

Écotoxicologie

LES CRIQUETS SAUVAGES, EXCELLENTS INDICATEURS DES ZONES POLLUÉES PAR LES HYDROCARBURES POLYAROMATIQUES (HAP) MISE AU POINT MÉTHODOLOGIQUE

par

Jacques BOUCHARD

et Christiane BOUCHARD-MADRELLE¹

Comme nous le disait F. ZAJDELA, il devint bien difficile, à partir des années 80, d'expérimenter directement sur des Mammifères ; sauf, bien sûr, à utiliser des cultures cellulaires sinon tissulaires – l'analyse des effets des substances toxiques et, en particulier, des cancérigènes restant naturellement possible et indispensable en clinique humaine. En conséquence, certains biologistes furent amenés à expérimenter, « comparativement », sur la faune aquatique, poissons en particulier. En cherchant à évaluer des effets de perturbations anthropiques, il y avait aussi une fenêtre considérable avec un autre type de « matériel », les Invertébrés du sol ou de la végétation proprement dite : Mollusques, Crustacés ou Insectes liés à des biotopes particuliers, exposés à des perturbations de plus en plus inquiétantes.

Il était étonnant de constater, autour des années 80, que les Insectes herbivores ne faisaient guère l'objet de recherches éco-toxicologiques. Sauf dans le domaine des insecticides. Directement concernés par des conditions chimiques difficiles, les Acridiens sont pourtant un matériel de choix ; nous l'exploitons progressivement depuis des années : les réactions physiologiques lors de l'alimentation dans des milieux pollués par des HAP, purs ou en mélanges, nous ont permis de constater des troubles divers très importants. Il est question de troubles de l'activité mitotique, de la régénération après intoxication et des déséquilibres du fonctionnement de certains organes dont dépend la survie des espèces étudiées. Les troubles, estimés et évalués, peuvent faire l'objet de tests permettant de signaler le degré de dangerosité de perturbations chimiques de l'air et, secondairement, l'importance des perturbations durables des sols par les HAP.

1. MC UPS Orsay, rue Saint-Nicolas, 91940 Gometz-le-Châtel (bouchard-madrelle@dbmail.com).

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

Récemment, nous avons mis au point un test basé sur l'étude des glandes salivaires des criquets subissant une pollution par les HAP lors de leur alimentation. Il s'agit d'un test rapide. Dans le présent article, nous décrivons brièvement les étapes qui ont précédé son établissement. De plus, nous apportons des précisions complémentaires par rapport aux textes publiés et, d'autre-part, nous présentons une nouvelle méthode qui permettra, en examinant systématiquement les tubes de Malpighi, d'établir un test encore plus simple et rapide.

Mots-clés : criquets ; pollutions ; HAP ; montagne ; organes cibles ; troubles cellulaires ; modèles biologiques.

Wild grasshoppers as alternative biomodels in areas polluted by polyaromatic hydrocarbons (PAH): a methodological update

Due to economic and ethical problems with the use of vertebrates in medical and experimental studies, insects have been suggested as alternative models for toxicological research, whether pre-clinical or not, such as the testing of PAH.

A good knowledge of insect ecology and histological structure is therefore required if they are to be substituted for vertebrate models.

According to previous investigations of aquatic pollution with PAH, it is now important to study their prevalence in the air and their effects on phytophagous insects, which ingest them after deposition on soils and plants.

It is exceedingly difficult to get an accurate measure of the doses of PAH consumed by insects. However, experiments permit a first approach, sufficient to estimate and evaluate some selected effects on carefully targeted tissues and organs.

We used grasshoppers for strictly controlled laboratory experiments, as well as a new experimental line of work under natural alimentary conditions. We chose species harvested from "clean" or strongly polluted mountain meadows. Pollution depends on PAH adsorbed on air particles and is clearly modified by photolysis before being ingested with leaves, flowers, pollen, etc.

Step by step, we have demonstrated the importance of histopathology as a screening tool for the detection of novel disorders within the digestive tract, including the salivary glands and Malpighian tubules.

Mitotic and regenerating perturbations are first easily observed with pure PAH and with mixed PAHs absorbed and more or less metabolized by plants, which are finally eaten by grasshoppers.

According to our baseline survey, the first aspect of which had been clearly established using classic histological studies, we described a salivary test. Moreover, this test has been recently simplified: whole mounts of salivary glands coloured with toluidine blue provide a good means of precisely evaluating salivary destructive effects: indices (IDS) are established from RNA dispersion and cellular disorganization.

Moreover, it appeared useful to introduce a second test, based on the evaluation of destructive effects of PAH pollution in the epithelial tissue of Malpighian tubules, the cells of which can eventually be completely destroyed. Clearly, this M. test will be easier to apply in practice.

We conclude that it is reasonable to suppose that a methodical survey to study the effects of new sources of pollution, such as incinerators or poorly managed industrial plants, could be set up to study grasshopper anatomical disorders in detail. Such a survey should be relatively easy to establish with the aid of our grasshopper tests: for us, the solution appears to be just round the corner.

Keywords: grasshoppers; pollutions; PAH; mountains; methodologic steps; cellular disorders; bio-models.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques

Introduction et mise au point méthodologique

Le plan de ce texte n'est pas habituel : c'est le résumé de l'évolution d'une réflexion qui porte sur près de vingt ans. Elle est nourrie de séries de résultats très liés les uns aux autres. Nous parlons seulement des temps forts pour lesquels nous avons constaté des faits originaux lorsque des criquets sont intoxiqués par des hydrocarbures. Cela nous conduit à envisager la mise au point de tests. L'ensemble n'est pas seulement un résumé, c'est plutôt un synopsis évolutif qui contient de plus l'ébauche d'un nouveau développement, c'est-à-dire d'un autre test.

Il est pour nous souhaitable d'utiliser des Acridiens comme matériel-test pouvant renseigner sur l'importance des pollutions par hydrocarbures dans les milieux naturels de n'importe quelle zone rurale. C'est du moins ce que nous décrivons depuis plusieurs années essentiellement en montagne, là où la végétation est notoirement, et pourtant paradoxalement, imprégnée par des HAP transportés par l'air chargé en produits de pyrolyse ou de combustions incomplètes d'origine multiple.

Mais ce matériel d'analyse ne semble pas avoir la faveur des biologistes, quelle que soit leur spécialité ou les polluants testés.

On connaît, cependant, les travaux effectués sur la pollution aérienne des Lichens par l'équipe de Madame J. ASTA, mais beaucoup moins ceux qui sont entrepris avec des Invertébrés. Il y a ainsi des observations concernant des Mollusques du sol, mais elles portent sur la présence des métaux lourds (GOMOT-DE VAUFLEURY, 2000 ; FRITSCH, 2010). Citons aussi les travaux complexes de PONGE sur la faune foisonnante des Collemboles intoxiqués par des produits pétroliers résiduels répandus dans la nature sur des sites industriels (2004).

En ce qui concerne les mutagènes, plus ou moins cancérigènes, on sait que la recherche des effets des HAPs chez l'Homme, porte : i) sur le plan clinique, non expérimental, ou ii) dans des conditions expérimentales, en cultures de « tissus » ou en cultures cellulaires de nature très diverses. Bien entendu, en règle générale, et depuis plus de vingt ans, les études expérimentales ne sont plus effectuées sur les anciens animaux de laboratoire. C'est d'ailleurs pour cela que F. ZAJDELA (Inst. du Radium, à Orsay) nous avait suggéré, il y a longtemps, vers 1990, de travailler sur les criquets pour lesquels il avait tenté de voir dans quelle mesure leur présence ou leur absence en montagne pouvait dépendre de pollutions anthropiques. Ses conseils ont été déterminants.

Quoiqu'il en soit, les criquets sont a priori un excellent matériel-test. Végétariens, ils consomment des plantes qui, toutes, absorbent au niveau foliaire et racinaire, mais aussi transforment les HAPs grâce à des enzymes largement répandues, des hydroxylases dont les mécanismes d'action ont été analysés dès les années 70, même si les processus sont multiples – nous les avons précisés (BOUCHARD, 1987). Les produits initiaux sont des oxydes et des époxydes, etc. On sait que les « brouillards » pollués s'accumulent notablement à la surface des plantes où les HAP sont transportés en phase gazeuse et sous forme de gouttelettes en solution aqueuse.

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

Ils peuvent demeurer, éventuellement intacts, dans des revêtements cireux et surtout des huiles, foliaires ou florales, dans la mesure où ils ne sont pas d'emblée absorbés par les stomates. Mais notons par ailleurs qu'ils peuvent être modifiés auparavant, ou sur les végétaux, par le soleil et particulièrement par les UV (point confirmé par exemple en 1965, 1966 et 1967 par l'un de nous (J. BOUCHARD) quand nous les faisons agir sur un autre matériel biologique en milieu marin). Et la voracité des criquets est un atout considérable pour nos recherches.

Nous avons abordé le problème – éminemment complexe – des impacts des HAPs sur des criquets en procédant par étapes complémentaires, d'abord toutes histologiques, en analysant certains de leurs effets sur les divers organes.

Puis nous en sommes venus à mettre au point une méthode plus simple, plus directe, basée sur l'examen particulier d'anomalies des glandes salivaires extraites et colorées isolément pour des évaluations quantitatives ; celles-ci portaient sur la basophilie générale et donc la répartition intracellulaire des ARN. Le test, qui n'impliquait pas un travail histologique, s'est avéré facile à appliquer sans réelles difficultés techniques.

Mais il y a encore plus simple en procédant de la même façon, directement, sans histologie, par l'observation microscopique des tubes de Malpighi, organes excréteurs dont le métabolisme résume toute l'activité physiopathologique de chaque animal intoxiqué. Ce dernier point pourrait conduire à une sorte de conclusion provisoire.

Les étapes

Pour chaque étape, chaque temps fort de ce texte, nous préciserons brièvement quelles ont été les techniques employées avant de résumer ou de compléter les résultats publiés.

Remarques préliminaires (sans illustration dans ce texte) : constatant, depuis des années, la complexité du phénomène mitotique chez divers Vertébrés, il nous a paru absolument nécessaire d'évaluer chez nos criquets la vigueur mitotique des différents organes ; condition *sine qua non* pour chercher à comprendre ce que nous allions constater en analysant des effets produits par des substances toxiques sur notre nouveau « matériel », matériel utilisé en laboratoire ou prélevé dans des milieux naturels pollués. La colchicine a été beaucoup utilisée par le passé pour « bloquer » les mitoses des tissus les plus divers (DUSTIN, 1936), ce qui permettait, en principe, d'évaluer le potentiel de croissance chez des plantes ou des animaux variés. Nous avons donc appliqué ce test dit stathmocinétique par injections de colchicine. Or, chez la souris, ce test nous était apparu, dès les années 60, très insuffisant pour comparer efficacement des tissus normaux ou plus ou moins modifiés lors de situations pathologiques et, en particulier, précancéreuses. Ce point avait intéressé A. LACASSAGNE qui nous avait invités à présenter certains résultats lors d'une séance d'information à l'Institut Curie (BOUCHARD & MAY, 1967).

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polycycliques aromatiques

Ainsi, l'analyse précise des effets progressifs de la colchicine nous a permis de constater que la croissance de tissus pathologiques s'effectuait de manière radicalement différente de la normale et que la notion de vagues de mitoses devait être approfondie voire discutée. Les injections de cet alcaloïde, faites à heure fixe, entraînaient même des disparités inattendues suivant l'état du tissu, lesquelles montraient que de nouveaux troubles profonds de l'activité mitotique pouvaient être décelés suivant l'état, normal ou plus ou moins pathologique. C'est ainsi que nous avons pu analyser, disséquer précisément les étapes successives de la tumorigenèse épidermique par le benzo-a-pyrène, ou B(a)P. La méthode a été étendue à la tumorigenèse mammaire et pulmonaire. Un travail plus vaste, entrepris sur les conseils d'Antoine LACASSAGNE, nous a même permis de préciser que notre façon de faire permettait d'analyser comparativement des lésions épidermiques « testées » *in vitro* (BOUCHARD, 1971). Ensuite, nous avons étendu notre méthode en la testant sur divers tissus normaux ou tumoraux soumis à l'action d'autres antifusoriaux employés à cette époque comme anti-cancéreux (BOUCHARD, 1987), méthode générale qui entraînait ce que F. ZAJDELA appelait amicalement « l'effet Bouchard ! ».

Parallèlement, injectés à heure fixe chez une espèce de criquets de montagne, *Gomphocerus sibiricus* (Linné, 1767), les antimitotiques ont provoqué des réactions histologiques se rapprochant très étroitement de ce que nous avons vu chez la souris (J. BOUCHARD, 1998), ce qui tendrait à prouver que les phénomènes de mitogenèse ne sont pas fondamentalement distincts d'une espèce à une autre. Leurs tissus « en renouvellement » réagissent à la colchicine suivant un même schéma et une chronologie rappelant la souris (intestin, caeca, organes génitaux...). Ce qui n'est pas le cas, par contre, de la glande salivaire ou des tubes de Malpighi, organes dont la croissance est terminée chez l'adulte. Ces différences seront responsables des résultats que nous avons accumulés depuis.

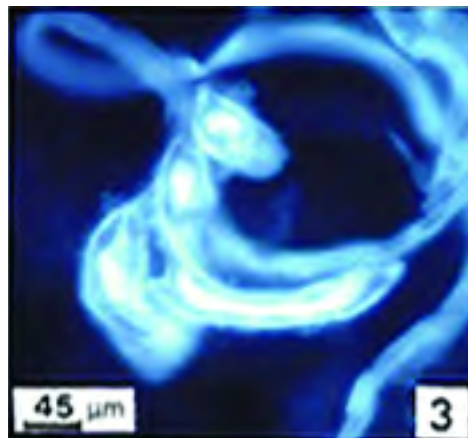
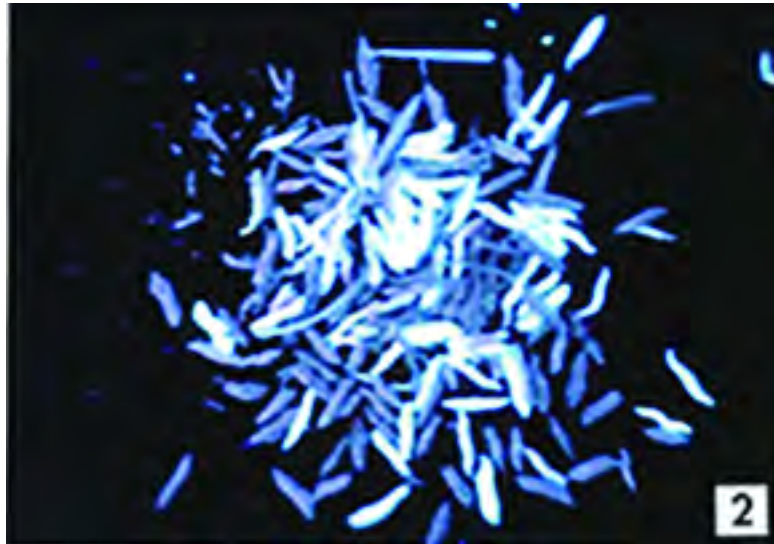
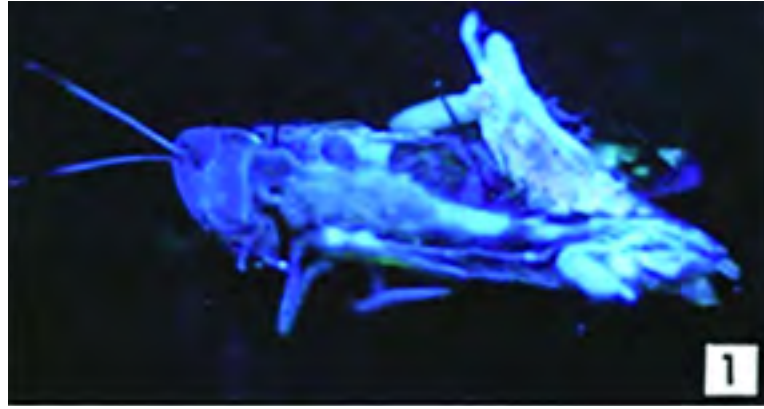
NB : le présent travail se situe à l'orée de ce qui est maintenant une méthode de détection d'impacts chimiques préjudiciables pour la nature et, *in fine*, pour notre santé. Il s'inscrit dans notre souci constant de chercher à déceler des impacts de l'anthropisation sur les équilibres naturels.

Première étape *sensu stricto* : étude de la pénétration d'hydrocarbures chez des criquets nourris en laboratoire à Orsay (BOUCHARD, 1999)

Aperçu technique

Nous avons travaillé en utilisant d'abord des HAP purs ingérés par des criquets faciles à récolter autour du campus d'Orsay (*Gomphocerus rufus*, Linné, 1758) avant de passer aux espèces de montagne.

Pour partir sur des bases simples, il fallait proposer aux animaux non pas des feuilles végétales fraîches, *a priori* déjà plus ou moins polluées directement dans la nature, et aussi par absorption racinaire initiale, mais un médium cellulosique vierge, précisément imprégné à volonté par les HAP en concentration déterminée. Autrement dit, il s'agissait de mimer des feuilles de plantes uniquement polluées en



Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques

surface, sans absorption racinaire concomitante. Compte tenu de la voracité de la première espèce utilisée, *Gomphocerus rufus* L., nous lui avons proposé du papier à cigarette (donc inerte du point de vue chimique) imprégné par des solutions acétoniques d'hydrocarbures, BaP et 3MC (ou 3 méthyl-cholanthrène) puis soigneusement séché à l'obscurité (système discuté avec J. GENERMONT). Les animaux furent mis en présence des papiers + HAP dans des récipients bien aérés. L'alimentation a été ainsi maintenue pendant une semaine. Nous avons évalué à 0,05 mg la quantité moyenne de HAP ingérée au total par un individu de 360 mg en poids frais. Des expériences du même type ont été effectuées avec deux autres espèces (*Gomphocerus sibiricus* (L.) et *Euchorthippus pulvinatus* (F.W.)).

Sachant que les HAP employés sont fluorescents en lumière UV, nous avons aisément suivi leur pénétration dans l'organisme des animaux, d'abord par simple dissection et observation des organes avec une source d'UV émettant à 366 nm (UV products, San Gabriel, California).

Par ailleurs, en pratiquant des coupes histologiques à congélation, il a été facile d'analyser la structure des organes cibles en microscopie de fluorescence grâce à un appareillage adapté, c'est-à-dire une source de lumière incidente de 365 nm permettant les observations au photo-microscope Olympus avec filtres d'arrêt GG 13 de Zeiss Iena.

L'essentiel des résultats

Nous rappelons en peu de mots l'essentiel des résultats. Ils sont identiques pour les trois espèces. Les HAPs imprégnant les organes-cibles donnent une fluorescence bleue-violette.

Disséqués, les animaux furent observés et photographiés en lumière UV (Fig. 1). La pénétration au troisième et surtout au quatrième jour est remarquable à la dissection. Elle se renforce encore durant une semaine. Dans ces conditions, la fluorescence des tissus est violette (427 nm). Tous les organes sont plus ou moins fluorescents à ce moment, et nous soulignons le cas de l'épiderme, du tube digestif, des gonades, de

Figures 1-3

Première étape

Fig. 1. Dissection latérale de *Gomphocerus rufus* 4 jours après absorption continue de BaP. Fluorescence générale en lumière UV. Outre le tégument, le tube digestif est bien visible ainsi que tout le tractus génital de cette femelle, comme les muscles thoraciques. Ganglions nerveux particulièrement fluorescents.

Fig. 2. Pelotes fécales d'un individu récoltées durant les quatre jours de traitement au BaP.

Fig. 3. Effets du BaP au 5^e jour ; coupe à congélation. Forte fluorescence de l'épithélium des tubes de Malpighi observés au photomicroscope. Le contenu fluorescent des tubes est particulièrement brillant.

First stage

Fig. 1. Lateral dissection of *Gomphocerus rufus* 4 days after start of treatment with BaP. General fluorescence under UV light. Tegument entirely fluorescent; digestive tract clearly visible, as well as the genital organs of this female and the thoracic muscles. Nerve ganglia strongly fluorescent.

Fig. 2. Fecal pellets collected from an individual during four days of treatment with BaP.

Fig. 3. Effects of BaP by 5th day; freeze-dried preparation observed with light microscope. Epithelium of Malpighian tubules strongly fluorescent; contents very shiny.

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

leurs glandes annexes et surtout de la chaîne nerveuse et, à un moindre degré, le cas des glandes salivaires. Plus ou moins « diversement » métabolisés, les HAP sont fortement éliminés dans les « pelotes » fécales bleues ou blanchâtres (Fig. 2).

Les coupes à congélation ont permis de détailler quelque peu. Ici nous soulignons seulement le cas des tubes de Malpighi (Fig. 3) tout particulièrement remarquables, tant au niveau de leur épithélium qu'au niveau des produits excrétés (BOUCHARD, 1999). Ajoutons que la poursuite de « l'alimentation » conduit, au bout d'une semaine, à une saturation « éblouissante » de tous les organes, même à la dissection, et qui empêche la photographie précise, donc l'analyse.

Seconde étape : étude en histologie classique des anomalies constatées dans divers organes chez les espèces de montagne nourries comme précédemment (BOUCHARD & BOUCHARD-MADRELLE, 2000). Figures 1 à 7 de la seconde étape.

Aperçu technique

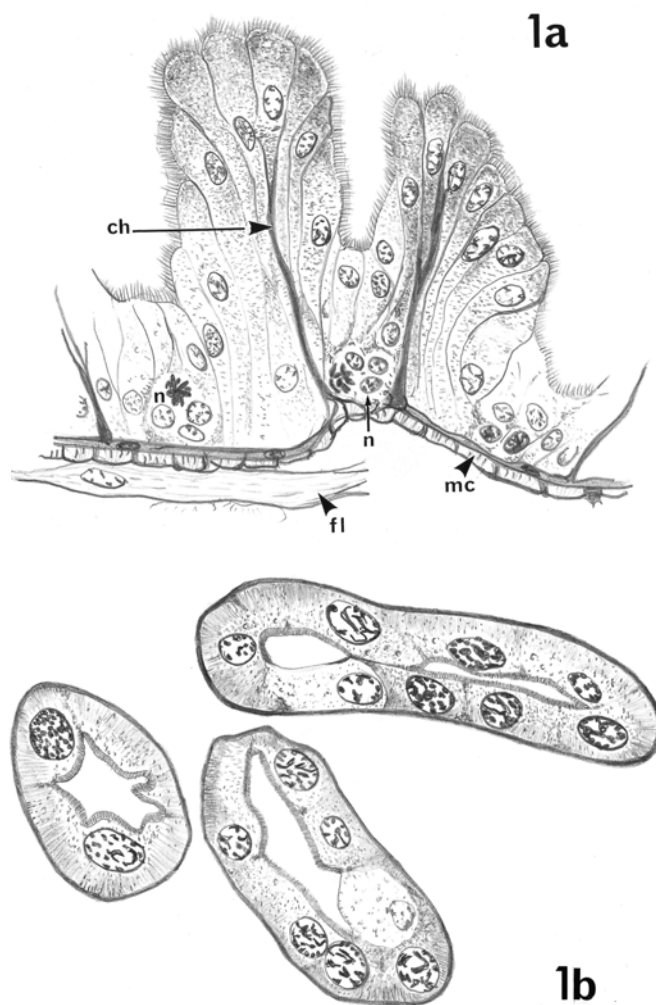
Cette partie du travail a été principalement effectuée en utilisant *Gomphocerus sibiricus* (Linné, 1767), espèce courante vers 2 300 m en Savoie sur le mamelon des Druges, là où la pollution « naturelle » est *a priori* relativement limitée compte tenu de l'éloignement des zones urbanisées. Les conditions d'alimentation sont les mêmes que précédemment puisque nous employons le même medium simple, le même support papier + HAP. Les individus, fixés sur place dans le Bouin, sont ensuite rapportés à Orsay et préparés pour l'analyse histologique sur coupes longitudinales para-sagittales colorées selon les méthodes trichromiques classiques de MASSON ou de PRENANT, principalement.

L'essentiel des résultats

Quatre HAP ont été employés. Ici nous montrons seulement deux exemples d'anomalies observées avec le BaP qui est l'hydrocarbure le plus toxique. Elles concernent le mésentéron (Figs. 1a, 2, 3, 4 et 5) et les tubes de Malpighi (Figs. 1b, 6 et 7). Il s'agit d'organes-cibles très remarquables lors de la première étape en microscopie de fluorescence.

Quant à la glande salivaire, qui n'était pas très repérable en éclairage UV, nous avons précisé dans notre publication de 2000 qu'elle apparaît pourtant extrêmement dégradée sur les coupes colorées au trichrome ou au bleu de toluidine : de nombreuses inclusions basophiles intracytoplasmiques et envahissantes remplacent le matériel finement granuleux du pôle basal des cellules sécrétrices, ce qui est une forme frappante de dégénérescence de « l'ergastoplasme » (correspondant au reticulum granulaire). Ce point a été repris et souligné en 2004 (BOUCHARD & BOUCHARD-MADRELLE), et cela va de pair avec une forte vacuolisation évoquant un état sub-létal. Rappelons que la glande est inerte du point de vue mitotique, incapable de régénération.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polycycliques



Deuxième étape

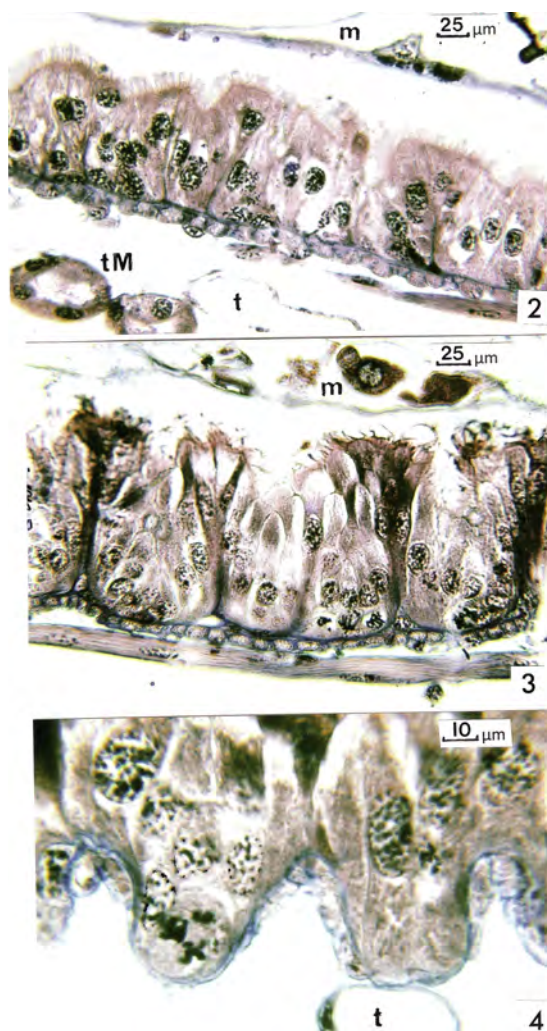
Deux dessins à partir de coupes colorées au trichrome de Masson.

Figure 1a : Dessin de structure de l'intestin moyen normal (*Gomphocerus sibiricus*). Épithélium plissé à microvillosités. Deux « nids » de croissance ont été représentés (n) ; ch : chorion ; fl : fibres musculaires longitudinales ; mc : muscle circulaire.

Figure 1b : Coupes de tubes de Malpighi normaux. Les cellules principales, nettement basophiles, possèdent une bordure en brosse très fine. Les cellules « muqueuses » sont plus pâles.

Second stage

Fig. 1. Drawings of normal slides stained with Masson's trichrome (*G. sibiricus*). **a** Midgut: folded epithelium with long microvilli. Two growth nests with mitoses. Ch: chorion; fl: longitudinal muscle fibers; m: circular muscle sheath. **b** Structure of normal Malpighian-tubules epithelium. Principal cells are basophilic with a delicate brush-border. Mucus cells show clear cytoplasm.



Deuxième étape

Photographies de coupes colorées au trichrome (*G. sibiricus*)

Fig. 2. Intestin moyen, 3 jours après le début d'ingestion de BaP. Tendance au déplissement de l'épithélium. Activité mitotique notable dans des nids mal circonscrits. m : membrane péritrophique. TM : tubes de Malpighi ; t : trachée.

Fig. 3. Autre aspect au bout de 4 jours d'ingestion de BaP. Tendance pycnotique de cellules digestives. Microvillosités d'aspect désordonné. Mitoses nombreuses dans les nids.

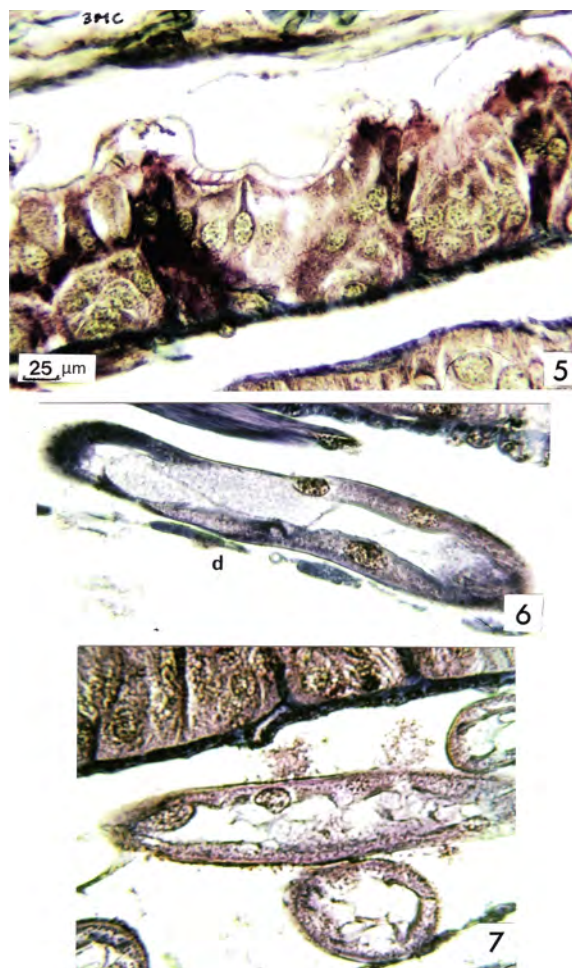
Fig. 4. *Idem*, toujours au bout de 4 jours. Les nids tendent à déformer la musculature lors de la prolifération.

Fig. 5. Aspect de l'intestin moyen au bout de 4 jours d'ingestion de 3MC. Destruction de la plupart des cellules digestives visibles entre les nids – d'ailleurs dépourvus de mitoses sur cette vue.

Fig. 6. Courte portion d'un tube de Malpighi de criquet intoxiqué durant 4 jours par le 3MC. Cellules principales déformées, étalées, ainsi qu'une cellule muqueuse. d : diaphragme ventral.

Fig. 7. Aspect d'un tube de Malpighi après 4 jours d'ingestion de BaP. Dégradation de toutes les cellules. La lumière du tube contient une sorte de coagulum plus ou moins bulleux, spumeux.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques



Second stage (Fig. 2 to 7)

Photographs of midgut and Malpighian tubules of *G. sibiricus* treated with HAPs. Trichrome stain.

2. Midgut three days after start of BaP treatment. Epithelium slightly unfolded. Nests of growth showing mitotic activity. M: peritrophic membrane; TM: Malpighian tubules; t: trachea.
3. Another aspect of the epithelial tissue after a treatment of 4 days. Pycnosis visible among digestive cells. Disorder visible among microvilli. Mitoses abundant.
4. Another aspect of epithelium after 4 days. Abundant mitoses in nests of growth which tend to deform the muscular sheath.
5. Example of epithelium partly destroyed 4 days after treatment with 3MC.
6. Structure of Malpighian tubule after 4 days of ingestion of 3MC. Principal cells are sub-pycnotic and flattened along conjunctivo-muscular sheath. d: ventral diaphragm.
7. Aspect of Malpighian cells after 4 days of treatment with BaP. They are partly destroyed and the secretion is highly spumous.

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

Curieusement, bien que leur fluorescence en UV soit considérable, nous ne constatons pas d'anomalies histologiques dans les ganglions nerveux ; la pénétration du HAP est-elle limitée à la lamelle neurale qui les gaine ainsi qu'à la périnèvre ? Y aurait-il, chez les Insectes, pour certaines molécules, une « barrière » comme chez les Vertébrés ? Au moins pour les ions, une telle barrière n'existe pas, selon TREHERNE & PICHON (1972).

Ajoutons que l'apoptose est, par contre, très frappante dans certains cystes testiculaires où les cellules sexuelles sont, cette fois, en contact étroit avec l'hémolymphe de la cavité générale.

Troisième étape (BOUCHARD & BOUCHARD-MADRELLE, 2004). Figures 1 à 7 de la troisième étape.

Aperçu technique

Il s'agissait d'estimer d'éventuels effets des fumées de moteurs à explosion sur des criquets consommant de l'herbe polluée, cette fois, par des mélanges contenant des HAPs dont on ne connaissait évidemment pas les concentrations.

Comme précédemment, les criquets utilisés appartenaient à l'espèce d'altitude *Gomphoceris sibiricus* (Linné, 1767), mais aussi, parallèlement à l'espèce *Euchorthippus pulvinatus* (Fisher von Waldheim, 1846) abondante en moyenne montagne, entre 500 et 700 m.

Les feuilles des végétaux (graminées et trèfles en mélange) que nous avons données à consommer à ces criquets avaient été préalablement fortement polluées, pendant une heure, par des fumées de moteurs fonctionnant au ralenti dans un espace confiné : moteur à essence ou moteur diesel. Nous avons pris des contacts directs avec des responsables de communication chez Total, Fina, Elf. Les fumées correspondant au moteur à essence contenaient, entre autres polluants, des mélanges de HAPs, substances qui se formaient toujours en « relative abondance », bien qu'il se fût agi de « nouveaux carburants ». On connaît, en outre, l'importance du soufre et des particules émis par le diesel sans pot catalytique.

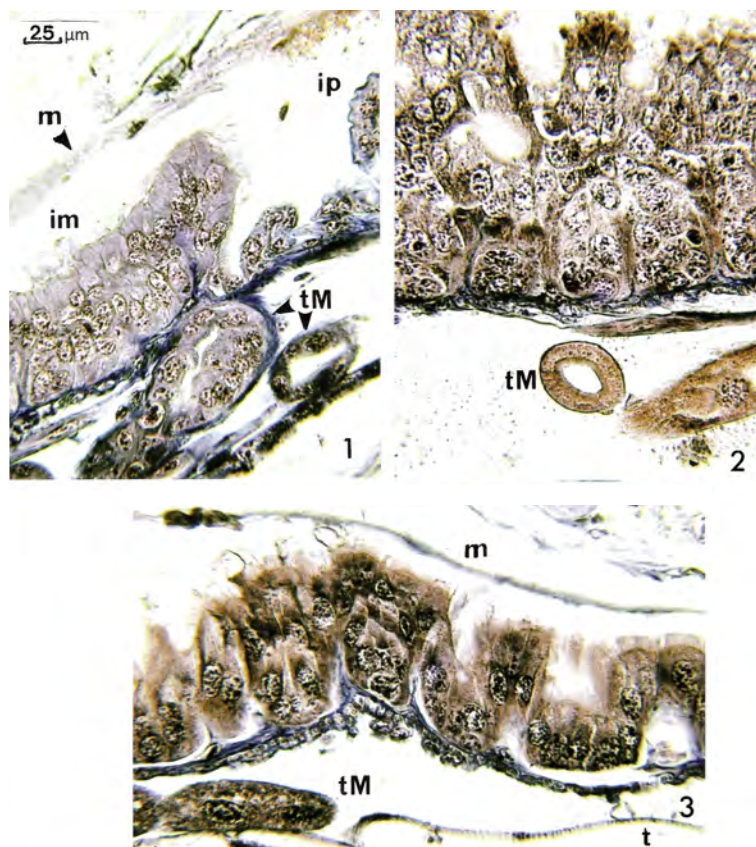
Malgré l'utilisation d'une nourriture végétale naturelle, il s'agissait bien entendu d'une expérience caricaturale par rapport aux conditions que des criquets pouvaient rencontrer dans leur milieu.

L'analyse anatomo-pathologique des criquets a été effectuée 5 heures, mais aussi 24 heures après le début de l'alimentation. Les techniques histologiques étaient les mêmes que pour l'étape précédente. On a étudié, là encore, les anomalies de tous les organes.

L'essentiel des résultats

Dans tous les cas, les fumées imprégnant les plantes augmentaient l'activité mitotique de régénération au sein du mésentéron, par ailleurs visiblement intoxiqué, localement nécrosé. Les fumées du diesel ont provoqué deux à trois fois plus de trou-

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques



Troisième étape

Fig. 1. Aspect sub-normal de l'intestin moyen de *Gomphocerus sibiricus* ayant consommé pendant 24 heures l'herbe polluée par la fumée d'un moteur à essence. Les tubes de Malpighi nés à la confluence de l'intestin moyen (im) et de l'intestin postérieur (ip), montrent malgré tout une basophilie cytoplasmique localement excessive.

Fig. 2. 24 heures après le début de l'alimentation à l'herbe polluée par la fumée d'un moteur diesel, on repère sur cette coupe (légèrement tangentielle) de nombreux nids riches en mitoses dans l'intestin moyen de *Gomphocerus sibiricus*. On ne voit que quelques cellules digestives « fonctionnelles ».

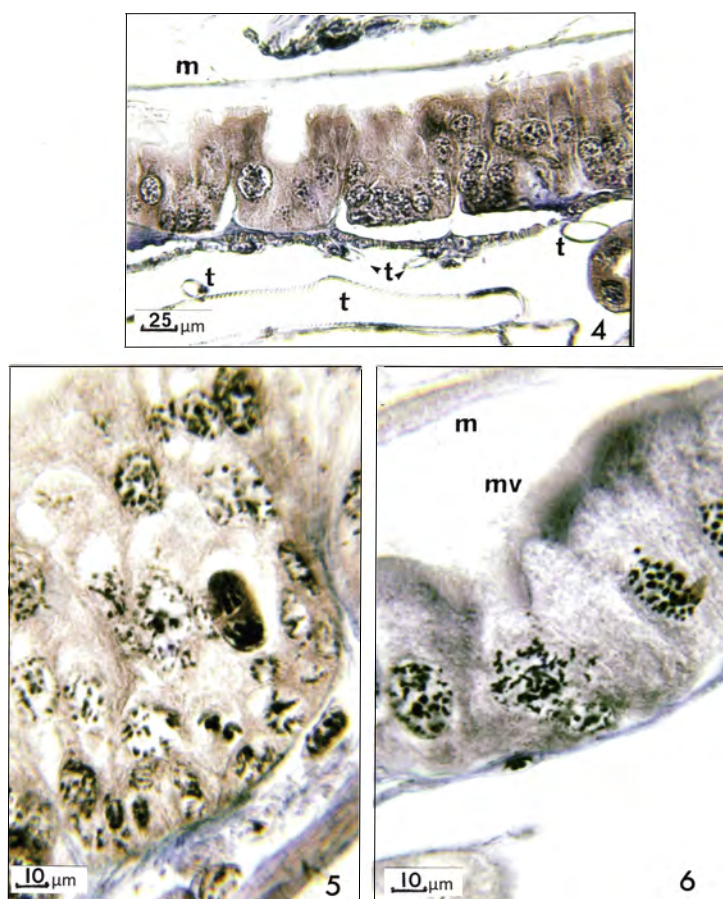
Fig. 3. Autre aspect beaucoup plus complexe du même tissu chez un *Euchorthippus pulvinatus* où l'on note l'abondance de cellules digestives en pycnose et dont les microvillosités sont localement détruites. Tendance au gonflement de plusieurs noyaux (au bout de 24h).

Third stage

Fig. 1. *Gomphocerus sibiricus* nourished for 24 h with grass polluted with petrol-engine fumes. Sub-normal aspect of midgut epithelium. The Malpighian tubules arising at the junction of the midgut (im) and posterior intestine (ip) are slightly basophilic, locally sub-pycnotic.

Fig. 2. *G. sibiricus* nourished for 24 h with grass polluted with diesel-engine fumes. Slightly tangential, this image of the midgut shows many epithelial nests with mitoses. Malpighian tubules are poorly structured.

Fig. 3. Same conditions as for Fig. 2. Digestive cells of an *Euchorthippus pulvinatus* are frequently destroyed (hyperchromatic). Microvilli are also locally aberrant, as on the left.



Troisième étape

Fig. 4. Chez cet autre individu l'épithélium de l'intestin moyen paraît aminci, sans pycnose notable, mais on souligne le gonflement de nombreuses cellules composant les nids. Certains noyaux sont clairement hypertrophiés.

Fig. 5. Dans les mêmes conditions : détail d'un nid montrant un gonflement généralisé des noyaux. Les mitoses sont abondantes à tous les stades.

Fig. 6. 24 heures après consommation d'herbe polluée par la fumée d'un moteur à essence, on voit ici un exemple où l'épithélium de l'intestin moyen de *Euchorthippus pulvinatus* est très aminci, même si l'on y trouve des mitoses ; les noyaux sont gonflés.

Third stage

Fig. 4. Same conditions as for Fig. 2. The epithelium of the midgut appears thinned, without evident pycnosis, but there is notable swelling of nuclei of some nest or differentiated cells.

Fig. 5. Same conditions as for Fig. 2. Detail of nest cells ; nuclei clearly swollen ; abundance of mitosis.

Fig. 6. Midgut of *Euchorthippus pulvinatus* nourished for 24 h with grass polluted by petrol-engine fumes. Epithelium relatively flat; mitotic activity evident; microvilli dense but embedded in something like a secretion.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polycycliques aromatiques

bles prolifératifs que ce que nous avons obtenu avec le BaP seul tel que nous l'avons fait consommer lors de l'étape précédente de notre travail. Cela peut paraître paradoxal, mais ici on ne connaît pas les doses d'hydrocarbure(s) (non communiquées par les raffineurs contactés) et l'on ne sait pas comment peuvent agir, en synergie ou en opposition, d'autres poisons des fumées ; poisons qui pourraient être responsables des déséquilibres locomoteurs transitoires notés chez la plupart des individus.

L'épithélium des tubes de Malpighi est partiellement dégradé dans nos expériences, montrant une nette mortalité cellulaire non suivie de régénération mitotique : c'est un tissu mitotiquement inerte, complètement « mûr » (cf. travaux de PATTON, 1953 et de STOBART & SHAW, 1964).

Les fumées provoquent clairement une dégénérescence très remarquable des glandes salivaires (Figs. 7 a et b) même si celle-ci n'atteint pas celle due au BaP, au 3-méthyl-cholanthrène ou au 1:2, 5:6 dibenzanthracène employés sur feuilles de papier. Rappelons que les glandes salivaires des criquets adultes sont incapables de régénération. Il ne peut donc être question d'activité mitotique. On observe alors des effets purement toxiques, sans tentative de correction mitotique. La vacuolisation des cellules est particulièrement frappante chez les criquets enfumés-diesel dont les inclusions basophiles cytoplasmiques sont particulièrement désordonnées par rapport à la normale (Fig. 7b).

Par ailleurs, en estimant et en évaluant l'ensemble des résultats (BOUCHARD & BOUCHARD-MADRELLE, 2004) il est clair que certains effets dégénératifs peuvent rappeler ce que l'on obtient en employant des HAP purs (en plus modérés sauf pour la mitogenèse intestinale, cette fois considérable). Et, d'autre part, les fumées dues à la combustion de l'essence sont moins nocives que celles qui sont émises par un moteur diesel. Ce point est essentiel car il souligne des nuances de réaction que l'on peut chiffrer en fonction de la nature « du » polluant.

Dans cette publication, nous avons montré que les criquets paraissent bien constituer un « modèle » sur lequel on pourrait travailler dans des conditions diverses.

Comment parvenir à exploiter à présent les effets d'une pollution intervenant à l'air libre, dans le milieu ambiant, et cela de façon aussi simple que possible ? Cela sera le sujet de la cinquième étape.

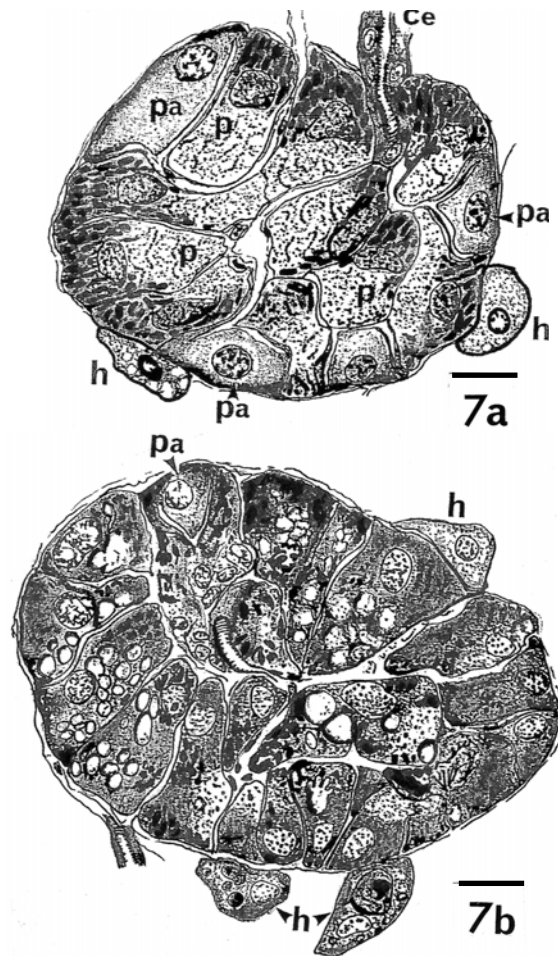
Quatrième étape (résultats non publiés). Figs. 1 à 4 de la quatrième étape.

Cette quatrième étape, dite du Bourget, nous a été suggérée par BLAKE de l'Université de Savoie, lequel étudiait d'éventuels effets d'hydrocarbures polluant le sol.

Ce que nous avons décrit jusque-là concernait une pollution uniquement foliaire, donc théorique, mais on pourrait envisager, par opposition, ainsi que nous l'avons signalé, une pollution uniquement racinaire provenant du substrat et se propageant au reste de la plante. Nous n'avons pas encore considéré cette situation dans notre travail bien que la pollution directe par le sol soit vraisemblable ou, à la réflexion, inéluctable. Les lignes qui suivent correspondent donc à des faits nouveaux.

Conditions techniques

G. BLAKE nous a fait parvenir (fin 2001) un lot de criquets *a priori* intoxiqués par l'intermédiaire de plantes dont les racines baignaient dans un « sol » souillé par du fluoranthène, HAP extrêmement banal au voisinage des axes de circulation et considéré comme mutagène, sinon cancérigène. Avec son élève CAFFY, BLAKE

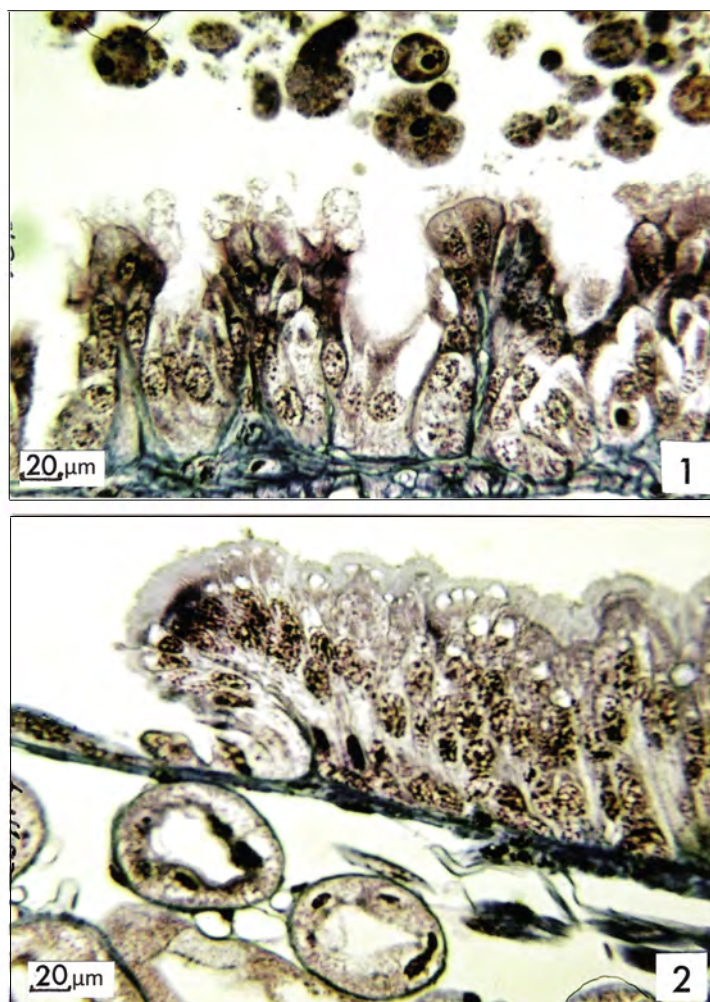
**Troisième étape**

Figs. 7a et 7b. Dessins de glandes salivaires. **7a** : structure histologique d'un acinus normal ; p : cellule principale à pôle basal basophile et très structuré, riche en ARN ; pa : cellule pariétale ou accessoire ; ce : canal excréteur ; h : hémocyte. **7b** : structure d'un acinus de criquet intoxiqué par l'herbe soumise aux fumées d'un diesel. Basophilie très irrégulière et forte vacuolisation cellulaire.

Third stage

Figs. 7a and 7b. Drawings of histological aspect of salivary glands. **7a**: normal acinus; p: principal cell with basal pole clearly basophilic, rich in regularly disposed RNA; pa: parietal or accessory cell; ce: excretory duct; h: hemocyte. **7b**: acinus of a grasshopper nourished with grass exposed to diesel-engine fumes; dispersed basophily; many cells show abnormal vacuoles.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques



Quatrième étape

Effets du fluoranthène ou de ses métabolites chez *Chorthippus sp.* (Le Bourget du Lac)

Fig. 1. Structure de l'intestin moyen. Pas de membrane péritrophique ; importante dégradation des cellules digestives avec microvillosités déstructurées ; pas de mitoses repérables dans les nids.

Fig. 2. Extrémité postérieure de l'intestin moyen. Nécrose seulement locale chez cet individu ; microvillosités engluées dans une sécrétion bulleuse ; tubes de Malpighi à cellules dégénérées.

Fourth stage

Effects of fluoranthene or its metabolites in *Chorthippus sp.* (Le Bourget du Lac)

Fig. 1. Midgut structure. Lack of peritrophic membrane; pycnosis of digestive cells whose microvilli are generally destructured; no observable mitosis.

Fig. 2. Posterior extremity of midgut of another animal. Degeneration seems to be limited, but many cells are bubbling and microvilli are embedded in a dense secretion.



Quatrième étape

Effets du fluoranthène ou de ses métabolites chez *Chorthippus sp.* (Le Bourget du Lac)

Fig. 3. Structure très perturbée des tubes de Malpighi. Noyaux généralement pycnotiques ou simplement hyperchromatiques.

Fig. 4. Ganglion nerveux thoracique. Dégénérescence complète des cellules gliales internes. Aspect hypertrophié, voire cavulé, du noyau de certains neurones.

Fourth stage

Effects of fluoranthene or its metabolites in *Chorthippus sp.* (Le Bourget du Lac)

Fig. 3. Partly destroyed Malpighian tubules. Nuclei generally pycnotic or just hyperchromatic.

Fig. 4. Thoracic nerve ganglion. Complete degeneration of internal glial cells; many neurons show very abnormal hypertrophied nuclei.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polycycliques aromatiques

nous a fourni là un matériel intéressant. Leurs criquets avaient mangé des feuilles de *Phragmites australis* élevés sur un milieu aquatique déjà pollué (effluent domestique), puis sur-pollué expérimentalement par du fluoranthène. Il s'agissait donc d'une pollution purement racinaire ; ce qui est un cas particulier et qui est lié aux problèmes de décontamination des milieux humides sensibles aux rejets domestiques, industriels ou routiers (principe du lagunage très étudié par BLAKE, 1997 et 2009). Si les métaux lourds sont bel et bien accumulés par des roseaux, par exemple, lesquels ont bien du mal à les minéraliser, en théorie (comme c'est le cas pour l'atrazine) les HAP peuvent être « métabolisés » très diversement (transformation proprement dite, combinaisons avec des résidus liés ou par dissipation – transfert, volatilisation ou minéralisation) et même réduits à des molécules dépourvues de toxicité. Selon CAFFY (comm. pers.), dans un effluent domestique baignant une surface expérimentale donnée, si l'on ajoute du fluoranthène en quantité connue (50 µg/l à raison de 10 l/h d'effluent, soit 84 mg comme charge hebdomadaire), il y aurait une épuration du milieu par les végétaux, avec disparition de plus de 95 % du HAP (durée du test non communiquée).

Ces chercheurs se demandaient si l'utilisation d'organismes phytophages comme les criquets serait intéressante pour repérer une toxicité résiduelle du HaP accumulé dans le végétal. Les techniques dont ils disposaient ne leur permettaient pas de confirmer la présence, voire de doser ce HAP dans les végétaux (qui, par ailleurs, ne manifestaient aucun ralentissement de croissance). Autrement dit : pouvait-on envisager que les feuilles des roseaux ainsi pollués puissent contenir encore assez de fluoranthène ou de produits dérivés toxiques pour perturber les criquets-consommateurs ?

Les chercheurs du Bourget ont utilisé des *Chorthippus* sp. (vraisemblablement *C. apicalis*), criquets récoltés dans les prairies proches des bassins expérimentaux. Insistons sur le fait que leur anatomie ne diffère pas de celle des espèces que nous utilisons, même si les cellules sont en général un peu plus petites.

Les criquets avaient été mis en cage sur les bassins expérimentaux pendant une semaine. Ils s'étaient nourris « essentiellement » de roseaux et de quelques « plantes adventices ». Les expérimentateurs ont remarqué une forte mortalité des criquets dans les bassins traités.

Rappelons que le fluoranthène est un hydrocarbure très répandu, mais qui n'est pas considéré comme cancérigène, même si c'est un génotoxique avéré (TARANTINI, 2009 et comm. pers. de J. CUZIN, en son temps ingénieur en chef SEITA).

Principaux résultats

Ce que nous allons décrire, pour l'essentiel, au sujet des résultats histologiques que nous avons obtenus, l'est avec l'autorisation récente de G. BLAKE (juin 2013). Ils lui ont été transmis de longue date (observations détaillées et diapos). Ils nous ont paru intéressants pour notre actuelle mise au point méthodologique. Mais

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

nous nous limitons ici à quelques observations qui ne seraient que des éléments d'une éventuelle publication complète.

Plusieurs anomalies histologiques – en particulier au niveau intestinal – peuvent être observées chez les « témoins » sans fluoranthène, quand les racines des roseaux baignent dans l'effluent domestique seul (dont on ne connaît rien). Mais c'est beaucoup plus frappant dans le lot traité.

Nous constatons une dégradation très considérable de l'épithélium du mésentéron, généralement plus frappante que dans nos précédentes expériences. Soulignons la pauvreté de la membrane péritrophique voire son absence locale, peut-être due à une érosion lors du transit de fibres végétales brutes. Elle protège normalement l'épithélium et agit en ultra-filtrant le liquide intérieur (DAY & WATERHOUSE, 1953). Par ailleurs, il existe en général une hypertrophie des microvillosités, deux fois plus longues que chez les « témoins » ou les autres espèces. Mais elles peuvent aussi disparaître complètement. Il n'y a aucune régénération mitotique au niveau des nids de croissance épithéliale ; ces nids ont un aspect « dormant » – effet inverse de ce que l'on observait avec les HAP purs ou contenus dans des fumées de combustion utilisées plus haut, en 2004. Ce qui va de pair avec une mortalité locale et la formation de bulles apicales dans les cellules à noyaux prépycnotiques : éliminées dans la lumière de l'intestin, elles se mêlent au magma « alimentaire » très peu dégradé. Et cela implique une sorte de déplissement de l'épithélium avec dégradation plus ou moins poussée des cellules choriales. Mais nous n'avons pas observé de hernies épithéliales forçant la gaine musculaire, ce qui est bien différent de ce que nous avons vu, en 2000 et 2004, en utilisant des HAP carcinogènes.

Pourtant, l'intestin antérieur et l'intestin postérieur ont un aspect normal. En fait, c'est la digestion qui est profondément perturbée – ce que confirme l'aspect « natif » des matériaux ingérés : fragments de feuilles de Phragmites où les fibres caractéristiques libéro-ligneuses de ces Monocotylédones sont parfaitement reconnaissables. Autre remarque : disposant vraisemblablement d'une nourriture inadéquate, certains individus ont pratiqué le cannibalisme ; on peut trouver des fragments tégumentaires d'autres criquets – rappelons que VOISIN, cité dans nos premiers textes, a constaté cette tendance chez les *G. sibiricus* qui, en septembre-octobre ne disposent plus assez d'herbe dans les zones d'altitude (1987) où ils sont, par ailleurs, la cause de la descente prématurée des moutons des alpages.

Ajoutons accessoirement que les caeca digestifs subissent eux aussi les perturbations épithéliales évoquées pour le mésentéron et qu'on y observe un désordre extraordinaire de ce tissu, avec mortalité plus ou moins intense et chute de cellules acidophiles dans la lumière (lâchers de ballons). On doit souligner un reflux notable du jus caecal dans l'intestin antérieur où l'on observe les cellules acidophiles, rougeâtres, évoquées ci-dessus.

Quant aux glandes salivaires, leur aspect dégénéré est évident : il est tel qu'il empêche toute analyse.

Ces aberrations au sein du tube digestif ont aussi pour conséquence une très forte dégradation des tubes de Malpighi. Elle est modeste chez les « témoins » se

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polycycliques

nourrissant seulement sur les plantes n'ayant pas subi l'introduction de fluoranthène dans l'effluent de culture (pas d'illustration) ; mais elle est flagrante après introduction du fluoranthène dans ce milieu ; cet hydrocarbure ou ses produits de dégradation sont absorbés avec le végétal consommé. L'épithélium des tubes est alors réduit à quelques cellules éparses, étalées le long de la face interne de la mince gaine de soutien. C'est plus frappant que lors des traitements effectués, par exemple, avec le BaP chez les *Gomphocères*. Le fluoranthène absorbé par *Phragmites* entraîne-t-il, lors de sa dégradation au niveau digestif et lors du transport « urinaire » dans les tubes de Malpighi, la formation de métabolites hautement toxiques pour les criquets qui les mangent ?

On constate aussi que c'est seulement dans cette expérience avec le fluoranthène que nous observons quelques curieuses anomalies au sein des ganglions nerveux. Ainsi les cellules gliales superficielles à glycogène sont peu colorables. On note une dégénérescence nucléaire qui est aussi repérable dans les gliales internes. De plus, le cytoplasme des neurones est souvent vacuolisé, au point qu'ils peuvent avoir un aspect en réseau basophile (avec dégénérescence du réticulum granulaire, REG ?). Mais il est difficile de comparer ces images avec celles des autres HAP que nous avons employés purs car le passage éventuel du fluoranthène dans le parenchyme des *Phragmites* ingérés introduit, vraisemblablement, des perturbations nouvelles dues à une métabolisation propre et non évaluée par l'équipe BLAKE.

Le fluoranthène donne un ensemble de résultats qui sont originaux. Mais quel est le rôle du mode d'alimentation des criquets ? Car en fait, les roseaux ne sont pas habituellement la base de la nourriture des criquets. On doit donc nuancer même si les images entraînées par l'absorption de métabolites du fluoranthène sont remarquables.

Cinquième étape. Les résultats histologiques ont été partiellement publiés (BOUCHARD & BOUCHARD-MADRELLE, 2005). Étude des glandes salivaires.

Conditions techniques

Cette fois, les criquets se nourrissent dans leur biotope naturel local, en zones « propres » ou bien polluées par des fumées de moteurs d'engins automobiles circulant et stationnant sur des emplacements réservés durant toute la belle saison.

Des fumées toxiques chargées en HAP agissent sur l'ensemble de la plante, au niveau foliaire et vraisemblablement racinaire.

Ce que nous soulignons concerne uniquement l'histologie des glandes salivaires, prises comme cibles préférentielles et comme base d'un test.

Pour l'histologie, cent criquets appartenant à trois espèces ont été prélevés dans la nature et répartis en cinq lots.

a) *Gomphocerus sibiricus* (Linné, 1767)

Premier lot : vers 2300 m hors PNV « Parc Naturel de la Vanoise » (site des Druges, sous le col de l'Iseran), en Haute Maurienne, sur des aires *a priori* « faible-

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

ment polluées » compte tenu de l'altitude et de l'interdiction d'accès d'un chemin qui concerne les automobiles. Ce sont nos témoins.

Deuxième lot : la même espèce a été aussi capturée en milieu « pollué » par les fumées, hors PNV, vers 2000 m, sous le col de l'Iseran, aux abords du parking du Pt St-Charles (Tarentaise).

b) *Stauroderus scalaris* (Fischer von Waldheim, 1846)

Premier lot : en zone faiblement polluée, vers 2 300 m également (site de la Duis, à proximité de l'une des sources de l'Arc ; PNV).

Deuxième lot : la même espèce en milieu pollué, au voisinage du parking de l'Écot (Maurienne), à 2000 m, hors PNV.

c) *Euchorthippus pulvinatus gallicus* (Maran, 1957).

Lot unique : vers 500 m, en Haute-Provence, a été seulement récolté au voisinage d'un parking pour voitures et camions -remorques (site industriel d'Oraison).

Rappelons que chaque glande, ou plutôt groupe de glandes d'« un » individu, comporte environ soixante lobules ou acini.

Précisons la technique histologique. Après fixation des animaux, les glandes salivaires ont été prélevées entières, groupées lot par lot, déshydratées ensemble et incluses selon la méthode personnelle décrite en 2005, laquelle permet d'avoir toutes les glandes d'un lot ensemble dans un même bloc de paraffine, donc de ne pas en perdre durant la fabrication des coupes (à 5 μ m) et de les colorer de manière homogène.

Deux méthodes de coloration ont été employées sur ces glandes entières groupées sur les coupes : le trichrome de MASSON a été utilisé parfois, à titre comparatif, mais, pour cette étape, on a choisi systématiquement le bleu de toluidine à pH 5,6, système rapide et sûr recommandé par MASSON également pour l'étude de toutes sortes de tissus, normaux ou pathologiques (1956).

Il n'est peut-être pas inutile d'inclure dans notre bibliographie certains ouvrages d'histologie très classiques ; nous nous permettons d'insister sur quelques-uns, qu'il s'agisse de traités ou de livres de base et, par ailleurs, il semble suffire de citer quelques noms connus de scientifiques qui ont bien voulu nous conseiller, nous encourager à des stades différents de nos activités d'histologistes : traités d'histologie de LANGERON (1942) ou de CHEVREMONT (1956), traité d'hématologie clinique de BESSIS & BERNARD (1958), traité d'histologie des tumeurs humaines de MASSON (1956, déjà cité), traité de cancérologie expérimentale de GRAFFI & BIELKA (1963) ; auxquels se sont ajoutés des contacts personnels grandement salutaires avec R.M. MAY, A. LACASSAGNE, F. ZAJDELLA, G. RUDALI ou A. BEAUMONT et J. GENERMONT.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques

L'essentiel des résultats

Cette technique histologique au bleu de toluidine permet d'analyser aisément et comparativement la structure des acini, la répartition des éléments basophiles dans les cellules et la localisation des fines vacuoles protéiques bien observables dans les cellules dont le fonctionnement est normal (Figures 1 et 2), voire dans certaines cellules lésées par l'exposition aux vapeurs toxiques. Le bleu de toluidine est particulièrement révélateur.

Les résultats montrent que les lobules des glandes de criquets vivant parmi la végétation polluée contiennent en général des inclusions violemment basophiles, massives ou sous forme de gouttelettes (Figures 3 à 5) ; ces inclusions cytoplasmiques sont bien distinctes de celles, beaucoup plus fines et régulièrement disposées, que l'on trouve dans le cytoplasme de cellules normales, plus ou moins riches en ergastoplasme finement granuleux.

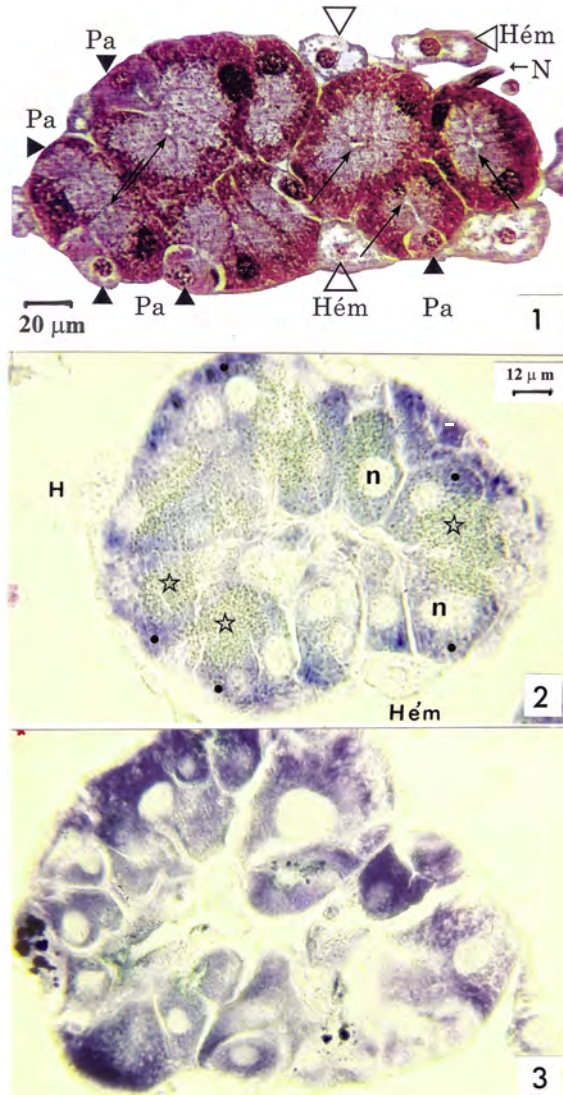
Il convient ici de préciser une notion d'histologie qui s'est affinée d'année en année.

On sait depuis longtemps que les zones de cytoplasme cellulaire normal, riches en ARN, correspondent à ce que l'on qualifiait d'ergastoplasme, notion de base classique pour les hématologues tels M. BESSIS et J. BERNARD (1958). Et « l'ergastoplasme » est complexe, basophile et osmiophile, certes constitué d'ARNs, mais aussi de lipides et de protéines voisinant avec des mitochondries. Les ARNs qui se combinent au bleu de toluidine (chlorhydrate de triméthyl thionine) sont une partie du « réticulum endoplasmique granulaire » (particulièrement abondant dans le cytoplasme des lymphocytes ou dans les corps de Nissl des neurones médullaires).

L'ergastoplasme des hématologues est sans doute une notion fort complexe puisqu'il correspond aussi à des inclusions dont la colorabilité est plus ou moins particulière, comme c'est le cas pour les mastocytes qui font toujours l'objet de recherches nouvelles. D'autant que le bleu de toluidine est métachromatique avec des mucopolysaccharides.

Quoi qu'il en soit, l'affinité de ce colorant pour les ARNs est une certitude qui est mise en valeur dans le domaine médical : on sait depuis longtemps, grâce à des travaux de C. OBERLING et de W. BERNHARD (cités par GRAFFI & BIELKA, 1963), que l'ergastoplasme – ou plus précisément le « réticulum endoplasmique de Porter » des tissus inflammatoires ou cancéreux – peut avoir un aspect gonflé ou vacuolisé. Et, dans la pratique courante, le bleu de toluidine, utilisé comme colorant vital, est un moyen, pour certains praticiens, de détecter par fibroscopie, des plages de cellules tumorales en chirurgie digestive préopératoire. Et en post-opératoire, ou au cours d'une exploration de contrôle, ce colorant donne à l'anatomo-pathologiste le moyen de confirmer ou d'infirmer immédiatement un diagnostic indispensable pour le chirurgien.

Or, dans nos cas, il est apparu clairement, grâce au bleu de toluidine, que le contenu basophile du cytoplasme salivaire avait souvent un aspect tout-à-fait anormal.



Cinquième étape

Coupes histologiques de glandes salivaires.

Fig. 1. *Euchorthippus pulvinatus*. 500 m. Un acinus de glande salivaire normale ; coloration trichrome de Masson. Coupe légèrement tangentielle. **Pa** : cellules pariétales ou secondaires. Entre les cellules principales, le canal excréteur est fléché. Accumulation de grains très basophiles violets-noirâtres dans la portion basale du cytoplasme des cellules principales ; pôle distal, sécréteur, mauve, très finement granuleux ; **Hém.** : hémocyte ; **n** : fibre nerveuse.

Fig. 2. *Gomphocerus sibiricus*. 2300m. Un acinus de glande salivaire normale ; coloration au bleu de toluidine. Les noyaux (**n**) restent incolores ; le reticulum ergastoplasmique (indiqué par des points) correspond aux grains de la partie basale, ou proximale, des cellules principales ; leur sécrétion, distale, très finement granuleuse, apparaît en vert jaunâtre (étoiles).

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques

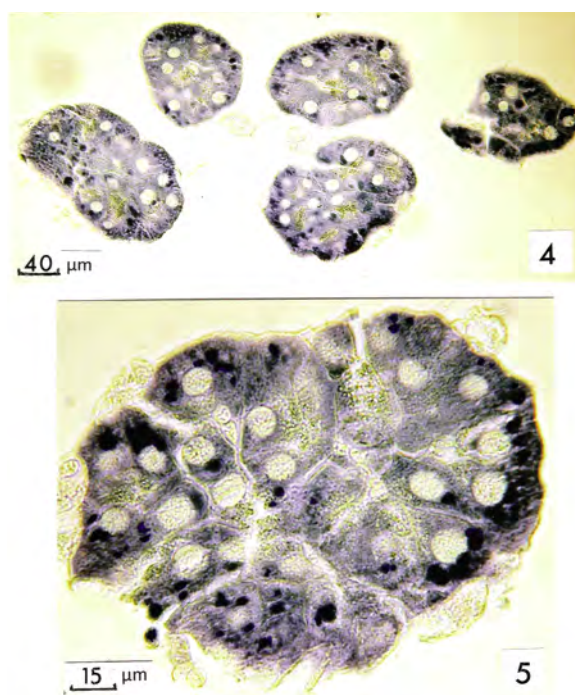


Fig. 3. *Stauroderus scalaris* ; un acinus de glande provenant d'un animal intoxiqué dans l'herbe du parking de l'Écot (2000 m) ; coloration bleu de toluidine. Cellules principales à cytoplasme très déstructuré et non sécréteur ; flaques basophiles et gouttelettes éparses.

Figs. 4 et 5. *Euchorthippus pulvinatus* dans une friche de parking en Haute Provence (500m) ; acini de plusieurs criquets intoxiqués. Coloration au bleu de toluidine. Extrême déstructuration cellulaire et accumulation de flaques et gouttelettes très basophiles ; on repère cependant des restes de sécrétion qu'il est difficile de localiser par rapport à un pôle cellulaire distal.

Fifth stage

Histological sections of salivary glands.

Fig. 1. *Euchorthippus pulvinatus*. Acinus of normal salivary gland; Masson's trichrome stain. **Pa**: parietal cells; fine arrows between principal cells indicate secretory duct; basophilic grains occupy the basal part of principal cells, the secretion of which appears as clear, fine, mauve inclusions at their distal pole. **N**: nerve fiber.

Fig. 2. *Gomphocerus sibiricus* (2300 m); normal acinus stained with toluidine blue. Nuclei (**n**) are uncoloured and the endoplasmic reticulum corresponds here to blue grains at basal pole of principal cells (black dots). Clearly distinct distal secretion appears green.

Fig. 3. Acinus of a *Stauroderus scalaris* sampled from grass of a car-park (Ecot, 2000 m). Toluidine blue staining. Cytoplasm of principle cells highly destructured and non secretory. Sparse basophilic accumulations and droplets.

Fig. 4 and 5. Acini of *Euchorthippus pulvinatus* living in grass of a car-park in Haute Provence (500 m). Toluidine blue staining. Extreme cellular disruption with accumulation of strongly basophilic droplets. Green-staining secretion grains are relatively abundant, but the distal part of the secreting cells is difficult to locate.

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

Ces inclusions curieuses, irrégulièrement disposées et généralement très diverses, nous apparaissent comme des indices – quantifiables – d’une dégradation salivaire (IDS) qui peut être très importante. Un test d’abondance des IDS permettrait d’estimer l’impact des aberrations cellulaires induites par les toxiques accumulés dans la nourriture. Il pourrait être évalué par un calcul simple de moyennes, lot par lot, ayant valeur statistique.

Là, nous disposons fondamentalement d’un test pratique et permettant une analyse fine sur un lot de criquets. Il peut être quantitatif en comparant des lots provenant de biotopes différents.

Sixième étape, sans histologie proprement dite (BOUCHARD & BOUCHARD-MADRELLE, 2010). Les glandes salivaires sont étudiées entières.

On peut pratiquer un test encore plus simple que celui de notre cinquième étape et cela sans histologie.

Conditions techniques

Lors de la dissection d’un criquet, sa glande salivaire, qui est constituée de plusieurs groupes d’acini situés dans des plans horizontaux différents, peut être colorée *in situ* par le bleu de toluidine, puis montée directement sur lame. Cette seconde méthode permet l’analyse microscopique de glandes entières isolées et dispense d’effectuer les techniques d’histologie classiques, rebutantes pour le chercheur pressé ; cela permet de comparer précisément les effets produits d’un individu à un autre dans chacun des lots et lot par lot.

Avec plus d’une centaine de criquets, nous avons constaté qu’il est particulièrement simple – rentable – de colorer les glandes individuellement au bleu de toluidine, *in situ*, en salière ou sur lame. Chaque glande étant ensuite montée en résine pour l’observation directe au microscope. Cela va très vite. On peut alors rapprocher ce que l’on voit des observations histologiques précédentes et évaluer, lot par lot, le pourcentage moyen d’acini pour lesquels on trouve des Indices de Dysfonctionnement Salivaire (IDS).

Résultats essentiels

Les glandes entières montées sur lame sont nettement plus épaisses que les coupes analysées durant la cinquième étape de ce travail, mais on analyse aisément la structure de chaque acinus où les anomalies de structure cellulaires apparaissent de manière très contrastée. Les effets de la pollution de l’herbe dont les criquets se nourrissent sont sans équivoque et il est aisé d’évaluer l’impact en comptant le nombre d’acini atteints sans se préoccuper, dans un premier temps, de l’importance relative des impacts acinus par acinus. Des moyennes peuvent être établies rapidement.

Nous donnons ici quelques chiffres concernant deux espèces : *G. sibiricus* et *S. scalaris*. Ces valeurs, ont été établies en étudiant environ 6 500 acini appartenant à 100 criquets.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques

Lot par lot, pourcentages d'acini avec IDS :

G. sibiricus Un lot de témoins (site des Druges, 2 300 m, Haute Maurienne)

6,3 % I — I ± 2,9 %

Premier lot intoxiqué (parking pont Saint Charles 2 056 m, au-dessus de Val d'Isère)

20 % I — I ± 3,3 %

Deuxième lot intoxiqué (parking Besson, 2300m, au - dessus de l'Alpe d'Huez)

28 % I — I ± 6,8 %

S. scalaris Un lot de témoins (la Duis, 2 300 m, proximité sources de l'Arc ; PNV)

11,9 % I — I ± 2,3 %

Un lot intoxiqué (parking de l'Écot, Haute Maurienne, hors PNV).

23,7 % I — I ± 3,5 %

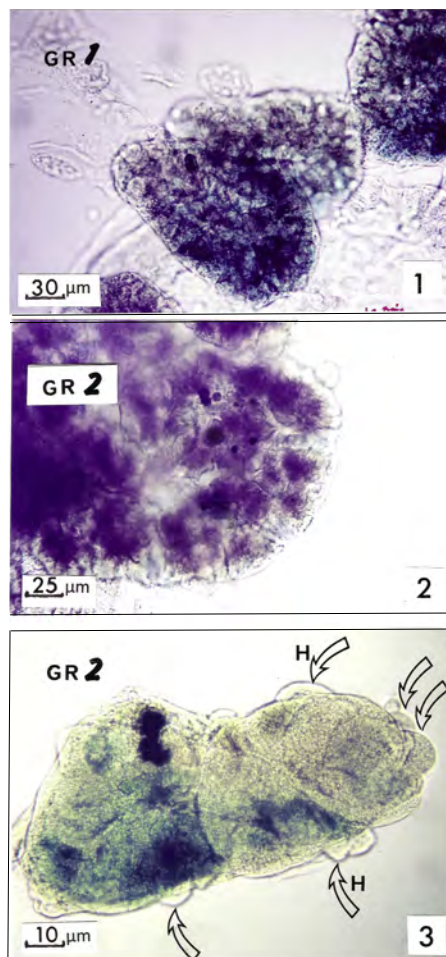
Cela vient en complément des résultats que nous obtenions en histologie. Mais il apparaît utile de souligner deux points nouveaux. Ainsi :

– ce que nous avons calculé jusqu'ici ne tient pas compte de l'intensité relative des troubles IDS d'un acinus à un autre ; pourtant l'observation microscopique montre clairement que la plupart des acini dégradés en zones polluées sont nettement plus atteints que la plupart des acini dégradés des criquets témoins ;

– on doit être prudents quant à la notion de « témoins » car, même en altitude, les pollutions par HAP ne peuvent pas être considérées comme nulles : on sait que les courants aériens entraînent les polluants à des distances souvent importantes et souvent jusqu'à des altitudes dépassant 3 000 m ; ce qui pourrait expliquer les valeurs « témoins » relativement élevées. Et doit-on, dans la Haute vallée de l'Arc, en apparence très « pure », tenir compte de l'influence éventuelle de machines agricoles qui pourraient être utilisées de temps à autre à la ferme de la Duis – abandonnée (?) – à 100 m de nos lieux de récolte ? Rappelons que certains criquets, même s'ils sont parfois considérés comme essentiellement sténophages (DAY & WATERHOUSE, 1953), ne dédaignent pas, à l'occasion, des nourritures inattendues : flaques d'huile, cambouis, courroies de cuir de sac à dos, couvertures de laine ou restes de pique-nique... Mais c'est quand même secondaire selon nous et reste du domaine de la curiosité !

Il est clairement possible de préciser ce qui correspond au premier point (Figures 1 à 6). En effet, nous introduisons maintenant la notion de **grade** comme le font régulièrement, par analyse extemporanée, les cancérologues, les chirurgiens au cours d'une intervention, pour estimer le degré de malignité d'une tumeur grâce à l'anatomie pathologique et en se référant à ce qu'ils connaissent déjà des tumeurs du même type : ici on peut estimer que les glandes salivaires correspondent à un même type et qu'il y a quatre grades dans l'intensité des troubles IDS. Le grade 1 correspond, pour une glande donnée, à des troubles de la colorabilité tout juste repérables ; dans les mêmes conditions, le grade 2 implique la présence d'inclusions inhabituelles, plus ou moins abondantes dans de nombreux lobules et bien distinctes des zones riches en acides nucléiques et en sécrétion ; le grade 3 correspond à des images d'aspect voisin mais où les inclusions sont devenues plus abondantes dans un nombre important d'acini d'une glande donnée ; et le grade 4 évoque une dégénérescence quasi

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)



Sixième étape

Définition des grades. Montages salivaires. Colorations au bleu de toluidine.

Fig. 1. Acini correspondant au grade 1, le plus proche de la normale, où les gouttelettes sont très peu nombreuses et de petite taille. *Stauroderus scalaris* de la Duis (2 300 m).

Fig. 2. Grade 2 : 8 gouttelettes et amas basophiles amorphes. *Gomphocerus sibiricus* du parking Besson (environ 2 200 m).

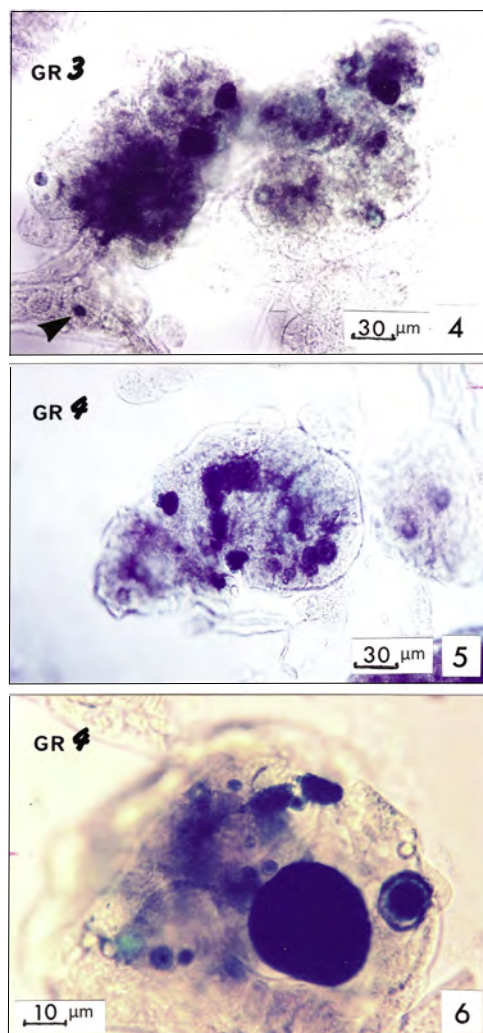
Fig. 3. Grade 2 : petit acinus de *Gomphocerus sibiricus* du parking St Charles (vers 2 000 m). Deux gouttelettes denses dans des cellules très peu colorables, sauf flaques basophiles locales et non délimitables ; **H** : hémocytes non colorés par le bleu.

Fig. 4. Grade 3 : acini de *Stauroderus scalaris* du parking de l'Écot (2000 m), envahis par des flaques basophiles et des gouttelettes généralement très denses. L'une d'elle est expulsée dans le canal excréteur (flèche). Abondance d'hémocytes pâles.

Fig. 5. Grade 4 : exemple de troubles concernant un autre criquet prélevé dans le même site. Grande accumulation de gouttelettes basophiles avec flaques plus ou moins denses dont une moniliforme.

Fig. 6. Grade 4 : acinus complètement « dégradé » - au sens habituel du terme - *Gomphocerus sibiricus* du parking St Charles.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques



Sixth stage

Définition of grades. Salivary preparations stained with toluidine blue.

Fig. 1. Grade 1: acini in *Stauroderus scalaris* (la Duis). Grade closest to normal state, with basophilic droplets sparse and very small.

Fig. 2. Grade 2: 8 droplets and amorphous basophilous accumulations in acinus of *Gomphocerus sibiricus* (Besson car-park).

Fig. 3. Grade 2: a small acinus with two droplets in poorly staining cells. H: hemocytes (*G. sibiricus*, St Charles car-park).

Fig. 4. Grade 3: dense basophilic material and abundant droplets in three acini. A dense droplet is expelled in a duct (*S. scalaris*, l'Ecot car-park).

Fig. 5. Grade 4: high abundance of basophilic material (*S. scalaris*, de l'Ecot car-park).

Fig. 6. Grade 4: strong degradation of a salivary acinus (*G. sibiricus*, St Charles car-park).

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

complète de l'ensemble de la glande salivaire avec accumulation de gouttelettes ou de blocs très basophiles, voire noirâtres dans de nombreux acini. Donc, nous avons tout récemment repris l'étude de la totalité des montages effectués pour notre texte de 2010.

Auparavant, nous avons utilisé les précautions qui suivent. Sur 120 animaux récoltés dans cinq sites, nous en avons seulement comptabilisé 97, en éliminant ceux qui, à la dissection, montraient un tube digestif pratiquement vide – sans que l'on puisse connaître la raison de cette inappétence –, et ceux qui étaient parasités de manière évidente. Des larves de mouches Tachinides à des stades différents peuvent ainsi exister dans la cavité générale et paraissent se nourrir essentiellement en brouyant les testicules ; dans d'autres cas, ce sont des vers Mermithidés que l'on trouve à plusieurs stades dans la cavité générale ; mais il est particulièrement important de souligner l'abondance de grégarines dans l'intestin moyen, voire dans les caeca où elles sont implantées dans l'épithélium au stade trophozoïte. Ce point n'avait pas été pris en compte en 2010.

Dans chacun des sites étudiés, nous présentons maintenant les résultats portant sur les degrés, les grades de dégradation salivaire estimés (dans l'ordre que nous avons choisi au sujet des pourcentages d'acini dégradés). À chaque glande (rappelons que chaque glande de criquet contient en moyenne 60 acini), c'est-à-dire à chaque criquet, correspond un grade de dégénérescence compris entre 1 et 4. On pourrait détailler, criquet par criquet, présenter pour chaque lot de criquets le grade de chaque glande ; mais pour faire court, nous signalons seulement le grade moyen approché pour 10 criquets – soit 10 glandes – d'un lot donné, témoin ou intoxiqué ; et le critère utilisé est une estimation du nombre de glandes où l'on constate un dépassement du grade 2.

Importance des dégradations salivaires

(estimée sur des lots ramenés à 10 criquets).

- *G. sibiricus* - 22 témoins, 3 glandes > grade 2, soit 1,6 sur 10 criquets
sur 22 St Charles, 10 glandes > grade 2, soit 4,5/10
sur 16 Besson, 8 glandes > grade 2, soit 5/10
- *S. scalaris* - 22 témoins 5 glandes > grade 2, soit 2,2 sur 10 criquets
sur 15 Écot 8 glandes > grade 2, soit 5,3/10

Cela donne une idée de l'intensité des dégradations, c'est-à-dire, non plus seulement du nombre d'acini lésés, comme nous l'avons dit en 2010, mais de la profondeur des lésions. Ce sont des valeurs qui pourraient être qualifiées de subjectives, mais qui doivent renforcer de simples comptages directs et les pourcentages d'acini avec IDS. Nous pensons qu'elles sont fondamentales, complémentaires. Remarquons qu'elles sont, par ailleurs, plus rapides à obtenir que ne l'étaient les pourcentages. Ce point suggère bien qu'il ne faut pas négliger certains aspects « subjectifs » d'observations qui peuvent paraître *a priori* « peu scientifiques ». Et cela pourrait être utile dans un programme plus ambitieux que celui qui fut le nôtre, où l'on analyserait des valeurs portant sur des sites plus divers et des régions plus vastes.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques

Quant au second point (qu'est-ce qu'un témoin ?), il est évidemment impossible de déterminer un degré zéro de pollution ; on doit se contenter d'approximations. Certains le font couramment en analysant l'accumulation de toxiques polluants des sols, donc le milieu ambiant, végétal essentiellement. Et compte tenu des perfectionnements permettant d'effectuer des analyses fines, avec des techniques appropriées, par spectrométrie de fluorescence, par exemple, il serait possible de préciser la densité, voire la composition ponctuelle en HAP de fumées repérées en différents sites périurbains et surtout ruraux, tous fondamentalement névralgiques pour l'avenir humain, et secondairement incorporés dans un sol. Ce qui signifie que l'on pourrait définir, comme base et avec précision, ce qu'est un témoin végétal ou animal, considéré comme vierge de toute pollution. Comparativement, en différents points du sol d'un milieu « naturel » soumis à des pollutions, on pourrait alors évaluer le poids d'un agent toxique particulier sur les êtres vivants.

En 2004, le Laboratoire Régional des Ponts et Chaussées de Lille publiait, par l'intermédiaire du Certu, des résultats extrêmement précis concernant les teneurs moyennes en HAP de différents types de sols. L'analyse portait sur 14 molécules dont le fluoranthène et le benzo(a)pyrène dans des sols urbains, dans un sol rural et un sol forestier. Pour ces deux HAP particuliers, un sol rural, clairement agricole, apparaissait très peu pollué par rapport à des sols urbains fortement imprégnés, 1200 et 400 fois plus riches, en $\mu\text{g}/\text{kg}$; et, chose curieuse, *a priori*, le sol de forêt donnait des valeurs tout aussi inquiétantes : la forêt avait-elle « peigné » l'atmosphère ambiante en piégeant les HAPs ? Par ailleurs et dans la même publication, l'INRA de Bordeaux décrivait les protocoles de prélèvement et d'analyse des HAP pour les plantes consommables, du blé à la vigne. Depuis, les méthodes d'analyse ont sans doute évolué, devenant plus précises, portant peut-être sur des échantillons biologiques plus petits.

Comme nous l'avons dit dans notre introduction, certains auteurs ont estimé ou évalué chez des animaux bio-accumulateurs (RAMADE, 1993) des « réponses permettant de prévoir et/ou de révéler une altération de l'environnement ». Les réponses peuvent être diversement appréciées. Cela sans pouvoir se référer à des conditions idéales proches de pollution zéro.

En milieu terrestre, à part des Oligochètes ou certains Crustacés Isopodes, les observations sont peu diversifiées. Et, avec J.-F. PONGE, nous constatons « l'extrême rareté » des recherches et des tests impliquant des HAP. En bref, chez les Insectes, on semble s'intéresser seulement aux intoxications par les insecticides. Nous soulignons le manque d'intérêt concernant les Orthoptères. Le cas des Acridiens qui brouillent la végétation herbacée du sol, polluée par HAP, reste un champ d'exploration quasi vierge. Nous nous demandons pourquoi. C'est loin de toute logique.

Quoi qu'il en soit, dans une étude très fouillée, précise et diversifiée, J.-F. PONGE (2004) a constaté des perturbations comportementales dans des populations de Collembolles du sol en contact avec des composés organiques, 16 substances dont le fluoranthène, liées à l'industrie pétrolière qui a, autrefois, souillé durablement les sols de la région de Pechelbronn. Il a considéré le cas de très nombreuses espèces

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

(29 à 37 suivant les expériences) mais, il faut le noter, déterminables seulement par un petit nombre de spécialistes. L'ensemble est extrêmement original. J.-F. PONGE dit que des tests comportementaux doivent être pris en considération avec ce matériel. D'autant qu'il doute de la représentativité de certaines espèces d'animaux du sol – Nématodes, Enchytréidés, Annélides, Acariens ou même certaines espèces de Collembolés. Il dit qu'il est important d'évaluer la perte de biodiversité provoquée par des pollutions locales aux HAPs. Pour lui, les effets seraient différents selon les espèces, portant à la fois sur leur abondance et sur leur contenu intestinal (consommation fongique et bactérienne). Les systèmes d'analyse de J.-F. PONGE, fondamentalement très précis et informatifs, sont cependant extrêmement contraignants pour constituer une pratique courante. Nos observations sur des criquets sont beaucoup plus modestes et les techniques employées sont très simples, demandant seulement une bonne expérience de microscopiste.

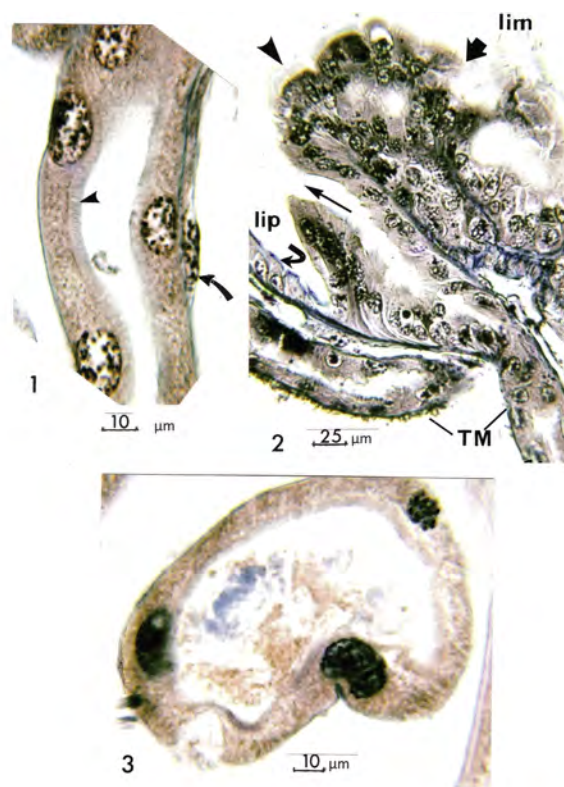
N.B. Ce qui pourrait être une nouvelle étape d'analyse :

Utilisation des tubes de Malpighi pour un test calqué sur le test salivaire précédent

Quoiqu'il en soit, d'autres constatations anatomiques récentes pourraient nous inciter maintenant à une extrapolation du test microscopique salivaire. Nous indiquons, à part de notre synopsis, une ébauche nouvelle. Nous disposons de faits en nombre suffisant pour présenter dès lors quelques lignes qui nous paraissent être un complément essentiel.

Chez les criquets adultes, les glandes salivaires et les tubes de Malpighi ont atteint leur taille définitive, ce qui n'est pas le cas des autres éléments du tube digestif. On n'y repère plus de mitoses, même en pratiquant des injections de colchicine particulièrement révélatrices. On peut toutefois en noter encore, lors d'une agression toxique, juste au débouché des tubes dans l'intestin moyen (nous avons montré cela en soulignant le fait grâce à la colchicine). Rappelons que, chez les criquets, les tubes naissent clairement à partir du mésentéron, à la jonction mésentéron-proctodeum, et que, à ce niveau, leur épithélium comporte déjà une bordure en brosse, beaucoup plus mince que la ciliature mésentérique, mais qui, nulle part, ne peut être confondue avec le revêtement chitinoïde typique de l'épithélium de l'intestin postérieur dont on connaît l'origine tégumentaire. Quoiqu'il en soit, les tubes de Malpighi se caractérisent totalement avec formation de deux types de cellules bien différenciées, les unes muqueuses à cytoplasme très peu colorable et d'autres, largement plus abondantes, qui effectuent le fonctionnement essentiel de ce qui peut évoquer un néphron. Les cellules muqueuses auraient un rôle protecteur de la paroi dans les cas où des cristaux se formeraient durant le transit des liquides excrétés (PATTON, 1953). Les autres plus abondantes, sont sans doute très actives sur le plan de la régulation ionique, comme chez de nombreuses espèces d'insectes (STOBART & SHAW, 1964), mais aussi pour l'élimination de toxiques divers, en particulier les HAP (BOUCHARD, 1999).

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques



Ébauche pour un test simple où l'on utiliserait les tubes de Malpighi. Histologie – trichrome de Masson.

Fig. 1. Structure proche de la normale d'un TM de criquet se nourrissant d'herbe polluée par des fumées de moteur à essence. Flèche courte : une cellule de la gaine musculaire. Pointe de flèche : bordure en brosse des cellules principales. (*Gomphocerus sibiricus*).

Fig. 2. Lésions discrètes chez *G. sibiricus* ayant consommé de l'herbe polluée par le diesel : origine d'un TM à la jonction intestin moyen/intestin postérieur : quelques cellules surcolorées ou prépycnotiques. lim : lumière intestin moyen ; lip : lumière intestin postérieur ; grosse flèche courte : zone dégradée de la bordure en brosse intestinale ; tête de flèche : zone où la bordure en brosse est respectée ; flèche courbe : revêtement chitinoïde de l'épithélium de l'intestin postérieur.

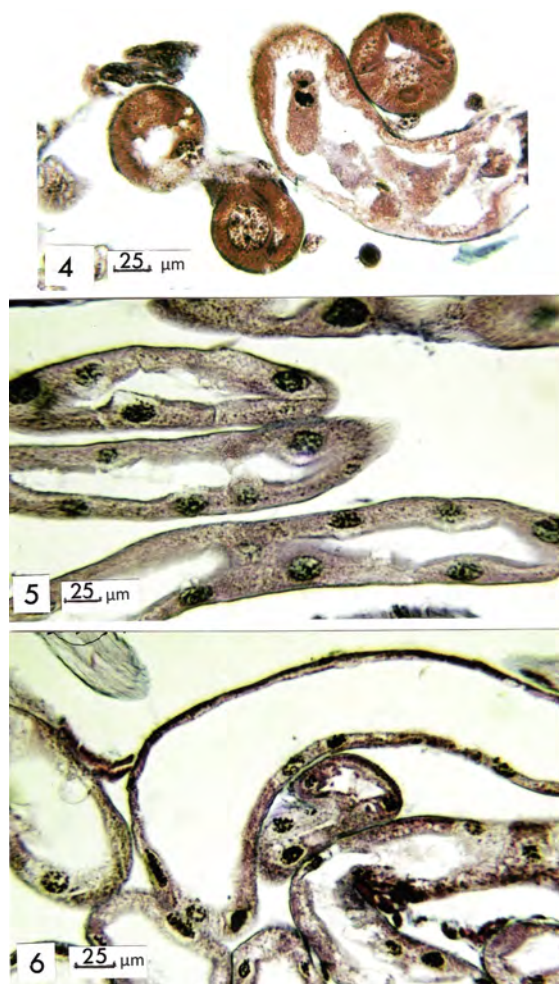
Fig. 3. Coupe d'un TM gonflé, très dégradé par la fumée de diesel ; bordure en brosse très réduite (*G. sibiricus*).

Proposal for a simple test using Malpighian tubules. Sections stained with Masson's trichrome.

Fig. 1. Subnormal aspect of a Malpighian tubule in a grasshopper (*Gomphocerus sibiricus*) feeding on grass polluted with petrol-engine fumes.. Curved arrow: a cell of the conjunctivo-muscular sheath; arrow-head: brush border of principal cells.

Fig. 2. Discret lesions in *Gomphocerus sibiricus* after consumption of grass polluted by diesel-engine fumes. Starting-point of a Malpighian tubule at junction of midgut and hindgut, showing some overstained or prepynotic cells; lim: midgut; lip: hindgut; short arrow: disorganized brush border; arrow-head: brush border with normal aspect; curved arrow: chitinized sheath of hindgut.

Fig. 3. Section of a swollen Malpighian tubule, strongly degraded by diesel-engine fumes, with a reduced brush-border (*G. sibiricus*).



Ébauche pour un test simple où l'on utiliserait les tubes de Malpighi.
Histologie – trichrome de Masson (suite).

Fig. 4. Désagrégation d'un TM chez un criquet ayant consommé du BaP (*Gomphocerus sibiricus*).

Fig. 5. Altération de l'épithélium d'un TM nourri à partir de roseaux poussant sur un sol pollué par le fluoranthène (*Chorthippus sp.*).

Fig. 6. Destruction très poussée, localement complète de l'épithélium d'un TM chez un animal pollué comme dans la figure 5 par le fluoranthène. Ne pas confondre les noyaux plus ou moins pycnotiques avec des mitoses, fondamentalement inexistantes dans les TM (*Chorthippus sp.*).

Proposal for a simple test using Malpighian tubules. Sections stained with Masson's trichrome.

Fig. 4. Disaggregation of a Malpighian tubule in a grasshopper having consumed BaP (*G. sibiricus*).

Fig. 5. Alteration of the epithelium of a Malpighian tubule in a grasshopper (*Chorthippus sp.*) feeding on a rose-bush growing in soil polluted by fluoranthene.

Fig. 6. Advanced destructive effects of fluoranthene in *Chorthippus sp.*, showing flattened Malpighian tubule, the epithelium of which is degenerated, with more or less pycnotic nuclei.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques

Débarassés des nécessités de l'activité mitotique, donc des phénomènes liés à la croissance, les glandes salivaires et les tubes de Malpighi des criquets adultes se prêtent à des études sur des cellules apparemment « quiescentes ». Les fonctions des cellules de Malpighi sont devenues purement métaboliques, sécrétoires ou détoxifiantes et sont d'un intérêt particulier.

En nous basant sur les coupes *in toto* utilisées pour les premières étapes de notre travail, nous disposons de nombreuses images très parlantes, mais qui ne suffisent pas. Pour aboutir, la technique sera simple et rapide.

Ces tubes se prêtent, comme les glandes salivaires, à l'élaboration d'un test comparable à celui que nous préconisons avec celles-là ; il sera même plus rapide: on peut pratiquer, après dissection, des prélèvements et des colorations en salière, mais plutôt sur lames. Tout nous pousse à adapter la méthode.

Nous avons dit que les tubes subissaient de profondes modifications structurales en fonction des traitements toxiques subis. Ainsi, les cellules muqueuses peuvent régresser et les cellules principales tendre à disparaître. Les effets du benzo(a)pyrène et surtout du fluoranthène sont particulièrement remarquables. Ils sont frappants si l'on compte les cellules qui tapissent fondamentalement la lumière des tubes ; car elles se déforment, s'aplatissent à la façon d'une pâte à crêpe ou même laissent la basale des tubes en contact direct avec la lumière. Et pour les compter il suffit de disposer parallèlement plusieurs tubes sur lame – en faisceaux - et de les colorer en mettant en valeur leur structure grâce à l'*hématoxyline de HARRIS* qui prend seulement et très vigoureusement sur les noyaux. La coloration est ultra rapide, directe et très intense (BOUCHARD, 1987). Le montage final et la conservation du matériel individuel se font alors comme pour la glande salivaire. Il est clair que les comptages effectués pour une longueur donnée de tubes seront faits non seulement « à la main » mais aussi de manière automatique. La technique donnera d'excellents résultats, complémentaires du présent travail.

Conclusion d'ensemble de notre synopsis

L'augmentation des multiples formes de combustion et de pyrolyse qui dépendent des activités humaines, leur transport et leur dépôt sur le sol et les végétaux, induisent de graves effets sur les criquets qui constituent notre matériel-test. Chez plusieurs espèces différentes, des anomalies dues aux polluants peuvent être décelées lors du déroulement de la mitose et de certains processus fonctionnels de plusieurs organes.

Compte tenu de notre principe d'analyse basé sur l'étude d'animaux faciles à récolter dans la nature, est-il utopique d'envisager, à une autre échelle, un système de détection itinérant, une sorte de balayage méthodique de secteurs choisis du territoire ? Il conviendrait de répertorier des secteurs particulièrement frappés par des pollutions et d'en dresser une cartographie dynamique. Pourrait-on envisager des antennes mobiles ? De plus, elles seraient équipées non seulement pour repérer,

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

comme on sait le faire, les HAPs dans les sols, mais aussi dans des organismes vivants très susceptibles, tels des criquets, bio-accumulateurs effectifs. Cela avec un test accessible.

Voilà qui pourrait ressembler à une gageure ! Nullement : d'éventuels chercheurs suivraient en cela les traces d'entomologistes et écologistes passionnés qui ont opéré dès les années 60 ou 70. À notre connaissance, VERNEAUX (1973) et son équipe de spécialistes ont été parmi les premiers à travailler sur de vastes régions, mais en milieu aquatique. Ils ont inventorié la faune arthropodienne, donc la qualité des nombreux ruisseaux de toute la Franche-Comté. Depuis lors, d'autres ruisseaux sont méthodiquement prospectés par des petits groupes qui travaillent grâce aux subventions des Fédérations départementales ou régionales de pêche et, apparemment, grâce à l'INRA. Ils utilisent des tests faunistiques, essentiellement l'IBGN, mais aussi des tests plus laborieux, donc plus coûteux en matériel et en spécialistes.

Dans cet esprit, il conviendrait de cartographier précisément la répartition et les variations dans le temps des pollutions aériennes locales, bases des atteintes en pathologie animale. Une telle cartographie permettrait sans doute de consolider la notion fondamentale d'individus témoins, récoltés dans des secteurs indiscutablement dépourvus de pollutions, donc de répondre au second point évoqué plus haut dans ce texte. Simultanément, dans les secteurs plus ou moins pollués, leurs effets pourraient être estimés et évalués chez les criquets, animaux clairement placés en première ligne... Tout en rêvant à l'application au vivant d'un éventuel « kit » comme il en existe pour tester les sols, on pourrait déjà faire beaucoup par l'usage méthodique et simple de la dissection ! On l'a fait lors de la première étape de notre travail, mais la technique était évidemment trop fruste : nous avons testé – en laboratoire ! – la pénétration de HAPs employés à des doses relativement importantes, alors que « dans la nature » les concentrations de polluants sont malgré tout et heureusement très faibles, donc, hélas, indétectables avec nos seuls moyens.

En outre, il est clair que notre technique d'observation directe de montages colorés de glandes salivaires serait tout-à-fait possible puisqu'elle est rapide et sans équivoque. Nous pensons aussi que l'observation systématique des montages de tubes de Malpighi pourra également s'avérer utilisable.

On obtiendrait alors des résultats permettant d'évaluer précisément, chez des criquets, le degré des aberrations anatomiques et fonctionnelles dues aux pollutions. On parviendrait ainsi à un stade où les observations constitueraient un ensemble fiable. Cet ensemble permettrait de faire le lien avec la recherche en pathologie médicale. Lien qui nous paraît être ténu. De fait, malgré les moyens modernes, une analyse des données concernant des effets des HAPs sur l'animal, en milieu naturel, conduit à constater la pauvreté des connaissances écologiques en physiopathologie.

Remarque

F. ZAJDELA s'était penché sur le cas des criquets de montagne, dont *Psophus stridulus*, qui lui paraissait être en régression dans les Alpes, etc., où il soupçonnait l'intervention de pollutions industrielles.

Criquets sauvages en zones polluées par hydrocarbures polyaromatiques

Notre seul regret est de n'avoir pu approfondir ses réflexions. Présents aux alentours du col de la Croix de Fer et du Glandon, sur le flanc Est de Belledonne, à peu de distance des usines du fond de vallée, le long de l'Arc – La Chambre – les *Psophus* dont il nous parlait paraissent être de moins en moins abondants, ce qui ne permet plus l'analyse précise à différentes altitudes.

RÉFÉRENCES

- ASTA, J. (1993).- Les lichens, indicateurs de pollution atmosphérique dans la région Rhône-Alpes. *Bull. Assoc. Fr. Lichen., Mémoires*, n° 2, 71-84.
- BESSIS, M. & BERNARD, J. (1958).- *Hématologie clinique*. Paris, Masson et C^{ie} Éd., 526 p.
- BLAKE, G. (1997).- *A new methodology concept in aquatic ecotoxicology: the integrated approach from laboratory to outdoor experimentation*. In: *Geosciences and water resources experimental data modelling*. Bardinet C. & Royer J.J., Springer Intern. Publish., Berlin, p. 85-92.
- BLAKE, G. (2009).- Les eaux pluviales dans l'aménagement : principes, stratégies et solutions techniques. LOCIE, École Polytechnique Savoie. Journées de l'eau de l'APS. 3w.graie.org.
- BOUCHARD J. (1965).- Action différentielle sur l'œuf d'Ascidie du 3-4 benzopyrène, ou du 1-2 benzopyrène préalablement irradiés ou non. *C. R. Soc. Biol.*, **159** (3), 540-544.
- BOUCHARD, J. (1966).- Influence du solvant sur l'activité, dans l'œuf d'Ascidie, d'un hydrocarbure fluorescent, le benzopyrène. *C. R. Soc. Biol.*, **160** (3), 457-460.
- BOUCHARD, J. & MAY, R.M. (1967).- Test stathmocinétique appliqué à l'étude de la physiologie de la mitose dans l'épiderme normal, cicatriciel ou tumoral. *Arch. Sci. Physiol.*, **21** (2), 153-183.
- BOUCHARD, J. (1987).- *Recherche de nouveaux critères pour l'étude des principales formes de prolifération cellulaire chez la souris*. Thèse d'Etat, Univ. Paris XI, Orsay, 271 p. et fasc. d'illustration, 200 p. Microfilm Univ. Grenoble.
- BOUCHARD, J. (1998).- Évaluation de l'impact de produits toxiques sur le criquet de montagne *Gomphocerus sibiricus* (colchicine et 6-mercaptopurine). *Ann. Sci. Nat.*, **19** (3-4), 127-140.
- BOUCHARD, J. (1999).- Effets produits chez trois espèces de criquets par l'ingestion d'hydrocarbures polyaromatiques réputés cancérigènes. *Ann. Sci. Nat.*, **20** (2), 53-66.
- BOUCHARD, J. & BOUCHARD-MADRELLE, C. (2000).- Lésions provoquées chez le criquet *Gomphocerus sibiricus* par l'absorption de benzopyrène et de 3-méthylcholanthrène. *Ann. Sci. Nat.*, **21** (4), 119-136.
- BOUCHARD, J. & BOUCHARD-MADRELLE, C. (2004).- Impacts de pollutions atmosphériques sur le mésentéron et la glande salivaire de criquets sauvages – Évaluation d'un modèle criquet. *Bull. Soc. zool. Fr.*, **129** (3), 271-296.
- BOUCHARD, J. & BOUCHARD-MADRELLE, C. (2005).- Pollution atmosphérique par les « nouveaux carburants ». Application d'un modèle criquet. *Bull. Soc. zool. Fr.*, **130** (3), 263-286.
- BOUCHARD, J. & BOUCHARD-MADRELLE, C. (2010).- Mise en évidence rapide de pollutions du tapis végétal par l'étude d'anomalies de la glande salivaire de criquets sauvages. *Bull. Soc. zool. Fr.*, **135** (3-4), 281-297.
- CERTU, Lab. Régional des Ponts et Chaussées de Lille. (2004).- *Comparaison des méthodes d'analyse des éléments traces métalliques ETM et des hydrocarbures aromatiques polycycliques HAP sur les sols et les végétaux*. Dossier Certu, Centre d'Études sur les Réseaux, Lyon, 120 p.
- CHEVREMONT, M. (1956).- *Traité d'histologie et cytologie*. Desoer Éd., Liège, 826 p.
- DAY, M.F. & WATERHOUSE, C. (1953).- *Functions of the alimentary system*. In: *Insect Physiology*. Roeder, K.D. Ed., N.Y. and London, 299-349.

Bulletin de la Société zoologique de France 141 (2)

- DADD, R.H. (1963).- Feeding behavior and nutrition in grasshoppers and locusts. *Adv. Insect Physiol.*, **1**, 47-109.
- DUSTIN, A.P. (1936).- La colchicine, réactif de l'imminence caryocinétique. *Arch. Portug. Sci. Biol.*, **5**, 38-43.
- FRITSCH, C. (2010).- *Utilisation intégrée de bioindicateurs pour la surveillance des sols et des systèmes terrestres*. Thèse, Univ. de Franche-Comté, 353 p.
- GRAFFI, A. & BIELKA, H. (1963).- *Problèmes de cancérologie expérimentale*. Gauthier-Villars Éd., Paris, 560 p.
- GOMOT-DE VAUFLEURY, A. (2000).- Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb and pentachlorophenicol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **46** (1), 41-50.
- HAUBRUGE, E. & AMICHOT, M. (1998).- Les mécanismes responsables de la résistance aux insecticides chez les Insectes et les Acariens. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, **2** (3), 161-174.
- INERIS, PICHARD, A. (2005).- Dossier composants organiques fossiles ou générés par la combustion incomplète de matières organiques. – également émis lors des éruptions volcaniques. Cas du fluoranthène au niveau du sol, 39 p.
- IRIS (1993).- Dossier fluoranthène (CASRN 206-44-0). Actualisation: Integrated Risk Information System. https://cfpub.epa.gov/ncea/iris/iris_documents/documents/subst/0444_summary.pdf.
- LANGERON, M. (1942).- *Précis de microscopie : technique-expérimentation diagnostic*. Masson & C^e Éd., 1339 p.
- LA VOIE, E.J., HECHT, S.S., BEDENKO, V. & HOFFMANN, D. (1982).- Identification of the mutagenic metabolites of fluoranthene, 2-methylfluoranthene, and methylfluoranthene. *Carcinogenesis*, **3** (8), 841-846.
- MARCHAND, N., BESOMBES, J.L., MASCLLET, P. & JAFFREZO, J.L. (2005).- Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two french alpine valleys. *In: Environmental Chemistry*, Heidelberg, S.B. Edit., 409-417.
- MASSON, P. (1956).- *Tumeurs humaines. Histologie, diagnostic et techniques*. Maloine Éd., Paris, 1 214 p.
- PATTON, R.L. (1953).- Excretion. *In: Insect Physiology*, Roeder, K.D. Ed., Academic Press, N.Y. and London, 387-403.
- PONGE, J.F. (2004).- *Effets des composés organiques sur la faune du sol. Perturbation des communautés et recolonisation des substrats pollués*. HAL. Id : hal. 00538698. hal.archives-ouvertes.fr, 42 p.
- RAMADE, F. (1993).- *Dictionnaire encyclopédique de l'Écologie et des Sciences de l'Environnement*. Édiscience international Éd., Paris, 822 p.
- STOBBART, R.H. & SHAW, J. (1964).- Salt and water balance : excretion. *In: The Physiology of Insecta*. Vol. III. Rockstein, M. Ed., Acad. Press, N.Y. and London, 189-258.
- TARANTINI, A. (2009).- *Modulation de la génotoxicité d'hydrocarbures polycycliques (HAP) en mélanges. (mélanges réels)*. Thèse, Grenoble, 174 p.
- TREHERNE, J.E. & PICHON, Y. (1972).- The Insect blood-brain barrier. *Adv. Insect Physiol.*, **9**, 257-313.
- VERNEAUX, J. (1973).- Cours d'eau de Franche-Comté (Massif du Jura). *Essai de Biotypologie*. Thèse d'Etat, Univ. Franche-Comté, Besançon, France, 260 p.
- VOISIN, J.F. (1987).- Observations sur une pullulation d'*Aeropus sibiricus* en Grande Sassièrre (Savoie). *Bull. Soc. Entomol. Fr.*, **91** (7-8), 213-218.
- XUE, W., & WARSHAWSKY, D. (2005).- Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: a review. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **206** (1), 73-93.