50376 1984 H6

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

5037

Nº d'ordre 1190

THÈSE

Présentée à l'Université des Sciences et Techniques de Lille pour obtenir le grade de Docteur de 3ème Cycle en Biologie et Physiologie Animales Option : Biologie appliquée à l'Environnement

par



EFFETS HISTOPHYSIO PATHOLOGIQUES ET BIOCHIMIQUES DE L'INTOXICATION D'UN VER MARIN (NEREIS DIVERSICOLOR) PAR DEUX MÉTAUX LOURDS (LE CADMIUM ET LE MERCURE)

Soutenue le 10 juillet 1984 devant la Commission d'examen Président : M. PORCHET Rapporteur : N. DHAINAUT-COURTOIS Examinateurs : P. VASSEUR D. DIVE A. DHAINAUT

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
A - Sources de pollution par le cadmium et le mercure	1
l° Le Cadmium	1
2° Le Mercure	1
 B - Effets physiologiques des pollutions par le Cadmium et le Mercure 1° Chez l'Homme 2° Chez d'autres Vertébrés 3° Chez les Invertébrés 	1 1 1 2
a) Le Cadmium	2
b) Le Mercure	2
C - Concentration du Cadmium et du Mercure dans les	
chaînes alimentaires	3
l' Le Cadmium	3
2° Le Mercure	. 3
D - Complexation des métaux lourds chez les animaux	3
MATERIEL ET METHODES	5
I - Matériel biologique	5
II - Méthodes	5
A - Mode d'intoxication	5
B - Etude des effets pathologiques	6
l° Mode opératoire	6
a) Test de l'activité cérébrale	6
+ Régénération	6
+ Culture organotypique	6
b) Effets du Cadmium et du Mercure sur	
différents tissus	6

	Pages
2° Techniques	6
a) Technique de microscopie photonique	7
b) Technique de microscopie électronique	7
C - Appréciation de la résistance du ver	7
D - Devenir du Cadmium et du Mercure dans l'animal	7
E - Etude biochimique	7
l° Evaluation du Cadmium effectivement disponible	
pour le ver	8
a) Dosage du Cadmium dans l'eau de mer	8
b) Evaluation de l'adsorption du Cadmium par	
le verre et le papier	8
c) Pouvoir de fixation du Cadmium par la <i>Nereis</i>	8
2° Protéines fixant le Cadmium	9
a) Techniques préparatives	9
+ Intoxication	9
+ Extraction tissulaire	9
b) Technique analytique	9
+ Les surnageants	9
+ Les culots et les surnageants aliquots	9
F - Formules utilisées pour les différents calculs	11
CHAPITRE I - EFFETS DES DOSES - POURCENTAGE DE MORTALITE	12
I - Appréciation de la résistance du ver au Cadmium et	
au mercure	12
A - Doses utilisées	12
l° Le Cadmium	12
2° Le Mercure	12
B – Toxicité comparée du Cadmium et du Mercure	12
l° Le Cadmium	12
2° Le Mercure	12

. J

P	ages
II - Conclusion - Discussion	13
l° Conclusion	13
2° Discussion	13
CHAPITRE II - CADMIUM DISPONIBLE POUR L'ANIMAL	16
I - Evaluation du Cadmium disponible pour les Nereis	16
A - Quantité de Cadmium adsorbée	16
l° Résultats	16
2° Conclusion	16
B - Quantité de Cadmium absorbée par l'animal	16
l° Résultats	16
2° Conclusion	16
II - Facteur de concentration	17
l° Cadmium dans les eaux de lavage	17
2° Quantité de Cadmium dans les animaux	17
3° Expression du facteur de concentration	17
4° Evaluation du facteur de concentration de la Nereis	17
CHAPITRE III - EFFETS HISTOPATHOLOGIQUES DU CADMIUM ET DU MERCURE	19
I - Tests	19
A - Tests de l'activité cérébrale et évolution des	
produits génitaux mâles	19
l° Effets sur la régénération caudale (étude <i>in vivo</i>)	19
a) Le Cadmium	19
b) Le Mercure	19
c) Conclusion	20

.

rages	s	e	g	а	Ρ	
-------	---	---	---	---	---	--

						-0-
		2°	Efi	fets d	le la maturation des produits génitaux	
			mâ	les :	étude en culture organotypique	20
			a)	Princ	cipe de la culture organotypique	20
			Ъ)	Le Ca	admium	20
				b.1.	Observations des cerveaux au temps t _o de la culture après 4 ou ll jours d'intoxication <i>in vivo</i>	20
				b.2.	Observation des associations en fin de culture (cerveaux de vers intoxiqués <i>in vivo</i> et associés à des parapodes de mâles normaux)	21
				b.3.	Tableaux II et III résumant les résultats obtenus en culture organotypique après in- toxication des cerveaux <i>in vivo</i> par du Cadmium	22
				Ъ.4. Ъ.5.	Diagramme de l'évolution des produits génitaux en fonction de la dose et de de la durée Conclusion	24 24
			c)	Le Me	ercure	25
				c.1.	Observation des cerveaux au temps t _o de la culture après 4 jours d'intoxication <i>in vivo</i>	25
				c.2.	Le tableau IV résume les résultats obtenus en culture organotypique après intoxication des cerveaux <i>in vivo</i> par le Mercure, pen- dant 4 jours	26
				c.3.	Conclusion	26
B	-	Efi	fet	direc	et du Cadmium sur la spermatogenèse	26
		l°	4	jours	d'intoxication	27
		2°	11	jours	s d'intoxication	27
		3°	Tal tau	oleau ux int	V. Evolution <i>in vitro</i> des produits géni- toxiqués <i>in vivo</i>	27
		4°	Coi	nclusi	lon	28
С	 .	Coi	nclu	ision	: Effet du Cadmium sur les cellules neuro-	
		séo	créi gano	trices otypic	s et sur les cellules germinales en culture que	28

D - Discussion

В

28

	Pages
II - Effets du Cadmium et du Mercure sur différents tissus	29
A - Effets sur la chaîne nerveuse	29
l° Le Cadmium	29
2° Le Mercure	30
B - Effet sur l'oeil	30
1° Le Cadmium	30
2° Le Mercure	31
C - Effet sur la néphridie	31
l° Le Cadmium	31
2° Le Mercure	31
D - Effet sur l'intestin	31
l° Présentation de l'épithélium intestinal de	
la Nereis diversicolor	31
2° Effet du Cadmium	32
a) 22 ppm	32
b) 44 ppm	33
c) 55 ppm	33
d) Conclusion	34
3° Effet du Mercure	35
3.1. Effets comparés du Mercure sous forme de	
Méthyl et de chlorure	35
3.2. Effet du Mercure sous forme de chlorure	35
a) 0,36 ppm	35
b) 0,75 ppm	36
4° Discussion	36

•

		Pages
	CHAPITRE IV - PROTEINES COMPLEXANT LE CADMIUM	39
	Introduction	39
	I - Les métallothionéines	39
	A - Historique	39
	B - Répartition	39
	C - Localisation tissulaire des métallothionéines	40
	D - Métabolisme des métallothionéines	40
	l° Métaux induisant leur synthèse	40
,	2° Cinétique d'apparition	40
	3° Synthèse	40
	E - Spectre d'absorption	40
	II - Résultats obtenus chez Nereis diversicolor	40
	A - Le témoin	41
	l° Culot	41
	2° Surnageant	41
	B - Cinétique de fixation du Cadmium pour la dose 22 ppm	41
	l° Répartition du Cadmium après centrifugation de	41
	2° Cadmium au niveau du surnageant	41
	3° Conclusion	42
	C - Cinétique de fixation du Cadmium pour la dose 44 ppm	42
	l' Répartition du Cadmium après centrifugation de l'homogénat	42
	2° Cadmium au niveau du surnageant	43
	3° Conclusion	43

	Pages
D - Cinétique de fixation du Cadmium pour la dose 55 ppm	43
l° Répartition du Cadmium après centrifugation de	
l'homogénat	44
2° Evolution du Cadmium dans le surnageant	44
3° Conclusion	44
E – Récapitulatif sommaire des résultats	44
F - Résultats de l'analyse à la microsonde	44
III - Discussion	45
l° La dose	45
2° La complexation au niveau de protéines de	
gros poids moléculaire	45
3° Les métallothionéines	46
CONCLUSION GENERALE	48

BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

La mer est le réceptacle de nombreux polluants parmi lesquels figurent en bonne place des métaux lourds dont la diffusion est liée aux constante: physico-chimiques du milieu. Dans la biocénose, certains de ces métaux tels que le Cadmium et le Mercure sont à l'origine de phénomènes divers (absorption, fixation, accumulation, et, parfois aussi, relargage) qui peuvent entraîner des processus de toxicité directe ou indirecte intéressant non seulement la flore et la faune marine mais également l'Homme qui en consomme (AUBERT, 1983). Il aura toutefois fallu des catastrophes comme celles de Minamata (de 1953 à 1960), de Niigata (1965) ou de Toyama (1973) pour que l'on prenne enfin conscience de l'importance de telles pollutions.

A - SOURCES DE POLLUTION PAR LE CADMIUM ET LE MERCURE

Les sources en sont nombreuses. Elles peuvent être naturelles (retombées volcaniques, érosion des roches, lessivage des sols riches en gisements miniers) ou avoir une origine anthropogène.

Les installations industrielles diffusent dans l'environnement une série de corps chimiques qui vont, par voie respiratoire ou par voie digestive, s'intégrer aux organismes vivants pour en modifier le comportement et souvent entraîner leur mort.

1° <u>Le Cadmium</u> qui a un faible point de fusion s'évapore lors des manipulations thermiques telles que la fusion ou l'incinération. Le Cadmium s'échappe également des chaudières à charbon. Des dépôts importants sont observés à proximité des fonderies de Zinc, de Plomb ...

2° <u>Le Mercure</u>, surtout sous forme de méthyl-mercure peut provenir des usines fabriquant de l'acétaldéhyde, du plastique, des monomères vinyliques ou encore des fongicides et des herbicides

B - EFFETS PHYSIOLOGIQUES DES POLLUTIONS PAR LE CADMIUM ET LE MERCURE 1° Chez l'Homme

C'est un empoisonnement par le Cadmium qui a été responsable de l'épidémie d'Itaï-Itaï dont ont été victimes les habitants de Toyama au Japon (HASEGAWA, 1973). La maladie s'est manifestée par des troubles osseux, l'accroissement du taux de la phosphatase alcaline dans le sang, la protéinurie et la glucosurie. L'empoisonnement massif par le Mercure a provoqué les catastrophes de Minamata (FUJIKI, 1972) et de Niigata qui ont frappé surtout les pêcheurs. D'autres intoxications humaines à caractères épidermiques ont été signalées en Irak (1956, 1960, 1972) (BAKIR *et al.*, 1973), au Pakistan, au Guatemala (1966), au Nouveau-Mexique (1969) ainsi qu'en Suède (JERNELOV *et al.*, 1975). L'intoxication par le Mercure se manifeste par des troubles neurologiques, le retard mental et des troubles moteurs chez le foetus.

2° <u>Chez d'autres Vertébrés</u>, il a été montré que le Cadmium diminue la fertilité et peut entraîner la stérilité (FOWLER *et al.*, 1982 ; MAINES *et al.*, 1982 ; BARANSKI *et al.*, 1983 ; DWIVERDI, 1983 ; SAKSENA *et al.*, 1983). Il cause en plus l'hypertension (BOEHNE, 1979 ; REVIS *et al.*, 1981 ; TEMPLETON et CHERIAN, 1983) et des malformations embryonnaires (YONEYAMA, 1983). Tandis que le Mercure provoque surtout des lésions au niveau du système nerveux (CHANG, 1983 ; SYVERSEN, 1982).

Il est à noter que les deux métaux sont également connus pour leurs effets néphrotoxiques aussi bien chez l'Homme que chez les autres Vertébrés.

3° Chez les Invertébrés

Certains effets sont communs aux deux métaux alors que d'autres sont plus spécifiques.

a) <u>Le Cadmium</u>. L'intoxication par ce métal provoque chez l'Insecte *Locusta migratoria* des altérations des corps adipeux consistant en une réduction des réserves énergétiques ; le fonctionnement de l'appareil génital femelle est altéré par l'inhibition des synthèses, au niveau du corps jaune (MARTOJA *et al.*, 1983).

Chez le Crabe, le Cadmium cause, dans les cellules de la glande digestive, un accroissement de l'activité golgienne qui se traduit par une nette augmentation du nombre de dictyosomes, des saccules et des vésicules, et l'apparition simultanée de nombreux lysosomes, primaires et secondaires de type phagolysosome, les vacuoles digestives se transforment en d'énormes corps résiduels où sont séquestrées des inclusions denses aux électrons (CHASSARD-BOUCHAUD, 1983).

b) <u>Le Mercure</u>. Certains auteurs (MARTOJA*et al.*, 1983) ont montré qu'une intoxication par le Mercure provoque chez les *Locusta*, mâles ou femelles, une réduction du corps adipeux. Les mâles restent normaux tandis que chez les femelles la dégénérescence des ovocytes est très fréquente ; les cellules folliculaires dégénèrent également.

- 2 -

Chez un Nématode, *Caenorhabditis elegans*, POPHAMAND et WEBSTER (1982) ont observé un certain nombre d'altérations survenant au niveau de l'oesophage et de l'intestin après intoxication par le Cadmium et le Mercure.

C - CONCENTRATION DU CADMIUM ET DU MERCURE DANS LES CHAINES ALIMENTAIRES

1° Le Cadmium

La contamination a été réalisée avec du nitrate $(Cd(NO_3)_2, 4H_20)$ (FERARD *et al.* 1983). Les différents maillons de la chaîne sont successivement une algue chlorophycée (*Chlorella vulgaris*) un Crustacé (*Daphnia magna*) un poisson (*Leucaspius delineatus*). En ce qui concerne les algues, il a été démontré que le facteur de concentration est de 2.200 en moyenne. Les Daphnies nourries avec les algues contaminées présentent un taux de mortalité qui dépend du taux de Cadmium présent dans les algues. Le poisson, après quatre jours d'alimentation contaminée, ne présente par contre aucun signe d'intoxication. Selon les auteurs de l'expérience, ces résultats s'expliquent peut-être par la faible durée d'intoxication.

2° Le Mercure

Les deux premiers maillons utilisés (Chlorella vulgaris et Daphnia magna) sont identiques à ceux de l'expérience précédente. Les troisième et quatrième maillons sont représentés par un poisson (Gambusia affinis) et par un autre poisson, plus grand (Salmo gairdneri).

Les résultats ont montré que *G* .*affinis* concentre beaucoup plus le Mercure que *S.gairdneri*. Selon les auteurs (DELARCHE et RIBEYRE, 1978), le phénomène serait lié à la taille des deux poissons.

D - COMPLEXATION DES METAUX LOURDS CHEZ LES ANIMAUX

Certains Mollusques tels que les murex concentrent un million de fois le Cadmium des eaux de mer qui en sont particulièrement pauvres (MARTOJA et MARTOJA, 1984). Plusieurs questions se posent :

(i) Par quels mécanismes se produit la concentration - non toxique de ces ions métalliques ?

(ii) Sous quelle forme les métaux se trouvent-ils piégés dans la cellule ?

(iii) Est-ce sous la forme de complexes biochimiques ou de concrétions minérales qui englobent ces ions, les neutralisent, et les rendent inoffensifs ?

Dès 1957, MARGOSHES et VALEE avaient identifié à partir du rein du cheval une protéine qui s'associe à beaucoup d'ions métalliques. Plus tard, des études réalisées par des toxicologues permirent d'identifier aussi bien chez les Vertébrés que chez les Invertébrés (MURAKAMI *et al.*, 1983, EVERARD and SWAIN, 1983) ces protéines liant les ions metalliques à des complexes cytoplasmiques solubles de certaines cellules (Voir Chapitre IV).

Les métallothionéines ne représentent pas le seul système de détoxication cellulaire. En 1976, BRYAN a en effet montré qu'après centrifugation d'un homogénat de "reins" de *Peoten maximus*, il est possible d'obtenir un culot contenant la plupart des métaux lourds qui sont accumulés dans des granules intracellulaires. Les concrétions minérales insolubles sont à base de phosphate ou de pyrophosphate de Calcium et Magnésium, mais elles peuvent contenir également d'autres métaux : Manganèse, Baryum, Etain, Plomb etc... Les concrétions sont formées par l'alternance de zones concentriques denses et claires (d'où le nom de sphérocristaux). Ces sphérocristaux existent chez les Protozoaires, (SIMKISS, 1976), chez les Mollusques (CHASSARD-BOUCHAUD, 1981) les Annélides (BOILLY et RICHARD, 1978), chez les Crustacés (CHASSARD-BOUCHAUD, 1982 a et b) et chez les Insectes (MARTOJA *et q1.*, 1983).

L'utilisation de radioisotopes a montré que chez les Invertébrés la plupart des métaux polluants sont incorporés dans les sphérocristaux. L'incorporation se fait rapidement; quelques heures après exposition des animaux il n'y a plus de traces de ces derniers dans l'hémolymphe (sang des Invertébrés) (SIMKISS, 1981, MASON et <u>al</u>, 1982). La même conclusion a été obtenue par l'équipe BALLAN-DUFRANÇAIS (1982) qui a suivi au microscope électronique le processus de bioaccumulation de métaux dans les sphérocristaux de *Pecten maximus* en utilisant une microsonde aux rayons X.

Il est donc bien prouvé que certains métaux lourds tels que le Cadmium et le Mercure peuvent provoquer chez les animaux des troubles très graves qui peuvent même entraîner la mort. Les effets sont d'autant plus dangereux dans les chaînes alimentaires que certaines espèces possèdent des moyens de détoxication (métallothionéines ou sphérocristaux, par exemple) qui leur permettent d'accumuler sans dommage des doses parfois énormes d'ions métalliques.

Ayant travaillé antérieurement sur le système nerveux d'un ver marin (Nereis diversicolor O.F.Müller, Annélide Polychète), espèce euryhaline bien connue par ailleurs par sa grande résistance à la pollution, il nous a paru intéréssant de rechercher chez cet Invertébré les effets du Cadmium et du Mercure lors d'intoxications chroniques ou aiguës.

- 4 -

MATERIEL ET METHODES

I - MATERIEL BIOLOGIQUE

Les Nereis diversicolor O.F. Müller sont des Annélides Polychètes (Nereidae) vivant en grande abondance dans la vase des estuaires. Leur utilisation expérimentale présente divers intérêts. Les Nereis résistent bien à la pollution : il est donc intéressant de rechercher d'éventuels processus de détoxication chez les animaux situés en début de chaîne alimentaire. D'autre part, il est possible de réaliser un test rapide (8 jours environ) des variations de leur activité cérébrale.

Dès 1952, DURCHON avait montré que le cerveau des jeunes vers immatures élabore une substance inhibitrice de la maturation des produits génitaux mâles. Il est ainsi réalisé un "ver miniature" qui peut être maintenu plusieurs semaines sur milieu de culture gélosé.

Si le cerveau est actif, les produits génitaux restent bloqués au stade spermatogonies. Si l'activité des cellules neurosécrétrices a atteint un seuil trop bas, les produits génitaux évoluent en spermatozoïdes.

Les jeunes *Nereis* possèdent aussi la capacité de régénérer la partie caudale. Ce pouvoir de régénération est sous contrôle cérébral. Il est donc également possible de tester l'activité cérébrale en fonction du nombre de métamères régénérés en un temps donné. Ce test est toutefois plus long que le précédent (30 à 40 jours).

Nous avons donc essayé de voir quel est l'effet de susbtances toxiques comme le Cadmium ou le Mercure sur le cerveau *in vivo* (régénération) et surtout *in vitro* (maturation des produits génitaux).

II - METHODES

A - Mode d'intoxication

Les animaux sont intoxiqués par addition de Cadmium sous forme de nitrate $[Cd(NO_3)_2, 4 H_2O]$ à l'eau d'élevage. A titre comparatif, un autre ion bivalent a été utilisé : le Mercure, sous forme méthyl-mercure (CH₃HgCl). Nous l'avons abandonné à cause de son insolubilité et nous l'avons remplacé par le Chlorure mercurique (HgCl₂).

- 5 -

B - Etude des effets pathologiques

1° Mode opératoire

a) Test de l'activité cérébrale

+ Régénération

Cette opération est effectuée, sous la loupe binoculaire, sur des femelles dont le diamètre ovocytaire est inférieur à 80 μ m. Ces animaux sont préalablement anesthésiés par une solution de MS 222 à 2 % dans de l'eau de mer. Ils sont amputés au niveau du 30ème segment. Pendant les 6 premières heures, ils sont placés dans de l'eau de mer normale qui est changée chaque heure pour éliminer les traces de sang dues à la section. Ensuite les *Nereis* sont mises dans l'eau de mer contaminée par le Cadmium ou le Mercure, les témoins étant conservés dans de l'eau de mer normale.

+ Culture organotypique

Des femelles de diamètre ovocytaire inférieur à 80 µm sont intoxiquées pendant 4 jours ou 11 jours par le Cadmium ou pendant 4 jours par le Mercure.

Leur prostomium est prélevé, mis en culture sur un milieu gélosé (mis au point par DURCHON et SCHALLER, 1963) en association avec un parapode provenant de mâle, immature, non intoxiqué.

Des mâles sont intoxiqués par du Cadmium, leurs parapodes sont mis en culture, en absence de prostomium, sur milieu de DURCHON et SCHALLER (1963).

L'évolution des produits génitaux a été suivie en fonction de la dose et de la durée de l'intoxication. Ces deux expériences ont permis de comparer le comportement des cellules nerveuses et des cellules reproductrices en présence de l'élément toxique.

> b) Effets du Cadmium et du Mercure sur différents tissus Pour cette étude, des femelles de diamètre ovocytaire

inférieur à 80 µm, sont mises en élevage dans de l'eau de mer contaminée soit par du Cadmium soit par du Mercure.

Rappelons que pour toutes les séries d'expériences, l'élevage est fait à l'obscurité, à une température de 14°C ± 1°C.

2° <u>Techniques</u>

Pour observer les variations dues à l'absorption de l'élément toxique par la *Nereis*, nous avons eu recours aux techniques de microscopies photonique et électronique.

a) Technique de microscopie photonique

Les pièces sont fixées dans du Bouin aqueux, incluses dans la cytoparaffine (point de fusion 56° C - 58° C), coupées à 7 μ m et colorées par une technique signalétique des neurosécrétions (Fuchsine paraldéhyde - hématoxyline - picroindigocarmin) (GABE, 1954).

b) Technique de microscopie électronique

Les pièces sont fixées pendant 3 heures à 4° C dans le mélange glutaraldéhyde à 6 % dans du tampon phosphate de Sodium 0,4 M (pH 7,2), additionné de 2,5 % de chlorure de sodium. Elles sont ensuite lavées pendant une nuit, à 4° C, dans le même tampon phosphate 0,4 M (1 volume) et du sucrose 0,33 M (3 volumes) ; postfixées, pendant une heure à température ambiante, dans un mélange : tétroxyde d'Osmium 2 %, tampon phosphate 0,4 M (pH 7,2), chlorure de sodium 2,5 %, et enfin deshydratées dans l'acétone. L'inclusion est réalisée dans l'araldite. Les coupes sont effectuées à l'ultrotome L.K.B. Les coupes fines sont contrastées en deux temps : à l'acétate d'Uranyle puis au citrate de plomb (selon REYNOLDS, 1963).

Les observations ont été faites aux microscopes électroniques Siemens ou Jéol 120 CX.

Par ces deux techniques nous avons essayé de suivre les altérations dues aux intoxications par le Cadmium ou par le Mercure au niveau de divers tissus dont le système nerveux, les cellules germinales, le tube digestif et la néphridie.

C - Appréciation de la résistance du ver

Plusieurs lots d'animaux sont intoxiqués par diverses doses de Cadmium ou de Mercure. Les eaux d'élevage sont changées toutes les 24 heures. Le pourcentage de mortalité est calculé en fonction de la durée d'intoxication.

D - Devenir du Cadmium et du Mercure dans l'animal

Des coupes à la paraffine, des coupes à congélation, des semifines et des frottis de coelomocytes sont passés à la microsonde (CAMECA) pour localiser le niveau de fixation du Cadmium et du Mercure.

E - Etude biochimique

Cette étude a été réalisée pour le Cadmium uniquement. Tous les dosages de Cadmium ont été faits par Spectrophotométrie d'Absorption de Flamme (S.A.A.F) (Appareil: Atomic Absorption Spectrophotometer : Perkin-Elmer 238).

- 7 -

La localisation du Cadmium fixé par les animaux a été recherchée par dosage des fractions obtenues après chromatographie sur Gel de Sephadex G.75.

1° Evaluation du Cadmium effectivement disponible pour le ver

Il peut y avoir adsorption de Cadmium par le verre du pot d'élevage et par le papier filtre ; en plus, l'eau de mer est susceptible d'apporter une quantité initiale de Cadmium, indépendante de nos expériences. Ces facteurs pourraient donc modifier la quantité de Cadmium disponible pour les vers lors d'une intoxication. Nous avons essayé de les évaluer.

> a) Dosage du Cadmium dans l'eau de mer Ce dosage se fait par analyse d'échantillons d'eau de

mer provenant de la Station Marine de Wimereux.

b) Evaluation de l'adsorption du Cadmium par le verre et le papier

Pour ce test nous avons choisi la dose moyenne de 44 ppm de Cadmium. Trois cents millilitres de cette solutionsont misdans un pot d'élevage contenant du papier filtre. Dans ces conditions (en absence des animaux) il est évident que la diminution de la quantité de Cadmium de la solution est due à l'adsorption de ce dernier, c'est-à-dire sa fixation sur le verre et le papier filtre. Après avoir séjourné pendant 4 jours dans le pot d'élevage, la solution est dosée en S.A.A.F. pour déterminer la nouvelle quantité de Cadmium.

c) Pouvoir de fixation du Cadmium par la Nereis

Six animaux (de diamètre ovocytaire 80 µm - 130 µm) sont mis par pot d'élevage contenant trois cents millilitres de solution d'eau de mer à 44 ppm de Cadmium. Après 4 jours d'intoxication, les animaux sont lavés, pendant 24 heures, dans de l'eau de mer, pour éliminer les surcharges non spécifiques en Cadmium. Le dosage de ce dernier en S.A.A.F. se fait : - dans l'homogénat total des animaux qui est minéralisé et qui a subi l'attaque acide. Ce dosage permet d'évaluer l'absorption du Cadmium par les animaux.

- dans l'eau de lavage, pour évaluer l'élimination de l'élément après 24 heures de lavage.
- dans l'eau d'élevage pour déterminer la quantité de Cadmium non utilisée par les animaux après les 4 jours d'intoxication.

- 8 -

2° Protéines fixant le Cadmium

a) Techniques préparatives (BOUQUEGNEAU et MARTOJA, 1982)
 + Intoxication

Six animaux sont groupés dans un pot contenant de l'eau de mer à O ppm (témoins), 22 ppm, 44 ppm et 55 ppm de Cadmium. Les vers sont intoxiqués pendant 7, 19, 24 heures, quatre jours ou onze jours. L'intoxication est arrêtée par lavage dans l'eau de mer naturelle pendant vingt-quatre heures.

+ Extraction tissulaire

Les animaux sont pesés, homogénéisés avec un homogénéiseur en téflon dans deux volumes de tampon [bicarbonate d'ammonium (NH₄ HCO₃) 0,1 M à pH 7,4].

- Les homogénats sont centrifugés à 20 000 g/20 mn à 4° C. Les surnageants sont mis à part. Les culots sont homogénéisés comme ci-dessus, centrifugés à 20 000 g/20 mn à 4° C.
- Les culots et les surnageants sont lyophilisés.

b) Technique analytique

+ Les surnageants

Ils sont repris dans un volume déterminé du même tampon. Une fraction aliquote est gardée pour le dosage du Cadmium du surgageant total. Elle sera traitée comme le culot. Le reste est injecté à une colonne de gel Séphadex G_75 (2,1 cm/100 cm). L'élution se fait avec du tampon bicarbonate d'ammonium (0,1 M à pH 7,4). La colonne est reliée à un spectrophotomètre enregistreur. L'absorbance de l'éluat est mesurée à 254 nm et 280 nm.

Des fractions de 6 ml sont recueillies et passées en S.A.A.F. pour le dosage du Cadmium.

+ Les culots et les surnageants aliquots

Ils sont minéralisés pendant 12 heures à l'étuve à 110° C. Ils subissent une digestion acide à l'<u>eau régale</u> : 2 ml d'un mélange d'acide chlorhydrique et d'acide nitrique par gramme de poids frais de tissus. Cette attaque se fait au bain-marie à 60°C pendant 24 heures.

Pour chaque échantillon, un essai blanc est préparé uniquement avec de l'eau régale (sans animaux) ce qui permet de quantifier l'apport de Cadmium dû à l'expérimentation.

Tous les échantillons sont filtrés, dilués dans de l'eau bidistillée et passés en S.A.A.F. pour doser le Cadmium. Les différentes étapes expérimentales sont résumées dans le tableau I.

Etapes de l'extraction tissulaire et du dosage du Cadmium Intoxication des animaux Lavage pendant 2 heures Homogénéisation dans 2 volumes de tampon bicarbonate d'ammonium (0,1 M; pH 7,4) Centrifugation à 20 000 g/20 mn/4°C Culot Surnageant 1 Homogénéisation (dans 2 volumes de tampon) Centrifugation : 20 000 g/20 mn/4°C Culot Surnageant 2 Surnageant 1 + Surnageant 2 Lyophilisation et dilution dans Lyophilisation le tampon bicarbonate d'ammonium Surnageant Surnageant aliquot chromatographie Culot et surnageant aliquot Elution sur colonne de gel Séphadex G 75 Minéralisation (12 h à l'étuve 110° C) Absorbance à 254 nm et 280 nm Attaque à l'eau régale (24 h au bain-marie 60°C) Dosage du Cadmium dans les fractions en S.A.A.F. Dosage du Cadmium en S.A.A.F.

1° <u>Correction des pertes de poids après homogénéisation</u> Poids initial des animaux : P_o Poids des animaux + 2 volumes de tampon : P₁ Poids des animaux + 2 volumes de tampon après homogénéisation : P₃ Poids de tissus = $\frac{P_0 \times P_3}{P_1}$ en grammes de poids frais.

2° <u>Correction des pertes de poids après lyophilisation</u> Poids de tissu dans le culot lyophilisé : P₄ Poids de tissu dans le surnageant lyophilisé : P₅

$$P_4 = \frac{P_0 \times Poids \ du \ culot \ lyophilisé}{P_1}$$
 en grammes de poids sec

$$P_5 = \frac{P_0 \times Poids \ du \ surnageant \ lyophilisé}{P_1} \qquad en \ grammes \ de poids \ sec$$

3° <u>Poids de tissu total : P6</u>

 $P_6 = P_4 + P_5$ en grammes de poids sec.

4° <u>Quantité de Cadmium dans le culot</u>

k ppm représente la valeur de la lecture en S.A.A.F.

5° Quantité de Cadmium dans le surnageant aliquot

<u>k ppm x surnageant total x volume de dilution de surnageant aliquot</u> : surnageant aliquot x P₆

en µg de Cadmium par gramme de poids sec de tissus de départ.

6° Quantité de Cadmium dans les fractions de l'éluat

<u>k ppm x surnageant total x volume des fractions</u> Surnageant (injecté dans la colonne) x P₆ :

en µg de Cadmium par gramme de poids sec de tissus de départ

CHAPITRE I

EFFETS DES DOSES

POURCENTAGES DE MORTALITE

I - APPRECIATION DE LA RESISTANCE DU VER AU CADMIUM ET AU MERCURE

A - Doses utilisées

l° <u>Le Cadmium</u>. Il est utilisé sous forme de nitrate. Les doses testées sont O ppm, 1,1 ppm, 22 ppm, 33 ppm, 44 ppm, 55 ppm, 66 ppm, 76 ppm et 87 ppm.

2° <u>Le Mercure</u> est utilisé sous forme de chlorure à des doses très faibles : O ppm, 0,035 ppm, 0,075 ppm, 0,18 ppm, 0,36 ppm, 0,75 ppm et 3,65 ppm.

Dans le cas des deux produits 12 animaux sont intoxiqués pour chaque dose.

B - Toxicité comparée du Cadmium et du Mercure

1° Le Cadmium (fig. 1)

Nous avons constaté l'existence d'un temps de latence, qui est d'autant plus grand que la dose est plus faible. Pendant ce temps, les *Nereis* ne présentent aucun signe d'intoxication. les premières manifestations qui marquent le début de la sensibilisation des animaux, sont d'abord une spiralisation du tiers postérieur, et une nage très active.

L'intoxication est de plus en plus marquée. Le tonus de la partie postérieure de l'animal diminue. Son irrigation sanguine ne se fait plus. Une décomposition postéro-antérieure est alors observée. La partie antérieure de l'animal continue à vivre apparemment normalement tout en entraînant la partie altérée. Quand la décomposition atteint la région céphalique, l'animal succombe dans les 24 heures suivantes. Notons que de telles manifestations n'ont été observées que pour des doses supérieures à 44 ppm.

2° <u>Le Mercure</u> (fig. 2)

Dans ce cas également, le temps de latence dépend de la dose. L'intoxication se manifeste par l'élargissement de la région antérieure du corps qui devient très rigide et se dresse. La contraction est maintenue





jusqu'à la mort de l'animal. Des hématomes sont observés à la base des parapodes. Par endroits, la cuticule se sépare de l'épiderme et forme une enveloppe transparente.

Une hémorragie intense vide le corps des animaux de leur sang. Ils meurent dans les heures qui suivent.

II - CONCLUSION - DISCUSSION

1° Conclusion

Les observations macroscopiques et la comparaison des courbes de mortalité par le Cadmium et le Mercure nous permettent de penser que *Nereis diversicolor* ne répond pas de la même façon à ces deux ions bivalents.

Elle est plus sensible au Mercure qu'au Cadmium. En effet, elle répond plus facilement, c'est-à-dire de façon plus rapide et à des doses plus faibles de Mercure que de Cadmium.

Elle supporte des doses très fortes de Cadmium par rapport aux doses utilisées chez d'autres animaux. Nous citons en exemple un Nématode marin *Enoplus brevis* Bastian (HOWELL et SMITH, 1983).

2° <u>Discussio</u>n

La toxicité aiguë, c'est-à-dire à court terme, est généralement exprimée par concentration, ou par dose léthale (CL 50 ou DL 50). Cette valeur représente, pour une durée (habituellement de 48 ou 96 heures) et dans des conditions expérimentales spécifiées, la concentration ou la dose de la substance capable de tuer 50 % des individus d'une espèce donnée.

Pour le Cadmium, la DL 50 varie beaucoup selon l'espèce considérée. De nombreuses espèces d'Invertébrés sont rapidement tuées pour des doses inférieures à 1 ppm. En général les organismes dulçaquicoles sont plus sensibles au Cadmium que les organismes marins. Cependant des exceptions peuvent être observées. Pour l'éventail de concentrations que nous avons essayées (1,1 ppm, 22 ppm, 33 ppm, 44 ppm, 55 ppm, 66 ppm, 76 ppm et 87 ppm), la deuxième est déjà très forte. Il faut toutefois noter que le Vibrio marin (Protozoaire) supporte jusqu'à 200 ppm de Cadmium, il est d'ailleurs pour celà considéré comme souche peu sensible (GAUTHIER et FLATAN, 1977). Pour l'huître, la dose est de 5 à 20 ppm (SIEWICKI *et al.*, 1983), alors que pour *Enoplus brevis* Bastian elle est de 1 ppm (HOWEL et SMITH, 1983). Il nous paraît important de signaler que l'Insecte d'eau douce *Eusthenia spectabilis* est considéré comme très résistant, en effet sa DL 50 pour 14 jours est de 204 ppm (EVERARD et SWAIN, 1983). Dans tous les cas cités ci-dessus, le Cadmium a été donné sous forme de chlorure, or dans nos expériences il a été introduit sous forme de nitrate. Ceci a une très grande importance car les nitrates sont considérés comme l'une des formes les moins toxiques de Cadmium.

Les différentes formes sont classées selon leur DL 50, comme suit :

Cyanure de Cadmium	DL 50	16 ppm
Chlorure de Cadmium	DL 50	88 ppm
Acétate de Cadmium	DL 50	222 ppm
Sulfate de Cadmium	DL 50	333 ppm
Nitrate de Cadmium	DL 50	357 ppm
Carbonate de Cadmium	DL 50	397 ppm
Sulfure de Cadmium	DL 50 >	5 000 ppm

Cette étude a été faite chez le Rat par BRENNER (1978). Donc la forme chimique que nous avons utilisée est peut-être l'une des raisons pour lesquelles *Nereis diversicolor* supporte de fortes concentrations de Cadmium.

En ce qui concerne le Mercure, les signes macroscopiques d'intoxication apparaissent à des doses faibles et proches de celles citées chez d'autres animaux comme le Nématode *Coenorhabditis elegans* (1,4 x 10^{-4} M) (POPHAM et WEBSTER, 1982).

Par comparaison de nos résultats obtenus avec le Cadmium et le Mercure il est possible de penser que: soit *Nereis diversicolor* est plus sensible au Mercure qu'au Cadmium, soit le Mercure est plus toxique.

Cette différence de comportement vis-à-vis des deux toxiques a été signalée chez d'autres animaux comme l'Anguille (NOËL-LAMBOT et BOUQUEGNEAU, 1977). Dans ce cas la différence de toxicité a été expliquée par le fait que les deux métaux sont distribués de façons différentes. Dans les deux cas, le maximum de concentration est atteint dans les reins. Après viennent le tractus digestif et le foie pour le Cadmium, les branchies et le foie pour le Mercure.

Le Cadmium est donc contenu essentiellement dans les viscères, alors que le Mercure est dans les muscles. L'effet plus toxique du Mercure pour l'Anguille a été expliqué par la différence de facteur de concentration, et a été lié à une plus faible perméabilité au Cadmium qu'au Mercure au niveau de leur chemin de capture. En effet les branchies, principal site d'absorption de Mercure, sont moins perméables au Cadmium.

Or, dans le cas de *Nereis diversicolor*, c'est la région antérieure qui répond pour le Mercure, et la région postérieure pour le Cadmium. Le Mercure agit peut-être sur les muscles de la région de la trompe en provoquant leur contraction. Et le Cadmium agit sur les tissus néoformés dans la région postérieure moins sensible à l'influence cérébrale.

Nous pensons que si *Nereis diversicolor* supporte des doses fortes de Cadmium, c'est qu'il y a plusieurs facteurs qui peuvent agir indépendemment ou simultanément :

- l'absence de l'absorption de Cadmium à cause d'une barrière biologique. Mais cette hypothèse est à rejeter car il y a mortalité à partir d'une certaine durée pour les différentes doses. La variation de pH est très faible d'une dose à l'autre et ne peut être la cause de la mortalité.
- Quand on intoxique les animaux, est-ce que tout le Cadmium leur est disponible ou bien y-a-t-il absorption par le matériel d'élevage ?
- Y-a-t-il un moyen d'élimination important ? ou bien *Nereis diversicolor* limite-t-elle les dégâts en limitant l'absorption?
- Quel est alors le pouvoir d'absorption de la Nereis ?
- Est-ce qu'elle possède, comme plusieurs autres animaux, la capacité de synthétiser des protéines qui complexent le Cadmium, le rendant ainsi moins toxique ?
- Ou bien possède-t-elle le moyen de piéger les métaux dans des sphérocristaux ?

Nous avons essayé d'éclaircir ces points dans les chapitres qui suivent.

CHAPITRE II

•

.

CADMIUM DISPONIBLE POUR L'ANIMAL

I - EVALUATION DU CADMIUM DISPONIBLE POUR LES NEREIS

A - Quantité de Cadmium adsorbée

1° Résultats

Le Cadmium est dosé dans la solution d'eau de mer, à 44 ppm et ayant séjourné pendant 4 jours dans un pot d'élevage contenant du papier filtre de dimension fixe. L'analyse de cette solution a donné une valeur de 24,4 ppm de Cadmium. C'est-à-dire qu'au bout de 4 jours, en absence d'animaux, la dose est passée de <u>44 ppm</u> à <u>24,4 ppm</u>. La quantité de Cadmium adsorbée est donnée par la différence entre la dose initiale et la dose après 4 jours : 44 ppm - 24,4 ppm = 19,6 ppm.

2° Conclusion

Tout ce qu'on donne à l'animal ne lui est pas disponible. Une fraction est adsorbée par le verre et le papier filtre. Cette valeur représente 44,54 % de la quantité totale (initiale). La *Nereis* ne dispose donc que des 55,45 % de la dose initiale.

B - Quantité de Cadmium absorbée par l'animal

1° Résultats

Quatre *Nereis* sont mises en élevage pendant 4 jours dans une solution de 44 ppm. L'analyse des eaux d'élevage a donné la valeur : 21,65 ppm.

Donc, sur les 24,4 ppm disponibles (voir ci-dessus) une quantité a été absorbée et il reste 21,65 ppm. Cette quantité est égale à 2,75 ppm (24,4 ppm - 21,65 ppm). Cette valeur représente 6,25 % de la dose initiale (44 ppm).

2° Conclusion

Quand nous intoxiquons des *Nereis* à la dose de 44 ppm pendant 4 jours, nous devons nous attendre à ce que 44,54 % soient adsorbés, et que 55,45 % soient effectivement disponibles. Sur les 55,45 %, 6,25 % sont absorbés par les animaux. Si Nereis diversicolor supporte des quantités énormes de Cadmium c'est donc grâce à 2 phénomènes importants :

- une fraction assez élevée est absorbée, et seule la moitié (environ) de la dose initiale est effectivement disponible.
- Sur ce qui est donné, la *Nereis* ne prélève que 6,25 %. L'absorption limitée de l'élément toxique semble un caractère adaptatif de la *Nereis* qui vit dans des zones très polluées.

Nous pensons que la capacité d'absorption du Cadmium par les animaux dépend de la dose et de la durée d'intoxication.

II - FACTEUR DE CONCENTRATION

1° Cadmium dans les eaux de lavage

Les animaux avant le dosage sont lavés pendant 24 heures dans de l'eau de mer normale.

L'analyse de l'eau de lavage a donné la valeur <u>0,02 ppm</u>, exactement la même quantité dans l'eau de mer provenant de la Station Marine de Wimereux. Cette valeur est à la limite de la sensibilité de l'appareil. Il est permis alors de penser que l'animal n'élimine aucune fraction du Cadmium absorbé, pendant les 24 heures de lavage.

2° Quantité de Cadmium dans les animaux

Le dosage de l'homogénat total des animaux donne une valeur

de <u>42,42 ppm</u>.

3° <u>Expression du facteur de concentration</u> Ce facteur est défini comme étant le rapport :

Quantité de métal dans les animaux (1) Quantité de métal dans l'eau d'élevage (2)

(1) Valeur exprimée en µg de Cadmium par gramme de poids frais d'animaux.
(2) Valeur exprimée en µg de Cadmium par millilitre de milieu d'élevage.

4° Evaluation du facteur de concentration de la Nereis

Les résultats précédents montrent que sur les 44 ppm données 6,25 % seulement sont absorbés. Nous pensons donc que ce facteur doit intervenir dans le calcul du facteur de concentration qui devient alors :

- 17 -

Quantité de métal dans les animaux

Quantité de métal dans les eaux d'élevage x pourcentage d'absorption

Le dosage des animaux intoxiqués à la dose 44 ppm, et n'absorbant que 6,25 % du Cadmium initial donne une valeur de 42,42 ppm. Le facteur de concentration calculé est alors de 15,4.

Nous avons ensuite procédé à une vérification de l'efficacité de la méthode d'extraction du Cadmium (cf. Matériel et méthodes).

Les résultats ci-dessus nous montrent que *Nereis diversi*color absorbe (pour une intoxication de 4 jours à la dose de 44 ppm) 2,75 ppm. Le facteur de concentration étant de 15,42 nous devons nous attendre à trouver lors de l'analyse des animaux la quantité de : 1,75 x 15,42 = 42,405 ppm. Or nous avons trouvé 42,42 ppm. La différence est probablement due aux erreurs de calculs. Nous pouvons conclure que la méthode d'extraction choisie est très efficace.

CHAPITRE III

EFFETS HISTOPATHOLOGIQUES DU CADMIUM ET DU MERCURE

Ces effets ont été recherchés sur tous les tissus de la *Nereis* mais surtout sur le système nerveux central, les produits génitaux mâles et l'intestin. La néphrotoxicité du Cadmium et du Mercure étant bien connue chez tous les Mammifères étudiés et chez les Poissons (MARTOJA *et al.*, 1982) nous avons également étudié la néphridie.

I - TESTS

A - Tests de l'activité cérébrale et évolution des produits génitaux mâles

1° Effet sur la régénération caudale (Etude in vivo)

L'expérience doit avoir une durée minimale d'une quarantaine de jours.

a) Le Cadmium

Les animaux sont amputés au 30ème segment. Les doses utilisées sont 22 ppm, 30 ppm et 33 ppm. Pour les doses 44 ppm et 55 ppm nous n'avons pu maintenir les vers en élevage pendant plus de deux semaines.

Nous avons constaté que toutes les étapes de la régénération se font normalement par comparaison aux témoins (DENNAÏ, 1982). Dans tous les cas on arrive à la formation d'un régénérat de 7 à 13 segments, présentant un tube digestif et une chaîne nerveuse néoformés complets, morphologiquement normaux. Cette évolution est obtenue après 32 jours.

Nous avons donc conclu qu'*in vivo*, pour les doses et la durée de nos expériences, le Cadmium ne bloque pas l'activité cérébrale ; les divisions mitotiques conduisant à la formation du régénérat se font normalement.

b) Le Mercure

Dans le deuxième cas d'intoxication, les doses utilisées sont 0,025 ppm et 0,036 ppm. Comme pour le Cadmium, après 32 jours de traitement les animaux régénèrent normalement 7 à 13 segments. Le tube digestif et la chaîne néoformés apparaissent (en microscopie photonique) normaux. Nous pouvons donc tirer la même conclusion que pour le Cadmium.

- 19 -

c) Conclusion

Pour les deux métaux les doses utilisées sont faibles. Des doses plus élevées ne sont pas supportées par les animaux qui ont subi un premier traumatisme (l'amputation).

Il semble donc que, dans le cas de nos expériences, ni le Cadmium ni le Mercure n'affectent l'activité cérébrale qui stimule la régénération. Les mitoses de néoformation se déroulent apparemment normalement.

2° Effets sur la maturation des produits génitaux mâles : Etude en culture organotypique

Les prostomiums proviennent de femelles intoxiquées pendant 4 jours ou 11 jours par du Cadmium (à 22 ppm ; 44 ppm ; 55 ppm) et pendant 4 jours par du Mercure (à 0,075 ppm ; 0,18 ppm ; 0,36 ppm et 0,75 ppm). Ils sont associés à un parapode provenant d'un mâle immature, non intoxiqué et mis en culture normale.

a) Principe de la culture organotypique

Il est établi depuis longtemps que chez Nereis diversicolor le cerveau stimule la régénération et bloque l'ovogenèse et la spermatogenèse chez les jeunes vers. Or il a été démontré tant in vivo qu'in vitro, qu'en milieu anhormonal, c'est-à-dire en absence du cerveau, cette inhibition est levée. Ainsi en culture organotypique à 20°C, on peut observer rapidement la spermatogenèse, c'est-à-dire l'évolution des spermatogonies en spermatozoïdes au bout de 5 à 6 jours (Pl. I, fig. A). Ceci bien sûr dans le cas d'un parapode isolé qu'on appellera pour la suite des observations parapode témoin. L'association témoin est constituée par un cerveau non intoxiqué et un parapode. Cette association cicatrise avant 24 heures. La circulation sanguine est établie, le facteur peptidique d'origine cérébrale arrive jusqu'aux spermatogonies qui seront mainnues sous cet état pendant toute la durée de la culture (Pl. I, fig. B).

C'est d'après le degré d'évolution des produits génitaux que l'on peut contrôler l'activité cérébrale dans le cas des associations cerveaux traités - parapodes normaux.

b) Le Cadmium

b.1. Observations des cerveaux au temps t_o de la culture après 4 ou 11 jours d'intoxication *in vivo*22 ppm -

Les cerveaux traités pendant 4 jours (Pl. VI, fig. A) ou ll jours, sont comme les témoins. Les corps pédonculés se présentent sous forme d'un champignon constitué de cellules contigués. La capsule adhère bien au cerveau.

- 44 ppm -

L'intoxication ne provoque pas de modification ni au bout de 4 jours, ni au bout de 11 jours (Pl. VI, fig. B).

- 55 ppm -

Au bout de 4 jours (P1. VI, fig. C), les corps pédonculés ont une apparence normale, mais des cellules neurosécrétrices fuchsinophiles sont vacuolisées et l'épiderme est désorganisé par endroit. Après 11 jours (P1. VI, fig. D), les cellules des corps pédonculés sont complètement dissociées, l'épiderme peut disparaître et la cuticule est alors détachée du prostomium.

> b.2. Observation des associations en fin de culture (cerveaux de vers intoxiqués *in vivo* et associés à des parapodes de mâles normaux)
> - 22 ppm -

Jusqu'à 11 jours d'intoxication les produits génitaux situés dans les parapodes se présentent sous forme d'amas (Pl. I, fig. D) de spermatogonies analogues à ceux de l'association témoin (Pl. I, fig. B). Le blocage est donc maintenu.

L'observation du cerveau correspondant (Pl. I, fig. C) révèle une structure identique à celle d'un témoin. De très nombreux neurones fuchsinophiles sont observés, notamment au niveau du noyau 20. Les cellules à mucus épidermiques semblent particulièrement chargées.

- 44 ppm -

Après 4 jours d'intoxication, dans certains parapodes, des spermatogonies sont encore visibles. Leur étude ultrastructurale (Pl. I, fig. E) montre un aspect tout à fait normal en ce qui concerne les organites cellulaires. Mais les mitochondries ont souvent une matrice dense et quelques unes seulement ont une matrice claire. Cette hétérogénéité est peut-être due à l'intoxication. Le Cadmium a donc pu être transporté du cerveau vers le parapode.

Dans d'autres parapodes les produits génitaux sont en prophase de méiose (Pl. II, fig. A) donc à l'état de spermatogonies.

L'observation du cerveau correspondant montre une structure assez bien conservée. Les cellules neurosécrétrices fuchsinophiles persistent au niveau du noyau 20. Et les cellules à mucus sont toujours abondantes au niveau de la partie antérieure du prostomium. Il y a un début de levée de l'inhibition de la spermatogenèse et donc un début de diminution de l'activité cérébrale. Il est à noter que les structures semblent partout peu affectées.

Pour 11 jours d'intoxication, dans le parapode (Pl. II, fig. E), la méiose est terminée, et on est passé du stade amas de spermatocytes au stade spermatides groupées en tétrades ou libres.

Au niveau du cerveau correspondant (P1. II, fig. D) on n'observe pas d'altérations notables, les neurones fuchsinophiles persistent toujours.

- 55 ppm -

Pour cette dose forte, après 4 jours d'intoxication, l'activité cérébrale diminue considérablement, et on observe souvent des spermatides libres (Pl. II, fig. B).

Au niveau du prostomium (Pl. II, fig. C), la cuticule commence à se soulever par endroits, mais l'épiderme est encore peu modifié. Les cellules à mucus sont bien chargées. Dans le cerveau, les corps pédonculés sont encore compacts, mais la majorité des cellules neurosécrétrices fuchsinophiles sont vacuolisées.

L'altération est plus poussée dans le cas de ll jours d'intoxication. L'inhibition est complètement levée, quelques spermatides se présentent encore sous forme de tétrades (Pl. II, fig. G), les autres sont différenciées en spermatozoïdes. L'aspect des produits génitaux présente un léger retard par rapport au témoin (Pl. I, fig. A). Le cerveau n'exerce plus d'inhibition. Dans ce dernier les cellules des corps pédonculés ont disparu, quelques neurones fuchsinophiles persistent et notamment au niveau du noyau 20. Sous la cuticule, l'épiderme est complètement déstructuré (Pl. II, fig. F)

> b.3. Les tableaux II et III résument les résultats obtenus en culture organotypique après intoxication des cerveaux *in vivo* par du Cadmium

	Dose	0 ppm	22 ppm	44 ppm	55 ppm
	Aspect général	normal	normal	normal	normal
Cerveau	CP	normal	normal	normal	normal
	CNS FP+	+	+	+	+
Parapode	Produits génitaux	amas de spermatogonies	amas de spermatogonies	amas de spermatocytes	Spermatides en amas ou tétrades

Tableau II - 4 jours d'intoxication

CP : corps pédonculés ; CNS : cellules neurosécrétrices fuchsinophiles.

Tableau III - 11 jours d'intoxication

	Dose	0 ppm	22 ppm	44 ppm	55 ppm
	Aspect général	normal	normal	normal	altéré
Cerveau	СР	normal	normal	normal	cellules dissociées
	CNS FP ⁺	+	+	÷	+
Parapode	Produits génitaux	amas de spermatogonies	amas de spermatogonies	Spermatides en tétrades ou libres	Spermatides libres et spermatozoïdes

CP : corps pédonculés ; CNS : cellules neurosécrétrices fuchsinophiles.


b.5. Conclusion

Contrairement aux expériences réalisées sur la régénération, la culture organotypique permet de tester des cerveaux de vers intoxiqués par des doses fortes. Les résultats obtenus montrent qu'il existe une action progressive du Cadmium sur le cerveau avec altérations des cellules neurosécrétrices ou du moins de leur fonctionnement. A partir du 4ème jour, les cerveaux intoxiqués par 44 ppm et 55 ppm ne bloquent plus éventuellement les produits génitaux à l'état de spermatogonies. Ils ne font que retarder l'évolution de la spermatogenèse. Un traitement pendant 11 jours par 55 ppm lève totalement l'inhibition, le cerveau est inactif (Fig.3) Rappelons que pour cette même durée, la dose de 22 ppm est inefficace ; les produits génitaux, comme dans le cas de l'association témoin restent bloqués à l'état de spermatogonies. Il est à noter que contrairement à d'autres, les cellules neurosécrétrices de type II (selon DHAINAUT-COURTOIS, 1970) conservent leur chromophilie. Il est donc possible de mettre en doute leur implication directe dans la synthèse du principe inhibiteur de la maturation génitale.

b.4. Diagramme de l'évolution des produits génitaux en fonction de la dose et de la durée (Figure 3) c) Le Mercure

c.l. Observation des cerveaux au temps t_o de la culture après 4 jours d'intoxication in vivo - 0,075 ppm -

Dans ce cas comme pour le Cadmium (Pl. VI, figs A et B) l'intoxication pendant 4 jours ne provoque aucune modification. Les corps pédonculés sont formés de cellules contiguës, la capsule adhère bien au cerveau. La cuticule paraît normale. Des cellules à mucus sont visibles au niveau de l'épiderme (Pl. VIII, fig. A).

- 0,18 ppm -

Les structures semblent normales (Pl. VIII, fig. B) - 0,36 ppm -

Les corps pédonculés sont normaux. La capsule adhère toujours au cerveau. Mais l'épiderme est complètement désorganisé (Pl. VIII, fig. C).

- 0,75 ppm -

L'épiderme est complètement détruit. Les cellules des corps pédonculés commencent à se dissocier (Pl. VIII, fig. D).

c.2. Observation des associations en fin de culture (cerveaux de vers intoxiqués *in vivo* pendant 4 jours et associés à des parapodes de mâles normaux)
- 0,075 ppm -

Le cerveau est normal. Les corps pédonculés ont une structure bien compacte. Au niveau des parapodes les produits génitaux se présentent sous forme d'amas de spermatogonies.

- 0,18 ppm -

On n'observe aucune modification par rapport à

l'association témoin.

- 0,36 ppm -

Le cerveau est normal (Pl. V, fig. B). L'aspect des corps pédonculés rappelle celui des témoins. Les cellules neurosécrétrices sont nombreuses et vacuolisées. Au niveau du parapode (Pl. V, fig. A), les produits génitaux se présentent sous forme d'amas de spermatides. L'inhibition est donc levée, le cerveau a seulement retardé l'évolution des spermatogonies en spermatides.

- 0,75 ppm -

Le prostomium est très altéré. A l'emplacement de l'épiderme, on observe de nombreuses taches correspondant au mucus. Une

- 25 -

traînée de cellules dissociées constitue un vestige des corps pédonculés (Pl. V, fig. D). Le cerveau ne peut plus exercer d'inhibition. Mais dans le parapode correspondant (Pl. V, fig. C) on n'observe plus de produits génitaux. Les nombreux petits points visibles sur la figure correspondent peutêtre aux spermatozoïdes qui ont été altérés après le virage.

> c.3. Le tableau IV résume les résultats obtenus en culture organotypique après intoxication des cerveaux *in vivo* par le Mercure, pendant 4 jours

Tableau IV

	Dose	0 ppm	0,075 ppm	0,18 ppm	0,36 ppm	0,75 ppm
Cerveau	Aspect général	normal	normal	normal	normal	très altéré
	СР	normal	normal	normal	normal	disparu
	CNS FP ⁺	+	+	+	nombreuses et vacuolisées	disparues
Parapode	Produits génitaux	spermatogonies	spermatogonies	spermatogonies	spermatides	spermatozoïdes altérés ?

c.4. Conclusion

On peut conclure, comme pour le Cadmium, que selon les doses le Mercure agit sur le cerveau en provoquant une diminution de son activité, et par conséquent la levée progressive de l'inhibition.

Si, pour la dose la plus forte utilisée (0,75 ppm/ 4 jours), l'hypothèse d'un virage mais aussi d'une altération des produits génitaux se vérifiait, il faudrait conclure que le Mercure imprégnant le prostomium intoxiqué a diffusé dans le parapode.

B - Effet direct du Cadmium sur la spermatogenèse

Des mâles immatures, dont les produits génitaux se présentent sous forme d'amas (de spermatogonies ou de spermatocytes), ont été intoxiqués pendant 4 jours pour la dose 55 ppm et pendant 4 jours ou 11 jours pour la dose 44 ppm.

Les parapodes isolés ont été mis en culture normale sur milieu gélosé. Ce test a été effectué pour tester la capacité des produits génitaux à évoluer après intoxication.

- 26 -

1° 4 jours d'intoxication

Jusqu'à la dose de 55 ppm, les produits génitaux semblent insensibles. En effet à la fin de l'intoxication et donc lors de la mise en culture, les produits génitaux se présentent toujours sous forme de spermatogonies (Pl. III, fig. A). Leur observation en microscopie électronique montre des structures tout à fait normales.

A la fin de la culture, la spermatogenèse est terminée. Les spermatozoïdes formés ont une structure conforme à la description de BERTOUT (1976) (Pl. III, fig. B).

Il est possible de conclure que pour 4 jours, même la dose la plus forte n'a pas d'effets sensibles sur les produits génitaux.

2° <u>11 jours d'intoxication</u>

Les mâles n'ont pas résisté à la dose 55 ppm. Pour la dose 44 ppm, les produits génitaux à l'arrêt de l'intoxication se présentent, au microscope électronique, sous forme de tétrades de spermatides (Pl. IV, fig. A). Ces dernières montrent une vacuolisation importante ; des mitochondries ont perdu leurs crêtes et leur matrice a subi par endroits une densification. Certains saccules golgiens sont dilatés soit à leur extrémité, soit totalement. Ces modifications indiquent probablement un début de dégénérescence. A la fin de la culture, les spermatides restent bloquées au même stade. L'altération est très avancée ; toutes les mitochondries sont très denses, le noyau est une simple plage chromatinienne très dense, le coelome est rempli de restes cellulaires et de corps autophagiques (Pl. IV, fig. C).

Il est donc possible que pendant l'intoxication, le cerveau ait été altéré, puisque la méiose s'est produite *in vivo* et que les produits génitaux ont évolué en spermatides ; ces dernières présentent des signes de dégénérescence en fin de culture.

3° Le tableau V résume l'évolution *in vitro* des produits génitaux intoxiqués *in vivo*

Tableau V

	44 ppm/4 j	55 ppm/4j	44 ppm/11 j
Temps t _o de la culture	spermatogonies	spermatogonies	Spermatides altérées
Fin de la culture	spermatozoïdes	spermatozoĭdes	Spermatides complètement dégénérées

4° Conclusion

L'effet du Cadmium se poursuit donc après l'arrêt de l'intoxication : en effet, la dégénérescence est plus prononcée en fin de culture pour la dose de 44 ppm/11 jours.

Une dose plus faible appliquée pendant une durée plus longue peut avoir plus d'effet qu'une dose forte à durée plus courte. En effet, la dose de 44 ppm pendant ll jours provoque la dégénérescence des cellules germinales qui restent bloquées au même stade (stade spermatide) même après levée de l'inhibition (culture de parapodes isolés). Par contre, la dose 55 ppm pendant 4 jours semble inefficace : les spermatozoïdes paraissent normaux tout au moins du point de vue structural.

La toxicité du Cadmium au niveau des cellules germinales se manifeste par une vacuolisation importante, une densification des mitochondries qui perdent leurs crêtes, et des dilatations au niveau de certains saccules golgiens ou bien au niveau de leur extrémité seulement.

C - <u>Conclusion</u> : effets du Cadmium sur les cellules neurosécrétrices et sur les cellules germinales en culture organotypique

Un cerveau traité (par 44 ppm ou 55 ppm de Cadmium) *in vivo* n'exerce plus, en culture organotypique normale, l'inhibition de la spermatogenèse ; il ne fait que la retarder. Les cellules germinales mâles contenues dans les parapodes de vers traités par 55 ppm pendant 4 jours *in vivo*, évoluent en culture comme les témoins (tableau V).

Il est donc possible de penser que les cellules germinales sont moins sensibles que les cellules neurosécrétrices. De plus, le Cadmium semble agir de façon préférentielle sur les cellules sécrétant l'hormone inhibitrice car, même dans le cas où les cerveaux sont complètement altérés (tableaux III et IV), des cellules fuchsinophiles persistent. Ceci conduit à penser que ce ne sont pas ces dernières qui participent à l'élaboration de l'hormone inhibitrice ou bien que ce sont les voies de transport de la neurohormone qui ont été altérées ou enfin que la structure même de la molécule peptidique est modifiée voire inactivée par le Cadmium.

D - Discussion

D'après les résultats que nous avons obtenus (tableaux II à V)) le Cadmium et le Mercure peuvent soit diminuer l'activité du cerveau soit la bloquer complètement (Fig. 3). En plus, le Cadmium agit directement sur les cellules germinales. L'action de ces deux éléments a été étudiée sur l'appareil génital d'un seul Invertébré (*Locusta migratoria*), et une perturbation du fonctionnement de l'appareil génital femelle a été observée par l'équipe de MARTOJA (MARTOJA *et al.*, 1982)

Des études plus poussées de l'action du Cadmium sur la spermatogenèse ont été effectuées chez les Vertébrés. Chez le Rat, le Cadmium provoque une oligospermie, voire une azoospermie (SAKSENA *et al.*, 1983). Les mécanismes provoquant la stérilité peuvent être dûs soit à l'inhibition de l'hème oxygénase du testicule (MAINES *et al.*, 1982), soit à l'inhibition de l'acétylcholine transférase et la diminution de la mobilité des spermatozoïdes du Rat et de l'Homme (DWIVEDI, 1983).

En ce qui concerne les *Nereis*, il conviendrait donc d'effectuer des tests de fertilité avec les spermatozoïdes obtenus après intoxication par le Cadmium à la dose de 55 ppm pendant 4 jours avant de conclure définitivement à une parfaite innocuité sur ces cellules.

II - EFFETS DU CADMIUM ET DU MERCURE SUR DIFFERENTS TISSUS

A - Effets sur la chaîne nerveuse

1° Le Cadmium

a) 22 ppm

Après 4 jours d'intoxication (P1. VII, fig. A), la

chaîne nerveuse garde une structure comparable à celle du témoin. Les cellules neurosécrétrices sont très nombreuses. Certaines d'entre elles sont vacuolisées.

L'évolution au bout de ll jours ne montre toutefois pas de modifications notables (Pl. VII, fig. B), il est à noter un probable élargissement des fibres géantes latérales.

b) 44 ppm

On retrouve la même évolution que précédemment.

En effet, après 4 jours la structure est normale, les cellules neurosécrétrices sont abondantes et sont parfois vacuolisées (Pl. VII, fig. C).

Au llème jour, la structure demeure intacte, mais le vaisseau ventral s'hypertrophie (Pl. VII, fig. D).

c) 55 ppm

La structure d'ensemble paraît encore normale après

4 jours (Pl. VII, fig. E). Les cellules neurosécrétrices sont toujours visibles. L'ultrastructure de cette chaîne (Pl. VII, fig. F) montre une névroglie et des neurofilaments d'apparence normale (DENNAÏ, 1982 ; DHAINAUT-COURTOIS *et al.*, 1983 ; DELACOURTE *et al.*, 1984).

Après 11 jours d'intoxication (Pl. VII, fig. G), la chaîne est très altérée.

En conclusion : la chaîne nerveuse, comme le cerveau, semble bien résister au Cadmium et son altération n'est évidente que pour la dose la plus forte et la durée la plus longue d'intoxication.

2° Le Mercure

a) 0,036 ppm/21 jours

Les observations dans ce cas révèlent une structure normale (P1. IX, fig. A). Le vaisseau sanguin semble hypertrophié.

b) 0,075 ppm/4jours, 0,18 ppm/4 jours et 0,36 ppm/4jours
 Pour toutes ces doses on ne remarque aucune modifica tion remarquable (P1. IX, figs B et C).

c) 0,75 ppm/4 jours

L'épiderme est lésé, il se détache de la cuticule (Pl. IX, fig. D). La chaîne nerveuse est très altérée. La paroi des fibres géantes est irrégulière.

En conclusion : comme le Cadmium, le Mercure ne provoque des altérations visibles que pour la dose la plus élevée.

B - Effets sur l'oeil

l° Le Cadmium

Pour toutes les doses il ne provoque apparemmentpas d'altération au niveau des yeux. Par exemple pour la dose 55 ppm pendant ll jours (Pl. X, fig. A), la structure de l'oeil paraît normale. Il est cependant à noter qu'après arrêt de l'intoxication et mise en culture organotypique pendant 7 jours, l'altération est telle qu'on peut à peine reconnaître l'organe photorécepteur (Pl. X.Fig. B).

Ceci nous permet de conclure que le Cadmium est probablement un toxique lent. Son effet continue même après arrêt du traitement. Ceci est probablement dû à son lent processus d'élimination ou bien encore au fait que les lésions qu'il provoque sont irréversibles.

2° Le Mercure

Seule la dose la plus forte, 0,75 ppm pendant 4 jours, altère les tissus. L'épiderme disparaît mais la structure de l'oeil est bien conservée (Pl. X, figs C et D).

C - Effets du Cadmium et du Mercure sur la néphridie

l° Le Cadmium

Avec les doses 44 ppm et 55 ppm pendant 11 jours de traitement, la désorganisation est telle qu'on peut à peine reconnaître la néphridie en microscopie photonique. Au microscope électronique, des cristaux de calcium ont été observés à la limite entre un vaisseau et le canal néphridien. Ce phénomène pourrait être un caractère pathologique. Il est intéressant de noter ici que la néphrotoxicité se manifeste par une calcinose observée chez de nombreux animaux tels que les Poissons et les Mammifères. Les dépôts dans les tubes collecteurs sont formés par du phosphate et de l'oxalate de Calcium (MARTOJA, TRUCHET et BOUQUEGNEAU, 1982).

2° Le Mercure

Les résultats sont analogues à ceux obtenus avec le Cadmium. Soit la dose est faible et aucune modification par rapport au témoin n'est observée, soit la dose est très forte , la néphridie est alors très désorganisée.

D - Effets sur l'intestin

L'intestin semble être le premier organe cible de l'intoxication par le Cadmium et le Mercure.

1° <u>Présentation de l'épithélium intestinal de Nereis diversicolor</u> Sa structure est analogue à celle de *Perinereis cultrifera*

(DAHKAMA, 1981, 1983). L'étude en microscopie photonique de la région moyenne de l'intestin montre qu'il est formé de cellules plus hautes que larges, le noyau étant situé dans le tiers supérieur. Ces cellules qualifiées d'entérocytes sont séparées de la lumière intestinale par une bordure en brosse. La zone basale est constituée par des vaisseaux sanguins et des muscles (Pl. XI, fig. A). L'ultrastructure montre que la bordure en brosse est formée par des microvillosités (Pl. XII, fig. A). Entre les bases des microvillosités existent de nombreux corps denses aux électrons, allongés selon le grand axe des cellules ; il s'agit des formations apicales denses décrites chez *Perinereis cultrifera* par DAKHAMA (1981). Dans cette zone apicale, certaines formations cellulaires sont riches en ergastoplasme. Les mitochondries sont nombreuses. A l'opposé de la zone apicale, la zone basale (Pl. XII, fig. B) de l'intestin est séparée des muscles par la lame basale. Le vaisseau envoie des digitations dans l'épithélium. Les noyaux sont allongés dans le sens du grand axe des cellules. Les mitochondries de cette région sont également nombreuses. Dans certaines cellules, l'ergastoplasme est bien représenté.

2° Effet du Cadmium

a) 22 ppm

En microscopie photonique, après 4 jours d'intoxication, nous n'avons observé aucune modification par rapport à l'intestin témoin. Notons cependant que, par endroits, les vaisseaux sont riches en cellules dont on ne connaît pas l'origine exacte. Ces cellules ont été également observées chez le même animal dans le cas de traitement par des micro-ondes (RADZIZEWSKI et DHAINAUT-COURTOIS, inédit). Pour une intoxication de 11 jours (Pl. XIII, fig. B) on ne remarque aucune évolution importante. L'étude ultrastructurale montre que le traitement pendant 4 jours ne provoque pas d'altération (Pl. XVI, fig. A) au niveau des microvillosités et des formations apicales denses. Les noyaux et les mitochondries ont également un aspect normal. Par contre, les saccules sont denses. L'ergastoplasme est actif et présente une organisation particulière (P1. XIV, fig. B). La vacuolisation est importante. De nombreux lysosomes apparaissent dans le cytoplasme. Le phénomène le plus marquant est l'apparition de sphérocristaux (P1. XIV, figs A et B) dont les dimensions varient de 0,4 µm/0,2 µm à 0,55 µm/0,35 µm. La majorité de ces sphérocristaux paraissent vides sur les préparations. Après 11 jours d'intoxication (P1. XV, fig. A), les microvillosités se raccourcissent et sont parfois absentes alors que les formations apicales denses semblent normales. Les mitochondries présentent parfois des configurations particulières. Leur matrice subit une densification ; certaines d'entre elles sont isolées dans de grosses vacuoles où elles sont digérées (Pl. XV, figs A et B). Certains noyaux sont de très petite taille et présentent un dépôt chromatinien périphérique très important. Dans d'autres, la chromatine se présente sous forme de mottes ; ces noyaux peuvent contenir des inclusions d'origine inconnue. Dans un troisième cas, les nucléoles semblent hypertrophiés. L'ergastoplasme présente toujours une organisation inhabituelle et

semble activé. Au niveau du cytoplasme de certaines cellules, de nombreux corps lysosomiaux résiduels sont observés et les granules de glycogène semblent coalescents. Les sphérocristaux sont nombreux dans la zone apicale. Ils sont plus changés que dans le cas précédent. Leur diamètre varie de 1,03 µm/0,86 µm à 1,55 µm/0,86 µm.

b) 44 ppm

En microscopie photonique, après 4 jours d'intoxication on n'observe pas de variations dans la structure del'intestin mais la hauteur a diminué. La lumière intestinale devient grande.

Après 11 jours d'intoxication (P1. XIII, fig. D), l'épithélium est en début de désorganisation. On ne reconnaît plus la zone des noyaux. Les fibres musculaires basales semblent élargies et le vaisseau ventral hypertrophié.

En ultrastructure, après 4 jours d'intoxication (Pl. XVII, fig. A), on observe de très nombreuses zones lipidiques vidées. Les microvillosités sont courtes ou absentes et semblent entourées d'une enveloppe, probablement muqueuse, qui semble en cours de désquamation.

Les formations apicales denses deviennent rares (P1. XVI, fig. C et Pl. XVII, fig. A), certaines d'entre elles paraissent se détacher de la membrane apicale, et migrent en profondeur de l'épithélium où elles vont se localiser à proximité des mitochondries. Ces dernières ont une matrice très dense. Les noyaux ont un aspect pathologique. Des mottes de chromatine viennent s'accoler au nucléole hypertrophié (Pl. XVI, fig. A). Des corps lysosomiaux à matrice hétérogène apparaissent dans certaines cellules (Pl. XVI, fig. B). La coalescence des granules de glycogène devient très évidente. Les sphérocristaux sont nombreux et changés. Leur diamètre varie de 0,75 µm/0,50 µm à 1,1 µm/0,45µm.

Après 11 jours d'intoxication, les microvillosités disparaissent complètement. Les formations apicales denses ne persistent que par endroits. La vacuolisation est générale, les noyaux ont une chromatine très dense qui se présente sous forme de granules dispersés dans la matrice nucléaire ou bien de mottes disposées partout à la périphérie. Les corps denses lysosomiaux deviennent très nombreux et les mitochondries disparaissent complètement.

c) 55 ppm

L'étude en microscopie photonique de l'effet du Cadmium après 4 jours d'intoxication (Pl. XIII, fig. E) montre une désorganisation complète de l'épithélium intestinal. Les restes cellulaires remplissent la

- 33 -

lumière intestinale. Les cellules déjà signalées dans les vaisseaux deviennent très nombreuses. Les muscles adhérant à la zone basale entrent en dégénérescence.

Au llème jour, la désorganisation est complète (Pl. XIII, fig. F). Dans la lumière intestinale, il ne reste plus que quelques vestiges de l'épithélium. Les vaisseaux sanguins prolifèrent et remplacent l'épithélium intestinal. L'intestin s'affaisse.

L'observation en microscopie électronique montre qu'après 4 jours d'intoxication (P1. XVIII, fig. A) la dose de 55 ppm provoque la disparition de la presque totalité des microvillosités. Les formations denses apicales semblent normales en nombre mais elles se fragmentent, et les parties détachées migrent vers la profondeur de l'épithélium intestinal. Les mitochondries sont très denses, et peuvent s'enrouler. La chromatine forme des mottes qui viennent s'accoler au nucléole hypertrophié. L'ergastoplasme (P1. XVIII, fig. B) à organisation particulière montre une densification interne. Tous les sphérocristaux sont vides. Après ll jours (P1. XVIII, fig. C) on trouve dans la lumière intestinale des restes cellulaires et des formations entourées par une membrane à matrice hétérogène.

d) Conclusion

L'étude en microscopie photonique montre que l'intoxication ne provoque pas de modifications pour la dose 22 ppm (Pl. III, figs A et B). Mais pour la dose 44 ppm, à partir du 4ème jour l'épithélium intestinal diminue de hauteur (Pl. XV, fig. C). Au llème jour, c'est le début de la désorganisation (Pl. XIII, fig. D). Dans le cas de la dose 55 ppm, la destruction est complète au 4ème jour de l'intoxication ; le muscle adhérant à l'intestin est altéré. On constate la prolifération des cellules dans les vaisseaux (Pl. XIII, fig. A). D'après les figures de désorganisation observées, on peut penser que l'intoxication se manifeste par une désorganisation apicobasale qui provoque la diminution de la hauteur de l'épithélium. A la fin du processus , les vaisseaux prolifèrent et prennent la place de l'épithélium intestinal.

Mais l'étude ultrastructurale montre que déjà à partir de la dose 22 ppm utilisée pendant 4 jours l'animal est sensible et que des sphérocristaux apparaissent dans la zone apicale de l'intestin. En plus, l'ergastoplasme devient actif et présente des figures d'organisation nouvelle. L'intoxication plus poussée se manifeste toujours par l'ap-

parition de sphérocristaux, un raccourcissement, voire la disparition des microvillosités ; les formations denses apicales finissent par se fragmenter

- 34 -

et s'enfoncer dans la profondeur des cellules. On note également la densification de plus en plus poussée des mitochondries. L'ergastoplasme très actif présente toujours des configurations particulières.

Le système vacuolaire et les corps lysosomiaux deviennent très importants. La chromatine répond également par formation de mottes qui s'accolent au nucléole hypertrophié. Quand la désorganisation commence, la zone apicale reste bien limitée et c'est la zone supranucléaire qui se vide ; l'épithélium perdrait sa tonicité et s'affaisserait alors ; ce serait la raison de la diminution de la hauteur de l'épithélium. Dans le cas ultime il n'y a plus que le vaisseau et la lame basale.

3° Effets du Mercure

3.1. Effets comparés du Mercure sous forme de méthyl et de chlorure

Lors d'une observation au microscope photonique, l'intoxication pendant 4 jours par du Mercure sous forme de chlorure (HgCl₂) ne semble pas provoquer d'altérations de l'épithélium intestinal dont la structure reste comparable à celle du témoin (Pl. XI, fig. A). En effet, pour les doses 0,36 ppm et 0,75 ppm (Pl. XI, figs A et B), on ne voit pas de modifications notables ; les fibres musculaires semblent toutefois élargies. Le méthyl-mercure à 0,039 ppm (Pl. XI, fig. C) provoque par contre la désorganisation de l'intestin après 72 heures de traitement.

Ces résultats montrent que le méthyl mercure, même à une dose très faible, est plus toxique que le chlorure de mercure au niveau de l'intestin de Nereis diversicolor.

3.2. Effets du mercure sous forme de chlorure

a) 0,36 ppm

Des vers intoxiqués pendant 4 jours ne montrent aucune modification en microscopie photonique (P1. XI, fig. B). En microscopie électronique, on note par contre une diminution considérable de la hauteur et du nombre des microvillosités qui paraissent entourées par une sorte d'enveloppe fine qui est probablement muqueuse (P1. IXX, fig. A). Les formations apicales denses sont également moins nombreuses que chez le témoin (P1. XII, fig. A). Elles semblent se fragmenter et s'enfoncer dans la cellule. Les mitochondries sont rares et présentent une densification de leur matrice (P1. XIII, fig. A). Dans certains noyaux l'agrégation de chromatine est de plus en plus poussée et finit par former des amas localisés. D'autres ont une matrice claire (P1. IXX, figs A et B). L'ergastoplasme est actif et présente

- 35 -

une organisation différente de celle observée dans le cas d'intoxication par le Cadmium. Des corps denses résiduels sont observés dans les zones riches en ergastoplamse. De nombreuses vacuoles autophagiques appparaissent dans le cytoplasme. Les sphérocristaux ont un diamètre variant de 0,31 µm/ 0,2 µm à 0,73 µm/0,41 µm et sont généralement vides.

b) 0,75 ppm

Après 4 jours d'intoxication, les microvillosités deviennent très rares ; les formations apicales denses sont très espacées et se fragmentent (Pl. XX, fig. A). L'ergastoplasme, très actif, est organisé en zones concentriques (Pl. XX, fig. B) et présente une densification interne. Les sphérocristaux sont nombreux et ont un diamètre de 1,52 μ m/ 0,34 μ m à 2,06 μ m/1,03 μ m ; ils sont chargés et se situent non loin de la zone occupée par les gouttelettes lipidiques.

4° <u>Discussion</u>

Pour les deux métaux, nous avons signalé que l'ergastoplasme est très actif et présente des configurations particulières dont certaines rappellent celles décrites par MEREAU (1983) chez *Tetrahymena pyriformis* (Protozoaire) intoxiqué par le Thirame. L'activation de l'ergastoplasme pourrait être liée à la synthèse de protéines qui complexeraient le Cadmium et le Mercure. Cette hypothèse est à vérifier par l'utilisation de produits marqués.

Nous avons également constaté que dans certains cas les mitochondries se spiralisent (P1. XVIII, fig. A). Des cas de déformations mitochondriales dues à l'intoxication ont été également signalés par MEREAU (1983). A côté de la spiralisation des mitochondries de Nereis diversicolor, nous avons remarqué que certaines d'entre elles paraissent avoir une localisation particulière par rapport aux-formations apicales denses (Pl. XVI, fig. C). Ces dernières se fragmentent toujours en cas d'intoxication poussée et migrent dans la profondeur de l'épithélium. Il est possible de penser que les mitochondries et peut-être les formations apicales denses jouent un rôle quelconque dans l'apparition des sphérocristaux. L'implication des mitochondries dans de tels phénomènes a été décrite par certains auteurs comme STUVE et GALL (1970). Il est à noter cependant que les mécanismes de formation des sphérocristaux sont très variés. Nous citerons ici quelques exemples tout en précisant que l'implication du système lysosomial est un aspect commun aux tissus des Invertébrés et que la majorité contiennent du Fer, du Cuivre et du Calcium (BROWN, 1982). D'après BROWN, il y a quatre processus majeurs de la formation des sphérocristaux.

- 36 -

- Le premier peut exister chez divers animaux (des Coelentérés aux Insectes). Il implique la formation de ces granules à partir de l'appareil de Golgi ou bien à partir des cisternes qui lui sont associées [exemple : *Musca domestica* (SOHAL *et al.*, 1977 cités par BROWN (1982)].
- Le deuxième site d'initiation est le réticulum endoplasmique et ses cisternes, comme dans le cas de dépôts de sels chez l'Insecte marin *Petrobius maritimus*.
 Dans quelques cas, il peut y avoir intervention de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (FAIN-MAUREL *et al.*, 1973).
- La troisèème possibilité est représentée par le dépôt de minéraux dans des vésicules ou vacuoles d'origine inconnue. C'est le cas des Mollusques (GEORGE *et al.*, 1975) et des Crustacés (HRYINEWECKA-SZYFTER, 1972; BROWN, 1976; HOPKIN et NOTT, 1980).
- Le quatrième site d'initiation est constitué par les mitochondries. Les premières études des tissus d'Invertébrés (WIGGLESWORTH et SALPETER, 1962) suggèrent que les concrétions sont formées par minéralisation des mitochondries. Chez les Mammifères, les études ont démontré l'accumulation de Calcium (WASSERMAN et KALLFELZ, 1970) et la capture de l'or (STUVE et GALL, 1970) au niveau des mitochondries. A la lumière des résultats obtenus, les auteurs (GEORGE et PIRIE, 1979) suggèrent qu'il n'y a pas un mécanisme unique pour les accumulations. On trouve ces dernières dans divers organites (mitochondries, lysosomes, vésicules dérivées de l'appareil de Golgi) et dans des vésicules de pinocytose. Toutefois,les différents organites cités pourraient être incorporés dans le schéma de l'origine et de la fonction des lysosomes.

- 37 -



Schéma des origines et fonctions possibles des lysosomes, repris de NOVIKOFF et HOLTZMANN (1976) et suggérant les voies d'incorporation des métaux (d'après BROWN, 1982).

- Voie 1 : Amoebocytes de Mytilus edulis incubés avec la ferritine in vivo. Vésicules de ferritine dans les branchies de Mytilus in vivo (GEORGE et al., 1975).
- Voie 2 : Formations de granules contenant les métaux chez Pecten maximus (GEORGE et al., 1980). Formation de particules de Cadmium chez Mytilus edulis (GEORGE et PIRIE, 1979).
- Voies 2 et 3 : Formation de granules contenant des métaux chez la mouche domestique : Musca domestica (SOHAL et al., 1976, 1977).

- 38 -

CHAPITRE IV

PROTEINES COMPLEXANT LE CADMIUM

INTRODUCTION

Comme nous l'avons signalé dans les chapitres précédents, *Nereis diversicolor* supporte des doses fortes de Cadmium. Elle pourrait résister à ce métal par son faible pouvoir d'absorption, son très faible facteur de concentration, et, peut-être, par la formation des sphérocristaux. On peut également envisager l'hypothèse qu'elle serait capable de synthétiser, comme d'autres animaux, des métallothionéines, ou d'autres protéines qui complexe-raient le Cadmium, le rendant ainsi moins toxique.

Avant d'exposer nos résultats, nous allons donner quelques généralités sur les métallothionéines.

I - LES METALLOTHIONEINES

A - Historique

Le nom de métallothionéines fut attribué par MARGOSHE et VALEE (1957) à une protéine cytoplasmique du cortex rénal du cheval. Cette protéine est caractérisée par son faible poids moléculaire (6 000 à 12 000 d), sa forte teneur en ions métalliques (Cadmium et Zinc), l'absence d'acides aminés aromatiques et une forte teneur en cystéine (30 %) des aminoacides.

B - Répartition

Les recherches ont surtout été effectuées chez les Mammifères (MARGOSHE et VALEE, 1957 ; SUZUKI *et al.*, 1963 ; EVANS *et al.*, 1983), ensuite chez les Oiseaux (WESER *et al.*, 1973) et les Poissons (BOUQUEGNEAU *et al.*, 1975 ; BOUQUEGNEAU et NOEL-LAMBOT, 1978 ; McCARTER et ROC H, 1983). En ce qui concerne les Invertébrés, ce sont les Mollusques qui ont été les plus étudiés (NOEL-LAMBOT, 1976 ; BOUQUEGNEAU *et al.*, 1983 ; GEORGE, 1983a, 1983b; DOHI*et al.*, 1983). A notre connaissance une seule Annélide a été étudiée dans ce domaine : *Eisenia foetida* (YAMAMURA, 1981). A côté des Annélides nous pouvons citer les Insectes, aquatiques surtout (EVERARD et SWAIN, 1983 ; YAMAMURA *et al.*, 1983).

C - Localisation tissulaire des métallothionéines

Les métallothionéines ont été mises en évidence *in vivo* à partir de la plupart des tissus (foie, reins, poumon). Elles ont été également extraites *in vitro* à partir des cultures tissulaires.

D - Métabolisme des métallothionéines

1° Métaux induisant leur synthèse

Le Cadmium possède l'action la plus puissante. Il est suivi par le Mercure inorganique, le Zinc et le Cuivre.

2° Cinétique d'apparition

L'étude faite chez les Mammifères montre que dans le foie, il existe un délai de 2 à 5 heures entre l'injection du métal et l'apparition de la métallothionéine. La synthèse est maximale une dizaine d'heures après l'administration (CHEN *et al.*, 1975 ; SHAIKH et SMITH, 1977). Dans les reins, le délai d'apparition est de trente minutes et le maximum se situe entre trois heures et cinq heures (PROBST *et al.*, 1977 ; SHAIKH et SMITH, 1977).

Ces différents résultats suggèrent que les mécanismes d'induction varient d'un tissu à l'autre.

3° Synthèse

Les synthèses des métallothionéines étudiées à l'aide de précurseurs marqués sont fortement ralenties par l'adjonction d'inhibiteurs des synthèses protéiques.

E - Spectre d'absorption

Le spectre d'absorption dans l'ultraviolet présente une particularité qui est due à la composition en acides aminés. Ce spectre varie suivant le métal fixé. L'absence de tryptophane et de tyrosine entraîne une absence d'absorption à 280 nm, tandis que la liaison métal-soufre (des cystéines) est responsable d'un épaulement du pic d'absorbance qui se situe à 250 nm pour le Cadmium-thionéine.

II - RESULTATS OBTENUS CHEZ N. DIVERSICOLOR

Pour tous les échantillons, l'homogénat a été séparé en culot et en surnageant (cf. matériel et méthodes). C'est au niveau des surnageants (fraction soluble) que se fait la recherche des métallothionéines.

1° <u>Culot</u>

Nous n'avons pas trouvé de Cadmium au niveau du culot des animaux témoins.

2° Le surnageant

Les protéines du surnageant après élution sur gel Séphadex G.75, se présentent sous forme de 2 pics majeurs. Ceci aussi bien dans le cas d'absorbance à 254 nm qu'à 280 nm (figs 4 et 5). Le premier pic se situe entre le volume d'exclusion de la colonne et le volume d'élution de la "Sérum-Albumine-Bovine". Il s'agit donc de protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 70 000 d. Le deuxième pic est situé à la limite du volume total, ces protéines ont par conséquent un poids moléculaire au-dessus de 10 000 d (fig. 5). Ces deux profils de pics de protéines sont retrouvés dans tous les cas d'intoxication.

Le dosage des différentes fractions de l'éluat a révélé des traces de Cadmium qui se situent sous la limite de sensibilité de l'appareil [courbe parallèle à l'axe des abscisses (fig. 5)].

B - Cinétique de fixation du Cadmium pour la dose 22 ppm

1° Répartition du Cadmium après centrifugation de l'homogénat

Le Cadmium ne se fixe qu'à partir de 24 heures d'intoxication (figs 6 et 7). Il se fixe sur le culot beaucoup plus vite que sur le surnageant. A partir de 24 heures le pourcentage de Cadmium fixé au niveau du culot diminue. On observe en même temps une augmentation du pourcentage de fixation au niveau du surnageant (Tableau VI).

<u>Tableau VI</u> - Pourcentage de répartition du Cadmium entre le culot et le surnageant

22 ppm 7 h		19 h	24 h	4 ј	11 j	
Culot	0 %	0%	59,70 %	26,06 %	10,70 %	
S	0 %	0%	45,52 %	73,92 %	89,20 %	

2° Cadmium au niveau du surnageant

Il n'y a aucune fixation de Cadmium avant 19 heures (Figs 8 et 9). Après 24 heures (fig. 10) un pic de Cadmium (pic I) apparaît au niveau de protéines de poids moléculaire supérieur à 70 000 d. En plus on soupçonne le début de la fixation sur les protéines dont le poids moléculaire est inférieur à 43 000 d. Au quatrième jour (fig. 11), le premier pic devient plus important, le second commence à s'individualiser (pic II). Au onzième jour (fig. 12), le pic I persiste et le pic II devient très important. Il apparaît en outre un troisième pic (pic III) sur des protéines dont le poids moléculaire est proche de 10 000 d (limite inférieure de filtration sur Gel Séphadex G.75).

Nous avons essayé de préciser ces résultats en utilisant un gel Séphadex G.100 qui permet la séparation de protéines de poids moléculaire entre 100 000 d et 10 000 d. Nous avons retrouvé trois pics de Cadmium (fig. 13). Le premier est porté par des protéines dont le poids moléculaire est supérieur à 100 000 d. le troisième est fixé sur des protéines de poids moléculaire aux alentours de 10 000 d. D'après le profil des pics de protéines, nous pouvons conclure que le gel G_100 montre moins d'affinité de séparation de nos protéines.

3° Conclusion

Au niveau de la fraction soluble, la fixation du Cadmium se fait à partir de 24 heures d'intoxication, sur les protéines de poids moléculaire de plus en plus petit. Le pic II représente le pic majeur de fixation.

C - Cinétique de fixation du Cadmium pour la dose 44 ppm

1° Répartition du Cadmium après centrifugation de l'homogénat

La fixation du Cadmium se fait plus tôt que pour la dose 22 ppm. La fixation commence dès le début sur le surnageant, diminue très rapidement jusqu'au quatrième jour, après elle réaugmente mais très faiblement. C'est sur le culot que la fixation est importante (fig. 14). En effet, la valeur du Cadmium dans le culot passe de 0 % (7 heures) jusqu'à 87 % environ, en s'élevant continuellement (fig. 15) jusqu'au onzième jour (fin de l'expérimentation (Tableau VII).

- 42 -

44 ppm	7 h	19 h	24 h	4 ј	11 j
Culot	0 %	15,40 %	48,08 %	78,72 %	87,19 %
S	100 %	94,59 %	51,9 %	21,26 %	12,79 %

2° Cadmium au niveau du surnageant

Le pic I apparaît à partir de 7 heures, en plus le pic II commence à s'individualiser. Ce dernier devient très important à partir de 19 heures. La fixation diminue (fig. 14), et seul le pic II persiste à 24 heures et continue à augmenter. Au onzième jour, en plus du pic II, le pic III apparaît.

3° Conclusion

Le Cadmium se fixe beaucoup plus dans le surnageant que dans le culot. Comme pour la dose 22 ppm il y a trois pics au niveau de la fraction soluble :

- pic I-sur des protéines de poids moléculaire supérieur à 70 000 d voire 100 000 d.
- pic II-pic majeur porté par les protéines de poids moléculaire inférieur à 43 000 d.
- pic III-pic tardif situé sur les protéines de poids moléculaire supérieur à 10 000 d.

D - Cinétique de fixation du Cadmium pour la dose 55 ppm

1° <u>Répartition du Cadmium après centrifugation de l'homogénat</u> Pour cette dose également la fixation commence à partir de

7 heures au niveau du surnageant. Après 24 heures le Cadmium augmente plus rapidement dans le culot. La figure 17 montre le pourcentage de distribution du Cadmium. Onconstate une évolution en sens inverse des teneurs respectives du culot et du surnageant.

<u>Tableau VIII</u> - Pourcentage de répartition de Cadmium entre le culot et le surnageant

55 ppm	7 h	`19 h	24 h	4 ј	11 j
Culot	11,27 %	11,83 %	10,07 %	60,35 %	37,27 %
S	88,80 %	88,15 %	89,93 %	39,64 %	62,71 %

-- FINHL RESULTS --

CORRECTED ATOMIC CONCENTRATION 7 :

<.	20000	6666	196	5		<	220	ēe,	564	585	6	5
0 107	79.820 59.819 59.819	99.813 99.813	79.856 99.856 99.872	99.856		1.00	97.565 77.673	99.631 99.637	102.744		79.740	560 • • • •
200 C	0.000	0.000	000000	0.601		55	0.000	0.000	0000	0000	0.000	0.003 naux
80 80 90 90	0.0010	0.004	0.001	0.003		58 0.001	0.040	0.025	100.0	0.033	500-0	0.025 s anin
11	0.000	0.000	0.004	0.001		11 11	0.000	0.000	0.002	0.000	000.0	hez de
110 110 110	0.000	0.001 0.000 0.000	0.000	0.002		5E	0.000		0000	200	000.	ents c
0H	000100000000000000000000000000000000000	81102	.002	1003		92	002	010		888	-000 - 000	éléme
FB 000	000000000000000000000000000000000000000	8585		.001 0		FB 605 0	000	0000				rtains
ct 673 6	010 910 910 910 900 900 900 900 900 900	013	014	015 0		сL 050 о	035	0000	020	4200	100	de cer
5 048 0	00000	66666	000)20 D.		55	6.20	000 1400				tion
	0000	0000	000	\$ 0.(0	000					, v.v parti
12 O	6666	0000	0000	0.00		R2 0	0000	000		666		la ré rémoi
6.001 100.0	0.000	0.008	0.004	0.004		0,002	0.000	0.001	0.004	21000 0000	0.010 Q	ntre des 1
Р 0.064	0.053	0.039 0.039 0.075	0.055	0,053	••	F. 0.163	0.101	0.014	0.075	6.0157		son el
SI 0.010	0.015	0.025 0.025 0.034 0.034	0.023	0.020	ACTION 7	31 0.017	0.025		0.001	0.035	120.0	mparai toxiqu
÷۲ 0.005	0.004	0.000 0.000 0.000 0.000	0.007	0.005	EIGHT FR	ыL 0,003	0.007	1000	0.011	0.013	0.005	x - co in
NA 0.017	0.007	0,006 0,012 0,012	0.012	ie 0.003	rected W	NA 0.024	0.011	0000	0.013	0.003 0.017 0.007	2000 2000	eau I)
ND.	C110-4110-	01~00	110	avera:	COR	ко. 1	(11)+	£ 63-0	1~ (0)	(h () ;-	3ver.43	Tabl

1 et 3 : intoxication au Mercure (intestin).
2 : témoin.

2 : témoin.
4 à 11 : intoxication au Cadmium
4, 5 et 6 représentent différents niveaux de l'intestin.
7 : fibre géante
8 : intestin
10 : fibre géante
11 : fibre géante

2° Evolution du Cadmium dans le surnageant

Le Cadmium se fixe à partir de 7 heures sous forme de nombreux pics répartis sur toutes les protéines (fig. 18). Ces pics persistent (pour toutes les durées de traitement) sauf les pics sur les protéines de poids moléculaire voisin de 10 000 d qui présentent des fluctuations en fonction du temps [19 heures (fig. 19), 24 heures (fig. 20) et 4 jours (fig. 21)]. Au onzième jour (fig. 22) le Cadmium est fixé partout, mais on retrouve le pic majeur (pic II).

3° Conclusion

Le Cadmium se fixe sur le surnageant dès le début de l'intoxication mais diminue rapidement et c'est le culot qui le prend en charge. Il nous est difficile d'interpréter la nouvelle augmentation à partir du 4ème jour car un seul animal a survécu dans nos expériences jusqu'au onzième jour.

E - Récapitulatif sommaire des résultats

La durée de sensibilisation de l'animal pour complexer le Cadmium dépend de la dose. Elle se fait à partir de 24 heures pour 22 ppm, et à partir de 7 heures pour 44 ppm et 55 ppm.

La répartition du Cadmium entre faction soluble et fraction insoluble dépend également de la dose. C'est le culot qui fixe le premier le Cadmium dans le cas de la dose la plus faible. A partir d'un seuil, le surnageant intervient et il continue à fixer beaucoup plus de Cadmium que le culot jusqu'au onzième jour. Ce phénomène est inversé pour les deux autres doses.

Au niveau du surnageant le Cadmium se répartit en gros sur trois sites : des protéines de poids moléculaire supérieur à 100 000 d (d'après élution sur Gel Séphadex G_100), des protéines de poids moléculaire inférieur à 43 000 d, et d'autres dont le poids moléculaire est proche de 10 000 d. Les premières portent le pic précoce (pic I), les deuxièmes portent le pic majeur (pic II) et les troisièmes le pic tardif (pic III).

F - Résultats de l'analyse à la microsonde

Nous avons essayé de voir s'il y a variation de la quantité de soufre entre des animaux témoins et intoxiqués par le Cadmium ou le Mercure . Cette variation pourrait être un des critères de la synthèse de métallothionéines. Nous avons donc fait en même temps l'analyse de plusieurs autres éléments (Tableau IX). Les résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les animaux témoins et les animaux intoxiqués. D'après ces résultats on peut émettre deux hypothèses :

- Soit la *Nereis* ne synthétise pas de métallothionéines ou "métallothionéines like" pour les doses et les durées de nos expériences,
- Soit qu'elle en possède déjà avant l'intoxication puisqu'il n'y a pas de différences entre les animaux témoins et les animaux intoxiqués.

III - DISCUSSION

l° La dose

Les doses que nous avons utilisées dans notre expérimentation peuvent paraître très fortes mais c'est un caractère qui varie avec les espèces et les écarts sont très grands. L'Insecte d'eau douce *Eusthenia spectabilis* a une DL 50 de 14 jours pour 204 ppm (EVERARD et SWAIN, 1983).

2° La complexation au niveau de protéines de gros poids moléculaire

Un des résultats notables de notre étude est la mise en évidence de la fixation de Cadmium sur des protéines de poids moléculaires relativement élevés (supérieur à 100 000 d (pic I), inférieur à 43 000 d (picII ou~pic majeur) et le troisième est proche de 10 000 d (pic III ou pic tardif).

Dans la bibliographie un animal proche des Polychètes, ayant montré la particularité de fixer sur quatre niveaux différents est *Eisenia foetida* (Annélide) [63 000 à 70 000 d, 10 000 d et inférieur à 2 000 d (YAMAMURA, 1981)]. Pour les Nématodes le mucus constitue la voie principale de capture du Cadmium. Chez *Enoplus* S.R.P. l'accumulation initiale se fait par adsorption cuticulaire. La cuticule est caractérisée par l'importance du matériel "collagen-like" (collagène des Nématodes) et la kératine. Ces deux constituants sont très riches en constituants di sulfures et qui se situent entre les résidus cysteinyls ce qui caractérise les protéines complexant les métaux (HOWELL, 1982). Chez *Enoplus brevis* Bastian le Cadmium se fixe sur des protéines de poids moléculaire 63 000det 29 000dsous conditions dénaturantes, et 450 000 et 28 000 sous conditions non dénaturantes (HOWELL et SMITH, 1983).

En ce qui concerne l'intervention de la fraction insoluble avant la fraction soluble, nos résultats semblent conformes avec les données bibliographiques relevées chez plusieurs Invertébrés, à savoir la fixation sur la fraction insoluble puis au niveau des grosses protéines de la fraction soluble. De telles répartitions ont été décrites chez l'Huître de commerce livrée à la consommation. En effet, 1/3 du Cadmium qu'elle contient est fixé sur la fraction insoluble, 20 % du Cadmium de la fraction soluble est fixé sur des protéines de poids moléculaire 40 000 et 50 000, et sur un peptide. L'intoxication expérimentale de l'Huître donne le mêmeprofil que l'Huître du commerce (répartition entre fraction insoluble et fraction soluble), mais la fixation sur les protéines de haut poids moléculaire disparaît (SIEWICKI *et al.*, 1983). Chez l'Insecte *Chironomus yoshimatsui* (intoxiqué par 10 ppm de Cadmium pendant deux jours) une fixation rapide se fait sur des grosses protéines qui se déchargent rapidement. Ensuite commence la fixation lente sur des protéines de poids moléculaire plus faible (YAMAMURA *et al.*, 1983).

Nereis diversicolor semble réagir comme d'autres Invertébrés, surtout pour la dose 22 ppm, elle paraît complexer le Cadmium sur des grosses protéines qui, peut-être, se scindent pour donner des poids moléculaires de plus en plus faibles. On pourrait penser également que le Cadmium fixé initialement sur les grosses protéines est transféré en fonction du temps et du degré de l'intoxication, sur des protéines de poids moléculaires de plus en plus faibles.

L'apparition de pics multiples dans le cas de la dose 55 ppm pourrait être expliquée par la complexation du Cadmium sur des protéines devenues instables après perturbation du métabolisme de l'animal par l'intoxication.

3° Les métallothionéines

D'après notre expérimentation Nereis diversicolor ne synthétise pas de métallothionéines car nous n'avons jamais observé d'inversion du spectred'absorbance ni de variation dans la quantité de soufre. L'hypothèse de processus très lent de synthèse de métallothionéines n'est pas à rejeter, puisque le Cadmium se fixe sur les protéines de poids moléculaire proche de 10 000 d à partir du onzième jour.Nous devons prolonger la durée d'intoxication pour la dose 22 ppm qui est bien tolérée par l'animal, et vérifier par l'utilisation de produits marqués s'il n'y a pas de synthèses de protéines qui sont masquées au niveau des spectres d'absorbance (par les protéines déjà existantes) à cause de leur faible concentration dans le surnageant.

Signalons enfin que cette absence des métallothionéines a été décrite chez de nombreux animaux comme l'Huître Ostrea edulis (JULSHAMN et ANDERSON, 1983); le Gastéropode Buccinum tenuissimum (DOHI et al., 1983) et le Calmar [Céphalopode (TANAKA et al., 1983)]. A côté des Mollusques nous pouvons citer les Nématodes : Enoplus S.A.P. (HOWELL, 1982) et Enoplus brevis Bastian (HOWELL et SMITH, 1983), et les Insectes : Locusta migratoria (MARTOJA, 1983). Le problème de la distribution des métallothionéines dans le règne animal reste obscur car ces substances ne semblent pas suivre une évolution phylogénique nette.

Une relation avec les conditions d'habitat semble également difficile à envisager (absence chez les Mollusques marins comme chez des Insectes).L'explication de leur présence (ou absence) permettra de mieux comprendre dans l'avenir la stratégie de défense des animaux vis-à-vis de leur environnement.

- 47 -







Cd : Témoin / 11 j.

- Figure 5
- NB

Volume d'exclusion de la colonne (gel séphadex G 75, 2,1 cm/ 100 cm) (PM supérieur à 70 000 d). Volume d'élution de la "sérum albumine bovine" (PM : 67 000 d).

- Volume d'élution de l'albumine de l'oeuf (PM : 43 000 d).
 - Volume total (PM supérieur à 10 000 d).









Figure 8



Figure 9



Cd : 22 ppm / 24 h.











Figure 12



Figure 13



Figure 14 - Répartition du Cadmium fixé entre le culot et le surnageant. Intoxication à la dose 44 ppm.








Cd : 55 ppm / 7 h.





Cd : 55 ppm : 19 h.

Figure 19













CONCLUSION GENERALE

L'utilisation de méthodes variées a permis de définir les doses de Cadmium ou de Mercure pouvant provoquer des intoxications chroniques ou aiguës chez la *Nereis*. Comme on le sait, ces phénomènes sont soumis à certains nombresde facteurs parmi lesquels figurent :

- le mode d'intoxication,
- les espèces considérées,
- la forme chimique utilisée.

Il semble que *Nereis diversicolor* - qui résiste à des doses assez élevées comparativement à d'autres animaux - possède trois "moyens de défense" contre la pollution par certains métaux lourds : - un faible pouvoir d'absorption, - le développement de sphérocristaux, - et enfin la complexation progressive du Cadmium, par exemple, au niveau de protéines de poids moléculaire d'abord très élevé. La présence de métallothionéines n'a par contre pu être démontrée.

Certains problèmes restent posés. Nous nous proposons dans un avenir proche de rechercher la signification des sphérocristaux et des formations ergastoplasmiques observés dans l'épithélium intestinal d'animaux intoxiqués.

Nous pensons également poursuivre la caractérisation des protéines complexant afin de pouvoir conclure d'une manière définitive à la présence ou à l'absence de métallothionéines chez les *Nereis*.

BIBLIOGRAPHIE

- AUBERT, M. (1983). Polluants inorganiques accumulables ou non en milieu marin. Bull. Acad. Nat. Méd., 167:467-472.
- BAKIR, F., DAMLUJI, S.F., AMINZAKI, L., MURTADHA, M., KHALIDI, A., AL RAWI, N.Y., TIKRITI, S., DHAHIL, H.I., CLARKSON, T.W., SMITH, J.C. et DOHERTY, R.A. (1973). Methyl mercury poisoning in Iraq. Science, 181:230-241.
- BALLAN-DUFRANÇAIS, C., JEANTET, A.Y. et HALPERN, S. (1982). Localisation intracellulaire par microanalyse X de métaux et de métalloïdes dans la glande digestive d'un Mollusque Bivalve (*Pecten maximus*). Implication des processus de digestion. C. R. Acad. Sci. Sér. III, 294:673-678.
- BARANSKI, B., OPAKA, J., WRONSKA-NOFER, T., FRZCINKA-OCHOCKA, M. et SITAREK,
 K. (1983). Effects of Cadmium on arterial blood pressure and lipid
 metabolism in Rats. Toxicol. Let., 18: 245-250.
- BARANSKI, B., STEIKEWICZ, I., SITAREK, K. et SZYMCZAK, W. (1983). Effects of oral, subchronic Cadmium administration on fertility, prenatal and postnatal progeny development in rats. Arch. Toxicol., 54 : 297-302.
- BERTOUT, M. (1976) Spermatogenèse de Nereis diversicolor O.F. Müller (Annélide Polychète). 1. Evolution du cytoplasme et élaboration de l'acrosome. J. Microsc. Biol. Cell., 25:87-94.
- BOEHME, D.H., SAMPSON, L.T. et MARK, M. (1979) Cadmium and hypertension : Tissue levels in human heart aorta and brain. Fed. Proc. 38:1209.
- BOILLY, B. (1974). Mode d'action du cerveau sur la régénération caudale de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). Wilhelm Roux' Archiv., 174:195-209.
- BOILLY, B. et RICHARD, A. (1978). Accumulation de fer chez une Annélide Polychète : *Magelona papillicornis* O.F.Müller. C. R. Acad. Sci. Sér. D, 286 : 1005-1008.
- BOUQUEGNEAU, J.M., CERDAY, Ch. et DISTECHE, A. (1975). Fis h mercury binding thionein related to adaptation mechanisms. F.E.B.S. Letters, 55 : 173-177.
- BOUQUEGNEAU, J.M. et DISTECHE, A. (1973). Two examples of physiological effects of Mercury on fish. Meeting, Brussel, 85-93.

- BOUQUEGNEAU, J.M. et MARTOJA, M. (1982). La teneur en Cuivre et son degré de complexation chez quatre Gastéropodes marins. Données sur le Cadmium et le Zinc. Oceanol. Acta, 5 : 219-228.
- BOUQUEGNEAU, J.M., MARTOJA, M. et TRUCHET, M. (1983). Localisation biochimique du Cadmium chez Murex trunculus L. (Prosobranche Néogastéropode) en milieu naturel non pollué et après intoxication expérimentale. C. R. Acad. Sc. Sér. III, 296 : 1121-1124.
- BOUQUEGNEAU, J.-M. et NOËL-LAMBOT, F. (1978). Les métallothionéines, structure fonctions et indidence dans les milieux marins par les métaux lourds. Act. Biochim. Mar. Colloque GABIM, 219-232.
- BREMNER, I. (1978). Cadmium toxicity. World Rev. Nutr. Diet., 32 : 165-197.
- BROWN, B.E. (1976). Observations on the tolerance of the isopod Asellus meridianus Rac to Copper and Lead. Water Res., 10 : 555-559.
- BROWN, B.E. (1982). The form and function of metal-containing 'granules' in invertebrate tissues. Biol. Rev., 57 : 621-667.
- BRYAN, G.M. (1976). Some aspects of heavy metal tolerance in aquatic organisms. In : Effects of polluants on aquatic organisms. (ed. A.P.M. Lockwood) : 7-34. Cambridge University Press (In BROWN, B., 1983).
- CHANG, W.L. (1983). Protective effects of Selenium against methyl mercury neurotoxicity; a morphological and biochemical study. Exp. Path., 23: 143-156.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C. (1981). Rôle des lysosomes dans le phénomène de concentration du Cadmium. Microanalyse par spectrographie des rayons C. R. Acad. Sc., Sér. III, 293 : 261-267.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C. (1982). Localisation ultrastructurale du Cadmium dans la glande digestive du Crabe *Carcinus maenas* (Crustacé Décapode). Microanalyse par spectrographie des rayons X. C. R. Acad. Sc. Sér. III, 294 : 153-157.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C. (1983). Rôle des lysosomes et des sphérocristaux dans le phénomène de concentration de l'Uranium chez la moule *Mytilus edulis* (L.) Microanalyse par spectrographie des rayons X. C. R. Acad. Sc. Sér. III, 296 : 581-586.
- CHASSARD-BOUCHAUD, C., CLAMET, D., ESCAIG, F. et KLEINBAUER, F. (1983). Bioaccumulation d'Uranium par des moules Mytilus edulis (L.) récoltées sur les côtes françaises de la Manche et contamination expérimentale. Microanalyse par émission ionique secondaire. C. R. Acad. Sc. Sér. III, 296 : 1095-1100.
- CHEN, R.W. et GANTHER, M.E. (1975). Relative Cadmium binding capacity of metallothionein and other cytosolic fractions in various tissues of the rat. Environm. physiol. Biochem., 5 : 378-388.

- CHERIAN, G.M. (1983). Absorption and tissue distribution of Cadmium in mice after chronic feeding with Cadmium chloride and Cadmium-metallothionein. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 30 : 33-36.
- DAKHAMA, A. (1981). Etude cytologique et métabolique de l'épithélium intestinal de *Perinereis cultrifera* Grübe. D.E.A. 1-27.
- DAKHAMA, A. (1983). Contribution à l'étude cytophysiologique de l'intestin des néréidiens (Annélides Polychètes). Thèse de 3ème Cycle, 1-41.
- DELACOURTE, A., DHAINAUT-COURTOIS, N., TRAMU, G. et DENNAÏ, N. (1984). Nereis giant fibers are strongly detected by monospecific antibodies against the 210 K neurofilament subunit : immunoblot and immunohistochemical studies. (à paraître).
- DELARCHE, A. et RIBEYRE, F. (1978). Chaîne trophique expérimentale en milieu limnique. Thèse de Doctorat en Sciences biologiques, Université de Bordeaux I, 1-247.
- DENNAÏ, N. (1982). Résultats préliminaires relatifs à l'étude du système nerveux central d'une Annélide Polychète *Nereis diversicolor*. Action de quelques substances pharmacologiques. Analyse de transports axonaux. D.E.A., 1-52.
- DHAINAUT-COURTOIS, N. (1970). Contribution à l'étude morphologique des processus sécrétoires dans le système nerveux central et au niveau de la glande infracérébrale des *Nereidae*. Thèse Doctorat Sciences Naturelles, 1-139.
- DHAINAUT-COURTOIS, N., DELACOURTE, A. et DENNAÏ N. (1983). Les neurofilaments des fibres géantes de *Nereis diversicolor* O.F. Müller (Annélide Polychète). Biol. Cell, 48 : 6a.
- DHAINAUT-COURTOIS, N., DELACOURTE, A., TRAMU, G. et DENNAÏ, N. Light and electron microscope study of giant fibers of a marine annelid worm (*Nereis diversicolor* O.F. Müller) with special reference to cytoskeleton (inédit).
- DHAINAUT-COURTOIS, N. et RADZIZEWSKI, E. Use of an invertebrate nervous system for testing biological effects of microwaves light and electron microscopy study (à paraître).
- DOHI, Y., OHBA, K. et YONEYAMA, Y. (1983). Purification and molecular properties of two Cadmium-binding glycoproteins from the hepatopancreas of whelk, *Buccinum tenuissimum*. Biochim. Biophys. Acta, 745 : 50-60.
- DURCHON, M. (1952). Recherches expérimentales sur deux aspects de la reproduction chez les Annélides Polychètes : l'épitoquie et la stolonisation. Ann. Sc. Nat. Zool. et Biol. Anim., 14 : 119-206.
- DURCHON, M. et SCHALLER, F. (1963). Application de la méthode de culture organotypique aux recherches endocrinologiques chez les Annélides Polychètes. C. R. Acad. Sci., 256 : 5615-5617.

DWIVEDI, C. (1983). Cadmium-induced sterility : possible involvement of the cholinergic system. Arch. Environ. Contamin. Toxicol., 12 : 151-156.

- EVANS, R.M., PATIERNO, S.R., WANG, D.S., CANTONI O. et COSTA, M. (1983). Growth inhibition and metallothionein induction in Cadmium resistant cells by essential and non-essential metals. Molec. pharmacol., 24 : 77-83.
- EVERARD, L.B. et SWAIN, R. (1983). Isolation, characterization and induction of metallothionein in the stonefly *Eusthenia spectabilis* following exposure to Cadmium. Comp. Biochem. Physiol., 75 C : 275-280.
- FAIN-MAUREL, M. A., CASSIER, P. et ALIBERT, J.(1973). Etude infracérébrale et cytochimique de l'intestin moyen de *Pterobius maritimus* Leach en rapport avec ses fonctions excrétrice et digestive. Tissue and Cell, 5 : 603-631.
- FERARD J. F., JOUANY, J. M., TRUHAUT, R. et VASSEUR P. (1983). Accumulation of Cadmium in a freshwater food chain experimental model. Ecotoxicol. Environ. Saf., 7: 43-52.
- FOWLER A.J., SINGH, D.N. et DWIVEDI, C. (1982). Effect of Cadmium on meiosis. Bull. Environm. Contam. Toxicol., 29 : 412-415.
- FUJIKI, M. (1972). The transitional condition of Minamata Bay and the neighbouring sea polluted by factory waste water containing mercury. 6th Int. Conf. Water Poll. Res. Paper n° 12.
- GABE, M. (1953). Sur quelques applications de la coloration par la fuchsine paraldéhyde. Bull. Micr. Appl., 3 : 153-162.
- GAUTHIER, M. et FLATAU, G. (1977). Concentration et mode de fixation du Cadmium par un Vibrio marin. C. R. Acad. Sc. Sér. D, 285 : 817-820.
- GEORGE, S.G. (1983a). Heavy metal detoxication in the mussel Mytilus edulis Composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). Comp. Biochem. Physiol., 76 C : 53-57.
- GEORGE, S.G. (1983b). Heavy metal detoxication in Mytilus kidney. An in vitro study of Cd- and Zn-binding to isolated tertiary lysosomes. Comp. Biochem. Physiol., 76 C : 59-65.
- GEORGE, S.G. et PIRIE, B.J.S. (1979). The occurence of Cadmium in subcellular particles in the Kidney of the marine mussel *Mytilus edulis*, exposed to Cadmium : the use of electron microprobe analysis. Biochem. Biophys. Acta, 580 : 234-244.
- GEORGE, S.G. et PIRIE, B.J.S. (1980). Metabolism of Zinc in the mussel Mytilus edulis (L.) a combined ultrastructure and biochemical study. J. Mar. Biol. Ass., 60 : 575-590.

- GEORGE, S.G., PIRIE, B.J.S. et COOMBS, T.L. (1975). Absorption accumulation and excretion of iron complexes by *Mytilus edulis* (L.). Proceed. Int. Conf. Heavy metals in the Environment, 27-31: 887-900.
- GEORGE, S.G., PIRIE, B J.S. et COOMBS T.L. (1980). Isolation and elemental analysis of metal rich granules from the kidney of the scallop, *Pecten maximus* (L.). J. exp. Mar. Biol.Ecol., 23 : 71-84.
 - HASEGAWA, Y. (1973). Some facts and documents relating to the health aspects of Cadmium pollution in Japan (1946-1972). Paper presented to the CFCD. Sector group on the occurence of chemical in the environment Patis 14-16 march 1973 (In AUBERT, M., 1983).
 - HOLT, D. et WEBB, M. (1983). Intestinal and hepatic binding of Cadmium in the neonatal rat. Arch. Toxicol., 52 : 291-301.
 - HOPKIN, S.P. et NOTT, J.A. (1979). Studies on the digestive cycle of shore crab *Carcinus maenas* (L.) with special reference to the B cells in the hepatopancreas. J. Biol. Assoc. U.K., 60 : 891-907.
 - HOWELL, R. (1982). The secretion of mucus by marine nematodes (Enoplus spp.). A possible mechanism influencing the uptake and loss of heavy metal polluants. Nematologica, 28 : 110-114.
 - HOWELL, R. (1983). Heavy metals in marine nematode : uptake tissue distribution and loss of copper and zinc. Mar. Poll. Bull., 14, 263-268.
 - HOWELL, R. et SMITH, L. (1983). Binding of heavy metals by the marine nematode Enoplus brevis Bastian, 1865. Nematologica, 29 : 39-48.
 - HRYNIEWIECKA-SZYFTER, Z. (1972). Ultrastructure of the hepatopancreas of *Porcellio scaber* in relation of the function of iron and copper accumulation. Bull. Soc. Amis Sc. Lett. Poznan, 12-13 : 135-142.
 - JERNELÖV, A., LANDNER, L. et LARSSON, T. (1975). Swedish perspective on mercury pollution. J.W.P.C.F., 47 : 810-822.
 - JOUANY, J.M., VASSEUR, P., FERARD, J.F. et TRUHAUT, R. (1981). Intérêt d'essais d'écotoxicité intégrée à moyen terme pour l'étude du transfert des toxiques par voie trophique. C. R. Acad. Sc. Sér. III, 292 : 1159-1161.
 - JULSHAMN, K. et ANDERSEN, K.J. (1983). Subcellular distribution of major and minor elements in unexposed molluscs in western Norway. I. The distribution and binding of Cadmium, Zinc and Copper in the liver and the digestive system of the oyster *Ostrea edulis*. Comp. Biochem. Physiol., 75 A ; 9-12.

- LYON, R., TAYLOR, M. et SIMKISS, K. (1983). Metal-binding proteins in the hepatopancreas of the crayfish (Anstropotambius pallipes). Comp. Biochem. Physiol., 74C : 51-54.
- McCARTER, J.A. et ROCH, M. (1983). Hepatic metallothionein and resistance to copper in juvenile Coho Salmon. Comp. Biochem. Physiol., 74 C : 133-137.
- MAINES, M.D., CHUNG, A.S. et KUTTY, R.K. (1982). The inhibition of testicular heme oxygenase activity by Cadmium. A novel cellular response. J. Biol. Chem., 257 : 14116-14121.
- MARGOSHE, M. et VALEE, B.L. (1957). A Cd protein from equine kidney cortex. J. Am. Chem. Soc., 79 : 149-150.
- MARTOJA, R., BOUQUEGNEAU, J. M. et VERTHE, C. (1983). Toxicological effects and storage of Cadmium and Mercury in an insect *Locusta migratoria* (Orthoptera). J. Invert. Pathol., 42 : 17-32.
- MARTOJA, M. et MARTOJA, R. (1984). La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. Le Courrier du C.N.R.S., 54 : 32-37.
- MARTOJA, R. et TRUCHET, M. (1983). Rôle d'un ommochrome dans l'excrétion de métaux essentiels (Cu, Zn) et dans l'excrétion à l'égard de contaminants métalliques (Ag, Cd) chez un Insecte (Locusta migratoria, Orthoptère). C. R. Acad. Sc., Sér. III, 297 : 219-224.
- MARTOJA, R., TRUCHET, M. et BOUQUEGNEAU, J.-M. (1982). Une néphropathie provoquée par le Cadmium chez l'Anguille adaptée à l'eau de mer. C. R. Acad. Sc. Sér. III, 295 : 369-374.
- MASON, A.Z. et NOTT, J.A. (1981). The rôle of intracellular biomineralised granules in the regulation and detoxication of metals in gastropods with special reference to the marine prosobranch *Littorina littorea*. Aquatic Toxicol., 1 : 239-256.
- MEREAU, M. (1983). Utilisation de Tetrahymena pyriformis synchrone en écotoxicologie : Contribution à l'étude des effets du Thirame (fongicide dithiocarbamate) sur l'ultrastructure cellulaire. Thèse 3ème Cycle, Université de Lille I, 1-65.
- MURAKAMI, M., THOYAMA, C., SANO K., KAWAMURA, R. et KUBOTA, K. (1983). Autoradiographical studies on the localization of metallothionein in proximal tubular cells on the rat kidney. Arch. Toxicol., 53 : 185-192.

- NOËL-LAMBOT, F. (1976). Distribution of Cd, Zn and Cu, in the mussel *Mytilus* edulis. Existence of Cd-binding proteins similar to metallothioneins. Experientia, 32 : 324-325.
- NOEL-LAMBOT, F. et BOUQUEGNEAU, J.-M. (1977). Comparative study of toxicity, uptake and distribution of Cadmium and mercury in the sea water adapted eel Anguilla anguilla, Bull. Environ. Contamin. Toxicol., 18 : 418-424.
- NOVIKOFF, A.B. et HOLTZMAN, E. (1976). Cells and organelles, 2nd Ed. Modern Biology Series. Holt Rinehart and Winston, New York. *In* BARBARA B.E. (1982). The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues. Biol. Rev., 57 : 621-667.
- PERRY, H.M. Jr, ERLANGER, M.W. et PERRY, E.F. (1983). Effect of a second metal on Cadmium-induced hypertension. Arch. Environ. Health, 38 : 80-85.
- POPHAM, J.D. et WEBSTER, J.M. (1982). Ultrastructural changes in Caenorhabditis elegans (Nematoda) caused by toxic levels of Mercury and Silver. Ecotoxicol. Environm. Saf., 6 : 183-189.
- PROBST, G.S., BOUSQUET, W.G. et MYAT, S. (1977). Kinetics of Cadmium-induced hepatic and renal metallothionein synthesis in the mouse. Toxicol. appl. Pharmacol., 39 : 51-60.
- REVIS, N.W., ZINSMEISTER, A.R. et BULL, R. (1981). Artherosclerosis and hypertension induction by lead and cadmium ions : an effect prevented by Calcium ion. Proc. Nat.Acad. Sci., 78 : 6494-6498.
- REYNOLDS, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol., 142 : 310-325.
- SAIKH, Z.A. et SMITH, J.C. (1977). The mechanisms of hepatic and renal metallothionein biosynthesis in Cadmium-exposed rats. Chim. Biol. Interactions, 19 : 161-171.
- SAKSENA S., WHITE, M.J., MERTZLUFFT, J., et LAU, I.F. (1983). Prevention of Cadmium-induced sterility by zinc in the mare Rat. Contraception, 27, 521-535.
- SIMKISS, K. (1976). Intracellular and extracellular rootes in biomineralisation. Symp. Soc. Exp. Biol., 30 : 423-444.
- SIMKISS, K. (1977). Biomineralisation and detoxication. Calcified tissue Research, 24 : 199-200.
- SIMKISS, K. (1979). Metal ions in cells. Endeavour, New series, 3 : 1-6.
- SIMKISS, K. (1981). Calcium and pyrophosphate and cellular pollution. Trds Biochem. Sc., 3-5.

- SIEWICKI, T.C. SYLDOWSKI, J.S. et WEBB, E.S. (1983). The nature of Cadmium binding in commercial eastern oysters (*Crassostrea virginica*). Arch. Envir. Contam. Toxicol., 12 : 290-304.
- SOHAL, R.S., PETERS, P.D. et HALL, T.A. (1976). Fine structure and X-ray microanalysis of mineralised concretions in the Malpighian tubules of the housefly, *Musca domestica*. Tissue and Cell, 8 : 447-458.
- SOHAL, R.S., PETERS, P.F. et HALL, T.A. (1977). Origine, structure, composition and age dependance of mineralised dense bodies (concretions) in the midgut epithelium of the adult housefly Musca domestica. Tissue and Cell, 9 : 87-102.
- STUVE, J. et GALL, P. (1970). Role of mitochondria in the handling of gold by the kidney : a study by electron microscopy probe microanalysis. J. Cell Biol., 44 : 667-676.
- SUZUKI, K.T. et MAITANI, T. (1978). Cadmium-113 FT NMR-Spectra of rabbit liver metallothioneins. Sep. Experentia, 34 : 1449-1450.
- SUZUKI, K.T., OHNUKI, R. et YAGUCHI, K. (1983). Post-mortem and *in vitro* dimerization of metallothionein in Cadmium accumulated rat liver and kidney. Toxicol. Let., 16 : 77-84.
- SYVERSEN, T.L.M. (1982). Effects of repeated dosing of metyl-mercury *in vivo* protein synthesis in isolated neurones.
- TANAKA, T., HAYASHI, Y. et ISHIZAWA, M. (1983). Subcellular distribution and binding of heavy metals in the untreated liver of the Squid ; comparison with data from the livers of Cadmium and Silver exposed rats. Experientia, 39 : 746-748.
- TEMPLETON, D.M. et CHERIAN, M.G. (1983). Cadmium and Hypertension. TIPS Reviews. Trds Pharmacol. Sc., 4 : 501-503.
- WASSERMAN, R.M. et KALLFELZ, F.A. (1970). Transport of calcium across biological membranes. In Biological calcification (ed. H. Schraer), 313-345, Amsterdam.
- WESER U., DONAY, F. et RUPP, H. (1973). Cadmium-induced synthesis of hepatic metallothionein in Chicken and Rats. FEBS Let. 32, 171-173.
- WIGGLESWORTH, V.B. et SALPETER, M.M. (1962). Histology of the Malpighian tubules in *Rhodnius prolixus* Stal. (Hemiptera). J. Insect. Physiol., 8 : 299-307.
- YAMAMURA, M., MORI, T. et SUZUKI, K.T. (1981). Metallothionein induced in the earthworm. Experientia, 37 : 1187-1189.

- YAMAMURA, M., SUZUKI, K.T., HATAKEYAMA, S. et KUBOLA, K. (1983). Tolerance to Cadmium and Cadmium-binding proteins induced in the midge larva *Chironomus yoshimatsui* (Diptera Chironomidae). Comp. Biochem. Physiol., 75 C : 21-24.
- YONEYAMA, M., SHARMA, R.P. et KLEINSCHUSTER, S.J. (1983). Methylmercury and organogenesis *in vitro* : inhibition of Glutamine synthetase induction and alteration of selected cellular enzymes in aggregation of dissociated embryonic chick retinal cells. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 12 : 157-162.

PLANCHES

.

•

.

. •

PLANCHES I à V

CULTURE ORGANOTYPIQUE

EFFETS DU CADMIUM ET DU MERCURE SUR L'ACTIVITE CEREBRALE ET SUR LES PRODUITS GENITAUX

Planches I, II et V - Les prostomiums de *Nereis* intoxiquées (femelles ayant un diamètre ovocytaire voisin de 80 µm) sont associés à des parapodes de mâles normaux, immatures ; durée de la culture : 7 jours.

<u>Planches III et IV</u> - Les parapodes de mâles immatures intoxiqués *in vivo* sont mis en culture pendant 7 jours.

PLANCHES VI à XX

ETUDE AUX MICROSCOPES PHOTONIQUE ET ELECTRONIQUE DES EFFETS DU CADMIUM ET DU MERCURE SUR DIFFERENTS TISSUS DE LA NEREIS

Planches VI, VII, X, XIII à XVIII : Cadmium

Planches VIII à XI, XIX et XX : Mercure

Planche XII : Epithélium intestinal témoin

PLANCHE I

- Culture organotypique
- Effets du Cadmium sur l'activité cérébrale
- Fig. A : <u>Parapode témoin</u>. Les produits génitaux ont évolué en spermatozoïdes (C) X 1049.
- Fig.B : <u>Association témoin</u> (Cerveau non intoxiqué). Les amas de spermatogonies () restent bloqués. X 107

Figs. C et D : Association 22 ppm/11j

- Fig. C : Cerveau d'aspect normal. Les cellules Fp⁺ sont nombreuses dans le noyau 20 (N 20). Au niveau de l'épiderme (Ep) beaucoup de cellules à mucus sont visibles. La flèche indique le sens antéropostérieur. X 107
- Fig. D : Dans le parapode correspondant, les produits génitaux se présentent toujours sous forme d'amas de spermatogonies (). X 1049

Figs. E et F : Association 44 ppm/ 4 j.

- Fig.E : Ultrastructure des produits génitaux toujours bloqués sous forme de spermatogonies. Les noyaux (N), l'appareil de Golgi () ont une apparence normale. L'existence de granules à densification focale (gdf) est également normale. Le seul caractère pathologique est la densification de la matrice de certaines mitochondries (m). X 11600.
- Fig.F : Pour le cerveau correspondant, les corps pédonculés (Cp) et les yeux (OA et OP) sont normaux. Des cellules FP⁺ sont observées au niveau du noyau 20 (N 20). Les cellules à mucus sont nombreuses dans l'épiderme (Ep). La flèche indique le sens antéropostérieur du cerveau. X 107.



PLANCHE II

- Culture organotypique

- Effets du Cadmium sur l'activité cérébrale

Les prostomiums de *Nereis* intoxiqués (femelles ayant un diamètre ovocytaire voisin de 80 µm) sont associés à des parapodes de mâles normaux, immatures. Durée de la culture : 7 jours.

Fig. A : Association (44 ppm/4j).

Parapode provenant de l'association. Les amas de spermatocytes sont en prophase de méiose (<a>). X 1049.

Figs.B et C : Association (55 ppm/4j).

- Fig. B : Dans le parapode, le virage est plus avancé que pour la dose précédente (Fig.A). Plusieurs spermatides () sont déjà libres. X 1049.
- Fig.C : Pour le cerveau correspondant, la structure d'ensemble est assez bien conservée. La cuticule (Cut) limite bien l'épiderme (Ep) au niveau duquel les cellules à mucus sont abondantes. De nombreuses cellules FP⁺ (V) sont observées au niveau du noyau 20 (N 20). X 107.

Figs. D et E : Association (44 ppm/11j).

- Fig.D : Le cerveau rappelle celui de la figure précédente. On constate un début d'altération de l'épiderme (Ep). X 107.
- Fig. E : Dans le parapode, les tétrades se dissocient (C). Beaucoup de spermatides sont libres. X 1049.

Figs. F et G : Association (55ppm/11j).

- Fig. F : Le cerveau est très altéré. Les cellules des corps pédonculés (Cp) sont dissociées. Des cellules Fp⁺ sont toujours présentes dans le noyau 20 (N 20). X 107.
- Fig. G : Dans le parapode correspondant, on observe toujours quelques tétrades, mais aussi des spermatozoïdes. X 1049.



PLANCHE III

- Culture organotypique

- Effets du Cadmium sur les produits génitaux

Parapodes de mâles immatures intoxiqués *in vivo* par 55 ppm pendant 4 jours et mis en culture pendant 7 jours.

- Fig. A : Au temps t_o de la culture, les produits génitaux se présentent sous forme d'amas de spermatogonies. Les organites cellulaires: noyaux (N), appareil de Golgi (), corps denses (cd) et les granules mitochondries (m) ont une apparence normale. Les grains de glycogène semblent également normaux. La flèche () montre un corps dense autophagique. X 11 600.
- Fig. B : A la fin de la culture, la spermatogenèse est terminée. Les spermatozoïdes formés paraissent normaux et sont conformes à la description faite par BERTOUT (1976).a : axonéme; d : matériel dense, gl : glycogène, TA : tube axial N : noyau, m : mitochondrie, Cd : centrioledistal, F : flagelle x 20 000



PLANCHE IV

- Culture organotypique
- Effets du Cadmium sur les produits génitaux
- Microscopie électronique

Parapodes de mâles immatures intoxiqués *in vivo* par 44ppm pendant 11 jours et mis en culture pendant 7 jours.

- Fig. A : Au temps t_o de la culture, les produits génitaux se présentent sous forme de tétrade de spermatides. Les noyaux (N) peuvent être encore considérés comme normaux. Mais la vacuolisation est très poussée dans le cytoplasme. Les mitochondries (m) perdent leurs crêtes et présentent des zones plus denses aux électrons. X 9 600
- Fig. B : Egalement au temps t_o de la culture, certains noyaux ont une chromatine presque uniformément dense. On voit une mitochondrie (m) ayant complètement perdu ses crêtes. L'appareil de Golgi (2) présente une dilatation de l'extrémité de certains saccules et une dilatation totale du saccule le plus interne. X 20 000.
- Fig. C : A la fin de la culture, les spermatides restent bloquées. Les mitochondries (m) sont très denses. L'aspect du noyau est complètement modifié. Les débris cellulaires et les corps autophagiques sont abondants. X 11 600.



PLANCHE V

- Culture organotypique
- Effets du Mercure sur l'activité cérébrale

Les prostomiums de *Nereis* intoxiqués (femelles ayant un diamètre ovocytaire voisin de 80 µm) sont associés à des parapodes de mâles normaux, immatures. Durée de la culture 7 jours.

Figs. A et B : Association (0,36 ppm/4j)

Fig. A : Dans le parapode, les produits génitaux ont évolué en spermatides (. X 1049

Fig. B : Le cerveau correspondant paraît normal mais de nombreuses cellules Fp⁺ sont vacuolisées (➤) au niveau du noyau 20 (N 20). X 107.

Figs. C et D : Association (0,75 ppm/4j)

- Fig. C : Les produits génitaux ne sont pas visibles. La strusture d'ensemble du parapode (Pa) est assez bien conservée. X 107.
- Fig. D : Le cerveau est très altéré. Au niveau de l'épiderme (Ep) on observe beaucoup de cellules à mucus. Les corps pédonculés (Cp) sont presque complètement disparus. X 107.



PLANCHE VI

- Effets du Cadmium sur le cerveau

Coupes sagittales. Observations au microscope photonique de la région des corps pédonculés. X 436.

Fig. A : 22 ppm/ 4j

Les corps pédonculés (Cp) ont le même aspect que ceux des animaux normaux. La capsule (ca) adhère au cerveau. Des cellules à mucus (O) sont visibles dans l'épiderme.

Fig. B : 44 ppm/11j

La cuticule (Cut), l'épiderme (Ep), sont apparemment normaux. Les corps pédonculés (Cp) semblent moins compacts que dans le cas précédent. Le reste du cerveau paraît normal.

Fig. C : 55 ppm/4j

On remarque un début de désorganisation. Les cellules des corps pédonculés (Cp) commencent à se dissocier. Certaines cellules nerveuses sont vacuolisées (v).

Fig. D : 55 ppm/11j

L'épiderme a complètement disparu de cette partie du prostomium. Les cellules des corps pédonculés (Cp) sont dissociées. La capsule se détache du cerveau. La masse fibreuse formée par les axones a perdu sa structure.



PLANCHE VII

- Effets du Cadmium sur la chaîne nerveuse

Figs A - E et G : coupes transversales. X 436

Fig. E : ultrastructure d'une fibre géante latérale

Fig. A : 22 ppm/4j

La structure de la chaîne nerveuse (CN) est relativement normale. On ne note pas de modifications au niveau des fibres géantes latérales. Certains péricaryons des cellules neurosécrétrices (ns) sont néanmoins vacuolisés.

Fig. B : 22 ppm/11j

La structure est toujours relativement normale tant au niveau de la névroglie (ng) qu'au niveau des fibres géantes latérales et médianes (f g l et f g m). On peut toutefois signaler une légère dissociation de l'ensemble des tissus.

Fig. C : 44 ppm/4j

On retrouve le même aspect morphologique que chez l'animal traité par 22 ppm/4j (Fig.A). Certaines cellules neurosécrétrices (ns) sont encore très chargées en matériel peptidique.

Fig. D : 44 ppm/11j

Les modifications sont encore légères au niveau de la chaîne. Le vaisseau ventral semble dilaté.

Fig. E : 55 ppm/4j

Même à cette dose, les cellules neurosécrétrices (ns) persistent. Le neuropile de la chaîne nerveuse est un peu vacuolisé.

Fig. F : 55 ppm/4j

L'ultrastructure de la fibre géante latérale est comparable à celle décrite antérieurement pour la fibre d'un animal non intoxiqué (DENNAI, 1982, DHAINAUT-COURTOIS et al, 1984) X 20 000

```
Fig. G : 55 ppm/11j
```

La chaîne nerveuse est complètement altérée. Cependant l'épiderme et la cuticule semblent relativement conservés.



PLANCHE VIII

- Effets du Mercure sur le Cerveau

Coupes sagittales. Observations au microscope photonique de la région des corps pédonculés. X 436.

Fig. A : 0,075 ppm/4j

```
Fig. B : 0,18 ppm/4j
```

Dans ces deux cas, la structure est bien conservée. Au niveau de l'épiderme (Ep), les cellules à mucus (O) paraissent très chargées. La cuticule (Cut) est normale. La capsule (Ca) adhère bien au cerveau et les corps pédonculés (Cp) sont compacts. On peut parfois noter la vacuolisation au niveau de quelques péricaryons.

Fig. C : 0,36 ppm/4j

L'épiderme (Ep) est détruit. Seuls, persistent la cuticule (Cut) et quelques débris cellulaires. Le cerveau est par contre peu altéré.

Fig. D : 0,75 ppm/4j

On note une dissociation au niveau des péricaryons et des axones des cellules des corps pédonculés (Cp).



PLANCHE IX

- Effets du Mercure sur la chaîne nerveuse

Coupes transversales. Observations au microscope photonique. X 436.

Fig. A : 0,036 ppm/3semaines

La chaîne nerveuse (CN) et l'épiderme ont une apparence normale. Mais le vaisseau semble dilaté.

Fig. B : 0,075 ppm/4j

- Fig. C : <u>0,36 ppm/4j</u> Dans ces deux cas, la structure générale est apparemment bien conservée.
- Fig. D : 0,75 ppm/4j

La chaîne nerveuse (CN) et l'épiderme sont altérés. La cuticule est détachée.



PLANCHE X

- Effets du Cadmium et du Mercure sur l'oeil

Coupes sagittales. Observations au microscope photonique.

Fig. A : 55 ppm Cd/11j

L'oeil antérieur (OA) ne présente aucune différence avec l'oeil d'un ver non intoxiqué. L'épiderme (Ep) est normal. X 436

Fig. B : 55 ppm Cd/11j + Culture 7j

L'effet du Cadmium continue après l'arrêt de l'intoxication et pendant la culture "normale". Seule, une partie du corps pédonculé persiste. Les autres structures sont méconnaissables. X 436.

Fig. C : <u>0,75 ppm Hg/4j</u> Détail de la Fig.D X 436

Fig. D : 0,75 ppm Hg/4j

L'épiderme (Ep) est complètement détruit; par contre, les autres structures (oeil antérieur (OA) muscles (M), système nerveux (SN)) sont encore bien visibles. X 107.



PLANCHE XI

- Etude comparative de la toxicité du Mercure utilisé sous les formes chlorure ou méthyl.

Coupes transversales. Observations au microscope photonique.

Fig. A : Intestin (I) témoin

Les noyaux des cellules intestinales sont nettement visibles. Des ovocytes (Ov) sont présents dans le coelome. Remarquer également la disposition et l'aspect de la chaîne nerveuse (CN) et des muscles ventraux (M). X 107.

Fig. B : 0,36 ppm Hg/4j (Hgc12)

L'épithélium intestinal (I), l'ovocyte (Ov) et les muscles (M) sont peu modifiés. X 436.

Fig. C : 0,75 ppm Hg/4j(Hgc12)

L'épithélium intestinal (I) ne présente pas de modifications importantes. Par contre, l'épiderme (repérable par la cuticule) et les fibres musculaires (M et Mo (muscle oblique)) sont fortement altérés. X 436.

Fig. D : 0,039 ppm/72 h (MeHg)

L'épithélium intestinal (I) se désorganise, les débris cellulaires sont rejetés dans la lumière intestinale. X436.




PLANCHE XII

Ultrastructure de l'épithélium intestinal d'un ver non intoxiqué.

- Fig. A : Région apicale de l'intestin avec de nombreuses microvillosités (mv) et des formations denses apicales (fad) caractéristiques des entérocytes. Les mitochondries (m) sont abondantes. Certaines cellules sont riches en ergastoplasme (erg). X 20 000.
- Fig. B : Région basale de l'intestin, séparée du muscle (M) par la lame basale (L.b). Le vaisseau (V) se prolonge à l'intérieur de l'épithélium par évaginations. Les mitochondries (m) sont nombreuses. Les noyaux (N) sont allongés selon le grand axe cellulaire. L'ergastoplasme (erg) est développé dans certaines cellules. X 7 200.





PLANCHE XIII

Histopathologie de l'épithélium intestinal après intoxication par le Cadmium.

Coupes transversales de la région moyenne de l'intestin. Observations au microscope photonique. X 436. ***** : lumière intestinale

Fig. A : 22 ppm/4j

L'épithélium intestinal (I) a une structure semblable à celle du témoin. Le vaisseau (V) se trouvant dans la région basale est riche en cellules. Le muscle (M) a un aspect normal.

Fig. B : <u>22 ppm/11j</u> L'épithélium intestinal (I) a un aspect normal.

Fig. C : <u>44 ppm/4j</u> La hauteur de l'épithélium intestinal (I) diminue.Les cellules sont un peu altérées.

Fig. D : <u>44 ppm/11j</u> L'intestin (I) se désorganise, le vaiseau ventral (V) s'hypertrophie.

Fig. E : 55 ppm/4j

L'intestin (I) est complètement désorganisé. Les débris cellulaires sont rejetés dans la lumière intestinale (*). Les cellules déjà décrites dans le vaiseau deviennent nombreuses. Du côté coelomique, les cellules sont également fortement altérées.

Fig. F : 55 ppm/11j

L'épithélium intestinal (I) a complètement disparu. Les vaisseaux (V) ont proliféré. Le muscle (M) qui entoure l'intestin est très altéré. Dans la lumière intestinale (*), persistent quelques vestiges de l'épithélium intestinal.



PLANCHE XIV

Ultrastructure de l'épithélium intestinal après intoxication par le Cadmium (22 ppm/4j).

- Fig. A : Les microvillosités (m.v), les formations denses apicales (fad) les mitochondries (m) et le noyau (N) semblent normaux. Les saccules golgiens (μ) sont denses aux électrons. Des sphérocristaux (sc) apparaissent dans le cytoplasme. Leur diamètre est de 0,4 μm/0,2 μm à 0,55 μm/Q35 μm.X 20 000.
- Fig. B : Détail des formations ergastoplasmiques (erg) présentes dans certaines cellules. Dans les autres sections cellulaires, les vacuoles sont assez nombreuses. Certaines se transforment peut être en sphérocristaux. X 11 600.



PLANCHE XV

Ultrastructure de l'épithélium intestinal après intoxication par le Cadmium (22 ppm/11j).

- Fig. A : Zone apicale de l'intestin. Les microvillosités se racourssissent et peuvent même disparaître. Les formations denses apicales (f.a.d) semblent normales. Les mitochondries (m) ont une matrice et présentent parfois une configuration particulière. Des noyaux (N) sont moins opaques aux électrons que ceux d'un ver témoin. Les sphérocristaux (sc) ont un diamètre de 1,03 μm/ 0,86 μm à 1,55 μm/0,86 μm. Ils présentent des formations denses concentriques. X 5 800
- Fig. B : Partie basale de l'intestin. Remarquer les couches musculaires (M) longitudinales et circulaires et la lame basale (Lb) où circule le sang. Dans les cellules intestinales, les noyaux sont assez clairs. Une cellule contient une formation ergastoplasmique (erg) assez développée alors qu'une autre cellule contient un corps résiduel. Les mitochondries (m) ont encore un aspect relativement normal. X 5 800.



PLANCHE XVI

Ultrastructure de l'épithélium intestinal après intoxication par le Cadmium (44 ppm/4j).

- Fig. A : Noyau (N) à matrice dense et à nucléole hypertophié contre lequel s'accolent des mottes de chromatine. Les mitochondries (m) ont perdu leur membrane et sont devenues très denses aux électrons. X 20 000.
- Fig. B : Cellule présentant un corps dense de type lysosomal(Cd) entouré par des mitochondries (m). Les sphérocristaux (sc) montrent bien l'alternance de zones concentriques denses et claires. Leur diamètre varie entre 0,75 μm/0,50 μm à 1,1 μm/ 0,45 μm. X 20 000.
- Fig. C : Les microvillosités (mv) sont courtes et moins nombreuses que dans l'intestin normal. Les formations apicales denses (fad) deviennent rares et certains fragments de celles-ci, enfoncés assez profondément, sont entourés par des mitochondries (Deux sphérocristaux (sc) sont visibles entre deux gouttelettes lipidiques vidées de leur contenu. X 20 000.



Angel Martin Martin Martin

PLANCHE XVII

Ultrastructure de l'épithélium intestinal après intoxication par Cadmium. Composition entre 44 ppm/4j et 44 ppm/11j.

Fig. A : 44 ppm/4j

Les microvillosités (mv) sont courtes et rares. Les formations apicales denses (fad) sont encore visibles. Les mitochondries sont opaques aux électrons. Noter la présence d'une vacuole autophagique (va). Au dessus des lobules lipidiques, les sphérocristaux (sc), de diamètre 0,33 μ m/0,2 μ m à 0,93 μ m/ 0,52 μ m, sont nombreux et toujours chargés. X 9 600.

Fig. B : 44 ppm/11j

Zone apicale remarquable par la pauvreté en organites cellulaires et en enclaves inertes. Les microvillosités (mv) sont totalement absentes. Quelques formations apicales denses persistent. Les corps denses de type lysosomial (Cd) sont très fréquents, les noyaux (N) sont dégénérescents. X 5 800.







PLANCHE XVIII

Ultrastructure de l'épithélium intestinal après intoxication par le Cadmium (55 ppm).

Fig. A : 55 ppm/4j

Zone apicale moins dégradée qu'avec la dose 44 ppm appliquée pendant 11 j (P1.XVII, Fig.B). Les microvillosités (mv) sont presque complètement disparues. Des fragments des formations apicales denses (fad) sont encore visibles. Les mitochondries (m) sont très denses (Om = mitochondries qui se spiralisent). Dans le noyau (N), la chromatine est assez dense et le nucléole semble hypertrophié. Les sphérocristaux (sc) de 0,31 μ m/0,31 μ m à 1,04 μ m/0,52 μ m sont peu changés. X 9 600.

Fig. B : <u>55 ppm/4j</u>

Zone basale à mitochondries (m) très denses et qui pourraient évoluer en simple corps dense apical (Cd) par perte de leur crête. L'ergastoplasme (erg) est hypertrophié et fortement altéré. X 20 000.

Fig. C : 55 ppm/11j

Zone basale. Le vaisseau (V) est bien développé. Il n'est séparé de la lumière intestinale (*) que par la lame basale (Lb) encore reconnaissable. A côté des débris cellulaires (r.c) on observe des formations hétérogènes (*) limitées par une membrane. X 15 400.





PLANCHE XIX

Ultrastructure de l'épithélium intestinal après intoxication par le Mercure (0,36 ppm/4j/HgCl₂).

- Fig. A : Zone apicale. Les microvillosités (mv) sont courtes. Les formations apicales denses (fad) sont peu apparentes. L'ergastoplasme (erg) est organisé. Certaines mitochondries présentent une légère densification de leur matrice (m). Les corps denses fCd) sont nombreux. Dans certains noyaux, l'hétérochromatine est assez développée. Les sphérocristaux (sc) ont un diamètre allant de 0,31 µm/0,20 µm à 0,70 µm/0,41 µm. X 9 600.
- Fig. B : Zone apicale. L'ergastoplasme développé (erg) contient des corps denses résiduels (+). D'autres corps denses (Cd) sont libres dans le cytoplasme. Les noyaux (N) ont une matrice claire. X 9 600.



PLANCHE XX

Ultrastructure de l'épithélium intestinal après intoxication par le Mercure (0,75 ppm/4j/HgCl₂).

Fig. A : Zone apicale. Les microvillosités (mv) et les formations apicales denses (fad) sont plus rares que dans le cas du Cadmium appliqué à la dose 44 ppm/4j. Les sphérocristaux (sc) sont moins nombreux et moins chargés (P1.XVII, Fig.A). Leur diamètre est de 0,68 µm/0,51 µm à 1,09 µm/1,20 µm.X 5 800.

Fig. B : L'ergastoplasme (erg) est enroulé et présente une densification interne. X 29 000.



