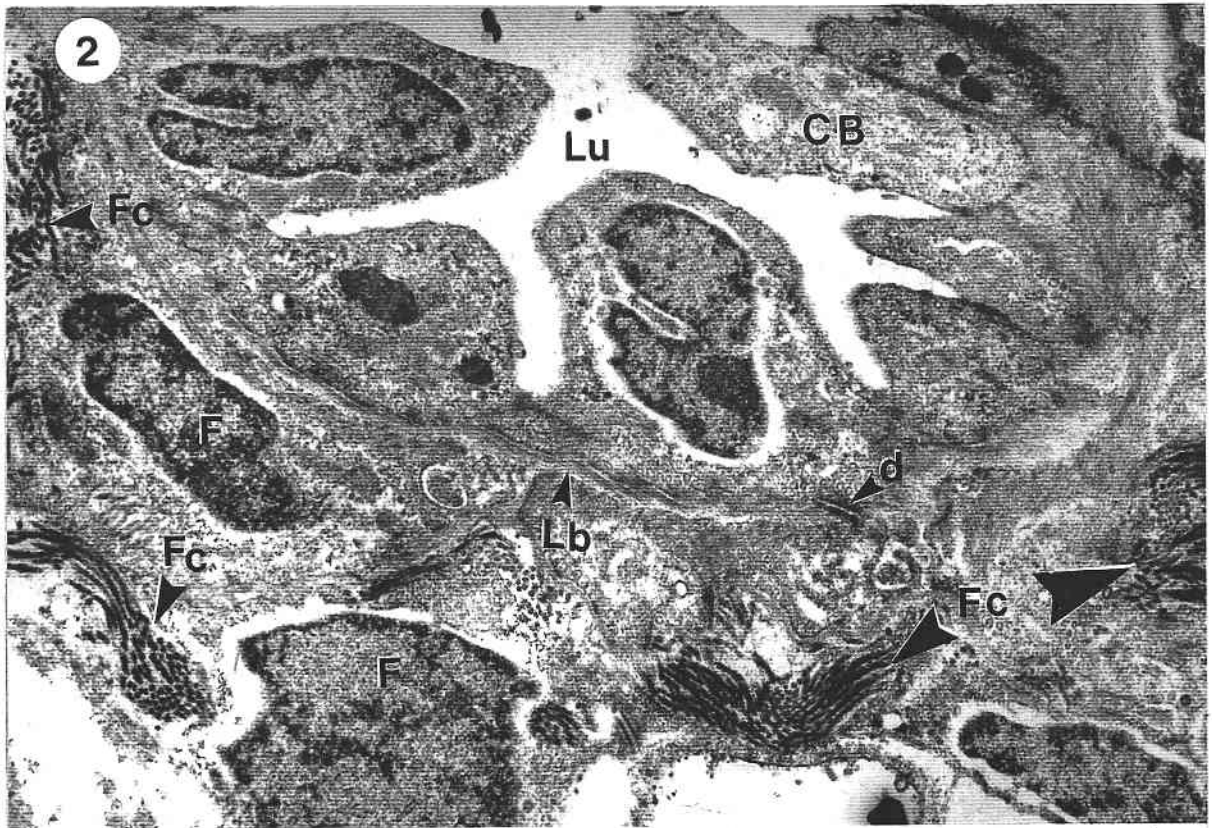
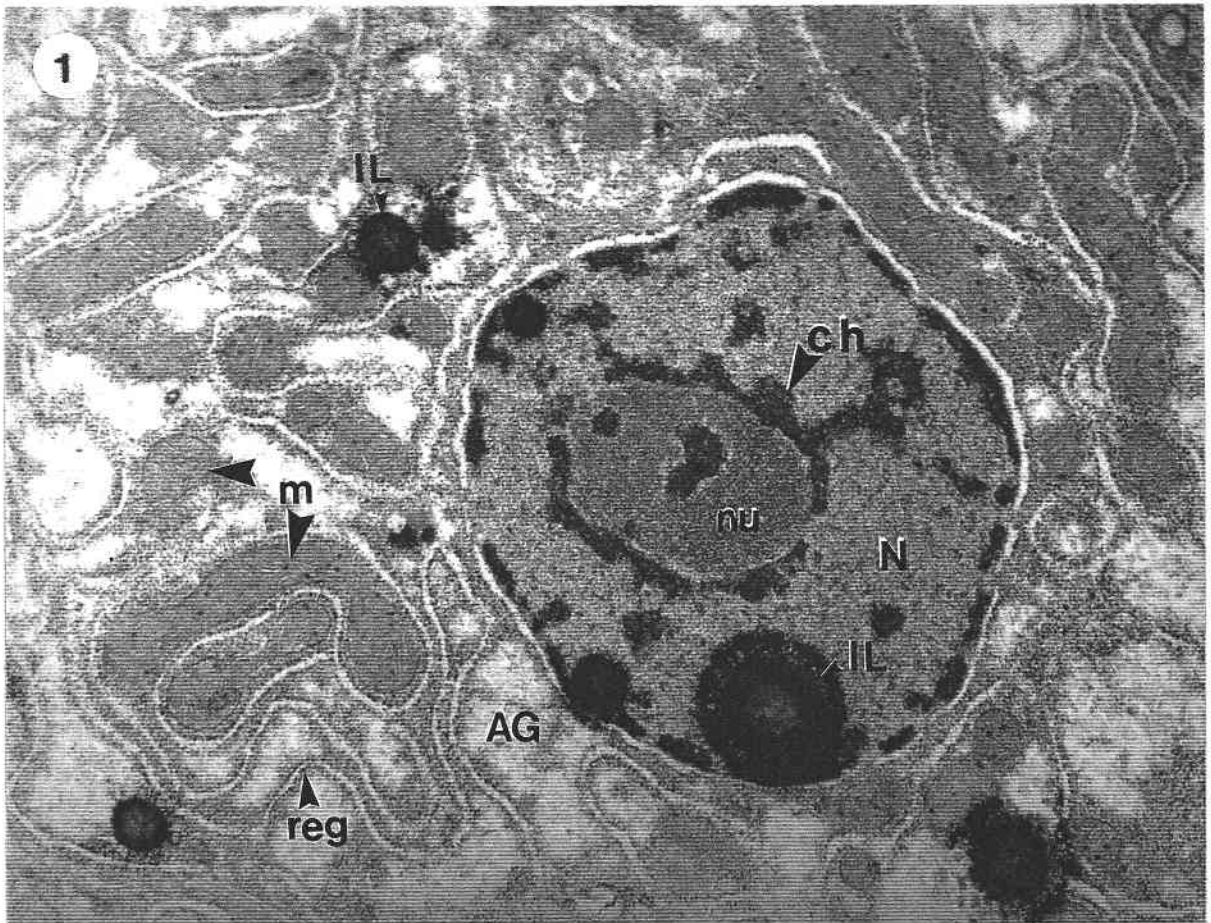
### MODIFICATIONS HEPATIQUES (coupes ultra-fines : MET)

**Fig. 1 :** Hépatocyte à inclusions lipidiques intranucléaires et intracytoplasmiques  
Organites cytoplasmiques (mitochondries et réticulum endoplasmique granuleux) et aires glycogéniques périnucléaires.  
(x 32000)

**Fig. 2 :** Fibrose péricanaulaire : cellules du canal biliaire non affectées.  
Présence de fibroblastes et d'abondantes fibres de collagène autour du canal biliaire.  
Serran 109 (LT = 158 cm ; PT = 41,8 g)  
(x 15500)

#### Légendes :

AG	:	aire glycogénique
CB	:	canal biliaire
ch	:	chromatine
d	:	desmosome
F	:	fibroblaste
Fc	:	fibre de collagène
Lb	:	lame basale
Lu	:	lumière
m	:	mitochondrie
N	:	noyau
nu	:	nucléole
Reg	:	réticulum endoplasmique granuleux



ANNEXES

## BILAN

Le bilan de la situation du laboratoire et de ses acquis, après 20 années d'existence effective, est présenté dans ce fascicule.

Il peut se résumer de la façon suivante :

- Enseignants-chercheurs :	4
- Personnel technique :	1
- Personnel administratif :	0,5
- Doctorants :	4
- Classement Direction de la Recherche du Ministère de l'Education Nationale :	Equipe d'accueil de doctorants = EA761
- Soutenances Thèses d'Etat :	4
- Soutenances Thèses de 3ème cycle :	10
- Nouvelles Thèses :	6
- Autres Thèses :	2
- Soutenances DEA :	26
- Nombre de Publications :	224
- Nombre de Rapports de contrats :	56
- Nombre de Contrats en cours :	5
- Autres rapports :	7
- Participation à des congrès : - nationaux :	47
- internationaux :	56
- Organisation de colloques :	6
- Participation à des sociétés scientifiques :	17
- Production de film audiovisuel CNRS :	1
- Production de film vidéo :	1
- Missions à l'étranger et outremer :	12
- Nombre d'A.T.P. du CNRS :	3

Figure 1 - Les algues (30 000 espèces)

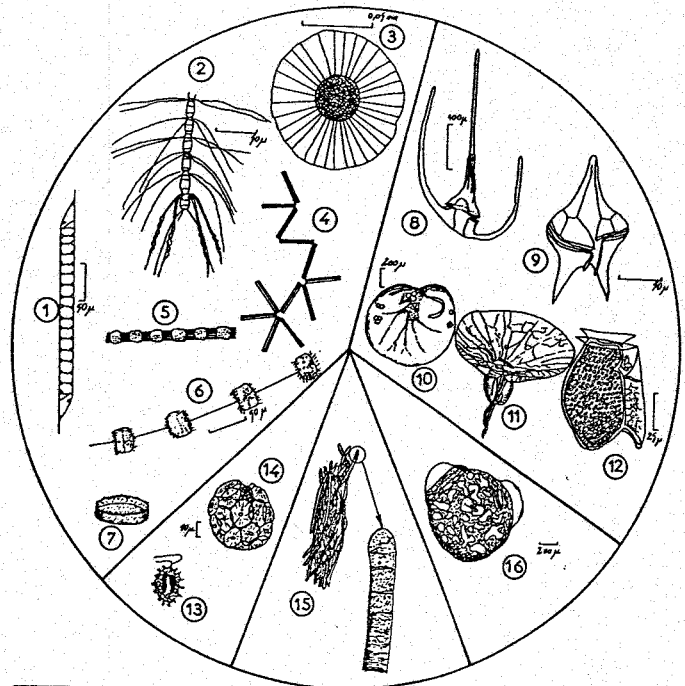
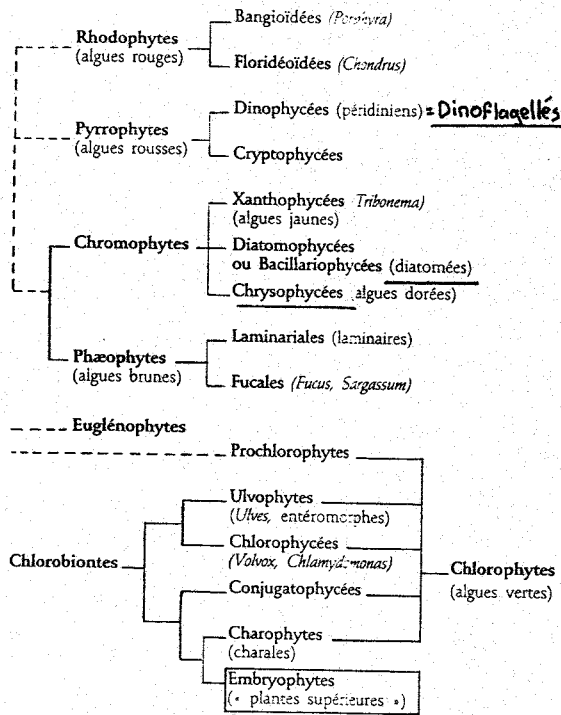


Fig. 1.3. Phytoplancton, espèces les plus communes :

**BACILLARIOPHYCÉES (Diatomées)**

1. *Rhizosolenia imbricata*. D'après Hustedt, 1930.
2. *Chaetoceros compressus*. D'après de Pavillard, 1925.
3. *Plaubtoniella sol*. D'après Hustedt, 1930.
4. Chaîne de *Thalassionema nitzschoides*. D'après Hustedt, 1930.
5. Chaîne de *Skeletonema costatum*. De Subrahmanyam, in Pérès, 1966.
6. Chaîne de *Thalassiosira decipiens*. D'après Hustedt, 1930.
7. *Coscinodiscus lineatus*. In Pérès, 1966.

**DINOPHYCÉES (Dinoflagellés)**

8. *Ceratium karstenii*. D'après Margaleff, 1950.

9. *Peridinium oceanicum*. D'après Margaleff, 1950.
10. *Noctiluca miliaris*. In Pérès, 1966.
11. *Ornithocercus splendidus*. D'après Schutt, in Pérès, 1966.
12. *Dinophysis schroederi*. D'après Margaleff, 1950.

**HAPTOPHYCÉES (Coccolithophorides)**

13. *Syracosphaera subsals*. D'après Conrad, in Pérès, 1966.
14. *Coccolithus leptoporus*. D'après Lohman, in Pérès, 1966.

**MYXOPHYCÉES**

15. *Oscillatoria thiebautii*. D'après Margaleff, 1950.

**PRASINOPHYCÉES (Xanthophycées)**

16. *Halosphaera viridis*. D'après Grau, in Margaleff, 1950.

“Et toutes les eaux qui étaient dans la rivière s'étaient changées en sang. Et les poissons se trouvaient dans la rivière et moururent. Et la rivière empestait, et les Egyptiens ne pouvaient pas boire l'eau de la rivière.”

(Livre de l'Exode, 7, 20-24)

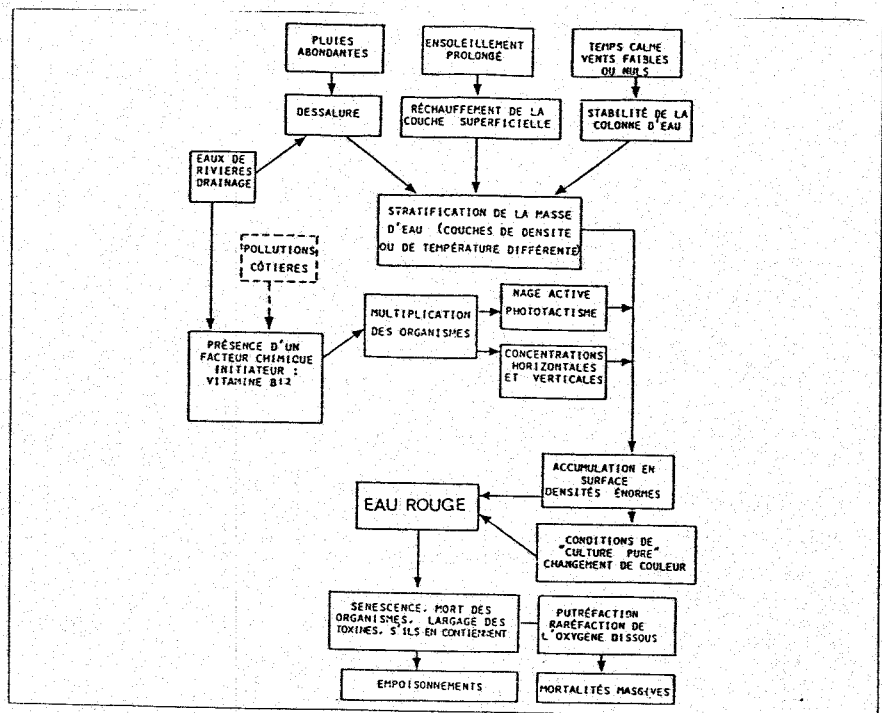


Figure 2 - Situations hydrologiques et climatiques provoquant une eau rouge (adapté de Wyatt, 1973).



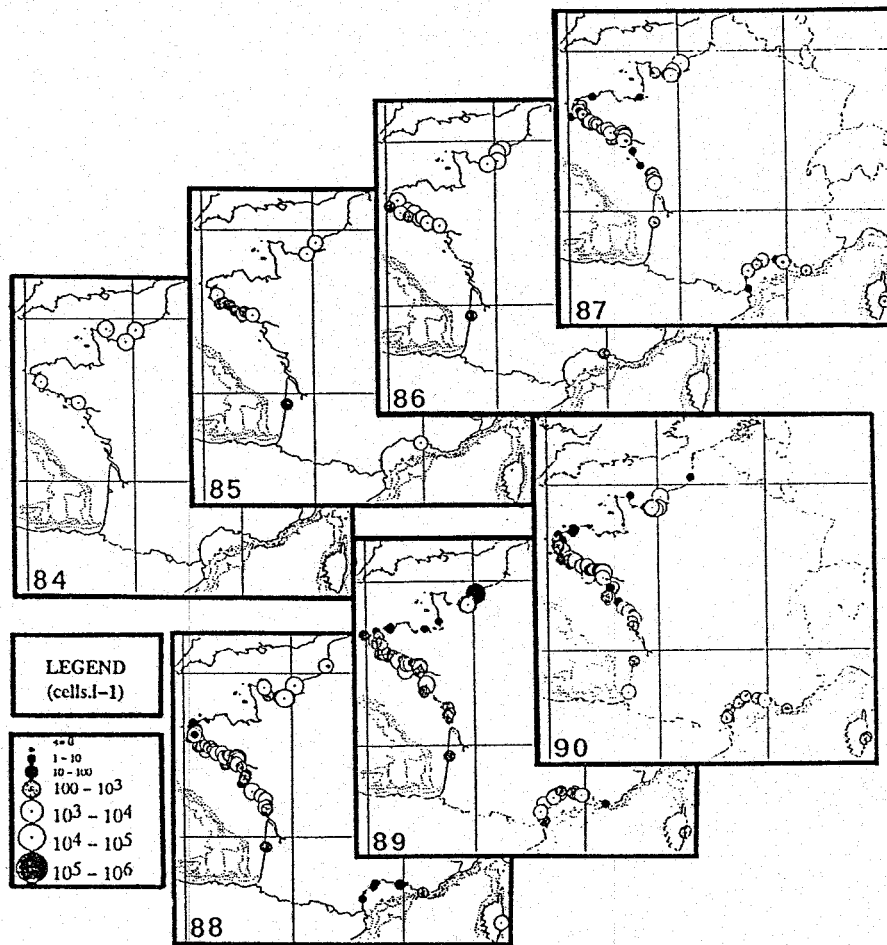


FIG. 1: Maximum cell counts of *Dinophysis* spp. along French coasts from 1984-1990 (from [14] ).

Fig. 14 Dinophysoid dinoflagellates.

Figs. 14 B (LM) . *Dinophysis fortii* from Tasmanian waters;

Figs. 14 D (SEM) *Dinophysis acuminata* from Tasmanian waters;

Scale bars: 10 µm.

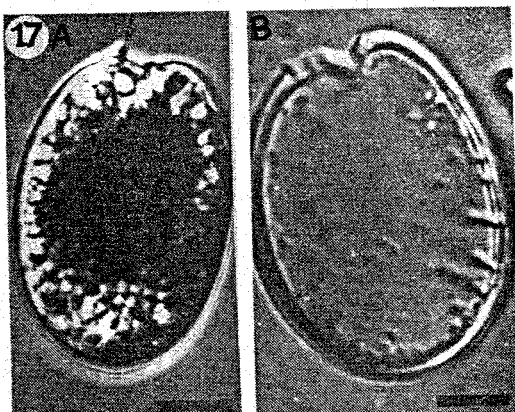
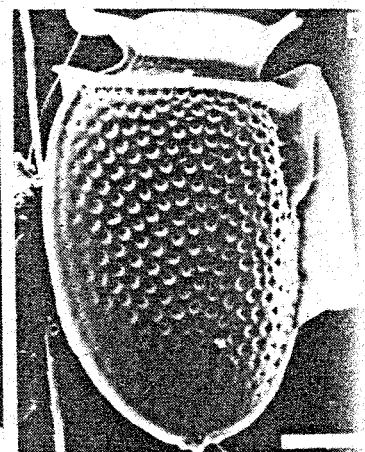
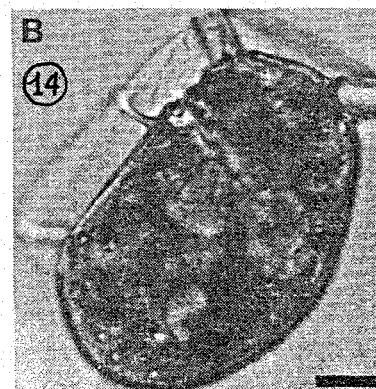


Fig. 17 *Prorocentrum lima* from Rottneest Island (W.A.).

Fig. 17A (LM). Oval cell with small anterior spine (arrow);

Fig. 17B (LM). Thecal half

Scale bars: 10 µm.

Composition du Bouin Hollande

Eau distillée .....	100 ml
Acétate de cuivre .....	2,5 g
Formol (40 %) .....	10 ml
Acide acétique .....	1 ml
Acide picrique .....	4 g

Erythrosine-orange G

Erythrosine .....	0,2 g
Orangé G .....	0,6 g
Eau distillée .....	100 ml
Acide acétique .....	1 goutte
Après dissolution on ajoute :	
Formol .....	1 ml

Bleu de toluidine

Bleu de toluidine .....	0,5 g
Eau distillée .....	100 ml

Acétate d'uranyle

Acétate d'uranyle .....	1,5 g
Alcool éthylique 50° .....	qsp 50 ml

Citrate de plomb

NaOH .....	0,4 g
Pb (NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .....	1,3 g
Citrate de sodium .....	2,13 g
Eau distillée .....	qsp 50 ml

158382 OKADAIC ACID  
(78111-17-8)

0-5°C



Ammonium Salt

Purity ≥ 98%

Potent inhibitor of serine/threonine-specific protein phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A) and of 2B at higher concentrations. Does not inhibit protein tyrosine phosphatases or kinases which have been tested

- Best known of a small family of diarrhetic shellfish toxins.

$C_{44}H_{68}O_{13} \cdot NH_3$  MW 822

Ref: 1. Haystead, T.A. et. al. (1989)

Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature*, **337**, 78-81.

2. Suganuma, M. et. al. (1988)

Okadaic acid: an additional non-phorbol-12-tetradecanoate-13-acetate-type tumor promoter. *PNAS*, **85**, 1768-1771.

3. Redpath, N.T. and Proud, C.G.

(1989) The tumour promoter okadaic acid inhibits reticulocyte-lysate protein synthesis by increasing the net phosphorylation of elongation factor 2. *Biochem. J.*, **262**, 69-75.

4. Karaki, H. et. al. (1989) Inhibitory effect of a toxin okadaic acid,

isolated from the black sponge on smooth muscle and platelets. *Br. J. Pharmacol.*, **98**, 590-596.

Also See:

- ICN PY20 & PY69 –  
α-Phosphotyrosine MAb
- Genistein

100 µg 1118,00  
300 µg 2883,50

## FIXATION A 550,00 mOsm/l et 3,4 % de glutaraldéhyde

TAMPON	FIXATEUR
Volume total : 50,0000 ml	Volume total : 25,0000 ml
Composition : Chlorure de Ca : 0,0579 g Cacodylate de Na : 2,4333 g Eau distillée QSP : 50,0000 ml	Composition : Glutaraldéhyde 25 % : 3,4000 ml Tampon : 10,8000 ml Eau distillée QSP : 25,0000 ml
Concentrations : Chlorure de Ca : 0,1157 % Cacodylate de Na : 0,2271 M	Concentrations : Chlorure de Ca : 0,0500 % Cacodylate de Na : 0,0982 M/l Glutaraldehyde : 3,4000 %
	Osmolarités : Chlorure de Ca : 13,5135 mOsm/l Cacodylate de Na : 196,1865 mOsm/l Glutaraldéhyde : 310,0000 mOsm/l

RINCAGE	Solution pour POST-FIXATION
Volume total : 50,0000 ml	Volume total : 5,0000 ml
Composition : Saccharose : 5,4768 g Tampon : 21,8000 ml Eau distillée QSP : 50,0000 ml	Composition : Saccharose : 0,8913 g Tampon : 4,3200 ml Eau distillée QSP : 5,0000 ml

Rq : La solution pour POST-FIXATION est à mélanger en parties égales avec une solution de Os04 à 4 %

Ajustement du pH à 7,4 avec HCl 1,00 N :

\* Ajustement du TAMPON (50.00 ml)

+ 571,85 µl de HCl

\* Ajustement du FIXATEUR seulement (25.00 ml)

+ 111,66 µl

ULTRATOME III  
LKB 8800

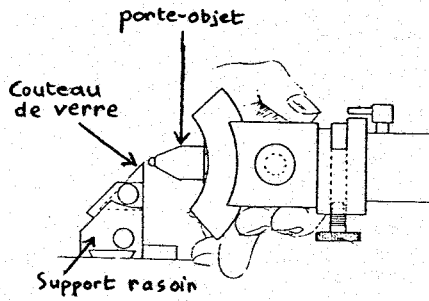
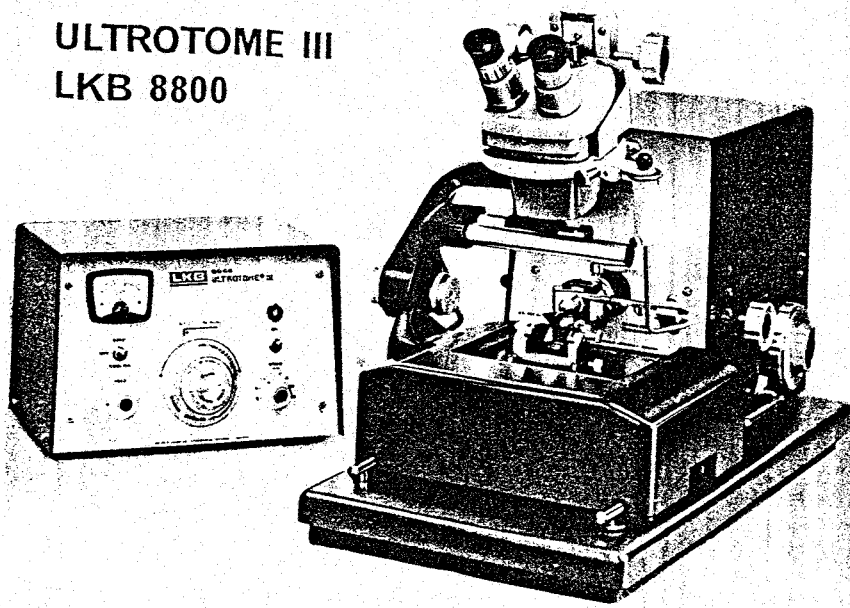


Fig 1 : Taille d'un bloc

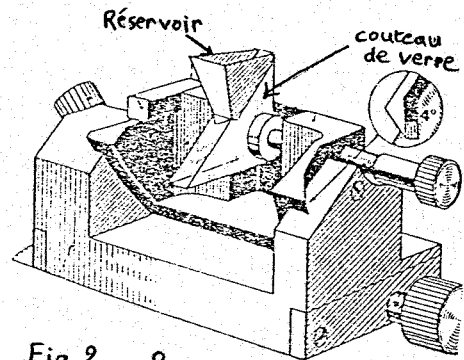


Fig 2. Rasoir de coupe

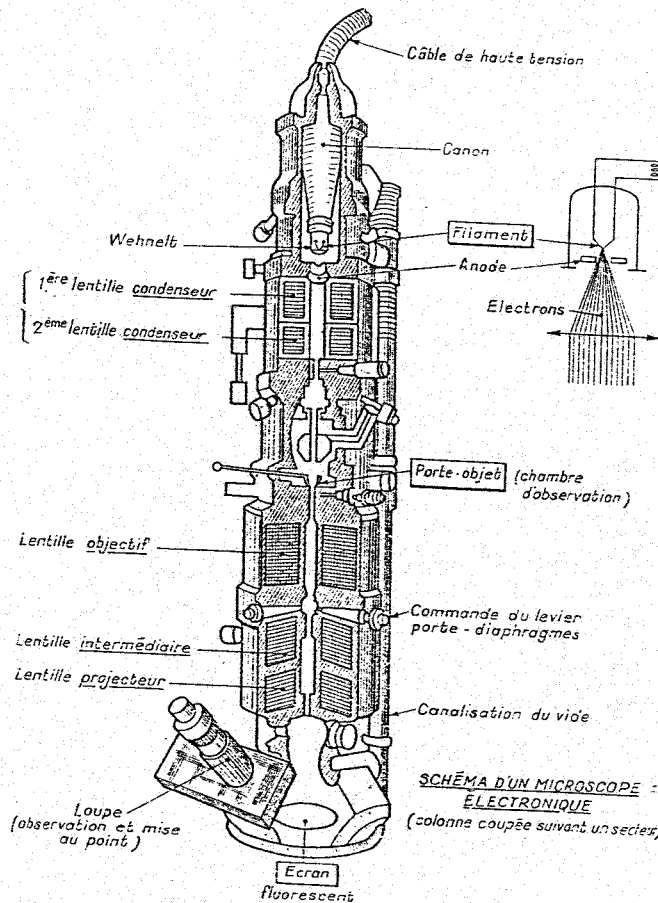


SCHÉMA D'UN MICROSCOPE ELECTRONIQUE (colonne coupée suivant un secteur) fig 3

## Two-Sample Analysis Results

	MORPHO.LST	MORPHO.LSI	Pooled
Sample Statistics: Number of Obs.	6	12	18
Average	116.5	116.583	116.556
Variance	129.5	250.629	212.776
Std. Deviation	11.3798	15.8313	14.5868
Median	110.5	113.5	112

Difference between Means = -0.0833333

Conf. Interval For Diff. in Means:	95	Percent	
(Equal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-15.5485	15.3819	16 D.F.
(Unequal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-14.1049	13.9382	13.6 D.F.

Ratio of Variances = 0.5167

Conf. Interval for Ratio of Variances:	0	Percent
Sample 1 ÷ Sample 2		

Hypothesis Test for H0: Diff = 0      Computed t statistic = -0.0114258  
 vs Alt: NE                              Sig. Level = 0.991025  
 at Alpha = 0.05                        so do not reject H0.

Morpho LST = longueur standard Témoins

Morpho LSI = longueur standard Intoxiqués

## Two-Sample Analysis Results

	Sample 1	Sample 2	Pooled
Sample Statistics: Number of Obs.	6	12	18
Average	0.0171667	0.0178333	0.0176111
Variance	1.53667E-5	2.23333E-5	2.01563E-5
Std. Deviation	3.92003E-3	4.72582E-3	4.48957E-3
Median	0.018	0.0185	0.0185

Difference between Means = -6.66667E-4

Conf. Interval For Diff. in Means:	95	Percent	
(Equal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-5.42658E-3	4.09325E-3	16 D.F.
(Unequal Vars.) Sample 1 - Sample 2	-5.24878E-3	3.91545E-3	12.0 D.F.

Ratio of Variances = 0.68806

Conf. Interval for Ratio of Variances:	0	Percent
Sample 1 ÷ Sample 2		

Hypothesis Test for H0: Diff = 0      Computed t statistic = -0.296985  
 vs Alt: NE                              Sig. Level = 0.770299  
 at Alpha = 0.05                        so do not reject H0.

Sample 1 = RNS Témoins

Sample 2 = RNS Intoxiqués