

UNIVERSITE DE NANTES

ETUDE *IN SITU* ET EXPERIMENTALE DE
PERTURBATIONS DU SYSTEME ENDOCRINIEN
CHEZ UN MOLLUSQUE, UN CRUSTACE ET
DEUX POISSONS MARINS ET/OU ESTUARIENS
SOUS L'INFLUENCE DE QUELQUES METAUX.

Contrat CNEXO N° 82/6997

-1984-

UNIVERSITE de NANTES

Etude *in situ* et expérimentale de perturbations du système
endocrinien chez un Mollusque, un Crustacé et deux Poissons
marins et/ou estuariens sous l'influence de quelques métaux
(Cd, Pb, Cu, Zn)

par ANDERSEN A.¹

AMIARD J.C.¹

AMIARD-TRIQUET C.¹

FERRAND R.²

L'HERMITE A.²

METAYER C.³

- 1 Laboratoire de Toxicologie et Hygiène Industrielle
- 2 Laboratoire de Biologie du Développement
- 3 Laboratoire de Chimie Analytique et Hydrologie

Contrat CNEXO N° 82/6997

S O M M A I R E

	Pages
1 - INTRODUCTION	4
2 - MATERIEL ET METHODES	6
2.1. Contaminations expérimentales	6
2.2. Analyse des éléments traces	8
2.3. Techniques cyto-immunologiques	8
2.3.1. Préparation des échantillons	8
2.3.2. Technique d'immuno-histofluorescence	9
2.3.3. Contrôles de spécificité des antisera	10
2.3.4. Examen des lames au microscope à rayons U.V.	10
3 - RESULTATS ET DISCUSSION	11
3.1. Etude du Crabe <u>Carcinus maenas</u>	11
3.1.1. Bioaccumulation des métaux	11
3.1.2. Etude histologique	12
3.1.3. Etude cyto-immunologique	14
3.2. Etude de la Moule <u>Mytilus edulis</u>	16
3.2.1. Bioaccumulation des métaux	16
3.2.2. Etude cyto-immunologique	17
3.3. Etude de la civelle, <u>Anguilla anguilla</u> juvénile	19
3.3.1. Bioaccumulation des métaux	19
3.3.2. Etude cyto-immunologique	19
3.4. Etude du Flet <u>Platichthys flesus</u>	21
3.4.1. Bioaccumulation des métaux	21
3.4.2. Etude cyto-immunologique	22
4 - CONCLUSIONS	23
BIBLIOGRAPHIE	26
TABLEAUX I à XI	
PLANCHES I à XI	

1 - INTRODUCTION

Les tests écotoxicologiques qualifiés de sub-léthaux se rapportant aux perturbations des grandes fonctions physiologiques, mettent bien souvent en oeuvre au laboratoire des concentrations de polluants infiniment supérieures à celles susceptibles d'être rencontrées dans les milieux marins même les plus pollués, à l'exception de déversements accidentels massifs. Nous avons pensé pouvoir nous rapprocher davantage des conditions naturelles du milieu en étudiant des altérations des mécanismes les plus intimes de la vie animale tels que des perturbations du système endocrinien chez des organismes soumis à une pollution métallique.

Des substances apparentées aux hormones de Vertébrés (hormone-like) ont été mises en évidence chez divers organismes aquatiques. Chez la Moule, le tube digestif présente des cellules synthétisant des hormones polypeptidiques (FRITSCH et SPRANG, 1977). Chez d'autres Mollusques (Céphalopodes, escargot) différentes substances "hormone-like" (encephalin-like, melanotropin-like, vasopressin-like) ont été mises en évidence essentiellement dans des structures nerveuses (MARTIN et coll., 1979, 1980, 1981).

Chez les Vertébrés, les cellules endocrines du tube digestif ont été l'objet de nombreuses études. Dans le cas des Poissons, on dispose de données concernant l'histologie classique, la microscopie électronique et l'étude cytoimmunologique (revue de KLEIN, 1977 ; LANGER et coll., 1979). Différentes hormones polypeptidiques ont été mises en évidence : gastrine, cholécistokinine (LARSSON et REHFELD, 1978), somatostatine et méthionine-enképhaline (LANGER et coll., 1979), neurotensine (REINECKE et coll., 1980), gastrine et somatostatine (NOAILLAC-DEPEYRE et HOLLANDE, 1981).

La première partie de notre étude consistera donc à rechercher de façon systématique les substances "hormones-like" chez des organismes marins ou estuariens en utilisant une série d'anticorps préparés contre diverses hormones de Vertébrés.

La première difficulté que rencontre l'écotoxicologue lorsqu'il

utilise un test de toxicité sub-léthale est d'interpréter les variations observées. En effet, il est indispensable de définir s'il s'agit de fluctuations naturelles du métabolisme en fonction des saisons, du statut nutritionnel, du sexe, de la maturité sexuelle des organismes, ou de perturbations dues au polluant. Nous sommes loin de posséder les connaissances de base sur les variations normales des mécanismes biochimiques chez les organismes marins.

A l'hétérogénéité naturelle intraspécifique dépendant des facteurs évoqués ci-dessus vient s'ajouter l'hétérogénéité extraspécifique. En conséquence, il est délicat d'extrapoler les résultats obtenus pour une espèce à une autre. Il serait nécessaire d'étudier au moins une espèce par grand groupe phyllogénique. C'est pourquoi dans la présente étude nous nous sommes intéressés à des espèces appartenant à trois groupes zoologiques parmi les plus importants : Mytilus edulis (Mollusques), Carcinus maenas (Crustacés), Anguilla anguilla juvénile et Platichthys flesus (Téléostéens).

De plus, il s'agit d'espèces abondantes dans les zones estuariennes et côtières qui sont parmi les plus susceptibles d'être soumises à des pollutions. Pour la Moule, son rôle admis d'indicateur biologique a été un critère supplémentaire de sélection. Le Flet a été retenu pour représenter les Poissons plats, espèces parmi les plus touchées par les phénomènes d'ulcération. Le choix de la Civelle répond à la fois à une opportunité locale et à la nécessité de faire porter l'étude au moins sur un organisme juvénile, les stades jeunes étant souvent beaucoup plus sensibles aux pollutions que les adultes.

Les études in situ, si elles reflètent de façon véridique les conditions réelles d'une pollution du milieu, sont généralement difficiles à interpréter. Tout d'abord, il est délicat de considérer en valeur absolue un site comme propre et un autre comme pollué, la différence restant souvent très relative d'autant que deux sites ne sont jamais rigoureusement identiques pour l'ensemble des paramètres physiques, chimiques et biologiques. D'autre part, il est rare, sauf dans le cas de pollution massive -et alors les effets observés se rapprochent plus d'effets léthaux que d'effets sub-léthaux- qu'un site soit contaminé par un seul polluant. De plus, l'étude in situ

se fait en un moment donné, or le matériel biologique a une histoire plus ou moins longue et la qualité du milieu (ou des milieux dans le cas des espèces vagiles) a pu varier au cours du temps. Il est en effet exceptionnel qu'un site soit soumis à une pollution unique à concentration constante sur une longue période avec des paramètres physico-chimiques et biologiques stables. On peut donc difficilement relier les effets sub-léthaux observés à une pollution donnée.

Au contraire, les expériences de laboratoire fixent la grande majorité des paramètres physico-chimiques et biologiques et s'intéressent à une pollution (ou un ensemble de pollutions) connue. Malheureusement, les conditions du laboratoire sont loin de reproduire fidèlement la complexité du milieu naturel. Il en résulte que les animaux mis en élevage au laboratoire ne sont pas dans les conditions optimales, ce qui risque d'aggraver l'effet néfaste du polluant. Par ailleurs, les formes physico-chimiques des polluants peuvent évoluer de façon totalement différente dans le milieu naturel et dans un aquarium. A cela s'ajoutent les innombrables possibilités de synergie et d'antagonisme des divers paramètres du milieu avec le polluant, qui sont nécessairement simplifiées à l'extrême au laboratoire. Il est souvent très difficile d'extrapoler au milieu marin les résultats obtenus expérimentalement.

C'est pourquoi nous avons utilisé ces deux types d'études de manière complémentaire. Pour chaque espèce étudiée, des prélèvements ont été effectués dans des sites supposés "pollués" ou "non pollués". Lorsque les analyses quantitatives ont effectivement révélé une contamination métallique des organismes, les perturbations éventuelles du système endocrinien (variations de la localisation cellulaire, présence ou absence des substances "hormone-like") ont été recherchées.

2 - MATERIEL ET METHODES

2.1. Contaminations expérimentales

De nombreuses caractéristiques du milieu ou des organismes sont susceptibles d'affecter l'accumulation biologique et la toxicité des métaux : température, salinité, forme physico-chimique, quantité de

nourriture disponible, âge, taille, sexe des organismes, état de maturité sexuelle, taux de croissance, cycle de la mue et de l'intermue chez les Crustacés. Pour chaque espèce, nous avons cherché à opérer dans des conditions expérimentales aussi constantes et sur des groupes d'animaux aussi homogènes que possible (Tableau I).

Il a été montré que certains organismes provenant de zones très contaminées par les métaux avaient développé une résistance aux effets toxiques de ces polluants. C'est pourquoi, à l'exception des civelles récoltées en Loire, les organismes destinés aux tests ont été prélevés dans des zones côtières réputées peu polluées.

La composition des eaux naturelles est très variable quant à la teneur en complexants naturels et en particules en suspension. Si ces dernières peuvent être éliminées par filtration, les complexants solubles ou colloïdaux ne sont pas éliminés. Or, de nombreuses observations indiquent que la complexation de certains métaux modifie leur disponibilité biologique et leur toxicité. Pour éliminer ces sources de fluctuation de la qualité de l'eau, il nous a paru préférable de travailler en eau de mer artificielle. Celle-ci a été obtenue par mélange d'eau déminéralisée et de sels de mer HW Wimex.

Les métaux étudiés ont été introduits dans le milieu expérimental sous forme de chlorures pour Cd et Cu, sous forme de nitrate pour Pb et sous forme d'acétate pour Zn. Afin de quantifier la décroissance de la concentration métallique initiale après une exposition de 24 heures, nous avons réalisé des dosages sur des prélèvements d'eau de mer du milieu expérimental sans organismes. Les résultats indiquent que, quelque soit la salinité, la décroissance en 24 heures est négligeable pour Cd, Cu et Zn tandis que pour le plomb, à la concentration de 1 mg Pb.l^{-1} testée sur C. maenas, elle atteint 40 % de la concentration initiale. D'après ces résultats, les contaminations expérimentales ont été réalisées en semi-continu, l'eau et le polluant étant renouvelés toutes les 24 heures pour Pb et toutes les 48 heures pour Cd, Cu et Zn. La gamme des surcharges métalliques testées apparaît dans le tableau II.

La nourriture introduite dans le milieu contaminé accumule des quantités de polluants variables selon le temps écoulé entre l'introduction de la proie et sa consommation. La toxicité à l'égard du

prédateur résulte donc dans ces conditions d'une double contamination : celle due à la présence de concentrations définies du polluant dans l'eau, celle due à des quantités mal déterminées dans la nourriture. D'autre part, lorsque les animaux d'expérience sont nourris, ils émettent consécutivement dans le milieu des produits d'excrétion solides et liquides susceptibles d'adsorber ou de complexer le polluant étudié. Il nous a donc paru souhaitable de ne pas nourrir les animaux d'expérience. Ce procédé n'a pas affecté leur survie puisque chez les témoins et aux surcharges métalliques les plus faibles, la mortalité a été négligeable pour toutes les espèces.

Pour les civelles, le problème de l'alimentation ne se posait pas puisque, aux stades soumis à l'expérimentation, les animaux ne se nourrissent pas. Pour les Moules, nous avons choisi d'effectuer les élevages en Novembre. En effet, une étude menée depuis deux ans en baie de Bourgneuf a montré qu'à cette période de l'année, les Moules commencent à s'amaigrir, ce qui correspond vraisemblablement à un appauvrissement de la nourriture disponible.

2.2. Analyse des éléments traces

Les échantillons biologiques étaient séchés à poids constant à l'étuve (80°C) et réduits en poudre à l'aide d'un broyeur en agathe afin d'éviter les risques de contamination métallique. Pour les échantillons de grande taille (poids sec supérieur à 200 mg), les dosages étaient effectués sur trois fractions aliquotes de 50 mg (poids sec). La minéralisation et l'extraction à l'aide de dithizone en solution chloroformique étaient réalisées selon la technique décrite par BOITEAU et METAYER (1978). Le cuivre était dosé à l'état de dithizonate dissous dans le chloroforme par spectrométrie d'absorption atomique sans flamme (AASF). Les dithizonates de Cd, Pb et Zn étaient détruits par une solution d'acide chlorhydrique normale, ce qui entraînait les métaux dans la phase aqueuse. Les dosages étaient effectués sur cette phase aqueuse soit par AASF (Cd, Pb) soit par absorption atomique de flamme (Zn).

2.3. Techniques cyto-immunologiques

2.3.1. Préparation des échantillons :

En fonction de la taille des échantillons, des animaux entiers,

des organes ou fragments d'organes ont été fixés dans du liquide de Bouin ou de Bouin-Hollande pendant des durées allant de 7 heures à 4 jours (Tableau III), puis rincés à l'eau courante, déshydratés dans des alcools de degré croissant, puis immergés dans l'alcool butylique avant imprégnation dans la paraffine fondue à la température de 56°C pendant une nuit. Les échantillons sont ensuite inclus dans des blocs de paraffine, les blocs sont débités au microtome en coupes sagittales, transversales ou horizontales de 6 à 10 μm . Les coupes sont montées sur lames gélatinées et séchées pendant 2 à 3 jours avant utilisation.

- Colorations des lames de repérage : Pour chaque animal, ou pour chaque organe ou fragment d'organe, une coupe sur 10 a été colorée par l'une des techniques suivantes : acide périodique-Schiff (APS), picro-indigo-carmin, hématoxyline-éosine, méthode de Mowry-Van Gieson à l'APS, bleu alcian, hématoxyline de Weiggert, picro-ponceau (Tableau III). L'examen de ces coupes en lumière blanche permet de choisir celles qui présentent la meilleure incidence pour l'étude immunologique des organes pris isolément ou du tractus digestif pour les animaux fixés in toto.

2.3.2. Technique d'immuno-histofluorescence :

Nous avons appliqué la technique d'immuno-histofluorescence indirecte préconisée par COONS (1955). Tous les anticorps ont été fournis par Monsieur M.P. DUBOIS (Laboratoire de Neuroendocrinologie sexuelle, INRA, NOUZILLY).

Les coupes sélectionnées sont soigneusement déparaffinées dans trois bains successifs de toluène, progressivement réhydratées dans des alcools de degré décroissant, puis longuement lavées à l'eau courante (1 h), enfin rincées dans l'eau distillée renouvelée trois fois et plongées dans du tampon phosphate 0,13 M, pH 7,4. Les coupes sont ensuite traitées pendant 30 minutes dans du sérum de mouton à 5 % dans du tampon phosphate, afin de saturer des sites antigéniques non spécifiques pouvant interférer avec les γ -globulines de moutons marquées à la fluorescéine. Les coupes sont alors rincées dans trois bains de tampon phosphate. A l'aide d'un papier absorbant (Sopalin)

le tampon est séché autour des coupes et pour chaque lame, 100 µl d'anticorps sont déposés à l'aide d'une seringue à insuline (Tableau IV). Les lames sont disposées horizontalement dans une chambre humide et incubées à l'abri de la lumière à 4°C dans un réfrigérateur pendant un temps variant de 2 à 18 heures. Les lames sont alors rincées une par une à l'aide d'une pissette de tampon, puis conservées dans des bacs du même tampon. Elles sont de nouveau séchées et 100 µl d'anti-sérum conjugué à l'isothiocyanate de fluorescéine (ITCF) sont déposés à la surface des coupes qui sont mises à incuber en chambre humide pendant un temps variant de 1 à 2 heures à la température du laboratoire (ne dépassant pas 19°C). Les lames sont alors rincées une par une avec du tampon, puis stockées dans des bacs de tampon, colorées pendant 10 mn dans une solution de bleu Evans au 0,01 %, puis de nouveau rincées dans le tampon avant d'être montées entre lame et lamelle dans de la glycérine tamponnée (glycérol 70 % dans du tampon phosphate).

2.3.3. Contrôles de spécificité des antisera :

2.3.3.1. Contrôle par saturation de l'antiserum spécifique par son antigène correspondant.

Les lames de contrôle sont traitées par l'antisérum spécifique auquel on a ajouté, 30 minutes avant le dépôt sur lame, 50 nano-Mole d'hormone par ml d'antiserum dilué dans du tampon phosphate pH 7,4. La technique se poursuit alors de la manière précédemment décrite (2.3.2.). La fluorescence spécifique doit être totalement éteinte sur ces lames.

2.3.3.2. Contrôle de l'interférence de l'antiserum conjugué.

Sur ces lames, l'application du premier antiserum est omise. Seul le deuxième antiserum conjugué à l'ITCF est appliqué. A l'observation ces lames doivent être dépourvues de fluorescence parasite résultant de l'accrochage non spécifique de l'antiserum conjugué.

2.3.4. Examen des lames au microscope à rayons ultra-violet :

Les lames sont observées à l'aide d'un microscope Leitz de type Diolux équipé d'un brûleur Ogram de 50 W, d'un filtre d'excitation

dans le bleu BG 12 de 3 mm, d'un système de Ploëm d'épillumination à miroir dichroïque et d'un filtre d'arrêt K 530.

Les coupes sont photographiées à l'aide d'un boîtier automatique CANON type A₁ muni de son adaptateur microscopique sur film Ektachrome 50 ou 160 ASA pour l'obtention de diapositives couleur, ou sur film Agfa 100 ASA pour l'obtention de négatifs noirs et blancs. Les diapositives couleurs ont été selon les besoins, rephotographiées à l'aide d'un duplicateur sur film noir et blanc Agfa 100 ASA et les négatifs ainsi obtenus tirés sur papier.

3 - RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats seront exposés en respectant la chronologie du déroulement du travail. En effet, pour la première espèce étudiée, le Crabe Carcinus maenas, nous avons effectué une recherche systématique de substances "hormones-like" en utilisant une série d'anticorps (préparés par M.P. DUBOIS) contre diverses hormones de Vertébrés : anti- β -lipotropine, anti- α -endorphine, anti- β -endorphine, anti- β -(1-24) ACTH, anti- α -(17-39) ACTH, anti-méthionine-enképhaline, anti-insuline, anti-glucagon, anti-substance P et anti-sérotonine. Les anticorps étudiés ensuite chez les autres espèces ont été choisis en fonction des premiers résultats obtenus et, en particulier, les résultats obtenus avec l'anticorps préparé contre la méthionine-enképhaline chez le Crabe nous ont conduit à une étude systématique de cette hormone-like chez la Moule, la civelle et le Flet.

3.1. Etude du Crabe Carcinus maenas

3.1.1. Bioaccumulation des métaux.

Les crabes étudiés qui étaient tous des mâles et qui se trouvaient au stade d'intermue C₄ (DRACH, 1939) appartenaient à quatre catégories (Tableau V) :

- Les crabes témoins provenant d'une zone non polluée ou peu polluée (Traict du Croisic) sacrifiés en février et en mai,

- Les crabes provenant d'une zone polluée (estuaire de la Loire), sacrifiés en février,

- Les crabes témoins maintenus en élevage sans alimentation et sacrifiés aux mêmes dates que les animaux traités après 1, 2 et 3 semaines;

- Les crabes ayant subi une contamination expérimentale et sacrifiés après 1, 2 et 3 semaines.

Les caractéristiques de contamination métallique de ces organismes sont indiquées dans le Tableau VI.

3.1.2. Etude histologique.

Les observations effectuées dans le cas des crabes témoins provenant du traict du Croisic correspondent aux données de la littérature se rapportant à différents Crustacés (HIRSCH et JACOBS, 1928, 1930 ; TRAVIS, 1954, 1955, 1957).

L'hépto-pancréas se présente comme un amas de très nombreux tubules dont la lumière est limitée par un épithélium. Entre les tubules se trouvent des cellules "de réserves" qui, à certaines phases du cycle (A et B) présentent une accumulation de lipides. Elles sont également riches en glycogène.

Deux principales catégories de cellules ont été distinguées chez les Crustacés :

- Les cellules dites "absorbantes" de type cylindrique caractérisées par un noyau basal ou central et dépourvues de grosses vacuoles;

- Les cellules dites "sécrétrices" sont de taille plus importante, elles contiennent du matériel fortement colorable et de volumineuses vacuoles.

Les deux catégories de cellules peuvent être observées chez la Langouste, après la mue, au cours des stades A et B. Il faut

remarquer que selon TRAVIS (1955), il pourrait s'agir de deux aspects du même type cellulaire dont les modifications structurales traduisaient des phases différentes du cycle.

Durant la phase d'intermue (phase tardive du stade C, celle des Crabes que nous avons étudiés) de nombreuses cellules apparaissent se rattacher au type sécréteur et elles atteignent une taille importante. La sécrétion de type apocrine aboutit au rejet, dans la lumière, non seulement du contenu vacuolaire, mais aussi d'une partie du cytoplasme. Seule la partie basale du cytoplasme et le noyau demeurent en place. Chez certains Crustacés cette sécrétion pourrait aussi être de type holocrine.

La comparaison des hépto-pancréas des Crabes fixés immédiatement après leur capture avec ceux soumis à une période de jeûne de 1, 2 ou 3 semaines n'a pas permis de déceler de différence notable. L'inanition n'apparaît pas avoir de conséquences sur le cycle des cellules de l'épithélium des tubules hépto-pancréatiques et en particulier, elle ne stimule pas la sécrétion apocrine. Ce fait avait déjà été relevé chez la Langouste par TRAVIS (1957).

Au stade d'intermue C₄, les images de cellules sécrétrices sont nombreuses, les cellules de l'épithélium montrent de volumineuses vacuoles. Les figures de sécrétion apocrine sont présentes. D'une façon générale, chez les Crabes témoins, les cellules qui libèrent leur sécrétion sont limitées à des plages qui n'occupent qu'une partie de la section des tubules concernés, les autres parties montrent des cellules contenant de volumineuses vacuoles (Pl. I, Fig. 1 et 2)

L'hépto-pancréas des Crabes provenant de l'estuaire de la Loire (zone polluée) montrent de nombreux tubes dont les cellules sont en phase de sécrétion active. Les plages de cellules ayant libéré leur contenu sont importantes, les autres cellules montrent pour la plupart de volumineuses vacuoles (Pl. I, fig. 3).

L'hépto-pancréas des animaux ayant subi une contamination expérimentale pendant 1 semaine, ne présentent pas de différences avec celui des animaux témoins. Les cellules sécrétrices sont

nombreuses, mais les plages de cellules ayant libéré leur contenu demeurent d'importance très limitée (Pl. I, fig. 4 ; Pl. II, fig. 1).

L'hépto-pancréas des animaux ayant subi une contamination expérimentale pendant 2 et 3 semaines présente de nombreux tubules montrant des plages très importantes de cellules qui ont libéré leur contenu dans la lumière (Pl. II, fig. 3, 4, 5).

3.1.3. Etude cyto-immunologique

Les anti-corps suivants (préparés par M.P. DUBOIS) ont été appliqués à l'étude cyto-immunologique de l'hépto-pancréas : anti β - lipotropine, anti α - endorphine, anti β - endorphine, anti β -(1-24) ACTH, anti α -(17-39) ACTH, anti-méthionine-enképhaline, anti-insuline, anti-glucagon, anti-substance-P et anti-sérotonine.

Dans l'hépto-pancréas, seul l'anti-corps préparé contre la méthionine-enképhaline a permis d'obtenir une réaction positive spécifique et de mettre en évidence une substance apparentée à la méthionine-enképhaline ("met-enk like") dans les cellules de l'épithélium des tubules hépto-pancréatiques.

Dans le cas de l'hépto-pancréas des Crabes témoins, la fluorescence apparaît surtout localisée à la base des cellules (Pl. III, fig. 1 et 2). De nombreux tubes présentent cette localisation pour l'ensemble de leurs cellules. Cette localisation est également observée dans le cas des cellules sécrétrices contenant de volumineuses vacuoles (Pl. III, fig. 2).

Les tubules de l'hépto-pancréas des Crabes témoins provenant de l'estuaire de la Loire montrent souvent une modification de la localisation de la substance "met-enk like" détectée par l'anti-corps. Dans de nombreux tubules, elle devient en partie ou en totalité apicale. Certaines cellules (Pl. IV) montrent une fluorescence répartie dans la totalité du cytoplasme. Ceci conduit à penser que cette substance "met-enk like" pourrait se déplacer de la base vers l'apex des cellules.

Les Crabes traités pendant 1 semaine par Cu, Zn, Pb, Cd, ne présentent pas, en ce qui concerne la localisation de la substance "met-enk like" de modifications par rapport aux témoins. Par contre, les tubules

hépato-pancréatiques des Crabes traités pendant 2 et 3 semaines montrent des modifications de leur aspect comme nous l'avons précédemment indiqué. La stimulation du processus sécrétoire s'accompagne d'une modification de la localisation de la substance "met-enk like" qui est souvent purement apicale pour un grand nombre, voire la totalité des cellules d'un même tubule (Pl. V, VI et VII).

Les images montrant une stimulation de la sécrétion sont nombreuses. Ce processus s'accompagne de l'accumulation périphérique de la substance "met-enk like" (Pl. V, fig. 1 ; Pl. VI, fig. 2) et probablement de sa libération ou de sa résorption dans un stade ultérieur (Pl. VI, fig. 2 ; Pl. VII, fig. 1 et 2). Dans quelques cas, la fluorescence apparaît très réduite au niveau de la zone apicale (Pl. VI, fig. 2 ; Pl. VII, fig. 1), elle peut même pratiquement disparaître de la zone apicale et réapparaître, encore peu importante, au niveau de la base des cellules (Pl. V, fig. 2).

Chez les animaux traités, la plupart des sections de tubules présentent des images de sécrétion qui peuvent parfois concerner la quasi-totalité des cellules d'une même section de tubule. Néanmoins, on rencontre toujours quelques sections de tubules qui présentent un aspect "normal". Tel est le cas des sections qui affectent la portion du tubule située près de l'extrémité aveugle et qui sont caractérisées par leur faible diamètre (Pl. I, fig. 4).

La succession des images concernant la localisation de la substance "met-enk like" mais aussi sa quantité conduit à penser qu'il existerait un cycle assez bien défini : synthétisée dans la région basale des cellules épithéliales (surtout de leur forme absorbante), elle se déplacerait vers l'apex pour être soit libérée, soit résorbée. Il faut remarquer d'ailleurs que, si cette substance est libérée dans la lumière au moment de la sécrétion apocrine, elle l'est sous une forme non immuno-réactive puisque l'on n'observe que peu ou pas de fluorescence dans la lumière des tubules.

Le fait est à souligner car au contraire, on observe assez fréquemment des vacuoles parmi le matériel libéré dans la lumière. Cette substance pourrait être impliquée dans la régulation des processus digestifs ou dans la libération des matières de réserve.

En dépit de variations individuelles, il apparait que, dans le cas des Crabes vivant dans des eaux polluées ou ayant subi un traitement par Cu, Zn, Pb et Cd, le processus sécrétoire des cellules hépato-pancréatiques est stimulé ; ce phénomène s'accompagne d'une modification de la localisation et de la quantité de substance "met-enk like" que nous avons détectée. Bien que la période d'inanition à laquelle les animaux traités ont été soumis n'apparaisse pas per se avoir d'influence sur l'intensité du processus de sécrétion des cellules hépato-pancréatiques, on ne peut évidemment exclure que l'inanition ait pu avoir un effet sensibilisateur aux traitements administrés.

3.2. Etude de la Moule Mytilus edulis

3.2.1. Bioaccumulation des métaux.

3.2.1.1. Etude in situ

Afin d'étudier l'impact des pollutions métalliques liées principalement aux activités d'un grand port plaisancier, nous avons prélevé des Moules sur la digue du port des Minimes (La Rochelle) à la fin de la période estivale. Le prélèvement témoin était constitué par des Moules de même taille provenant de la plage de la Gautrelle dans l'île d'Oléron. Aucune différence significative n'était observée entre ces deux lots pour le cadmium et le cuivre tandis que pour le plomb et le zinc, les concentrations dans les Moules des Minimes étaient à peine plus que doublées par rapport à celles d'Oléron (Tabl. VII). Pour tous les métaux, les Moules de St-Nazaire (prélevées à la sortie du sas Sud du port) présentent des concentrations plus élevées que les Moules provenant de la baie de Bourgneuf. Les différences les plus sensibles sont observées pour le plomb et le zinc (Tabl. VII). Ces différences restent cependant limitées et l'étude cyto-immunologique a été effectuée seulement dans le second cas où elles sont plus marquées.

3.2.1.2. Etude expérimentale

Pour les trois métaux étudiés, Cd, Cu et Zn à des surcharges croissantes dans l'eau correspondent des concentrations croissantes dans les branchies, l'hépto-pancréas et le reste des tissus mous (Tabl. VIII).

3.2.2. Etude cyto-immunologique

Chez les Moules témoins, l'observation en fluorescence de coupes après traitement par le sérum anti-met-enk révèle des cellules présentant une immuno-réactivité positive. Le repérage des différentes portions du tube digestif a été effectué sur les coupes d'après les données schématisées par BOUE et CHANTON (Pl. VIII). Les cellules immuno-réactives sont absentes de l'épithélium du caecum pylorique, de l'intestin et du rectum, rares dans l'épithélium buccal et oesophagien et très nombreuses dans l'épithélium de l'estomac.

Ce dernier présente divers aspects morphologiques qui résident en une succession de bourrelets épithéliaux et de plages épithéliales. Les bourrelets épithéliaux sont soulevés par un axe de tissu conjonctif sous-jacent et font saillie dans la lumière gastrique. Ils possèdent un épithélium constitué de cellules prismatiques hautes présentant une différenciation apicale en plateau strié et des implantations de cils vibratiles. Les cellules immuno-réactives sont situées entre les cellules ciliées et sont de deux types. Les types I possèdent leurs corps cellulaires distribués en nappe occupant une position moyenne par rapport à la hauteur de l'épithélium. Ces corps cellulaires sont pyriformes et la base élargie renferme le noyau qui apparaît non fluorescent. Le cytoplasme émet une fluorescence vive et envoie vers la surface ainsi que vers la lame basale de l'épithélium, un prolongement fin. Des incidences de coupe favorables permettent l'observation de prolongements basaux atteignant la surface de l'épithélium et de prolongements basaux atteignant la lame basale au contact de laquelle ils peuvent se diviser (Pl. VIII, fig. 1 et 2).

Le deuxième type (type II) possède un corps cellulaire semblable au premier type mais situé en position beaucoup plus basale. Ces cellules possèdent également des prolongements cytoplasmiques fluorescents : le prolongement basal est très court, le prolongement apical beaucoup plus long que pour le type I (Pl. IX, fig. 1).

Les plages épithéliales sont constituées par un épithélium plat de hauteur variable. Les cellules sont en majorité des cellules prismatiques ciliées à bordure en brosse entre lesquelles on peut observer des cellules immuno-réactives soit du type I, soit du type II (Pl. IX, fig. 2). En plus de ces cellules on peut observer dans l'épaisseur de

l'épithélium des amas de granules de taille variable présentant une autofluorescence jaune vive. Ces amas de grains sont soit répartis isolément (Pl. IX, fig. 3) soit en nappe continue d'extension variable (Pl. IX, fig. 4). L'observation en microscopie optique n'a pu révéler si ces granules occupaient une situation intracellulaire ou étaient situés dans des espaces intercellulaires. L'autofluorescence jaune vive suggère une nature lipidique ou lipo-protéique.

Concernant les cellules immuno-réactives, il est difficile d'apprécier si seuls les caractères morphologiques permettent de définir deux types cellulaires distincts ou si ces deux types I et II représentent une situation chronologique différente d'un même type cellulaire. Leur immuno-réactivité comparable plaiderait plutôt pour cette dernière explication.

La répartition des cellules immuno-fluorescentes au sein des bourrelets et des plages épithéliales est variable. Certaines de ces formations sur les coupes apparaissent soit riches en cellules immuno-actives, soit pauvres ou en sont même totalement dépourvues. Il semble donc que la distribution des cellules immuno-réactives ne soit pas homogène au sein de ces formations.

Les cellules fluorescentes observées chez les témoins "in situ" (fixés immédiatement après prélèvement) nous sont apparues moins intensément fluorescentes que celles des témoins expérimentaux (qui ont été soumis à une période de jeûne de 16 jours). Cependant, cette modification étant assez faible, il est délicat de l'attribuer soit aux fluctuations aléatoires de la technique utilisée, soit à une éventuelle variation quantitative de la substance recherchée, liée à l'inanition.

Chez les Moules contaminées expérimentalement (Tabl. VIII), il ne nous a pas été possible d'apprécier de notables différences avec les animaux témoins.

L'examen des coupes obtenues à partir de Moules prélevées en milieu naturel pollué (Tabl. VII) n'a pu mettre en évidence de cellules immuno-réactives. Les causes de cette déplétion en met-enképhaline pourraient être recherchées pour des polluants autres que les polluants métalliques utilisés (Cd, Cu, Zn) voire même d'autres polluants non métalliques.

3.3. Etude de la Civelle, Anguilla anguilla juvénile

3.3.1. Bioaccumulation des métaux.

Les dosages ont été effectués individuellement sur l'organisme in toto pour des civelles provenant de trois estuaires (Loire, Gironde, Vilaine) et dont le stade de développement s'échelonnait de V A à VI A₃ (ELIE, 1979). Les prélèvements ont été renouvelés de Février à Avril 1983. Pour aucun des métaux, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence en fonction du site de prélèvement ou du stade de développement. Dans ces conditions, il ne pouvait être question d'étudier d'éventuelles perturbations du métabolisme endocrinien entre animaux "pollués" et "non pollués".

Les résultats concernant la contamination expérimentale des Civelles sont réunis dans le tableau IX. La concentration de cadmium dans l'organisme dépend de la surcharge dans l'eau et augmente au cours de l'exposition. Pour le cuivre, plus forte est la surcharge dans l'eau, plus forte la concentration dans l'organisme, mais cette dernière se stabilise relativement vite. En effet, on n'observe aucune augmentation entre 2 et 4 semaines pour la surcharge la plus faible dans le milieu, ni entre 2 et 3 semaines pour la surcharge la plus forte. La concentration en zinc dans l'organisme reste stable pour les animaux exposés à la surcharge la plus faible dans l'eau. Elle n'augmente pas significativement par rapport au témoin chez les animaux exposés pendant 2 semaines à la surcharge moyenne. Par contre, après 3 semaines d'exposition à la surcharge moyenne ou 2 semaines à la surcharge la plus forte, les civelles ne régulent plus parfaitement la concentration du zinc dans leur organisme et la différence par rapport au témoin devient significative ($P < 0,05$)

3.3.2. Etude cyto-immunologique

Le repérage et le choix des niveaux de coupes convenant à l'observation du pancréas et de l'ensemble du tractus gastro-intestinal (Pl. X) ont été réalisés en colorant parmi les lames successives une lame sur cinq pour chaque individu soit au total 265 lames. Les lames non colorées contiguës ont été traitées avec les différents anticorps selon le protocole présenté dans le tableau récapitulatif (Tabl. IX).

Les résultats concernant la sérotonine, le glucagon, la somatostatine et la méthionine-enképhaline sont récapitulés dans le tableau X pour les Civelles témoins et contaminées.

3.3.2.1. Sérotonine

Toutes les civelles témoins ont réagi positivement au sérum anti-sérotonine. Les cellules immuno-réactives situées dans les muqueuses présentent une distribution variable en fonction des segments du tube digestif envisagés. Absentes dans l'oesophage, elles sont réparties de façon assez uniforme dans l'estomac où elles sont surtout localisées dans le col des glandes gastriques et l'épithélium de surface (Pl. XI, fig. 1 et 2). Elles sont nombreuses dans l'épithélium du bulbe duodéal et présentes dans l'épithélium intestinal. Elles n'ont pas été détectées dans le pancréas.

Les animaux expérimentaux apparaissent généralement moins immuno-réactifs que les animaux témoins à l'exception toutefois des civelles exposées à la plus faible surcharge expérimentale de cadmium ou de cuivre (4 semaines). Chez ces dernières, on relève la présence de cellules immuno-réactives dans l'estomac pylorique alors que pour les témoins, cette zone de l'estomac n'en comportait pas.

3.3.2.2. Glucagon

Des cellules immuno-réactives ont été observées dans les îlots endocrines du pancréas. Ces îlots présentent un dimorphisme chez les civelles. Des îlots de petite taille sont régulièrement répartis au sein du parenchyme exocrine, deux autres de grande taille sont appelés "corps de Brockmann" ; l'un est situé ventralement par rapport à l'estomac (îlot gastrique), l'autre dans la tête du pancréas en contact avec la rate (îlot splénique). Au sein de ces formations endocrines, des cellules à glucagon occupent une situation préférentiellement périphérique, d'autres constituent des cordons (Pl. XI, fig. 3). Des cellules immuno-réactives ont aussi été observées dans l'épithélium des canaux pancréatiques. D'autres, peu nombreuses, sont situées dans l'épithélium intestinal surtout au niveau de l'intestin antérieur et moyen.

Les animaux traités par le cadmium présentent d'une manière homogène une diminution de l'immuno-réactivité pour le sérum anti-glucagon. Les animaux traités par le cuivre présentent une réactivité variable d'un individu à l'autre avec cependant une déplétion marquée du glucagon dans le pancréas des individus exposés à la plus forte surcharge. Les animaux contaminés par le zinc ont montré une nette diminution de l'immuno-réaction.

3.3.2.3. Somatostatine

Les îlots pancréatiques possèdent des cellules immuno-réactives pour la somatostatine. Au sein des îlots, ces cellules présentent une situation plutôt centrale (Pl. XI, fig. 4). La muqueuse gastrique est également riche en cellules immuno-réactives mais c'est dans le bulbe duodénal qu'elles sont les plus nombreuses (Pl. XI, fig. 5). Quelques réactions positives sont observées au niveau de l'intestin mais les cellules concernées sont beaucoup moins denses.

Au niveau du pancréas, aucune variation notable n'a pu être observée entre animaux témoins et contaminés. Par contre, les surcharges expérimentales les plus fortes de Cu et les surcharges en zinc même les plus faibles, entraînent une déplétion de cette hormone-like dans l'estomac.

3.3.2.4. Méthionine-enképhaline

Nous n'avons pas observé de cellules positives dans le pancréas ni dans le tractus digestif antérieur. Les premières cellules immuno-réactives apparaissent dans l'intestin antérieur et moyen où elles sont régulièrement réparties (Pl. XI, fig. 6). Dans l'intestin postérieur le nombre des cellules observées décroît progressivement vers la valvule ileo-caecale. Pour cette hormone, les résultats sont comparables entre les animaux témoins et les animaux pollués.

3.4. Etude du Flet Platichthys flesus

3.4.1. Bioaccumulation des métaux.

L'ISTPM ayant signalé des captures relativement fréquentes de Poissons nécrosés dans le bassin à flot de Saint-Nazaire, nous avons

choisi d'étudier des Flets qui y sont prélevés et de les comparer à ceux provenant de l'estuaire de la Loire parmi lesquels nous n'avons pas observé de nécroses pendant plus de deux années de prélèvements mensuels sur deux sites, l'un proche de l'embouchure (banc de Bilho), l'autre à 17 km environ en amont (banc de l'île Pipy).

Les résultats des dosages de métaux effectués individuellement sur cinq organes sont présentés dans le tableau XI. Parmi les Flets provenant du bassin à flot seuls F12 et F13 étaient nécrosés. A l'époque du prélèvement, le bassin était très influencé par des apports d'eaux douces, des Poissons dulçaquicoles ayant été capturés en même temps que les Flets. Parmi les animaux "témoins", ceux qui proviennent de l'estuaire interne sont ceux qui se rapprochent le plus des individus "pollués" par les conditions de salinité auxquels ils étaient exposés dans leur milieu.

Les Flets F12, F14 et F17 ont été choisis pour les tests immunocytologiques. Pour le cadmium, F14 et F17 apparaissent comme de bons témoins, les teneurs de ce métal dans tous les organes étant beaucoup plus faibles que chez les individus provenant du bassin à flot. Pour le plomb, il n'en est pas de même, les concentrations étant plus faibles chez les animaux du bassin à flot que chez ceux de l'estuaire. Il semble que ces derniers aient subi une contamination car leurs teneurs en plomb sont également beaucoup plus élevées que les valeurs moyennes établies sur deux cycles annuels (Tabl. XI). Pour le cuivre, la répartition dans l'organisme est très différente en fonction du lieu de prélèvement, les concentrations les plus fortes étant mises en évidence dans le foie des individus de l'estuaire et dans les reins et la peau des individus du bassin à flot. Pour le zinc, aucune différence interprétable n'est observée ce qui peut être lié au fait que les concentrations du zinc soient similaires dans les différents sites ou que, les concentrations étant variables dans le milieu, les Flets régulent la concentration de ce métal dans leurs tissus comme cela a été montré expérimentalement (AMIARD et coll., 1984).

3.4.2. Etude cyto-immunologique

Chez les deux Flets témoins, nous avons obtenu une réponse positive au niveau de la muqueuse digestive pour deux anti-séra, l'un contre

la met-enképhaline, l'autre contre la somatostatine. Pour la met-enképhaline, les cellules immuno-réactives sont peu nombreuses, leur localisation est restreinte à la zone épithéliale superficielle de la muqueuse pylorique. Chez le Flet nécrosé, les cellules positives sont nombreuses dans l'estomac pylorique mais leur fluorescence est en général moins intense que chez le témoin. Pour la somatostatine, c'est également l'estomac pylorique qui s'est avéré le plus riche en cellules immuno-réactives. La réaction est très franche et les cellules sont nombreuses dans l'épithélium de surface, moins nombreuses dans la région du col des glandes et plus rares dans l'épithélium des glandes. Chez le Flet nécrosé, les cellules positives sont présentes. Leur nombre, leur localisation et leur répartition sont comparables à ce qui a été observé chez le témoin.

4 - CONCLUSIONS

Parmi les substances "hormone-like" mises en évidence chez les organismes aquatiques étudiés, quatre ont présenté des perturbations chez une ou plusieurs espèces soumises à un ou plusieurs types de pollution.

La présence de *sérotonine* avait été signalée dans le système gastro-entéro-pancréatique de Poissons Téléostéens (READ et BURNSTOCK, 1968). Nous avons mis en évidence une substance apparentée à la sérotonine chez la civelle, dans diverses régions de l'estomac et de l'intestin. La contamination expérimentale des civelles par le cuivre à la plus forte concentration testée ($300 \mu\text{g.l}^{-1}$) entraîne une déplétion de cette substance.

Le *glucagon* n'a pas été mis en évidence chez la Moule (FRITSCH et coll. 1976) mais il est présent dans le tractus digestif et le pancréas de Poissons Téléostéens (LANGER et coll., 1979). Chez la civelle, nous avons observé la présence d'une substance apparentée au glucagon principalement dans le pancréas, quelques cellules immuno-réactives étant de plus détectées dans l'intestin antérieur et moyen. La contamination expérimentale des civelles par le cadmium ($60 \mu\text{g.l}^{-1}$) le cuivre ($300 \mu\text{g.l}^{-1}$) et le zinc ($100 \mu\text{g.l}^{-1}$) entraîne une diminution de l'immuno-réactivité pour le sérum anti-glucagon.

La *somatostatine* fait également partie des hormones recencées dans le système gastro-entéro-pancréatique de Poissons Téléostéens (LANGER et coll., 1979; KLEIN et VAN NOORDEN, 1980; STEFAN et FALKMER, 1980; NOAILLAC-DEPEYRE et HOLLANDE, 1981; HOLMGREN et coll., 1982) et nous avons observé une substance apparentée dans des cellules de l'estomac pylorique du Flet, des îlots pancréatiques et de la muqueuse gastrique de la civelle. Les quelques observations effectuées chez le Flet n'ont pas révélé de différences entre animal nécrosé et témoins. Chez la civelle, si aucune perturbation n'est à signaler au niveau du pancréas, au niveau de l'estomac la contamination expérimentale par le cuivre ($300 \mu\text{g.l}^{-1}$) ou par le zinc ($100 \mu\text{g.l}^{-1}$) entraîne une dépression de la "somatostatine-like".

La présence de *méthionine-enképhaline* a déjà été signalée chez des Poissons Téléostéens (LANGER et coll., 1979). Nous avons retrouvé une substance apparentée à la met-enképhaline chez le Flet (muqueuse pylorique) et la civelle (intestin antérieur et moyen) mais aussi chez la Moule (cellules de l'épithélium stomacal) et le Crabe (cellules des tubules hépatopancréatiques). Chez la civelle, aucune différence nette n'a pu être mise en évidence entre les individus témoins et ceux ayant subi une contamination expérimentale par Cd, Cu et Zn. Chez le Flet, une chute d'immuno-réactivité des structures à met-enképhaline-like a pu être observée chez un individu nécrosé provenant d'un milieu pollué par rapport à des animaux non nécrosés provenant d'un site réputé moins pollué. Chez la Moule, une déplétion a pu être observée pour les animaux provenant d'un site "pollué" par rapport à ceux récoltés sur un site témoin. Si cette perturbation peut résulter de l'effet de polluants, il ne s'agit vraisemblablement pas des polluants métalliques étudiés puisque les Moules contaminées expérimentalement par Cd, Cu et Zn ne présentent pas d'anomalies notables par rapport aux témoins. Chez le Crabe, nous avons observé des variations de la localisation de la met-enképhaline-like dans les cellules des tubules hépato-pancréatiques sous l'effet d'une pollution chronique "in situ". Pour cette espèce, des perturbations similaires ont été induites expérimentalement en contaminant le milieu d'élevage par le cadmium ($2500 \mu\text{g.l}^{-1}$), le plomb ($1000 \mu\text{g.l}^{-1}$), le cuivre ($50 \mu\text{g.l}^{-1}$) et le zinc ($50 \mu\text{g.l}^{-1}$).

Ces données, bien qu'acquises chez un nombre relativement restreint d'animaux (Tabl. V, VII, VIII, IX), montrent que les polluants métalliques appliqués aux concentrations et pendant les durées précédemment décrites entraînent un certain nombre de perturbations dans la physiologie des régulations endocriniennes digestives chez les animaux étudiés. Si l'on compare les surcharges qui entraînent une perturbation du métabolisme endocrinien à moyen terme (maximum 4 semaines) à un paramètre toxicologique classique comme la $CL_{50}/96$ h (Tabl. XII), il apparaît qu'un test basé sur ces perturbations serait très sensible. Pour le cuivre et le zinc, les surcharges efficaces de 50 à 100 $\mu\text{g.l}^{-1}$ sont du même ordre de grandeur que les concentrations les plus fortes rencontrées dans les milieux marins les plus pollués.

Lorsqu'une pollution entraîne une variation importante du nombre des cellules détectées, de leur immuno-réactivité ou de la localisation intracellulaire de l'hormone-like - comme c'est le cas par exemple chez le Crabe à l'égard de la met-enképhaline-like - la technique utilisée peut constituer un outil de détection précoce d'une dégradation de la qualité du milieu.

Toutefois, pour assurer la validité de ce type d'essai biologique, il serait nécessaire de le soumettre à une étude statistique faisant intervenir un grand nombre d'échantillons et une analyse quantitative par morphométrie. La complexité de la méthode immuno-histologique, le coût et la rareté des anticorps disponibles ne permet pas d'envisager une banalisation de ce type d'essai.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AMIARD, J.C., AMIARD-TRIQUET, C. and METAYER, C., (1984) : Experimental study of bioaccumulation, toxicity and regulation of some trace metals in various estuarine and coastal organisms. In : Heavy metals in water organisms, Balatonfüred, Hongrie, 3-8 Sept. 1984.
- BOITEAU, H.L. et METAYER, C., (1978) : Microdosage du plomb, du cadmium, du zinc et de l'étain dans les milieux biologiques par spectrométrie d'absorption atomique après minéralisation et extraction. Analisis, 6, 350-358.
- BOUE, H. et CHANTON, R., (1962) : Zoologie I. Les Invertébrés. Ed. Douin et Cie, PARIS, 723 p..
- COONS, A.H., LEDUC, E.H. et CONNOLLY, J.M., (1955) : A Method for the Histochemical Demonstration of specific Antibody and its Application to a Study of the Hyperimmune Rabbit. J. Exp. MED., 102, 49-59.
- DRACH, P., (1939) : Mue et cycle d'intermue chez les Crustacés décapodes. Ann. Inst. Océanogr., 19, 103-391.
- ELIE, P., (1979) : Contribution à l'étude des Montées de Civelles d'Anguilla anguilla (L.). Poisson téléostéen anguilliforme dans l'estuaire de la Loire : Pêche, Ecologie, Ecophysiologie et Elevage. (Thèse 3ème Cycle, Rennes, 381 pp.).
- FRITSCH, H.A.R., VAN NOORDEN, S., PEARSE, A.G.E., (1976) : Cytochemical and Immunofluorescence Investigations on Insulin-like producing cells in the intestine of Mytilus edulis (L.). Bivalvia. Cell Tissue Res., 165, 365-369.
- FRITSCH, H.A.R. et SPRANG, R., (1977) : On the ultrastructure of polypeptide hormone producing cells in the gut of the ascidian Ciona intestinalis (L.) and the bivalve Mytilus edulis (L.). Cell Tissue Res., 177, 3, 407-413.
- GABE, M., (1968) : Techniques histologiques. Ed. Masson et Cie, Paris, 1113 p.
- HIRSCH, G.C. and JACOBS, W., (1928) : Der Arbeits rhythmus der mittel-darmdrüse von Astacus leptodactylus. Part I - Der Bervise der Periodizität. Zeitschr. Vergl. Physiol., 8, 102-144.
- HIRSCH, G.C. and JACOBS, W., (1930) : Part II - Wachstum als primärer Faktor des Rythmus eines polyphasischen organigen Sekretions-System. Zeitschr. Vergl. Physiol., 12, 524-558.
- HOLMGREN, S., VAILLANT, C., DIMALINE, R., (1982) : VIP-, Substance P-, Gastrin/CCK-, Bombesin-, somatostatin-, and glucagon-like immuno-reactivities in the gut of the Rainbow trout, Salmo gairdneri. Cell Tissue Res, 223, 141-153.

- KLEIN, C., (1977). Ultrastructural and cytochemical bases for the identification of cell types in the endocrine pancreas of teleosts. Intern. Review of cytology Supplement 6 Acad. Press, 289-346.
- KLEIN, C., VAN NOORDEN, S., (1980). Pancreatic polypeptide (PP) and glucagon cells in the pancreatic islets of Xiphophorus helleri H (Teleostei). Cell Tissue Res, 205, 187-198.
- LANGER, M., VAN NOORDEN, S., POLAK, J.M., PEARSE, AGE, (1979). Peptide hormone-like immunoreactivity in the gastrointestinal tract and endocrine pancreas of eleven teleost species. Cell Tissue Res, 199, 493-508.
- LARSSON, L.I., REHFELD, J.F., (1978). Evolution of CCK-like hormones in : Bloom SR (ed) "Gut Hormones". Churchill Livingstone, New York, pp. 68-73.
- MARTIN, R. et al., (1979) : Met-enk-like immunoreactivity in a cephalopod neurohemal organ. Neurosci. Lett., 15, 253-258.
- MARTIN, R., FRÖSCH, D., VOIGT, K.H., (1980) : Immunocytochemical evidence for melanotropin and vasopressin-like material in a Cephalopod neurohemal organ. Gen. Comp. Endocrinol., 42, 235-243.
- MARTIN, R., FRÖSCH, D., KIEHLING, C. and VOIGT, K.H. (1981) : Molluscan neuropeptide-like and enkephalin-like material coexists in Octopus nerve. Neuropeptides, 2, 141-150.
- METAYER, C., AMIARD, J.C. et AMIARD-TRIQUET, C., (1982) : Accumulation de quelques éléments traces métalliques (Cd, Pb, Cu et Zn) chez la Sole (Solea solea) et le Flet (Platichthys flesus) : variations en fonction de l'âge et organotropisme. Rev. Int. Océanogr. Méd., 66-67, 33-45.
- NOAILLAC-DEPEYRE, J., HOLLANDE, E., (1981) : Evidence for somatostatin, gastrin and pancreatic polypeptide-like substance in the mucosa cells of the gut fishes with and without stomach. Cell Tissue Res, 216, 193-203.
- READ, J.B., BURNSTOCK, G., (1968). Fluorescent histochemical studies of the mucosa of the vertebrate gastrointestinal tract. Histochemie 16, 324-332.
- REINECKE, M., CARRAWAY, R.E., FALKMER, S., FEURLE, G.E., FORSSMANN, W.G., (1980). Occurrence of neurotensin-immunoreactive cells in the digestive tract of lower vertebrates and deuterostomian invertebrates. A correlated immunohistochemical and radioimmunochemical study. Cell Tissue Res, 212 173-185.
- STEPHAN, Y., FALKMER, S., (1980). Identification of four endocrine cells in the pancreas of Cottus scorpius (Teleostei) by immunofluorescence and electron microscopy. Gen. Comp. Endocrinol. 42, 171-178.

TRAVIS, D.F., (1954) : The molting cycle of the Spiny Lobster, Palinurus argus Latreille. I. Molting and growth in laboratory-maintained individuals. Biol. Bull., 107, 433-450.

TRAVIS, D.F., (1955) : The molting cycle of the Spiny Lobster, Palinurus argus, Latreille. II. Pre- ecdysial histological and histochemical changes in the hepatopancreas and integument tissues. Biol. Bull., 108, 88-112.

TRAVIS, D.F., (1957) : The molting cycle of the Spiny Lobster, Palinurus argus, Latreille. IV. Post-ecdysial histological and histochemical changes in the hepato-pancreas and integumental tissues. Biol. Bull., 113, 451-479.

Tableau I - Lieux de prélèvement et conditions d'élevage des organismes-tests.

ESPECE	LIEU DE PRELEVEMENT	CONDITIONS D'ELEVAGE				
		5°/oo	$\theta^{\circ}\text{C}$	Volume expérimental	nb d'individu/ Conteneur exp.	Caractéristiques biologiques
<u>Mytilus edulis</u>	Baie de Bourgneuf	35°/oo	$15^{\pm}0,5^{\circ}\text{C}$	5 l	4	Longueur coquille 45 mm
<u>Carcinus maenas</u>	Traict du Croisic	25°/oo	$15,5^{\pm}0,5^{\circ}\text{C}$	2 l	2	Largeur carapace 45 mm Stade d'intermue C ₄ Sexe male
<u>Anguilla anguilla</u>	Loire	2°/oo	$15^{\pm}1^{\circ}\text{C}$	5 l	20	Civelles (stades pigmen- taires V _B , VI _{A0} , VI _{A1})

Tableau II - Gamme des surcharges métalliques testées

ESPECES	TEMPS DE CONTAMINATION	METAUX	GAMME DES SURCHARGES METALLIQUES (mg/l)			
<u>Mytilus edulis</u>	16 jours	Cd	0	0,0025	0,025	0,25
		Cu	0	0,01	0,05	0,1
		Zn	0	0,05	0,1	0,5
<u>Carcinus maenas</u>	1,2 et 3 semaines	Cd	0	2,5		
		Pb	0	1		
		Cu	0	0,05		
		Zn	0	0,05	0,125	
<u>Anguilla anguilla</u> (Civelle)	2 semaines et	Cd	0	0,06	2,5	
		Cu	0	0,05	0,3	
	3 ou 4* semaines	Zn	0	0,1	1	5

* 4 semaines pour la plus faible surcharge, 3 semaines pour les autres.

Tableau III - Récapitulatif des techniques immunologiques

ESPECE \ ETAPE	ETAT DE FIXATION	FIXATEUR	DUREE DE FIXATION(4°C)	COUPES HISTOLOGIQUES EPAISSEUR(µm) et ORIENTATION	COLORATIONS HISTOLOGIQUES de REPERAGE†
<u>Carcinus maenas</u>	hépatopancréas disséqué	BOUIN-HOLLANDE	2 à 4 jrs	5 -	APS hématoxyline-eosine
<u>Mytilus edulis</u>	-in toto- valves ouvertes	BOUIN	7 h	6 et 10 - coupes sagittales - coupes horizontales - coupes transversales	Picro-indigo-carmin Mowry Van-Gieson
<u>Anguilla anguilla</u> (Civelle)	-in toto-	BOUIN-HOLLANDE	4 jrs	7 - coupes sagittales - coupes horizontales	Mowry-Van-Gieson
<u>Platichthys flesus</u>	tractus digestif ouvert sur toute sa longueur	BOUIN-HOLLANDE	48 h	7 - coupes transversales	Picro-indigo-carmin

†d'après GABE, 1968.

Tableau IV : Anticorps utilisés.

Anticorps obtenus contre :	Nature du premier anti-serum	Dilution d'utilisation dans le tampon phosphate 0,13 M pH 7,4	Durée d'incubation du 1er anti-sérum	Origine du serum conjugué ITCF	durée d'incubation du sérum conjugué ITCF
Insuline	Cobaye	1/100	2 h	Lapin anti-cobaye M.P. DUBOIS Nouzilly	1 h
Glucagon	Lapin	1/100	2 h	Mouton anti-lapin ITCF Institut Pasteur	1 h
Somatostatine	Lapin	1/100	2 h	"	1 h
Met-enképhaline	Lapin	1/50 1/100	18 h	"	2 h
Sérotonine	Lapin	1/100	2 h	"	1 h
α -endorphine	Lapin	1/100	18 h	"	2 h
β -endorphine	Lapin	1/100	18 h	"	2 h
Substance P.	Lapin	1/50	18 h	"	2 h
ACTH 17-39	Lapin	1/100	18 h	"	2 h
ACTH 1-24	Lapin	1/100	18 h	"	2 h

Tableau V - Nombre de Carcinus maenas soumis à l'étude cyto-immunologique pour chaque type de traitement.

Type d'exposition	Fixation immédiate	Fixation après une période de jeûne de :		
		1 semaine	2 semaines	3 semaines
Zone "polluée" (St-Nazaire)	5			
Zone non polluée (Traict du Croisic)	1	3	4	6
Contamination par Cd		4	3	0
" " Pb		3	3	4
" " Cu		4	4	3
" " Zn		4	4	4

Tableau VI - Concentrations métalliques dans l'hépatopancreas de Carcinus maenas provenant de divers milieux naturels ou soumis à une contamination expérimentale (moyenne affectée de l'écart-type à la moyenne).

	Cd µg/kg sec	Pb µg/kg sec	Cu µg/kg sec	Zn mg/kg sec
A - Expérience de contamination (3 semaines)				
Témoin	544,3	1 012,7	321 519,0	113,9
Contaminés par :				
Cd	370 300,2	367,5	292 919,4	49,8
Pb	1 004,2	45 868,1	516 386,3	59,2
Cu	1 057,8	155,1	199 348,4	64,3
Zn	428,7	685,4	392 545,4	93,8
B - Animaux prélevés <u>in situ</u>				
Saint-Nazaire	5 005,8 (1 448,9)	1 300,2 (492,1)	24 911,8 (1 736,9)	121,8 (26,0)
Traict du Croisic	856,8 (171,6)	580,3 (294,0)	239 814,5 (31 165,1)	87,6 (9,4)

Tableau VII - Etude in situ de la Moule Mytilus edulis

Type d'exposition	Accumulation des métaux dans les tissus mous [†]				Traitement en immunologie	
	Cd(µg/kg sec)	Pb(µg/kg sec)	Cu(µg/kg sec)	Zn(mg/kg sec)	Caractéristiques des coupes	Nombre de lames traitées par la MET-ENK
Oléron "témoins"	943,1(32,7)	1879,3(41,2)	5161,7(154,4)	54,9 (3,2)	-	-
La Rochelle "pollués"	1034,6(11,7)	4800,2(109,8)	5075,7(122,3)	129,9 (0,6)		
Baie de Bourgneuf "témoins"	588,8	1856,4	4082,7	48,0	Coupes sagittales Coupes transversales 10 µm	7 18
St-Nazaire "pollués"	945,7(20,4)	4543,1(164,3)	6066,5(515,5)	121,2 (3,6)	Coupes sagittales	12

[†]Concentration moyenne affectée de l'écart-type à la moyenne.

Tableau VIII : Etude expérimentale de la contamination (16 jours) de la Moule par Cd, Cu et Zn

Surcharge expérimentale (mg/l)	Concentration du métal en surcharge dans :			Traitement en immunologie		
	Branchies mg.kg ⁻¹ sec	Hépatopancréas mg.kg ⁻¹ sec	Restes mg.kg ⁻¹ sec	Caractéristiques des coupes	Nombre de lames traitées par la MET-ENK	
Témoins :	Cd	0,8	0,7	0,8	Coupes sagittales 6 µm	11
	Cu	34,8	19,9	14,2	Coupes horizontales 6 µm	4
	Zn	50,7	58,2	84,5		
Cd 0,0025	3,6	3,7	2,3	Coupes sagittales 6 µm	7	
Cd 0,025	15,1	13,0	9,0	-id-	5	
Cd 0,25	155,1	94,5	63,5	-id-	13	
Cu 0,01	55,4	26,4	22,1	-id-	7	
Cu 0,05	142,1	76,3	46,7	Coupes sagittales 10 µm	10	
Cu 0,10	175,2	52,5	54,3	Coupes sagittales 6 µm	9	
Zn 0,05	136,7	99,6	92,6	-id-	7	
Zn 0,10	170,9	140,1	128,3	-id-	5	
Zn 1,00	310,9	292,1	196,2	-id-	9	

Tableau IX : Accumulation des métaux chez les Civelles contaminées expérimentalement.

Contaminant	Surcharge dans l'eau mg/l	Durée de l'expérience	Concentrations dans l'organisme*			Nombre de coupes traitées				
			Cd	Cu	Zn	MET-ENK	SRIF ^a	GLU ^b	-5	HT ^c
Témoin	0	moyenne sur 2, 3,4 semaines	0,38 (0,02)	2,36(0,24)	43,0 (2,0)	10	8	7		4
Cadmium	0,06	2 s	1,44 (0,14)			3	2	2		1
		4 s	3,00 (0,27)			3	2	2		1
	2,5	2 s	9,23 (0,89)			3	2	2		1
		3 s	19,46 (3,98)			3	2	2		1
Cuivre	0,05	2 s		8,43 (0,54)		3	2	2		1
		4 s		8,75 (0,66)		10	6	6		4
	0,3	2 s		12,35 (2,76)		3	2	2		1
		3 s		13,08 (0,51)		3	2	2		1
Zinc	0,1	2 s			37,6 (0,81)	3	3	3		2
		4 s			50,7 (2,5)	2	2	2		1
	1	2 s			53,1 (3,1)					
		3 s			65,4 (0,7)	2	2	2		1
5	2 s			74,0 (9,9)	3	2	2		1	

* Valeurs moyennes affectées (entre parenthèses) de l'écart-type à la moyenne.

a - SRIF = somatostatine

b - GLU = glucagon

c - SHT = sérotonine

RÉCAPITULATIF DES RÉSULTATS

Cellules Immunoreactives : ~ rares ~ peu nombreuses ~ nombreuses ~ très nombreuses ~

SEROTONINE : (▲) ▲ ▲▲ ▲▲▲
 GLUCAGON : (▮) ▮ ▮▮ ▮▮▮
 SOMATOSTATINE : (+) + ++ +++
 MET-ENKEPHALINE : (X) X XX XXX

TABEAU No X

D'IMMUNOLOGIE DES CŒLLES :

No REFÉRENCE CŒLLE	STADES PŒMENTAIRES (ŒIE 1979)	M E T A L	CONCENTRA- -TION EN mg/l	DURÉE DE CONTAMINA- -TION (SEMAINE)	PANCRÉAS ENDOCRINE	E S T O M A C :			I N T E S T I N :			
						GLANDULAIRE	PYLORIQUE	BULBE DUODENAL	DUODENUM I. ANTERIEUR	MOYEN	POSTERIEUR	RECTUM
113	VI _{A1}	-	-	-	(-) +	▲ ▮▮	+	▲		▲ X	▲	▲▲ +
114	VI _{A0} DEBUT	-	-	-	▮▮▮ ▮▮	+		▲▲ ▮▮	▮ (X)	▮▮ X		
115	VI _{A0} DEBUT	-	-	-	▮▮▮ ▮▮	▮▮		▲ ▮▮	X	▮ XX+	X	
121	VI _{A1}	Cd	0.06	4s	▮▮▮ ▮▮	▮▮	▲ ▮▮		▮▮	▮ XX▮▮	▮▮	
130	VI _{A1} DEBUT	Cd	2.5	3s	▮ ▮▮	+		▲ ▮▮	+			
85	VI _{A0} DEBUT	Cd	2.5	2s	▮▮ ▮▮	▮▮	▮▮	+	X	X +		
89	V _B Fin	Cd	0.06	2s	▮▮▮ ▮▮	▲ ▮▮	▲	+	+	▲ (-) XX		
118	VI _{A1}	Cu	0.05	4s	▮▮ ▮▮	▮▮▮	▲ +	▲ +	▮ XX			▲
117	VI _{A1}	Cu	0.05	4s	▮▮▮ ▮▮	+	▲	▲▲ +				
116	VI _{A1}	Cu	0.05	4s	▮▮▮ +	▮▮	▲▲	▲ ▮▮	XX			
133	VI _{A1} DEBUT	Cu	0.30	3s	▮ +			(+)			+	
78b	VI _{A1}	Cu	0.30	2s	(-) ▮▮			+	▮ +	(-) XXX		
79	V _B Fin	Cu	0.05	2s	(-) ▮▮	▮▮▮		▮▮				
111	VI _{A1} Fin	Zn	0.10	4s	▮ +	+	+	+				
101	VI _{A1} DEBUT	Zn	1.0	3s	▮▮ ▮▮			▲	▲ XX	XXX		▲▲
70	VI _{A1} DEBUT	Zn	5.0	2s	(-) +	▮▮▮ ▮▮	▮▮▮ ▮▮	▲	(-) X	▲ X		
78b	VI _{A1}	Zn	0.1	2s	▮ ▮▮			+	X			

Tableau XI - Accumulation des métaux chez les Flets provenant de différents sites de prélèvements.

METAL	Lieu de prélèvement Organe	Sanc de Bilho* 1977-1979	Ile Pipy* 1977-1978	St-Nazaire : Bassin à flot			Estuaire externe		Estuaire interne		
				F1 1	F1 2	F1 3	F1 4	F1 5	F1 6	F1 7	F1 8
CADMIUM $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sec}$	Foie	919,0 (156,6)	507,9 (48,8)	7008,8	2438,4	2326,2	1315,5	949,7	2342,3	391,0	1883,5
	Rein	425,1 (52,1)	629,5 (130,2)	879,1	1722,7	2223,1	321,2	147,3	250,0	91,5	251,9
	Peau	39,5 (11,2)	25,1 (7,7)	689,7	458,5	485,2	25,9	31,4	173,1	47,2	63,4
	Branchies	89,5 (22,7)	96,6 (14,2)	60,4	39,4	20,7	41,0	16,4	30,4	27,1	38,4
	Muscles	13,2 (4,3)	15,3 (3,8)	9,6	7,5	4,8	12,0	11,6	54,0	5,5	7,2
PLOMB $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sec}$	Foie	8215,1 (648,0)	5468,6 (1216,9)	10099,3	2201,7	2492,4	22351,6	23969,8	21471,5	14736,8	36392,7
	Rein	6329,0 (577,3)	7392,3 (1922,1)	5274,7	4285,7	4446,2	8543,0	96618,4	59583,3	20274,4	36641,2
	Peau	3631,9 (301,2)	3203,9 (888,0)	8008,9	5948,4	3045,8	4224,8	11114,6	13109,2	13633,3	15856,2
	Branchies	3663,3 (419,2)	3785,0 (2145,8)	16356,9	3082,9	2300,7	434,9	9223,0	32573,2	24780,3	25766,4
	Muscles	994,4 (98,7)	1122,7 (161,9)	1114,8	324,0	413,6	1593,7	2444,2	7033,5	4159,6	3750,2
CUIVRE $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ sec}$	Foie	56,37 (8,23)	38,26 (6,16)	29,14	11,36	18,14	83,82	201,01	34,23	55,94	169,19
	Rein	5,89 (0,74)	7,58 (1,04)	15,60	99,16	69,89	3,71	7,15	5,56	4,02	3,28
	Peau	2,23 (0,16)	2,60 (0,32)	19,58	11,81	47,44	1,48	2,75	4,91	2,02	2,43
	Branchies	1,73 (0,15)	2,16 (0,50)	3,22	2,71	3,12	3,27	1,40	1,58	1,95	1,67
	Muscles	1,23 (0,13)	1,61 (0,17)	2,49	2,06	1,26	1,02	1,15	1,61	0,90	0,82
ZINC $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ SEC}$	Foie	132,2 (9,0)	98,2 (12,6)	158,2	97,6	93,4	182,8	304,0	127,6	109,8	188,3
	Rein	324,0 (26,6)	207,4 (18,9)	163,0	158,1	93,1	202,0	333,3	243,1	251,5	129,8
	Peau	365,6 (11,0)	329,6 (20,9)	339,5	434,2	91,7	294,0	335,9	273,9	296,9	321,4
	Branchies	163,4 (16,8)	174,7 (12,2)	128,1	136,9	77,6	97,3	117,5	139,9	130,4	129,7
	Muscles	50,3 (2,0)	43,7 (2,2)	41,9	48,4	18,9	38,7	55,2	101,3	46,9	53,2

* valeurs moyennes affectées (entre parenthèses) de l'écart-type à la moyenne (d'ap. Métayer et coll., 1982).

Tableau XII- Sensibilité de différents tests effectués sur le Crabe et la civelle.

Espèce	Perturbation envisagée	Surcharge efficace ($\mu\text{g.l}^{-1}$) de :			
		Cd	Pb	Cu	Zn
<u>C. maenas</u>	CL ₅₀ /96 h	33400	>100000	5600	2400
	immuno-réactivité : met-enképhaline like	2500	1000	50	50
<u>A. anguilla</u> juv.(civelle)	CL ₅₀ /96 h	> 20000		3000	>20000
	immuno-réactivité :				
	sérotonine			300	
	glucagon	60		300	100
	somatostatine			300	100

PLANCHE I

Fig. 1 et 2 - Aspect des tubules de l'hépatopancréas d'un Crabe témoin provenant d'une zone non polluée (Traict du Croisic). Les 2 types de cellules peuvent être observés = absorbantes (A) dont le noyau est en position basale ou moyenne, et sécrétrices (S) contenant de volumineuses vacuoles (V). Des images de sécrétion apocrine (flèche) intéressant une partie limitée de la section des tubules sont présentes. Hématoxyline-éosine.

Fig. 3 - Tubules de l'hépatopancréas d'un Crabe provenant d'une zone polluée (estuaire de la Loire). Les cellules qui ont libéré leur contenu par sécrétion apocrine forment des plages importantes, elles constituent un épithélium beaucoup moins haut (flèches) que les cellules contenant des vacuoles (V).

Fig. 4 - Hépatopancréas d'un Crabe soumis à un traitement par le Cd pendant 1 semaine. L'aspect des tubules ne diffère pas de celui des tubules hépatopancréatiques des animaux témoins. APS.



PLANCHE II

Fig. 1 - Sections de tubules hépato-pancréatiques d'un Crabe traité par le Cd pendant 1 semaine. La libération apicale de la sécrétion demeure très limitée (flèche) et n'intéresse que quelques tubules. APS.

Fig. 2 - Les sections de tubules hépato-pancréatiques d'un Crabe traité par le Cd pendant 2 semaines ont un aspect d'hyper-sécrétion, des vacuoles (V) volumineuses et nombreuses peuvent être observées et la lumière du tubule contient le matériel libéré. APS.

Fig. 3 - Sections de tubules hépato-pancréatiques d'un Crabe traité par le Zn pendant 2 semaines. La quasi-totalité des tubules sont occupés par des cellules vacuolaires volumineuses. Certains tubules montrent un épithélium plat après libération de leur sécrétion (flèche). APS.

Fig. 4 - Sections de tubules hépato-pancréatiques d'un Crabe traité par le Pb pendant 2 semaines. Aspect d'hyper-sécrétion. De nombreuses cellules présentent des vacuoles de grande taille (V). APS.

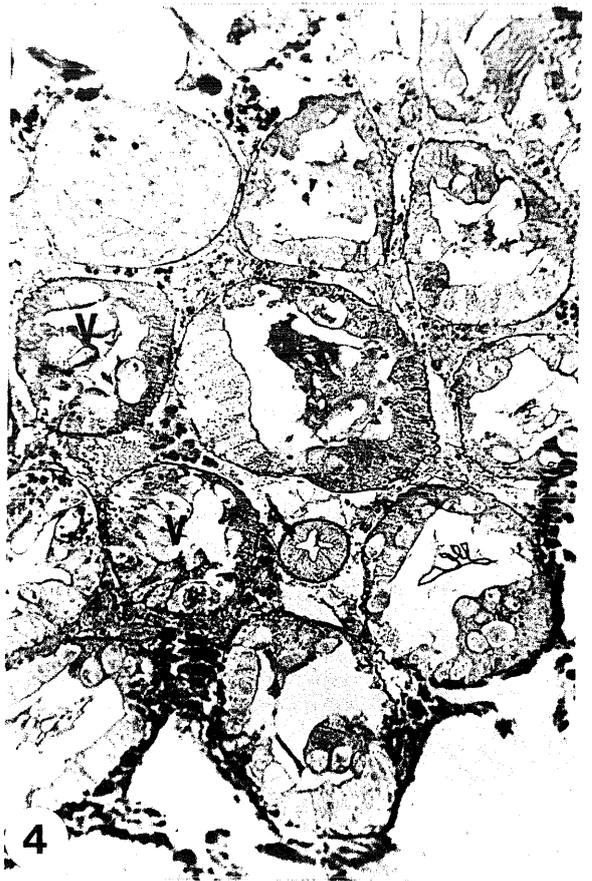
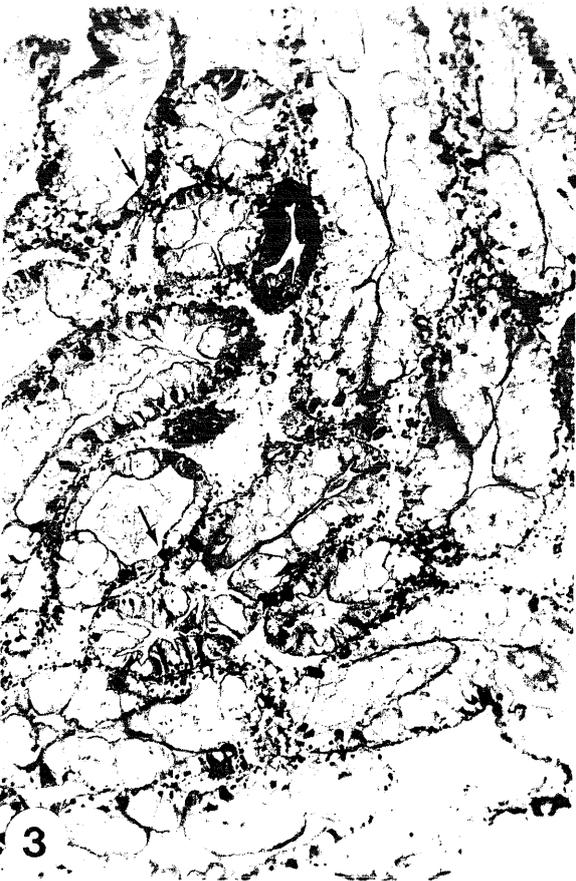


PLANCHE III

Fig. 1 et 2 - Tubules hépato-pancréatiques d'un Crabe témoin provenant du Traict du Croisic étudié en cyto-immunofluorescence. La fluorescence qui traduit la présence d'une substance apparentée à la méthionine-enképhaline, est localisée à la périphérie des tubules i.e dans la zone basale des cellules. Cette localisation basale se retrouve dans les cellules sécrétrices contenant de volumineuses vacuoles (Fig. 2).

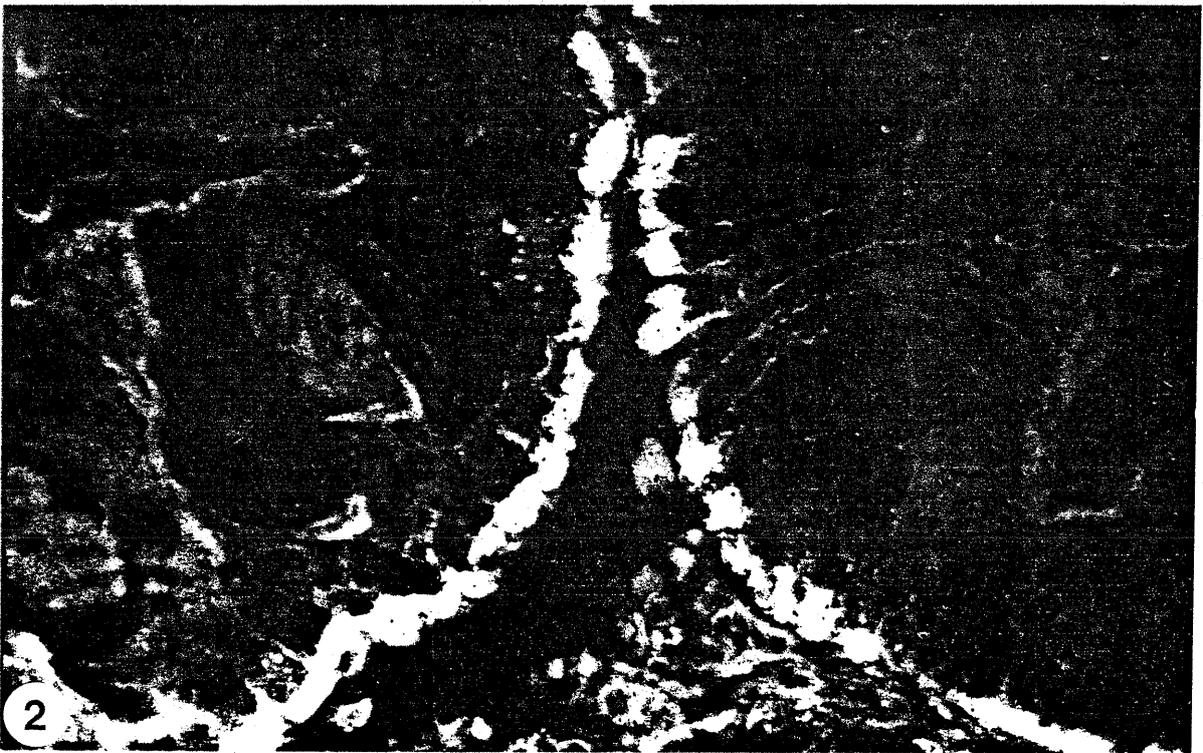
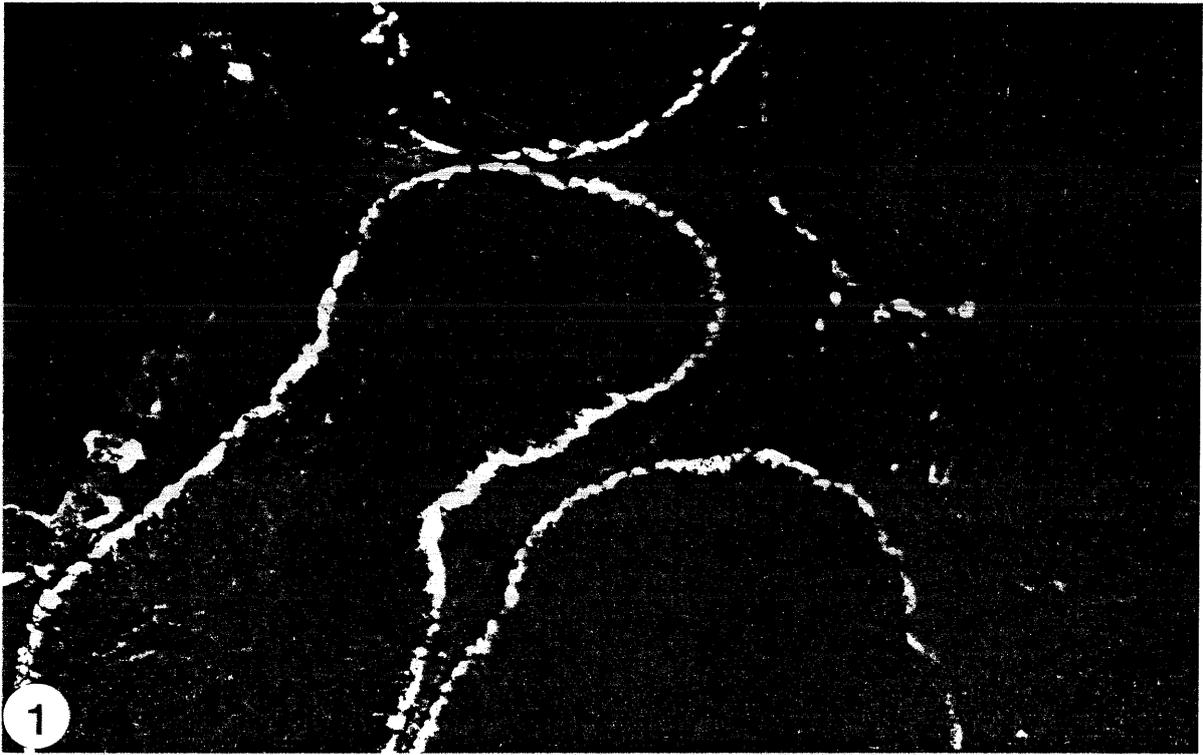


PLANCHE III

PLANCHE IV

Portion d'un tubule hépato-pancréatique de Crabe provenant de l'estuaire de la Loire. Les cellules présentées ici sont de type absorbant, elles montrent un noyau situé soit en position basale (Nb) ou en position moyenne (Nm). La substance fluorescente se trouve en partie en position basale (Fb) et en position apicale (Fa). Deux cellules montrent la présence de met-enk-like dans la totalité de leur cytoplasme, évoquant la possibilité d'un transfert de cette substance de la base vers l'apex des cellules, localisation la plus fréquente dans le cas de ces animaux.

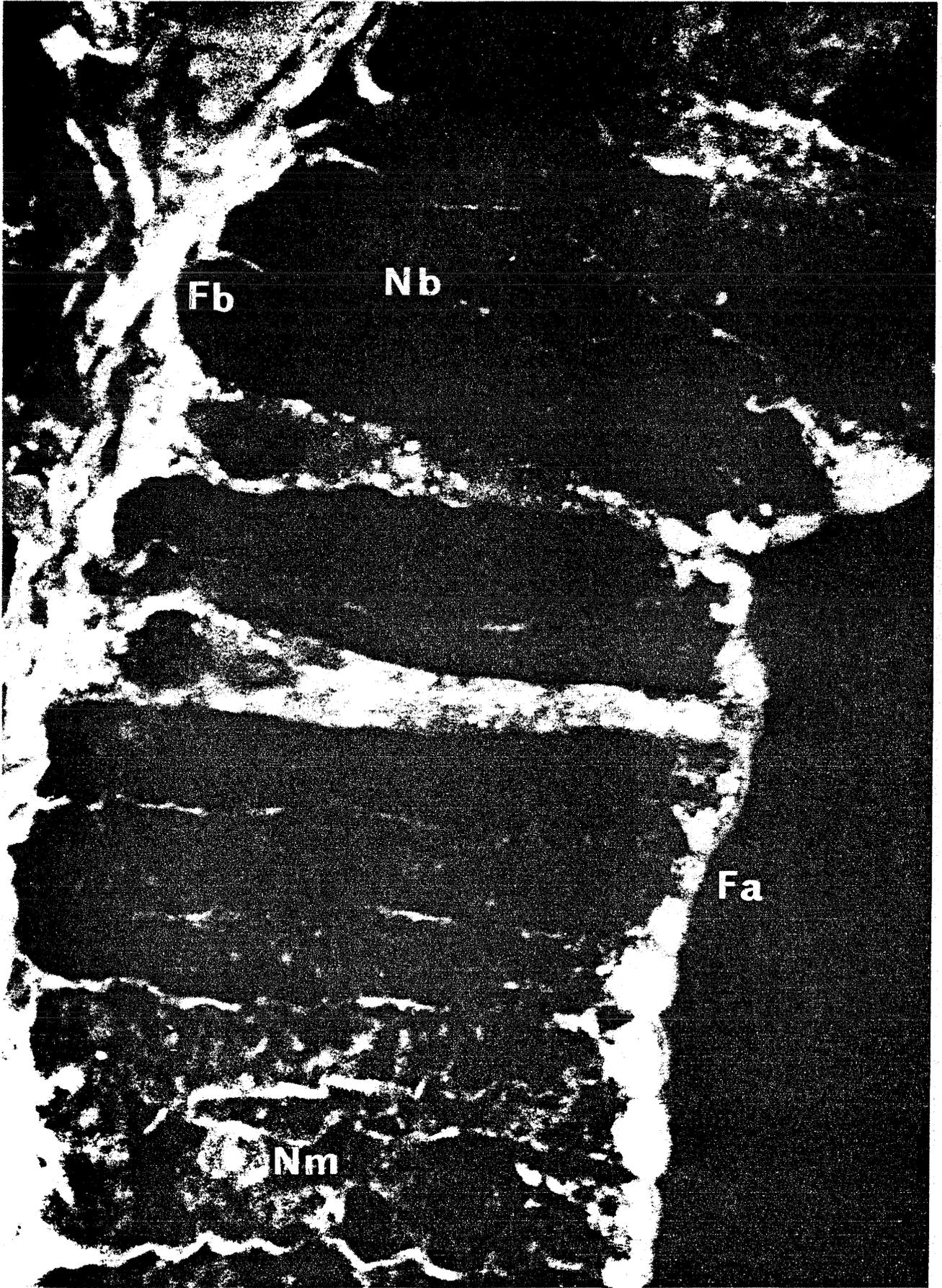


PLANCHE IV

PLANCHE V

Sections de tubules hépato-pancréatiques d'un Crabe traité pendant 2 semaines par le Zn.

Fig. 1 - Localisation apicale de la substance met-enk-like.

Fig. 2 - Dans ce cas la fluorescence apicale (Fa) est très réduite, elle a même disparu à certains niveaux, par contre la fluorescence basale (Fb) se manifeste de façon encore discrète.

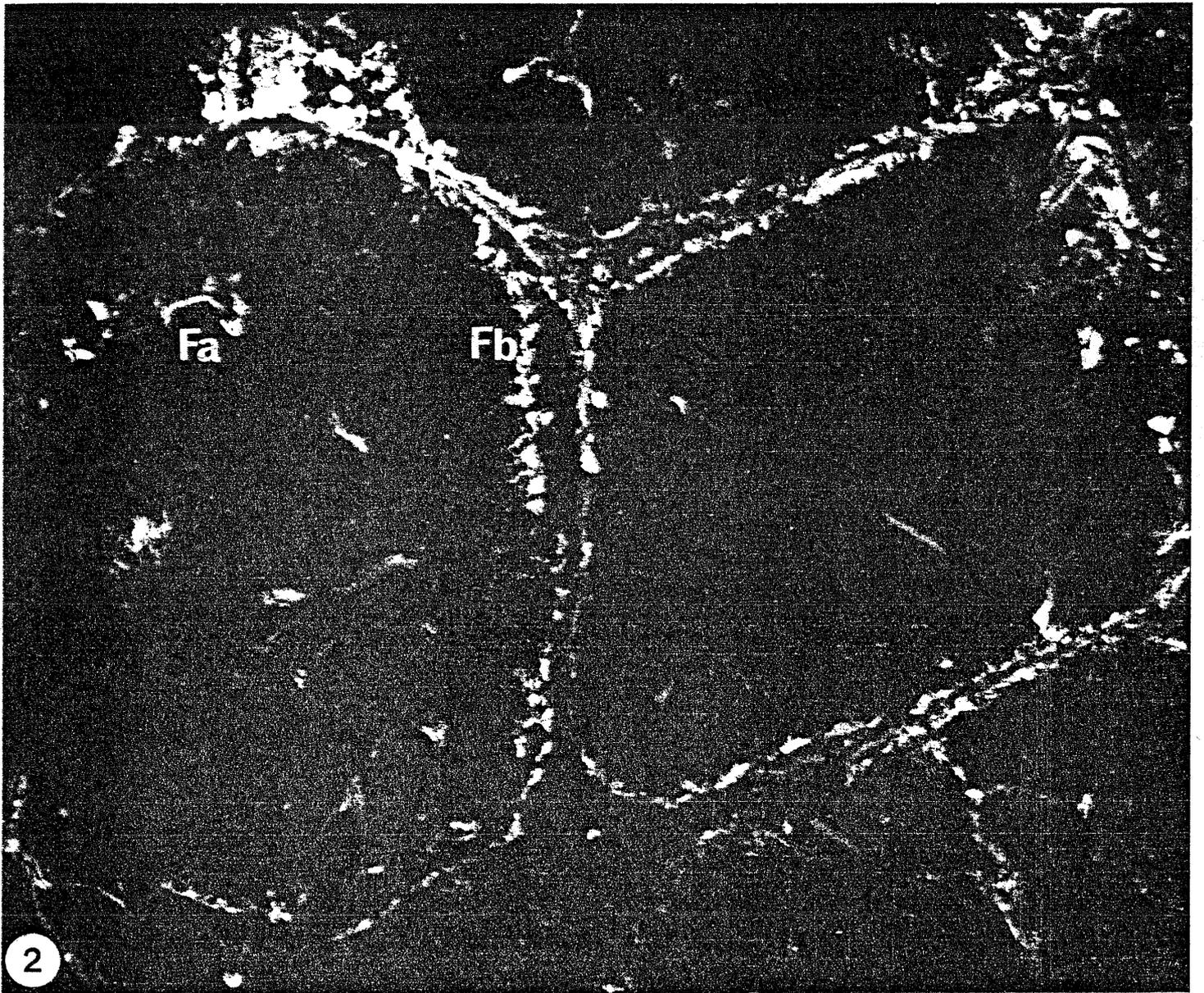
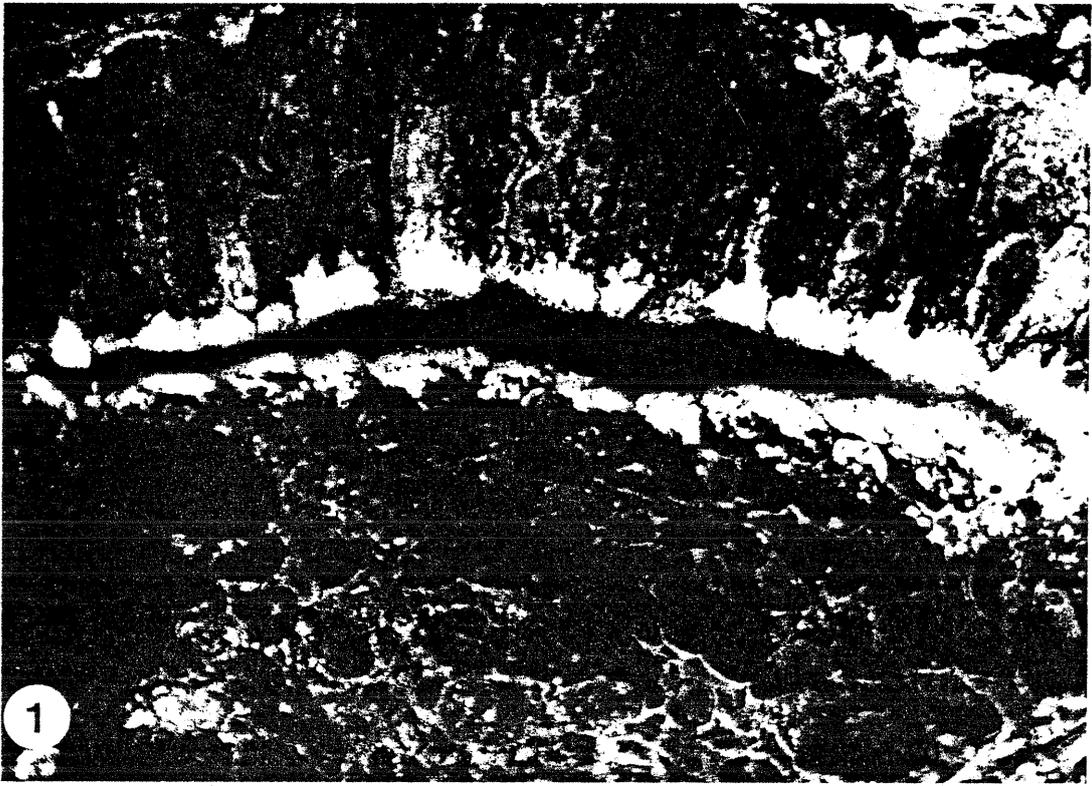


PLANCHE VI

Sections de tubules hépato-pancréatiques de 2 Crabes traités par le Cu pendant 2 semaines. L'anti-corps anti-met-enk s'est surtout fixé dans la zone apicale des cellules.

Fig. 1 - Les cellules sécrétrices caractérisées par leur taille et leur volumineuse vacuole (V) montrent une fluorescence strictement apicale (Fa). Certaines cellules présentent une fluorescence apicale réduite (Fr).

Fig. 2 - Une section de tubule montre des cellules cylindriques hautes à fluorescence apicale importante. Une plage du tubule voisin montre des cellules beaucoup moins hautes à fluorescence apicale réduite (Fr).

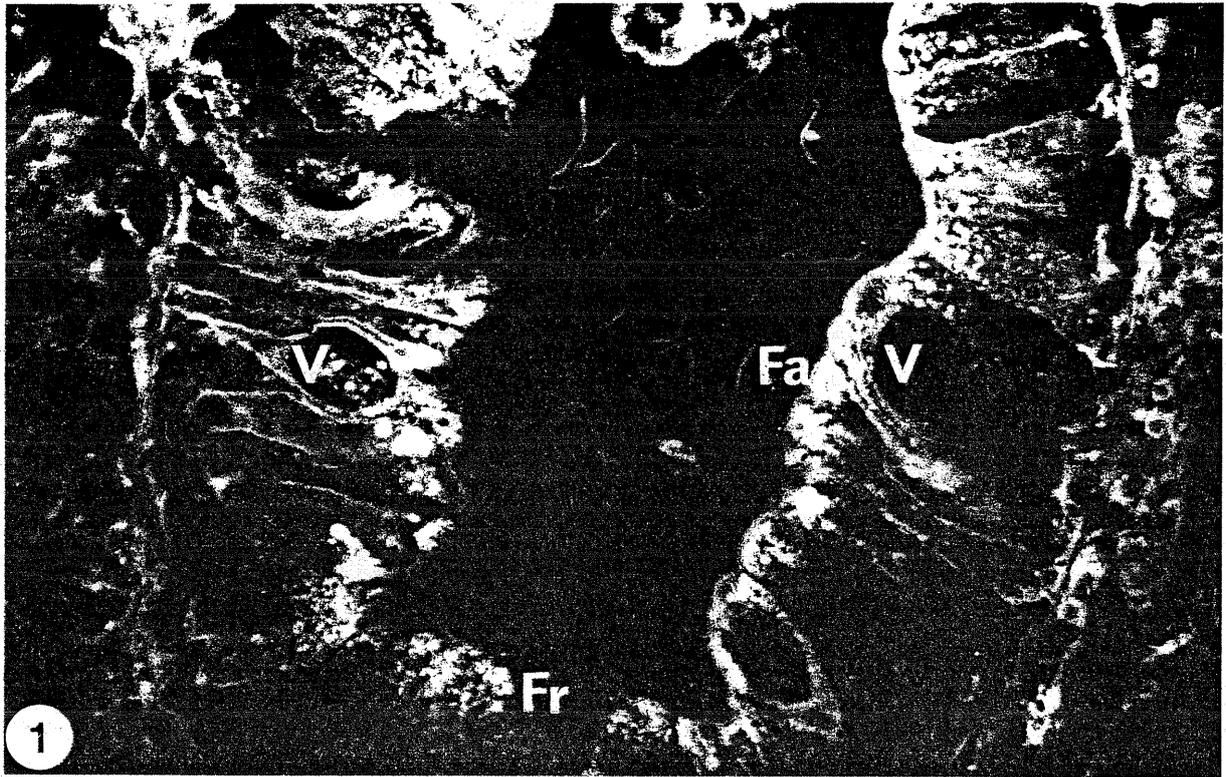


PLANCHE VII

Mise en évidence d'une substance "met-enk-like" dans les tubules hépato-pancréatiques de Crabes traités par le Pb et le Cd.

Fig. 1 - Sections de tubules hépato-pancréatiques d'un Crabe traité par le Pb pendant 2 semaines. La fluorescence est surtout apicale (Fa), elle apparaît très réduite dans certains tubules ou certaines parties de tubules (Fr).

Fig. 2 - Section de tubule hépato-pancréatique d'un Crabe traité par le Cd pendant 2 semaines. La fluorescence apicale (Fa) est peu intense alors qu'une fluorescence basale (Fb) peut-être observée dans cette portion de tubule.



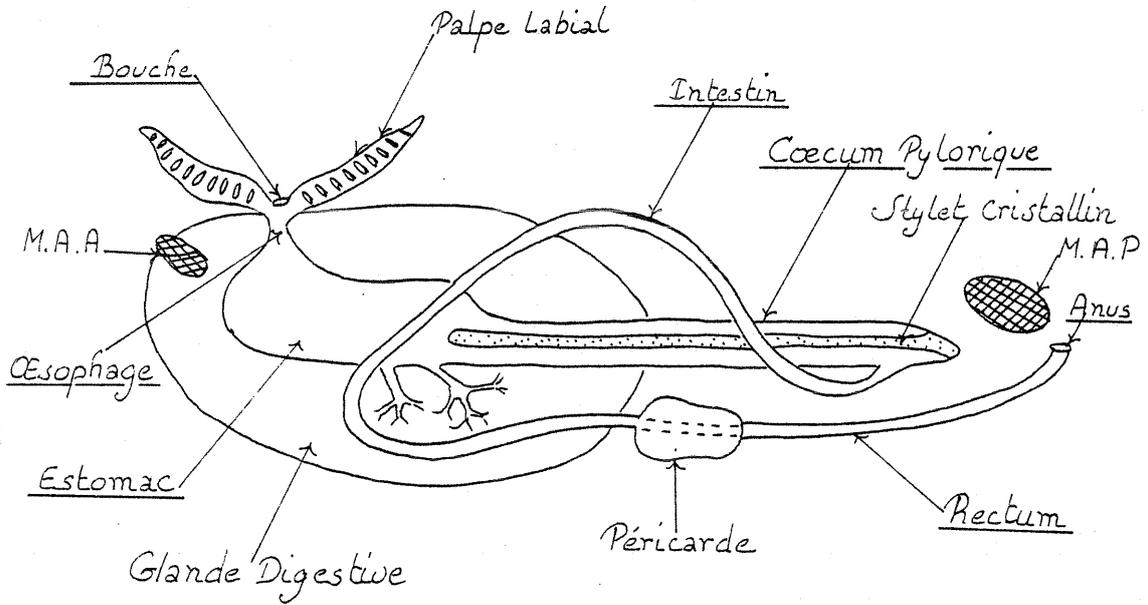
PLANCHE VIII

Fig. 1 - Epithélium de l'estomac de la Moule. Réaction au sérum anti-met-Enképhaline. Les cellules positives de type 1 présentent un corps cellulaire qui renferme le noyau en position moyenne et deux fins prolongements cytoplasmiques, l'un apical atteignant la lumière de l'estomac (L), l'autre la lame basale (L.B.) de l'épithélium (flèche). x 250.

Fig. 2 : Epithélium de l'estomac de la Moule. Réaction au sérum anti-met-Enkephaline. Incidence de coupe favorable pour l'observation d'un prolongement apical (flèche). x 250.

PLANCHE VIII

Représentation schématique du Tube Digestif de la Moule (d'ap Boué & Chanton)



M.A.A. = Muscle Adducteur Antérieur
 M.A.P. = " " " " Postérieur



PLANCHE IX

Fig. 1 - Epithélium de l'estomac de la Moule. Réaction au sérum anti-met-Enképhaline. Cellules immunoréactives de type II dont le corps cellulaire est situé à la base de l'épithélium (flèche). x 250.

Fig. 2 - Estomac de Moule. Réaction au sérum anti-met-Enképhaline. Plage épithéliale d'épaisseur régulière renfermant de nombreuses cellules immuno-réactives et des amas granulaires à fluorescence non spécifique désignés par les flèches. x 100.

Fig. 3 et 4 - Estomac de la Moule. Traitement par un sérum anti-met-Enképhaline saturé par son antigène homologue. Persistance d'une fluorescence non spécifique au niveau d'amas granulaires se présentant soit isolément comme dans le bourrelet de la fig. 3 soit en nappes continues comme dans la plage épithéliale de la fig. 4. x 250.

PLANCHE IX

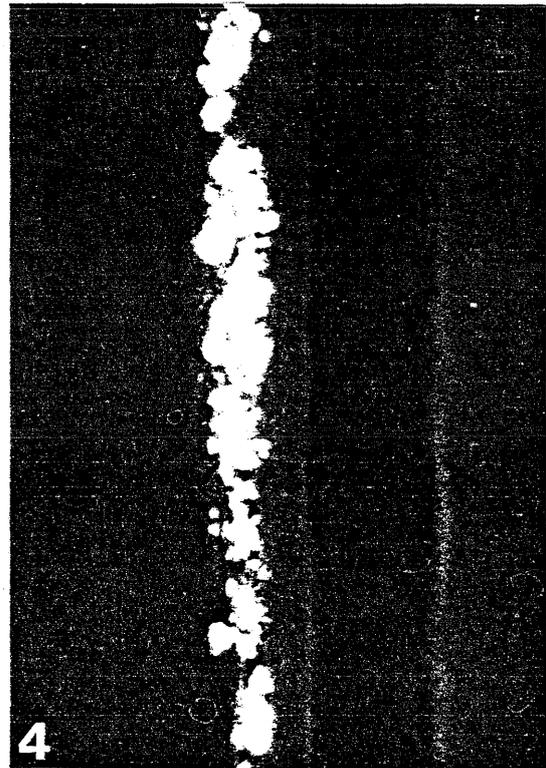
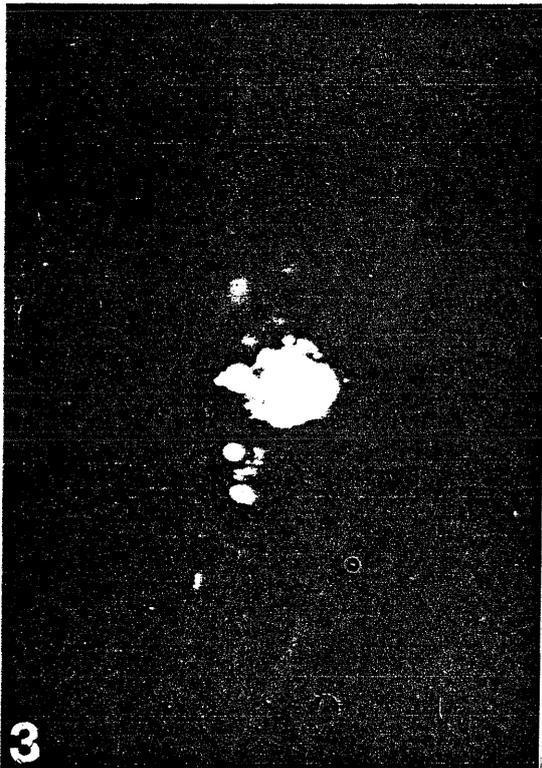
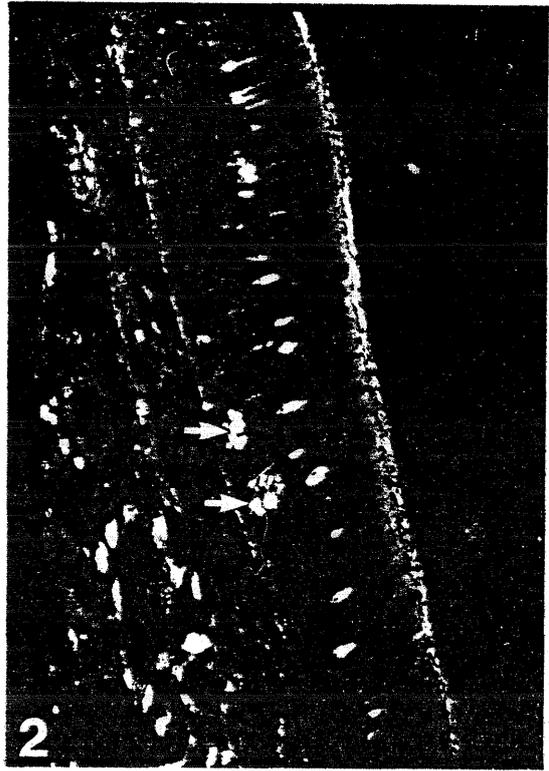
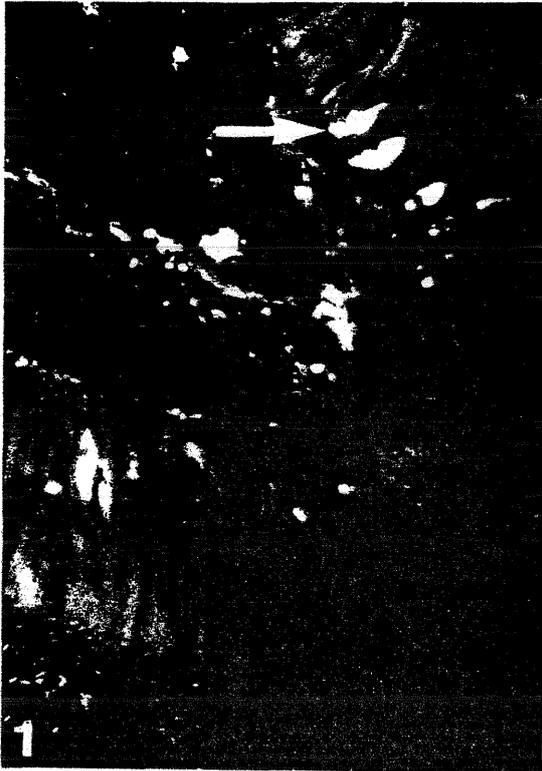
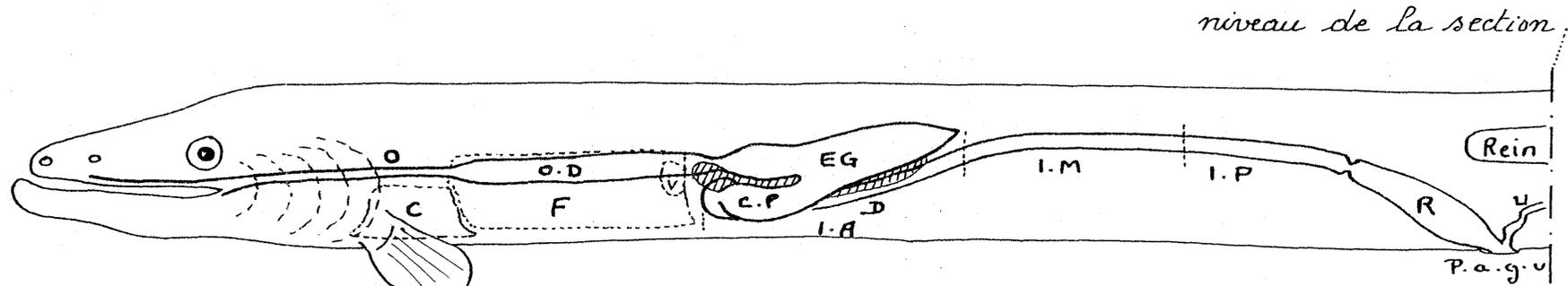
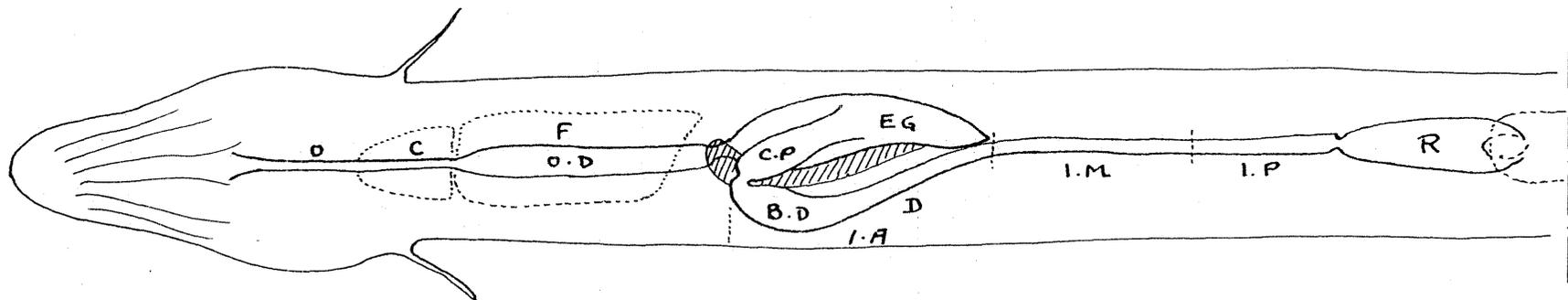


PLANCHE X

Représentation schématique du tube digestif de la Civelle.



Vue de profil



Vue ventrale

- Abréviations : B.D : bulbe duodéna. — C : coeur. — C.P : coecum pylorique. — D : duodenum.
 E.G : Estomac glandulaire. — F : foie. — I.A : intestin antérieur. —
 I.M : intestin moyen. — I.P : intestin postérieur. — O : oesophage. —
 O.D : oesophage dilaté. — P.a.g.u : papille ano-génito-urinaire. —
 R : Rectum. — U : uretère. — V : vésicule biliaire. —
hachuré : pancréas.

PLANCHE XI

- Fig. 1 : Estomac glandulaire de Civelles. Réaction au sérum anti-sérotonine. Présence de cellules localisées entre les cellules à mucus de l'épithélium de surface. Le corps cellulaire est basal et renferme le noyau. La cellule est en relation avec la lumière gastrique par l'intermédiaire d'un fin prolongement cytoplasmique apical (flèche). x 400.
- Fig. 2 : Estomac glandulaire de Civelles. Réaction au sérum anti-sérotonine. Présence de cellules localisées au niveau du col des glandes gastriques. Ces cellules, de forme pyramidale possèdent une base élargie et un apex fin en contact avec la lumière de la glande. x 250.
- Fig. 3 : Pancréas de Civelles. Réaction au sérum anti-glucagon. Réaction positive au niveau de volumineux flots endocrines (corps de Brockmann) et d'îlots de plus petite taille. Les cellules immunoréactives sont nombreuses, situées à la lisière des îlots et plus en profondeur en travées discontinues. x 100.
- Fig. 4 : Pancréas de Civelles. Réaction au sérum anti-somatostatine. Les cellules immunoréactives sont absentes en périphérie des flots, présentes dans la zone centrale, où elles constituent des cordons discontinus. x 250.
- Fig. 5 : Bulbe gastrique (coecum pylorique) de Civelles. Réaction au sérum anti-somatostatine. Les cellules immunoréactives sont nombreuses, le noyau est en général situé au milieu de la cellule qui est en relation avec la lumière et la lame basale par des prolongements cytoplasmiques. x 250.
- Fig. 6 : Intestin moyen de Civelles. Réaction au sérum anti-met-Enképhaline. Les cellules immunoréactives sont régulièrement réparties dans l'épithélium digestif, leur forme est triangulaire, leur base élargie renferme le noyau et la région apicale amincie est en contact avec la lumière de l'intestin. x 250.

PLANCHE XI

