

Écotoxicologie/Histologie

L'AUTOMÉTALLOGRAPHIE APPLIQUÉE À UN MODÈLE OLIGOCHÈTE : *EISENIA FETIDA TYPICA*. AVANTAGES ET LIMITES DE LA TECHNIQUE

par

Claire GRELLE

et Michel DESCAMPS

Dans le but de valider la technique d'autométallographie en tant qu'outil de diagnostic pour la faune du sol, nous l'avons appliqué à l'oligochète *Eisenia fetida* en condition d'intoxication chronique par le cadmium (élevage dans un terreau contenant 80 mg/kg de cadmium). Nous avons recherché la présence de métal à la fois sur des coupes à la paraffine et sur des coupes à congélation de manière à minimiser les éventuelles pertes de métal dues à la procédure d'inclusion. Témoins et intoxiqués présentent un marquage important au niveau du tissu chloragène, à mettre en corrélation avec la présence de fer. Les seules différences observables chez les intoxiqués concernent d'une part un faible marquage au niveau de la cuticule et d'autre part la présence de terre cadmiée dans le tube digestif. Cette présence de terre n'est jamais observée chez les témoins et atteste d'un métabolisme perturbé. Compte tenu de la non spécificité des métaux vis-à-vis de la technique d'autométallographie et à l'importante quantité de fer présente dans le tissu chloragène, nous concluons à l'impossibilité d'utiliser cette méthode comme outil de diagnostic chez l'oligochète *Eisenia fetida*.

Advantages and limits of autometallography : application to the earthworm *Eisenia fetida typica*

In order to evaluate the degree of contamination of soil fauna by heavy metals, we used autometallography. Earthworms (*Eisenia fetida*) maintained in a cadmium-contaminated soil (an horticultural mould containing 80 mg/kg of cadmium) were used as test animals. Autometallographic procedures were applied on paraffin sections (7 µm) as well as on frozen sections (approximately 10 µm), the later in order to prevent the loss of metal due to the histological procedure (fixation, dehydration, paraffin embedding, etc.). Both controls and intoxicated animals showed silver deposits on chloragocytes. This labelling

Bulletin de la Société zoologique de France 125 (1)

was correlated with the presence of iron in this cell type. The only differences observed in cadmium intoxicated animals concerned firstly, a weak reaction over the cuticle and secondly, the presence of cadmium-contaminated soil in the digestive tract. The presence of soil in the digestive tract was never observed in controls and could be attributed to a disturbance in the physiology of intoxicated worms. In conclusion, autometallography not being metal specific and due to the amount of iron always present in chlorogocytes, the autometallographic procedure cannot be used as a diagnostic tool for soil contamination in the earthworm *Eisenia fetida*.

Introduction

Une activité industrielle importante a laissé dans la Région Nord-Pas-de-Calais de nombreuses friches et terrains pollués. Une des conséquences majeures de cette pollution est l'accumulation de métaux lourds dans la couche superficielle de certains sols. Cette concentration anormale en éléments étrangers entraîne parfois des altérations profondes de la biocoenose (flore et faune) nuisant à l'équilibre écologique du milieu.

Parmi les invertébrés jouant un rôle prépondérant dans la structuration des sols, les Oligochètes sont particulièrement vulnérables aux pollutions métalliques, disparaissant alors parfois complètement. Les Oligochètes sont capables d'accumuler d'importantes quantités de métaux (SCAPS *et al.*, 1997 ; GRELLE & DESCAMPS, 1998), vraisemblablement jusqu'à un seuil critique variable selon les espèces ou la biodisponibilité des métaux.

Chez les Oligochètes, le cadmium est pour une grande partie stocké au niveau du tube digestif (plus de 60 %) ainsi que dans la paroi du corps (HONEYCUTT *et al.*, 1995). Le tube digestif des Oligochètes est entouré d'une couche de cellules, le tissu chlorogène, composé de chlorogocytes et d'éléocytes (*in* JAMIESON, 1981), qui intervient dans de nombreuses fonctions métaboliques : métabolisme et stockage du glycogène et des lipides, stockage des produits d'excrétion, des xénobiotiques et des métaux lourds. Au sein des chlorogocytes, on observe des structures concentriques denses aux électrons, les chlorosomes, contenant outre des sulfures et de la matière organique, du calcium, du magnésium et du phosphore. MORGAN & MORGAN (1989) ont montré que c'est au niveau de ces chlorosomes que se lie le plomb, très vraisemblablement à des ligands contenant du phosphore. Un deuxième type de granules, riches en soufre, est également observé et séquestre plus particulièrement le cadmium, lié alors vraisemblablement à des métallothionéines.

Lors d'une intoxication expérimentale, plusieurs techniques peuvent être envisagées afin de suivre le devenir des métaux (HOPKIN, 1989 ; CAJARAVILLE, 1995) :

- l'utilisation de précurseurs radioactifs qui seront métabolisés par l'animal. Cette technique est cependant très lourde et nécessite des précautions importantes de la part de l'expérimentateur ;

- la quantification des métaux par sonde à l'aide d'un microscope électronique est une méthodologie de choix mais qui reste onéreuse et peu envisageable en routine.

- la visualisation des métaux par autometallographie semble être une alternative satisfaisante pour l'étude de leur localisation et peut même dans certains cas être envisagée comme support d'une quantification (SOTO & MARIGOMEZ, 1997). Il s'agit par

Autométallographie appliquée

ailleurs d'une méthode relativement peu coûteuse tant que l'on ne passe pas à une technologie plus lourde qui est celle de la microscopie électronique, et pouvant donc être employée de façon routinière.

La technique autométallographique est déjà appliquée avec succès à des invertébrés aquatiques (voir entre autres, CAJARAVILLE, 1995 ; SOTO & MARIGOMEZ, 1997). En ce qui concerne la faune du sol, la technique a également été appliquée avec succès au Chilopode *Lithobius forficatus* L. (VANDENBULCKE *et al.*, 1998 a & b). Cependant, comme ce Myriapode présente une détoxification active, il est difficile de l'envisager comme modèle pour un outil de diagnostic et nous nous sommes tournés vers le modèle Oligochète *Eisenia fetida* comme animal-test.

Matériel et méthodes

Animaux et méthode d'intoxication

La souche utilisée dans notre expérimentation est constituée d'*Eisenia fetida typica* vivant dans un terreau horticole contaminé au cadmium. La dose de 80 mg/kg a été choisie en fonction de dosages effectués sur le terrain, au voisinage d'une usine métallurgique. Avant toute manipulation, les vers sont systématiquement mis à jeûner environ une semaine sur du papier filtre humide afin de vider leur tube digestif de toute trace de terre.

Les vers vivent dans le sol contaminé et s'y reproduisent librement depuis environ trois années. Le taux moyen en cadmium des vers adultes se maintient aux environs de 80 mg/kg de poids sec.

Principe de l'autométallographie

L'autométallographie est une technique d'auto-amplification par l'argent selon un procédé photographique sur coupes histologiques, de certains atomes métalliques (DANSCHER, 1981 ; DANSCHER *et al.*, 1987). L'autométallographie est une adaptation de la technique au sulfure d'argent de TIMM (1958), méthode qui permet de détecter les sulfures insolubles. Parmi ceux-ci se trouvent les sels de métaux toxiques, tels que le cadmium et le plomb (DANSCHER, 1981 ; DANSCHER *et al.*, 1987). De fait, en circonstances normales, la plupart des métaux présents dans les tissus sont précipités sous forme de sulfure suite au traitement par le sulfure de sodium (DANSCHER & SCHRÖDER, 1979). De ce fait, l'autométallographie n'est pas spécifique d'un métal donné. Néanmoins, parmi toutes les techniques histologiques, c'est la plus sensible et la plus efficace pour visualiser les métaux sur coupe histologique (SOTO & MARIGOMEZ, 1995). De plus, dans le cas d'une expérimentation, les différences observées entre témoins et intoxiqués sont dues obligatoirement à l'intoxication par le métal.

Fixation et inclusion

Les pièces ont été immergées juste après prélèvement dans le sulfure de sodium (0,1 % dans un tampon phosphate 0,1 M, pH 7,4) pendant 2 min puis fixées dans une solution de glutaraldéhyde (3 %, pH 7,4) pendant 15 min. Un nouveau traitement par le

Bulletin de la Société zoologique de France 125 (1)

Na₂S (7 min) suit cette première phase, un bain d'une heure dans la solution de glutaraldéhyde termine la fixation. Rincées 2 fois 5 min dans le tampon phosphate, les pièces sont déshydratées dans des bains d'alcool de concentrations croissantes (éthanol 70° : 30 min, 96° : 3 fois 30 min, 100° : 3 fois 1 heure, alcool butylique : 12 heures). L'imprégnation dans du paraplaste (*Paraplast Plus - Sherwood Medical Co.*) en fusion (60° C) se fait dans 3 bains successifs en un minimum de temps (12 heures) afin de limiter l'oxydation des sulfures métalliques.

Les pièces destinées aux coupes à congélation subissent le même traitement jusqu'au rinçage au tampon phosphate. Elles sont alors incluses dans le Tissue Tek (Labonord), congelées dans l'azote liquide et débitées au cryostat en coupes de 10 µm d'épaisseur.

Mise en œuvre de l'autométallographie

Des coupes, déparaffinées ou fraîchement décongelées sont plongées dans une solution de gélatine et séchées avant développement. Les lames, placées dans un récipient, sont recouvertes par le révélateur physique préparé juste avant l'emploi (composition : voir plus bas). Les récipients sont ensuite transférés dans un bain-marie à 26° C, à l'obscurité. Après un temps de développement de 90 min, déterminé par des essais préalables, les lames ont été rincées dans l'eau courante à 40°C pendant 45 min de manière à éliminer la gélatine et à réduire au maximum le bruit de fond. Les coupes sont enfin traitées par une solution de thiosulfate de sodium à 5 % (10 min), rincées à l'eau distillée et colorées. Les coupes sont observées après montage.

Révélateur physique

Les solutions stock suivantes sont préparées : 1) solution de gomme arabique à 50%, préparée directement à partir des pastilles de résine d'acacia ; 2) tampon citrate, 25,5 g d'acide citrique 1 H₂O + 23,5 g de citrate de sodium 2H₂O en solution dans de l'eau déionisée pour un volume final de 100 ml ; 3) agent réducteur, 0,85 g d'hydroquinone en solution dans 15 ml d'eau déionisée ; 4) apport d'ions d'argent, 0,11 g de lactate d'argent en solution dans 15 ml d'eau déionisée. Tous les produits sont d'origine Sigma. Le révélateur final est confectionné en mélangeant 60 ml de solution 1, 10 ml de solution 2, 15 ml de solution 3 et 15 ml de solution 4 immédiatement avant l'emploi (DANSCHER, 1981).

Mise en évidence du fer

Le fer ferrique présent dans les tissus est mis en évidence par la technique au bleu de Prusse (PERLS, 1866, *in* LISON, 1953) : les coupes déparaffinées sont traitées pendant 15 min dans une solution (v/v) fraîchement préparée de ferrocyanure de potassium à 2 % et d'acide chlorhydrique (2 %). Après rinçage, on effectuera une coloration des noyaux à l'azocarmin (15 min dans un mélange : Azocarmin 0,1g, acide acétique : 5 ml, H₂O : QSP 1 L).

Autométallographie appliquée

Étude ultrastructurale en microscopie électronique

Les animaux sont anesthésiés au chloroforme et les tissus étudiés sont prélevés et fixés par le glutaraldéhyde (3 %) dans un tampon phosphate (0,1 M, pH 7,4) pendant 2 heures. Après post-fixation par le tétroxyde d'osmium (1 %) dans le même tampon (1 h), les pièces sont déshydratées et incluses dans l'Épon (polymérisation à 60 °C pendant 48 h). Les coupes ultrafines (80-90 nm) contrastées à l'acétate d'uranyl et au citrate de plomb ont été observées grâce à un microscope électronique JEOL 100CX.

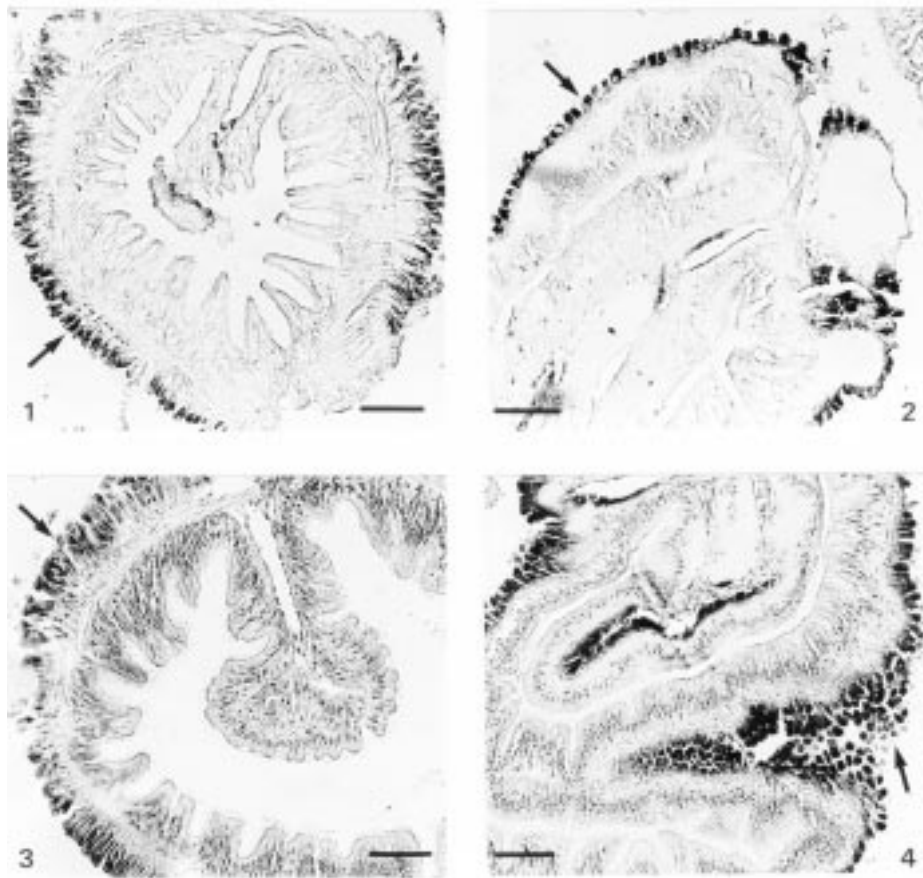
Résultats

Les images de marquage obtenue en autométallographie au niveau de l'intestin postérieur d'animaux témoins et intoxiqués sont présentées figures 1 et 2. On observe un marquage intense au niveau du tissu chloragène à la fois chez les animaux témoins et chez les animaux intoxiqués. Un marquage comparable a pu être observé sur des coupes à congélation réalisées afin de vérifier que des interférences possibles dues au traitement histologique des tissus n'étaient pas à mettre en cause. Chez les animaux intoxiqués, un faible marquage a pu être détecté au niveau de la cuticule et de l'épiderme ; il correspond vraisemblablement à une adsorption du métal ou à des particules de terre incrustées dans le tégument.

Le marquage observé au sein du tissu chloragène n'étant visiblement pas dû à une charge en cadmium, nous avons cherché à identifier le métal responsable. Il est connu que le tissu chloragène est riche en vacuoles contenant de l'hémoglobine et en sidérosomes contenant de la ferritine (*in* JAMIESON, 1981). Nous avons donc mis en évidence le fer par une technique histochimique classique, la technique dite au Bleu de Prusse (PERLS, 1866, *in* LISON, 1953). Les images des coupes ainsi traitées sont présentées figures 3 et 4. Le fer apparaît comme extrêmement abondant dans le tissu chloragène, aussi bien chez les témoins que chez les animaux intoxiqués, et peut certainement à lui seul expliquer l'intensité du marquage obtenu en autométallographie. Ce marquage obtenu n'est donc pas représentatif d'une intoxication mais est le reflet d'une activité métabolique normale.

Un autre fait observé mérite d'être mentionné : de nombreux résidus de terre cadmiée, marqués à l'argent, ont été retrouvés dans le tractus intestinal des animaux intoxiqués. La présence de terre n'étant jamais constatée chez les animaux témoins, cela atteste vraisemblablement d'une mauvaise assimilation ou d'un métabolisme ralenti et peut être mis en relation avec la petitesse des animaux intoxiqués par rapport aux animaux témoins.

Une étude ultrastructurale des cellules intestinales et du tissu chloragène a été réalisée en parallèle afin de déceler d'éventuels effets néfastes de la présence de cadmium dans les animaux. Aucune différence significative n'a pu être observée, tant au niveau du tissu chloragène qu'au niveau des cellules intestinales, entre les animaux vivant dans la terre contaminée en cadmium et les animaux témoins. Par contre chez les intoxiqués, de nombreux amas de glycogène, caractéristiques d'un état de stress, sont retrouvés dans les deux types cellulaires étudiés.

**Figures 1 & 2**

Marquage en autométallographie au niveau de l'intestin d'*Eisenia fetida* témoin (Fig. 1) et intoxiqué au cadmium (Fig. 2). Flèche : tissu chloragogène, barre : 50 μ m.

Figures 3 & 4

Mise en évidence histochimique du fer au sein du tissu chloragogène chez *Eisenia fetida* témoin (Fig. 3) ou intoxiqué au cadmium (Fig. 4). Flèche : tissu chloragogène, barre : 50 μ m.

Autométallographie appliquée

Discussion et conclusion

Compte tenu de la non spécificité de la technique d'autométallographie vis-à-vis des différents métaux, la plupart des métaux peuvent être visualisés sur coupes histologiques (DANSCHER & SCHRÖDER, 1979). Cette caractéristique est un avantage, permettant de mettre en évidence l'accumulation, et ce avec une grande sensibilité, des métaux traces polluants, par exemple chez les Mollusques Lamellibranches (SOTO & MARIGOMEZ, 1997) ou les Myriapodes Chilopodes (VANDENBULCKE *et al.*, 1998 a & b). La non-discrimination entre métaux est aussi un désavantage, tel que cela est démontré ici chez l'Oligochète *E. fetida* : en effet le stockage des métaux se fait au sein d'un tissu dont l'une des fonction est justement d'accumuler des déchets, entre autres les métaux provenant du métabolisme normal. La visualisation du métal au niveau de la cuticule quant à elle est trop aléatoire d'après ce qui a été observé pour être réellement utilisable comme test-diagnostic d'une contamination.

D'autres expériences ont également été tentées en parallèle : nous avons essayé de quantifier le cadmium sur coupes à la paraffine et à congélation par sonde X à l'aide d'un microscope électronique à balayage environnemental (Électroscan : collaboration avec l'École des Mines de Douai) qui aurait présenté l'avantage de pouvoir cartographier un tronçon relativement important (une coupe transversale entière par exemple) avec un minimum de préparation. Le même type d'expérience a été tenté avec un microscope analytique à rayons X GT-2000W (Oxford Instrument) sur des coupes à congélation épaisses (10 à 30 μm) et sur des intestins entiers d'animaux disséqués. Dans les deux cas, les résultats ont été peu concluants, la quantité de cadmium présent dans ce type de préparation étant vraisemblablement insuffisante pour être détectable.

En conclusion si l'utilisation de l'autométallographie pour détecter les métaux polluants au sein des tissus animaux semble être une voie intéressante sur certains modèles (CAJARAVILLE, 1995 ; SOTO & MARIGOMEZ, 1997 ; VANDENBULCKE *et al.*, 1998 a et b), toutefois, son utilisation sur l'Oligochète *Eisenia fetida* est rendue difficile par la présence au sein du lieu même de stockage de la majeure partie des toxiques d'une quantité importante de fer.

Remerciements

Le présent travail a reçu le soutien financier de la Région Nord-Pas-de-Calais (Programme de Recherches Concertées : « Environnement et Activités Humaines : Étude d'un secteur pollué par les métaux en vue de sa requalification »). Les auteurs souhaitent également remercier, pour l'aide et les facilités qu'ils ont pu apporter dans l'utilisation des matériels d'analyse, M. le professeur Durr de l'École des Mines de Douai, M. Pasquier (Oxford Instrument) et, pour le soutien technique dans la préparation des échantillons, Mlle Leroux et M. Brunet de l'Université de Lille I.

Écophysiologie d'Invertébrés du sol, Université de Lille I,
Bât. SN3, Biologie Animale, 59655 Villeneuve-d'Ascq Cedex.

RÉFÉRENCES

- CAJARAVILLE, M.P. (1995).- *Cell Biology in Environmental Toxicology*. University of the Basque Country Press Service, Bilbao.
- DANSCHER, G. (1981).- Histochemical demonstration of heavy metals. A revised version of the sulphide silver method suitable for both light and electronmicroscopy. *Histochemistry*, **71**, 1-16.
- DANSCHER, G. & SCHRÖDER, H.D. (1979).- Histochemical demonstration of mercury induced changes in rat neurons. *Histochemistry*, **60**, 1-7.
- DANSCHER, G., RYTTER NORGAARD, J.O. & BAATRUP, E. (1987).- Autometallography: tissue metals demonstrated by a silver enhancement kit. *Histochemistry*, **86**, 465-469.
- GRELLE, C. & DESCAMPS, M. (1998).- Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on Glutathione-S-Transferase activity. *Pedobiologia*, **42**, 289-297.
- HONEYCUTT, M.E., ROBERTS, B.L. & ROANE, D.S. (1995).- Cadmium disposition in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotox. Environ. Saf.*, **30**, 143-150.
- HOPKIN, S.P. (1989).- *Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates*. Elsevier Applied Science, New York.
- JAMIESON, B.G.M. (1981).- *The ultrastructure of the Oligochaeta*. Academic Press, New York.
- LISON, L. (1953).- *Histochimie et cytochimie animales. Principes et méthodes*. Gauthier-Villars, Paris.
- MORGAN, J.E. & MORGAN, A.J. (1989).- The effect of lead incorporation on the elemental composition of earthworm (Annelida, Oligocheta) chloragosome granules. *Histochemistry*, **55**, 27-40.
- SCAPS, P., GRELLE, C. & DESCAMPS, M. (1997).- Cadmium and lead accumulation in the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny) and its impact on cholinesterase and metabolic pathway enzyme activities. *Comp. Biochem. Physiol.* **116C**, 233-238.
- SOTO, M. & MARIGOMEZ, I. (1995).- Techniques for the study of metals in cell biology. In : *Cell Biology in Environmental Toxicology*, pp. 59-88, Cajaraville M.P. ed., University of the Basque Country Press Service, Bilbao.
- SOTO, M. & MARIGOMEZ, I. (1997).- Metal bioavailability assessment in « mussel-watch » programmes by automated image analysis of autometallographical black silver deposits (BSD) in digestive cell lysosomes. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **156**, 141-150.
- TIMM, F. (1958).- Zur Histochemie der Schwermetalle, das Sulfid-Silber-Verfahren. *Deutsche Zeitschrift für die gesamte gerichtliche Medizin*, **46**, 706-711.
- VANDENBULCKE, F., GRELLE, C., FABRE, M.-C. & DESCAMPS, M. (1998a).- Ultrastructural and autometallographic studies of the nephrocytes of *Lithobius forficatus* L. (Myriapoda Chilopoda): role in detoxification of cadmium and lead. *Int. J. Insect Morphol. Embryol.*, **27**, 111-120.
- VANDENBULCKE, F., GRELLE, C., FABRE, M.-C. & DESCAMPS, M. (1998b). - Implication of the midgut of the centipede *Lithobius forficatus* in heavy metals detoxification process. *Ecotox. Environ. Saf.*, **41**, 258-268.